فصلنامه (علمی – پژوهشی)

زیست شناسی تکوینی

سال چهاردهم، شماره ۱، زمستان ۱۴۰۰ ص. ۱۸-۹

مقاله پژوهشی

اثرات مهاری کوچک مولکول TPSF بر رشد و تکثیر سلولی در رده سلولی سرطانی انسانی پستان MCF-7: یک مطالعه آزمایشگاهی

کیاوش هوشمندی[۱]، الهام حویزی[۲*]، سعد گورانی‌نژاد[۳]، محمدرضا تابنده[۴،۵]

[۱] دانشجوی دکتری حرفه‌ای دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

[۲] دانشیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

[۳] استاد، گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

[۴] دانشیار، بخش بیوشیمی و بیولوژی مولکولی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

[۵] مرکز تحقیقات سلول‌های بنیادی و فناوری ترانسژنیک دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

[*] (نویسنده مسئول مکاتبات): e.hoveizi@scu.ac.ir

تاریخ دریافت: تیر ۱۴۰۰ تاریخ پذیرش: دی ۱۴۰۰

چکیده

سرطان پستان در بین سرطان‌های زنان رتبه اول ابتلاء و مرگ را به خود اختصاص داده است. امروزه کوچک مولکول‌ها به‌علت خصوصیات ویژه ابزارغالب در نوآوری‌های دارویی محسوب می‌شوند. هدف این تحقیق تعیین اثرات ضدرشدی و ضدتکثیری کوچک مولکول TPSF (4-(4—Fluorophenyl)-4-oxobutyl]thio]-1,3,6,9-tetrahydro-1,3-dimethyl-6-thioxo-2H-purin-2-one) درردهٔ سلولی سرطانی سینه MCF-7 بود. در این مطالعه آزمایشگاهی، سلول‌های سرطانی پستان رده MCF-7 در محیط کشت حاوی سرم ۱۰% کشت و با غلظت‌های ۰/۵، ۱، ۲، ۵ و ۱۰ میکرومولارTPSF تیمار و سپس در روزهای ۱و۳ و ۵ با استفاده از تست MTT بررسی شدند. سپساثرات ضدرشدی و ضدتکثیری کوچک مولکول TPSF بر سلول‌های MCF-7 بررسی شد. داکینگ مولکولی با استفاده از نرم‌افزار مولگرو انجام شد. آنالیز داده‌ها باآزمون ANOVA دوطرفه با تست تعقیبی Tukey انجام شد. طبق نتایج TPSF به صورت وابسته به دوز و زمان، میزان بقاء و تکثیر سلول‌های MCF-7 را بطور معنی‌داری ($P\leq ۰/۰۰۱$)کاهش داد. به‌طوریکه بعد از ۲۴ ساعت بقای سلول‌های تیمار شده با غلظت‌های ۰/۵، ۱، ۲، ۵ و ۱۰ میکرومولار به ترتیب ۹۰، ۷۹، ۶۸، ۵۰ و ۳۲ درصد بود که تایید کننده کاهش معنی‌دار ($P\leq ۰/۰۰۱$) بقا به‌صورت وابسته به دوز می‌باشد وغلظت ۵ میکرومولار به‌عنوان غلظت IC50 (غلظت مهار رشد) تعیین گردید. بررسی مورفولوژی هسته تغییراتی از جمله چروکیدگی، پیگمانته شدن هسته و قطعه قطعه شدن کروماتین را نشان داد. همچنین نتایج داکینگ تایید کننده برهمکنش TPSF با HER2 و ER بود. TPSF به‌عنوان یک کوچک مولکول موثر باعث مهار رشد سلول‌های سرطانی پستان می‌شود بنابراین می‌تواند به‌عنوان یک داروی ضدسرطان مورد توجه قرار گیرد.

کلیدواژه‌ها: کوچک مولکول، TPSF، سرطان سینه، رده سلولی MCF-7.

مقدمه

یکی از مهم‌ترین و بحث برانگیزترین مشکلات سلامتی در زنان سراسر دنیا، سرطان سینه می‌باشد. سرطان سینه یک بیماری چند عاملی است که ژنتیک، عوامل هورمونی و تقابل بین اشخاص و محیط در ایجاد آن نقش دارد [۲,۱]. سرطان سینه در کشورایران وحتی جهان در بین سرطان‌های زنان، رتبه اول ابتلاء و مرگ و میر را به خود اختصاص داده است [۳]. هر چند ایران یکی از کشورهایی است که میزان بروز سرطان سینه کم‌تری نسبت به سایر کشورها دارد، اما افزایش میزان بروز آن در سال‌های اخیر، این بیماری را به‌عنوان رایج‌ترین بدخیمی در میان زنان ایرانی تبدیل کرده است [۴]. از جمله راهکارهای درمانی این بدخیمی می‌توان به جراحی، شیمی درمانی و رادیوتراپی اشاره کرد. با این حال میزان مرگ ومیر بیماران بالا می‌باشد که خود حکایت از ناکارآمدی این راهکارهای درمانی دارد و علی رغم پیشرفت‌های مهم در تشخیص و درمان، از معضلات شایع زنان است [۴, ۵]. در سال‌های اخیر وجود داروهای موثری مانند تاموکسیفن و رالوکسیفن و یا داروهای ضد توموری آناسترازول که به همراه اشعه درمانی و یا ادجوانت‌های درمانی در طی ۳۰ سال گذشته جان بسیاری از زنان مبتلا را نجات داده است [۶]. با این وجود، معایب مختلفی از جمله عود بیماری ناشی از متاستاز در چند ماه پس از درمان، اثرات ناشی از مصرف داروها بر روی متابولیسم گلوکوکورتیکوئیدها و خطرات سرطان بعد از شیمی درمانی سرطان پستان، سبب محدودیت استفاده از این سیستم‌های درمانی شده است [۷]. بنابراین مطالعه و بررسی عواملي با اثرات جانبی کمتری، یکي از مهم ترین اهداف تحقیق در حوزه درمان سرطان است [۸]. از جمله علل اصلی بروز سرطان‌ها می‌توان به تأثیر عوامل محیطی در ایجاد جهش و تغییرات ژنتیکی مسئول بروز بدخیمی‌ها اشاره کرد. وضعیت جغرافیایی، نحوه زندگی، رژیم غذایی، عوامل استرس‌زا مانند بالا رفتن سن ازدواج و چاقی از جمله عوامل محیطی مستعد کننده ابتلا به سرطان سینه به شمار می روند [۹]). استروژن از جمله عوامل هورمونی موثر در سرطان پستان است این هورمون، یک فاکتور اساسی نه تنها در گسترش غده‌ی پستانی می‌باشد بلکه در گسترش و پیشرفت سرطان پستان و رحم در مراحل اولیه و پیشرفته نقش دارد بگونه‌ای که، ۷۰ درصد از سرطان‌های پستان بدخیم سطح بالایی از ER (Estrogen receptor) را بیان می‌کنند [۱۰]. از سال‌ها پیش، کوچک مولکول‌ها به عنوان پروب‌های شیمیایی و یا به عنوان عوامل ایجاد موتاسیون در علم ژنتیک شیمیایی وارد زیست شناسی شده‌اند. ا زاین گذشته در جریان گسترش علم شیمی سنتز مولکول‌های بسیار زیادی هر روزه در حال تولید و اضافه شدن به مجموعه مولکول‌های شناخته شده توسط انسان می‌باشد. برای کوچک مولکول‌ها تعریف دقیقی ارائه نشده است اما می‌توان آنها را به دو دسته طبیعی و مصنوعی تقسیم کرد [۱۱]. مولکول‌های کوچک طبیعی جزء جدا نشدنی فعالیت‌های مولکولی بدن موجودات زنده می‌باشد. کوچک مولکول‌ها علاوه بر ایفای نقش‌های مهم در درون سلول‌های زنده، در دستکاری پروتئین‌ها (تغییر فعالیت آن‌ها، مهار یا فعال کردن آن‌ها) و در نتیجه مسیرهای پیام رسانی استفاده می‌شوند [۱۲]. TPSF نیز بعنوان یک کوچک مولکول غیررقابتی با استروژن شناخته شده است (خارج از ناحیه‌ی اتصالی استروژن به رسپتور عمل می‌کند). مطالعات اثر مهاری این فاکتور را در رشد سلول‌های سرطانی با کاهش سطح رسپتور استروژن از طریق تجزیه توسط پروتئازوم را نشان داده است [۱۳, ۱۴].

بنابراین با توجه به شیوع سرطان سینه در ایران، شیب صعودی این بدخیمی طی دو دهه گذشته، و درمان‌های ناکارآمد، هدف از انجام این تحقیق تعیین اثرات ضد رشدی و ضد تکثیری کوچک مولکول (4-(4—Fluorophenyl)-4-oxobutyl]thio] -1,3,6,9-tetrahydro-1,3-dimethyl-6-thioxo-2H-purin-2-on) TPSF در رده ی سلولی سرطانی سینه MCF-7 بود.

مواد و روش‌ها

این مطالعه آزمایشگاهی که در پاییز ۱۳۹۷ در آزمایشگاه تحقیقاتی کشت سلول دانشگاه شهید چمران اهواز به انجام رسیده است. این مطالعه همچنین دارای کد اخلاق EE/97.24.3.70419/Scu.ac.ir از دانشگاه شهید چمران اهواز می باشد. کوچک مولکول TPSF (4-(4—Fluorophenyl)-4-oxobutyl]thio]-1,3,6,9-tetrahydro-1,3-dimethyl-6-thioxo-2H-purin-2-one) از شرکت سیگما (SML0232-5MG, sigma) خریداری شد. غلظت‌های ۰/۵، ۱، ۲، ۵ و ۱۰ میکرومولار از کوچک مولکول TPSF در محیط کشت به عنوان

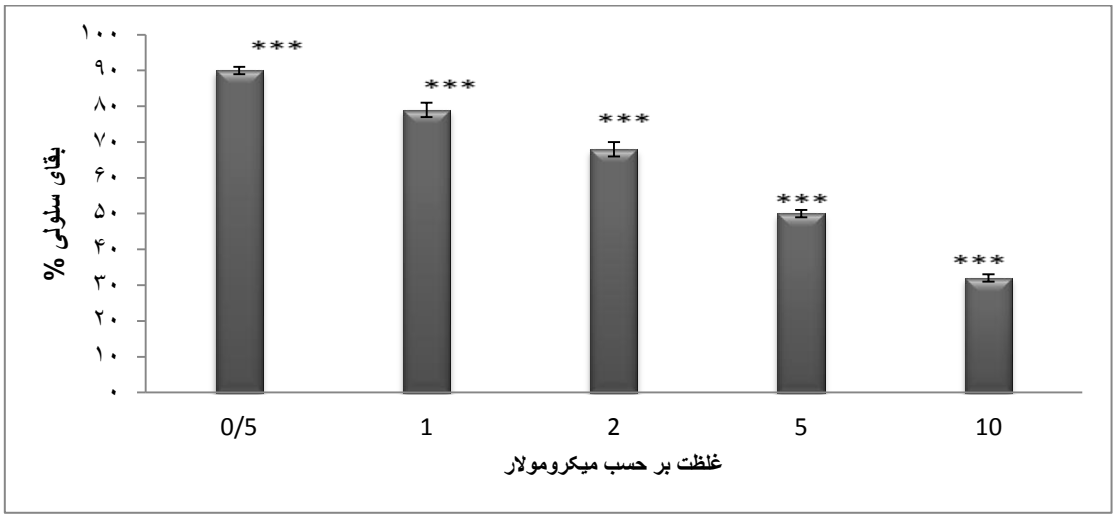
دوزهای مورد استفاده در کشت سلولی تهیه شد و پس از فیلتر نمودن توسط فیلتر سرسرنگی ۰/۲۲ میکرومتر در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد تا زمان استفاده نگهداری شدند. سلول‌های سرطانی پستان رده MCF-7 (Michigan Cancer Foundation-7) از موسسه پاستور تهران خریداری شد و در محیط کشت DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, Gibco, USA) حاوی ۱۰% FBS (Fetal bovine serum, Gibco, USA) کشت و در انکوباتور (شرکت سینا، ایران) با ۵% CO_2، ۹۵% رطوبت و دمای ۳۷ °C نگهداری شدند. زمانی که تراکم سلول‌ها در فلاسک به ۸۰ درصد رسید، پاساژ سلولی با استفاده از ترپسین (Gibco, USA) صورت پذیرفت که بعد از پاساژ سوم یا سلول‌ها برای تیمار در پلیت‌های ۹۶ خانه کشت شد یا با استفاده از DMSO (Dimethylsulfoxide) ۱۰% و FBS (Fetal bovine serum) ۹۰% در ازت مایع فریز شدند (۱۹). با استفاده از آزمون MTT -3-(4, 5 Dimethylthiazol-2-yl)-2, 5- (Diphenyltertrazolium Bromide) میزان بقاء سلول‌ها ارزیابی شد. برای این منظور بعد از پاساژ، سلول‌ها با تعداد cells/well ۱×۱۰^{۴} در هر چاهک از پلیت ۹۶ چاهکی حاوی محیط کشت DMEM حاوی ۱۰% FBS کشت شدند. ۲۴ ساعت بعد سلول‌ها با غلظت‌های ۰/۵، ۱، ۲، ۵ و ۱۰ میکرومولار از کوچک مولکول TPSF به مدت ۱، ۳ و ۵ روز تیمار شدند. برای هر گروه یک نمونه کنترل هم در نظر گرفته شد که در این گروه هیچ تیماری بر سلول‌ها انجام نشد. سپس آزمون MTT به این صورت انجام شد که در زمان‌های مورد نظر، محیط کشت از چاهک‌های حاوی سلول خارج و به هر خانه حدود ۱۰۰ میکرولیتر محیط تازه حاوی ۱۰ میکرولیتر محلول MTT (با غلظت ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) اضافه شد، سلول‌ها به مدت ۳ ساعت در دمای ۳۷ °C انکوبه شدند و سپس محلول MTT خارج و به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر دی متیل سولفوکساید (Merck, USA, 100%) اضافه شد و جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۵۷۰ نانومتر با استفاده از دستگاه میکروپلیت ریدر(Stat fax 2100, Florida, USA) اندازه‌گیری شد [۲۰]. برای بررسی و مقایسه مورفولوژیکی سلول‌ها، از گروه کنترل (تیمار نشده) و گروه‌های تیمار شده با غلظت ۵ میکرومولار به عنوان غلظت IC50 پس از یک روز با دوربین دیجیتال (X51, Olympus, Japan) متصل به میکروسکوپ اینورت (TCM 400, Labomed, USA) با عدسی شیئی ۲۰ عکس گرفته شد و تصاویر میکروسکوپی برای هر سلول در گروه‌های کنترل و تیمار بررسی و مقایسه شدند. هم‌چنین به منظور ارزیابی تغییرات هسته سلول‌هایMCF-7، این سلول‌ها در محیط کشت حاوی غلظت ۵ میکرومولار از کوچک مولکول TPSF به مدت ۴۸ ساعت کشت شدند. سپس محیط رویی سلول‌ها خارج گردید. سلول‌ها با PBS شسته و با پارافرمالدهید ۴ % تثبیت شدند و با استفاده از رنگ DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) (Sigma, USA) با غلظت ۳۰۰ نانومولار رنگ آمیزی و پس از شستشو با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت (X51, Olympus, Japan) بررسی و عکس‌برداری شدند. برای رنگ امیزی آکریدین اورنج/ اتیدیوم بروماید(Sigma, USA) سلول‌ها با غلظت‌های IC50 از TPSF به مدت ۲۴ ساعت کشت شدند. برای رنگ آمیزی ابتدا استوک ۱ میلی گرم بر میلی لیتر رنگ آکریدین اورنج و استوک ۱ میلی گرم بر میلی لیتر رنگ اتیدیوم بروماید تهیه و به نسبت مساوی ترکیب شدند. سپس سلول ها با این ترکیب به مدت ۵ دقیقه رنگ و در زیر میکروسکوپ فلوروسنت عکس‌برداری شدند. برای پیش‌بینی تعامل بین پروتئین‌های HER2 و ER با کوچک مولکول TPSF از نرم‌افزار Molegro virtual docker (CLC Bio company, Aarhus, Denmark) به همراه Molegro Virtual viewer V2.5 استفاده شد. ساختارهای سه بعدی پروتئین‌ها از بانک داده RCSB/PDBبازیابی و ساختار سه بعدی لیگاند از پایگاه داده Zinc بازیابی شد. انرژی EFL1 از خروجی نهایی ثبت شد. برای تعدیل پروتئین‌ها در این روش یون های فلزی، مولکول‌های آب و مولکول‌های حلال را حذف شد. امتیازات نهایی بالاتر از ۵ به عنوان میانکنش در نظر گرفته شد. در این آزمایش غلظت و زمان‌های متفاوت استفاده از TPSF به عنوان متغییرهای مورد آزمایش در نظر گرفته شدند و همه آزمایشات حداقل سه بار تکرار گردید. داده‌های حاصل از آزمون MTT، با کمک نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۸ (IBM SPSS, Armonk, NY, USA) و آزمون آماری (ANOVA) دو طرفه با تست تعقیبی Tukeyتجزیه و تحلیل شدند. نمودارهای لازم با کمک نرم‌افزار Microsoft Excel 2013 رسم و تفاوت‌ها در سطح $P<۰/۰۵$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج

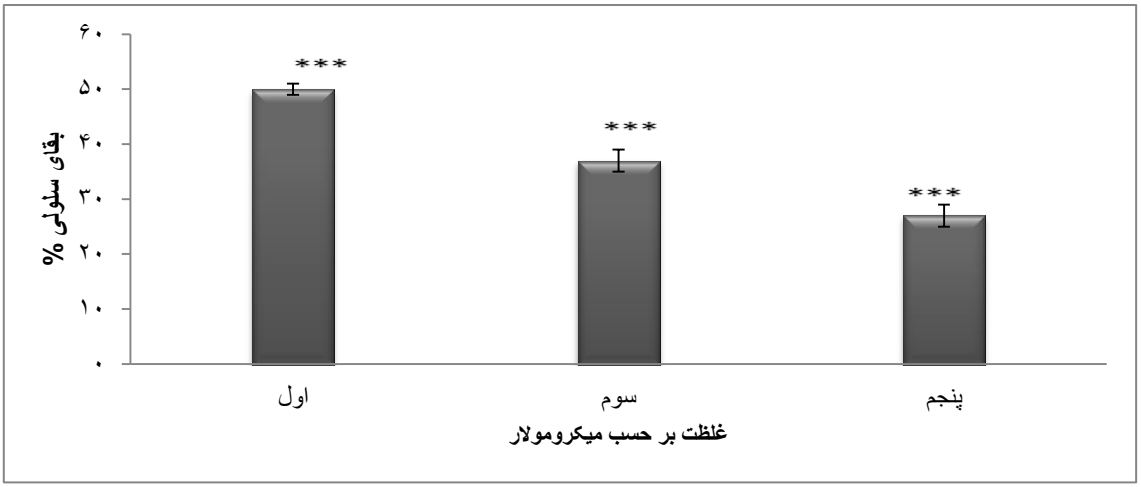
ارزیابی بقای سلولی

اثرات غلظت‌های مختلف کوچک مولکول TPSF بر بقای سلول‌های MCF-7 با استفاده از تست MTT انجام گرفت، به‌طوری‌که بعد از ۲۴ ساعت بقاء سلول‌های تیمار شده با غلظت‌های ۰/۵، ۱، ۲، ۵ و ۱۰ میکرومولار به ترتیب ۹۰، ۷۹، ۶۸، ۵۰ و ۳۲ درصد بود و غلظت ۵ میکرومولار به عنوان IC50 تعیین شد (شکل ۱).

هم‌چنین مقایسه درصد زنده ماندن سلول‌ها با روش MTT نشان داد که سلول‌های سرطانی MCF-7 پس از تیمار با غلظت‌های تعیین شده کوچک مولکول TPSF در روز اول نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری داشته‌اند (P<۰/۰۵). بقای سلول‌ها پس از در معرض قرار گرفتن با همان غلظت‌ها در روز سوم نسبت به گروه کنترل و همچنین نسبت به روز اول تیمار به صورت معنی‌داری کاهش یافت (P<۰/۰۱). درصد زنده بودن سلول‌ها در گروه‌های مورد آزمایش در روز پنجم نسبت به گروه کنترل و سایر روزها به شدت کاهش یافت که نسبت به نمونه کنترل و نمونه‌های روز اول و سوم کاهش معنی‌دار را نشان داد(P<۰/۰۱) (شکل۲).



شکل ۱: اثرات غلظت‌های مختلف کوچک مولکول TPSF بر بقای سلول‌های MCF-7 با استفاده از تست MTT و تعیین غلظت ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر به عنوان IC50 (آزمون ANOVA (*P<0.001**



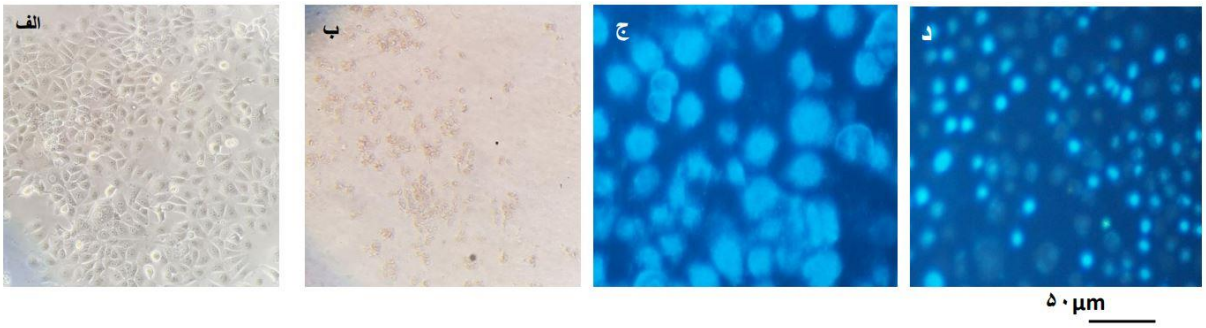
شکل ۲: اثرات غلظت IC50 (۵ میکرومولار) کوچک مولکول TPSF بر بقاء سلول‌های MCF-7 . بررسی بقاء با روش MTT در روزهای ۱، ۳ و ۵ بعد از تیمار انجام گرفت. حروف مشابه نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار (P<۰/۰۵) غلظت‌های مختلف TPSF و حروف غیرمشابه نشان دهنده تفاوت‌های معنی‌دار (P<۰/۰۵) بین روزهای مختلف آن می‌باشد (n=۳) (آزمون ANOVA 0.001>P*).**

ارزیابی مورفولوژی سلول‌ها

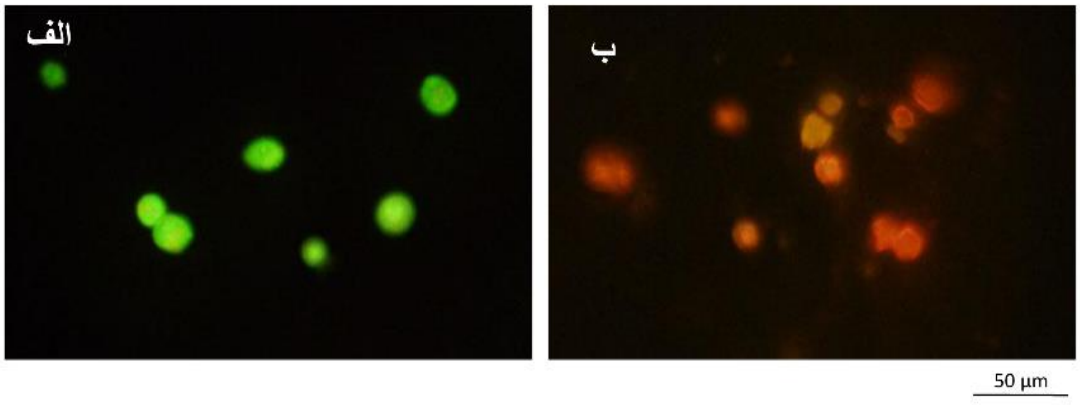
هم‌چنین بررسی مشاهدات مورفولوژی سلول‌های سرطانی رده MCF-7 با میکروسکوپ اینورت (۴۰X) نشان داد که غلظت‌های مختلف استفاده شده از کوچک مولکول TPSF تغییرات مورفولوژیکی محسوسی در سلول‌های سرطانی ایجاد می‌کند. این تغییرات شامل کاهش حجم قابل توجه سلول‌ها همراه با گرد شدن و چروکیدگی آن‌ها است که در مقایسه با نمونه‌های کنترل (شکل ۳-الف) اختلاف محسوسی نشان می‌داد هم‌چنین گرانوله شدن سلول‌ها همراه با سایر تغییرات مشهود بود (شکل ۳- ب). بررسی تغییرات مورفولوژی سلول‌های MCF-7 با استفاده از رنگ‌آمیزی DAPI(4',6-diamidino-2-phenylindoleو با میکروسکوپ فلئورسنت چروکیدگی و کاهش اندازه و قطعه قطعه شدن کروماتین را نشان داد که ناشی از تغییرات مورفولوژیك و در نتیجه نشانه‌هایی از مرگ برنامه‌ریزی شده سلول‌های MCF-7 می‌باشند که کاملا مشهود بود (شکل ۳- ج و ۳- د).

ارزیابی آپوپتوز

سلول‌های MCF-7 پس از تیمار با غلظت IC50 TPSF بارنگ‌های آکریدین اورنج/ اتیدیوم بروماید‌رنگ آمیزی شدند. همانگونه که در شکل۴ نشان داده شده سلول های کنترل گرد و شفاف و سبز رنگ بودند که به دلیل ورود رنگ آکریدین از غشای طبیعی سلولی بوده و نشان دهنده‌ی زنده‌مانی و عدم آپوپتوز آن‌ها بود. درحالیکه سلول‌های تیمار شده با TPSF به‌رنگ نارنجی با ظاهری فشرده و متراکم بوده که به دلیل ورود رنگ اتیدیدم بروماید از غشای آسیب دیده بوده و تائیدی بر مرگ سلولی و القاء آپوپتوز بود (شکل ۴).



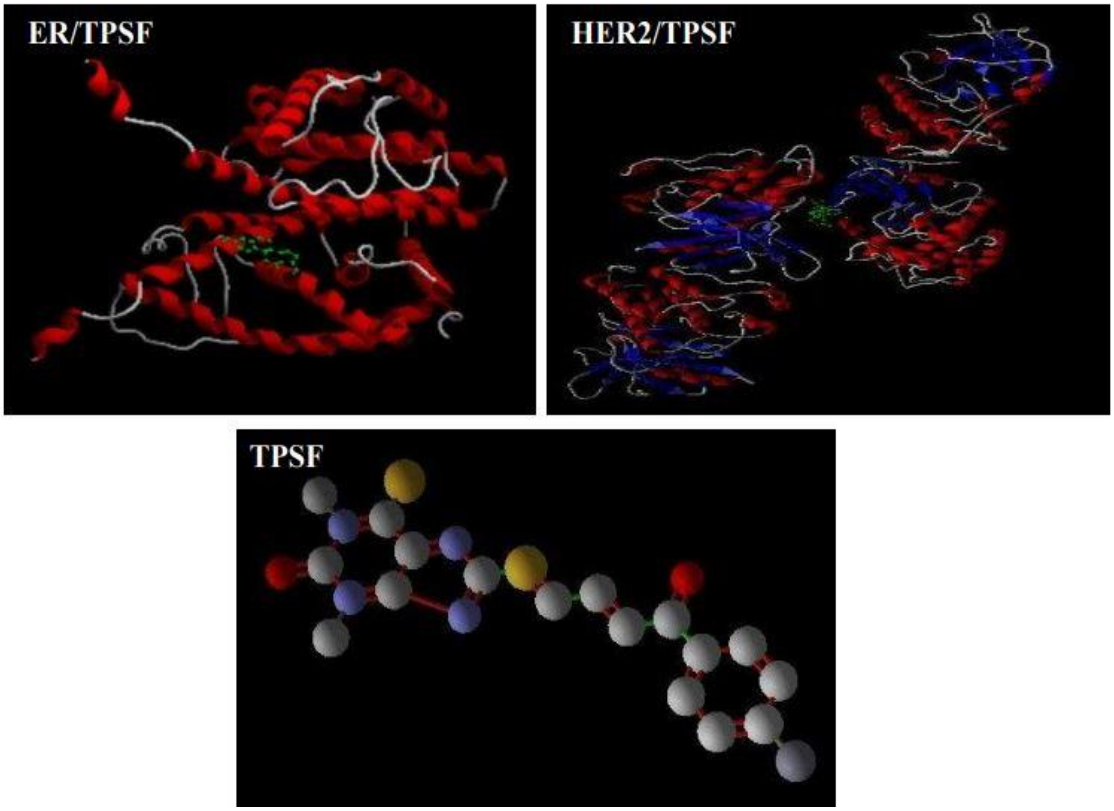
شکل۳: بررسی مورفولوژی سلول‌های MCF-7 در گروه کنترل و تیمار شده با غلظت ۵ میکرومولار TPSF با استفاده از میکروسکوپ معکوس (۲۰X) ۲۴ ساعت بعد از تیمار الف- نمونه کنترل ب- سلول‌های در حال آپوپتوز در نمونه تیمار شده . نتایج رنگ آمیزی با رنگ DAPI(4',6-diamidino-2-phenylindole) برای بررسی وضعیت هسته سلول‌های MCF-7 در حالت کنترل و تیمار شده با با غلظت ۵ میکرومولار TPSF با استفاده از میکروسکوپ فلئورسنت ج- نمونه کنترل د- هسته سلول‌های تیمار شده



شکل۴: نتایج رنگ آمیزی با رنگ آکریدین اورنج/اتیدیوم بروماید برای بررسی وضعیت آپوپتوز در سلول‌های MCF-7 در حالت کنترل و تیمار شده با با غلظت ۵ میکرومولار TPSF با استفاده از میکروسکوپ فلئورسنت بعد از ۲۴ ساعت الف- نمونه کنترل ب- سلول‌های تیمار شده

نتایج داکینگ مولکولی

داکینگ مولکولی با استفاده از نرم افزارهای Molegro virtual docker و Molegro virtual viewer انجام شد. جدول ۱ انرژی‌های اتصال را نشان می‌دهد، که با استفاده از نرم‌افزار مطمئن‌ترین اتصال با زنجیره جانبی با توجه به اتصال پروتئین ها با قسمت های فعال لیگاند ثبت شد. همانطور که در جدول ۱ و شکل ۵ ارائه شده است، کوچک مولکول TPSF برهمکنش و اتصال موثر با پروتئین‌های HER2 و ER را نشان داد. به صورت تئورتیک کوچک مولکول TPSF به پروتئین HER2 از طریق تشکیل پیوندهای استری و هیدروژنیک در بقایای Ala730(B), Ser855(D), ASN857(D), Lys854(D), Tyr781(D) Val725(B), متصل می‌شود. همچنین کوچک مولکول TPSF به پروتئین HER2 از طریق تشکیل پیوندهای استری و هیدروژنیک در بقایای His516 (A), Cys381 (B), Glu380 (B), Glu523 (B), متصل می‌شود. بنابراین کوچک مولکول TPSF احتمالا می‌تواند از طریق برهمکنش با این رسپتورها سبب مهار رشد و تکثیر سلول‌های MCF-7 شود.



شکل ۵: مطالعه داکینگ مولکولی و میانکنش بین TPSF (سبز رنگ) و پروتئین‌های HER2 و ER

جدول ۱. میانکنش مولکولی بین پروتئین‌های HER2 و ER با TPSF

Protein	RMSD(A°)	Total Score	Hydrogen and Steric bonds
ER	1.112	-84.247	His516(A), Cys381(B), Glu380(B), Glu523(B)
HER2	1.083	-121.17	Ala730(B), Ser855(D), ASN857(D), Lys854(D), Tyr781(D),Val725(B)

بحث و نتیجه‌گیری

با توجه به شیوع سرطان سینه در ایـران، شـیب صـعودی این بدخیمی طی دو دهه گذشته و درمان‌های ناکارمد در این مطالعه بران شدیم که اثرات ضد رشدی و ضد تکثیری کوچک مولکول 4-(4—Fluorophenyl)-4-oxobutyl]thio]-1,3,6,9-) (tetrahydro-1,3-dimethyl-6-thioxo-2H-purin-2-on TPSF در رده‌ی سلولی سرطانی سینه MCF-7 را بررسی کنیم. نتایج به دست آمده در این مطالعه نشان داد که کوچک مولکول TPSF به صورت وابسته به دوز و زمان، میزان بقاء و تکثیر سلول‌های سرطانی MCF-7 انسان را کاهش داد، به عبارت دیگر تیمار سلول‌های سرطانی MCF-7 با دوزهای مختلف کوچک مولکول TPSF، مرگ سلولی‌ها را متناسب با دوز دارو و زمان تیمار افزایش داد. TPSF باعث شد که درصد زنده بودن سلول‌ها در گروه‌های مورد آزمایش در روز پنجم نسبت به گروه کنترل و سایر روزها به شدت کاهش یابد که نسبت به نمونه کنترل و نمونه‌های روز اول و سوم کاهش معنی‌دار را نشان داد. هم‌چنین بررسی تغییرات مورفولوژی هسته سلول‌های MCF-7 با استفاده از رنگ آمیزی DAPI و با میکروسکوپ فلئورسنت، چروکیدگی و افزایش اندازه واکوئل‌ها، کاهش سیتوپلاسم، پیگمانته شدن هسته و قطعه‌قطعه شدن کروماتین را نشان داد که ناشی از تغییرات مورفولوژیك و در نتیجه نشانه‌هایی از مرگ برنامه‌ریزی شده سلول‌های MCF-7 می‌باشد که کاملا مشهود بود.

علی‌رغم پیشرفت‌های فراوانی که در حوضه‌ی درمان سرطان صورت پذیرفته است سالانه میلیون‌ها مرگ ناشی از سرطان در جهان رخ می‌دهد که اغلب مرگ و میرها در ارتباط با افزایش مقاومت بدن این افراد در برابر دارودرمانی می‌باشد. همچنین گران‌قیمت بودن و اثر جانبی فراوان این داروها علاوه بر خاصیت آنتی‌توموری آنها محدودیت‌هایی در استفاده از آن‌ها ایجاد کرده است. در این شرایط، کوشش در جهت یافتن یک عامل فارماکولوژیک مؤثر با حداقل اثر جانبی و ارزان‌تر بویژه در بافت پستان که نسبت به عوامل اندوکراین بسیار حساس می‌باشد امری اجتناب ناپذیر می‌باشد [۱۵]. یکی از مهمترین عوامل هورمونی در بروز سرطان سینه بیان بیش از حد رسپتورهای استروژنی می‌باشد [۱۶]. بسیاری از اثرهای بیولوژیکی استروژن در سلول‌های اپیتلیال رحم و پستان بواسطه‌ی گیرنده‌ی استروژن دیده می‌شود که افزایش تکثیر سلول‌های سرطانی در انواع سرطان‌های پستان و رحم یکی از این اثرات است، از مهمترین مسیرهای سیگنالینگ درگیر در این روند مسیر سیگنالینگ (PI3K/AKT) Phosphatidylinositol 3 kinase/AKT می‌باشد. AKT یکی از فاکتورهای مهم در تنظیم سیکل و تکثیر سلولی، محافظت سلول‌ها از مرگ برنامه‌ریزی شده‌ی سلول یا آپوپتوز و تشکیل و رشد عروق خونی می‌باشد. این مسیر در سلول‌های سرطانی به طور واضحی افزایش میابد [۱۷]. اثر دیگر فعال‌سازی سریع فاکتورهای رونویسی وابسته به گیرنده استروژن و مهار تنظیم رونویسی P53 در سلول‌های سرطانی پستان می‌باشد، این اثر از طریق بکارگیری مهارکننده‌های هسته‌ای کمکی (N COR, SMRT) و هیستون داستیلاز ۱ صورت می‌پذیرد [۱۸]. TPSFیک کوچک مولکول غیررقابتی با استروژن است که خارج از ناحیه‌ی اتصالی استروژن به رسپتور متصل می‌شود. استروژن باعث القاء و افزایش مقدار فاکتور کشنده‌ی توموری به نام فاکتور PI9 (Proteinase inhibitor 9) می‌شود. در نهایت استروژن موجب رهایی سلول‌های سرطانی از آپوپتوز القاء شده توسط سلول‌های ایمنی (لنفوسیت های T و سلول‌های کشنده‌ی طبیعی) می‌گردد. این کوچک‌مولکول القای تولید mRNA پروتئین PI9 را که به‌واسطه‌ی اتصال E2-ERα و یا اتصال OHT-ERα[1] صورت می‌پذیرد، مهار می‌نماید. TPSF به‌عنوان یک مهارکننده‌ی وسیع‌الطیف ERα در غلظت‌های معین، القای تولید mRNA سیکلین D1 با عاملیت E2 را مهار نموده، اما قادر به کاهش دادن سطح mRNA مذکور تا کم‌تر از سطح پایه‌ای بیان ERα نمی‌باشد. اما همین اثرگذاری در کاهش رشد رده‌های سلولی سرطانی در محیط آزمایشگاهی مؤثر بوده است. همچنین از آن جهت که TPSF به‌طور اختصاصی بیان ژن‌های هدف تنظیم با لیگاندهای ERα را هدف قرار می‌دهد، می‌توان از آن به‌عنوان پروبی مطمئن به‌جهت روشن ساختن نقش ERα در تنظیم ژن‌های پایین دست مختص به‌خود در رشد سلول‌های سرطان پستان بهره برد [۱۳, ۱۹]. Castero-Rivera و همکاران (۲۰۰۱) گزارش کردند که یکی دیگر از اثرات القائی توسط استروژن، افزایش مقادیر سیکلین D1 می‌باشد که عاملی مؤثر در رشد سلول‌های سرطانی سینه، رحم و دیگر سرطان‌ها می‌باشد.

1. 4-hydroxytamoxifen

مطالعات قبل گویای افزایش دو تا سه برابری مقادیر سیکلین D1 در سلولهای مبتلا به سرطان سینه می باشد [۱۳]. هم‌چنین افزایش مقادیر فاکتور رشد اپیتلیال عروقی(Vascular epithelial growth factor) مؤثر در تکثیر سلول‌های سرطانی و القاء گالاکتوزیل ترانسفراز ۱ که عاملی مؤثر در تکثیر و مهاجرت سلول‌های سرطانی می باشد نیز در پاسخ به افزایش سطوح استروژن در سلول‌های سرطانی مشاهده شده است [۲۰]. در پژوهشی که Mao و همکاران بر روی کوچک مولکول‌های مهارکننده رسپتور استروژن در سلول‌های سرطانی انجام شده، بیان گردیده که این کوچک مولکول‌ها به طور اختصاصی و به طور موثری قادر به بلوکه کردن استروژن وابسته به رشد سلول‌های سرطانی هستند [۲۰]. هم‌چنین پژوهش دیگر درارتباط با مهار غیر رقابتی کوچک مولکول TPSF بر روی ژن تنظیم کننده بیان استروژن و رشد سلول‌های سرطان سینه بیان می‌کند که اثر سمیت این کوچک مولکول به طور اختصاصی و موثری باعث مهار فعالیت رسپتور استروژنی و رشد سلول‌های سرطانی سینه می‌شود [۲۱]. در مطالعه‌ی Nicole و همکاران (۲۰۱۰) بر روی اثر TPSF بر سلول‌های سرطانی سینه نشان داده شد که TPSF به‌عنوان یک کوچک مولکول غیر رقابتی با استروژن، مهارکننده قوی و اختصاصی رسپتور استروژن (ER) می‌باشد که بیان ژن میانجی‌گر ER را بلاک می‌کند. نقش مهارکنندگی کوچک مولکول TPSF بواسطه‌ی کاهش مقادیر سیکلین D1 و کاهش مقادیر PI9 و مهار رشد سلول‌های سرطانی سینه می‌باشد. در نهایت این پژوهش توانایی این کوچک مولکول را در درمان سرطان سینه و همچنین جستجوی دیگر مکانیسم‌های عمل ER نشان داد. هم‌چنین نتایج این مطالعه نشان داد که TPSF باعث مهار رشد سلول‌های سرطانی مقاوم به تاموکسیفن، شده است که آن را به عنوان فاکتور جدید درمانی با پتانسیل کلینیکی بالا معرفی کرده است [۲۲]. همچنین بیان بیش از حد گیرنده فاکتور رشد اپیدرمی انسان (HER2)، گیرنده آنکوژنیک تیروزین کیناز، که در ۲۵ درصد از سرطان‌های سینه رخ می‌دهد، پیامدهای بالینی را به دنبال دارد و در نتیجه یک هدف جذاب برای مداخله درمانی محسوب می شود. مولکول‌های کوچک مهارکننده‌های تیروزین کینازی که با HER2 رقابت می‌کنند، اتو فسفریلاسیون و فعال‌سازی HER2 را مسدود می‌کنند و منجر به مهار تکثیر و سیگنال‌های بقا در پایین دست می‌شوند. امروزه HER2 به عنوان یک هدف درمانی اساسی در سرطان پستان محسوب می‌شود و استفاده از داروها و کوچک مولکول‌های مهارکننده HER2 توسعه یافته است [۲۳]. HER2 یک پروآنکوژن در ژنوم طبیعی انسان است که بر روی بازوی بلند کروموزوم ۱۷ قرار دارد و اگر در اثر فاکتورهای مختلفی بیان آن افزایش یابد به یک آنکوژن تبدیل می‌شود که باعث تولید بیش از حد پروتئین HER2 می‌گردد. پروتئین HER2 یک گیرنده فاکتور رشد اپیدرمی در غشای سلول است که شامل یک جزء خارجی و یک جزء داخل سلولی است که در بسیاری از بافت ها از جمله بافت پستان، کبد، تخمدان، کلیه ها و اعصاب مرکزی وجود دارد. افزایش بیش از حد پروتئین HER2 در حدود ۳۰ درصد از موارد سرطان مهاجم پستان گزارش گردیده است. امروزه بررسی بیان پروتئین HER2 به عنوان یک عامل پیش‌گویی کننده سرطان سینه در نظر گرفته می‌شود و اثبات گردیده که خطر بازگشت مجدد سرطان پستان در مواردی که افزایش بیان HER2 دارند بیشتر می‌باشد [۱۸]. بعلاوه ER یکی از عوامل پیش‌گویی کننده از سرطان پستان محسوب می شود. بیماران سرطانی پستان که دارای بیان مثبت رسپتور استروژن هستند پیش آگاهی بهتری نسبت به بیماری خود داشته و پاسخ‌های درمانی بهتری به داروهای استروژنی ضد سرطانی نشان می‌دهند. مطالعات نشان داده است در مدل‌های سرطانی که دو نوع رسپتور ER و HER2 بیان می شوند، پاسخ کمتری را به داروهای ضد سرطان نشان می‌دهند که به دلیل تداخل عملکرد درون سلولی این این دو رسپتور باهم است که سبب مقاومت دارویی می‌گردد پس از ارتباط تنگاتنگی بین این دو رسپتور وجود دارد (۲, ۲۴). بنابراین یافتن داروهایی که می‌توانند اثر متقابل روی این دو رسپتور داشته و سبب مهار آنها شود می‌تواند در درمان سرطان پستان مفید واقع گردد.

مطالعات داکینگ مولکولی در این تحقیق نشان دهنده میانکنش TPSF با تمایل بالا برای HER2 و بعلاوه ER می‌باشد که تاییدکننده پتانسیل بالای این کوچک مولکول به عنوان گزینه‌ای مناسب برای کنترل سرطان پستان محسوب می‌شود. بنابراین نتایج این تحقیق و سایر مطالعات نشان می‌دهد که می‌توان در حوزه درمان سرطان‌ها به عوامل جدید و مؤثرتر و با اثرات مضر کمتر دست پیدا کرد. از جمله محدودیت‌های این مطالعه عدم

بررسی‌های مولکولی در سلول‌های مورد مطالعه می‌باشد. هم چنین با توجه به اینکه کوچک مولکول TPSF بعنوان یک کوچک مولکول غیررقابتی با استروژن معرفی می‌گردد و احتمالا مهار رشد سلول‌های سرطانی غالبا بواسطه مهار این رسپتورها صورت می گیرد لذا پیشنهاد می‌گردد بررسی‌های سلولی مولکولی در زمینه تأثیر TPSF در بیان ژن‌های درگیر در رشد و مرگ سلولی در سلول‌های سرطان سینه و سایر سلول‌های سرطانی بویژه سرطان‌های مرتبط با تغییرات هورمونی مورد بررسی قرار گیرد.

به‌علت وجود محدودیت‌های درمانی برای انواع سرطان‌ها بویژه سرطان پستان، محققین باید برای یافتن داروها یا روش‌های درمانی موثر و کارا تمام تلاش خود را معطوف سازند در همین راستا نتایج این تحقیق و سایر محققان نشان می‌دهد که برخی از کوچک مولکول ها و از جمله TPSF، می‌توانند میزان بقاء و تکثیر سلول‌های سرطانی MCF-7 انسان را کاهش دهد، به عبارت دیگر تیمار سلول‌های سرطانی MCF-7 با دوزهای مختلف کوچک مولکول TPSF، مرگ سلولی‌ها را متناسب با دوز دارو و زمان تیمار افزایش داد پس TPSF به‌عنوان یک کوچک مولکول غیر رقابتی با استروژن احتمالا باعث مهار فعالیت این رسپتور و مهار رشد سلول‌های سرطانی سینه می‌شود.

تشکر و قدر دانی

هزینه تحقیقات از محل اعتبارات پژوهانه سال ۹۷ معاونت پژوهشی دانشگاه شهیدچمران اهواز تامین گردیده است. نویسندگان این مقاله کمال تشکر و قدردانی خود را از معاونت پژوهشی و فن‌آوری دانشگاه شهید چمران اهواز به‌خاطر حمایت-های مالی اعلام می‌دارد.

References

[1] He XC, Chen HY, Qiu Y, Tian L, Bao BS, Hao XP, et al. Associations of iron status with breast cancer risk factors in adult women: Findings from National Health and Nutrition Examination Survey 2017-2018. J Trace Elem Med Biol. 2021;68:126867. Epub 2021/10/01.

[2] Zhang H, Zhao N, Ahearn TU, Wheeler W, Garcia-Closas M, Chatterjee N. A mixed-model approach for powerful testing of genetic associations with cancer risk incorporating tumor characteristics. Biostatistics. 2021;22(4):772-88. Epub 2020/03/01.

[3] Gui-Bo Y, You-Zhu Z, Shu-Dong W, De-Bing S, Zhi-Hui D, Wei-Guo F. Study of the electrospun PLA/silk fibroin-gelatin composite nanofibrous scaffold for tissue engineering. Journal of biomedical materials research Part A. 2010;93(1):158-63. Epub 2009/06/19.

[4] Buttiron Webber T, Marra D, Puntoni M, Giuliano S, Briata IM, Cevasco I, et al. Patient- versus physician-reported outcomes in a low-dose tamoxifen trial in noninvasive breast cancer. The breast journal. 2021. Epub 2021/10/10.

[5] Taniyama T, Tokutani R, Hiramoto S. Risk factors of sudden unexpected death in patients with advanced cancer near the end of life. Palliative & supportive care. 2021:1-5. Epub 2021/10/06.

[6] Wang X, Xie Z, Lou Z, Chen Y, Huang S, Ren Y, et al. Regulation of the PTEN/PI3K/AKT pathway in RCC using the active compounds of natural products in vitro. Molecular medicine reports. 2021;24(5). Epub 2021/09/08.

[7] Goyal R, Goyal MK. Influence of Life Style Factors on Oral Potentially Malignant and Malignant Disorders: A Cross Sectional Study. Indian journal of otolaryngology and head and neck surgery: official publication of the Association of Otolaryngologists of India. 2021;73(4):443-6. Epub 2021/10/26.

[8] Yuan X, Cen J, Chen X, Jia Z, Zhu X, Huang Y, et al. Iridium oxide nanoparticles mediated enhanced photodynamic therapy combined with photothermal therapy in the treatment of breast cancer. Journal of colloid and interface science. 2022;605:851-62. Epub 2021/08/10.

[9] Liu C, Wu F, Liu Y, Meng C. Catalpol suppresses proliferation and facilitates apoptosis of MCF-7 breast cancer cells through upregulating microRNA-146a and downregulating matrix metalloproteinase-16 expression. Molecular medicine reports. 2015;12(5):7609-14. Epub 2015/10/16.

[10] D'Arcy MS. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. Cell biology international. 2019;43(6):582-92. Epub 2019/04/09.

[11] Alsfouk A. Small molecule inhibitors of cyclin-dependent kinase 9 for cancer therapy. Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry. 2021;36(1):693-706. Epub 2021/02/27.

[12] Borowiak M, Maehr R, Chen S, Chen AE, Tang W, Fox JL, et al. Small molecules efficiently direct endodermal differentiation of mouse and human embryonic stem cells. Cell Stem Cell. 2009;4(4):348-58. Epub 2009/04/04.

[13] Miyoshi Y, Murase K, Saito M, Imamura M, Oh K. Mechanisms of estrogen receptor-alpha upregulation in breast cancers. Medical molecular morphology. 2010;43(4):193-6. Epub 2011/01/27.
[14] Piperigkou Z, Karamanos NK. Estrogen receptor-mediated targeting of the extracellular matrix network in cancer. Seminars in cancer biology. 2020;62:116-24. Epub 2019/07/17.
[15] Eccles SA, Aboagye EO, Ali S, Anderson AS, Armes J, Berditchevski F, et al. Critical research gaps and translational priorities for the successful prevention and treatment of breast cancer. Breast Cancer Res. 2013;15(5):R92. Epub 2013/11/30.
[16] Ono M, Oba T, Shibata T, Ito KI. The mechanisms involved in the resistance of estrogen receptor-positive breast cancer cells to palbociclib are multiple and change over time. Journal of cancer research and clinical oncology. 2021;147(11):3211-24. Epub 2021/07/11.
[17] Li Y, Kong X, Xuan L, Wang Z, Huang YH. Prolactin and endocrine therapy resistance in breast cancer: The next potential hope for breast cancer treatment. Journal of cellular and molecular medicine. 2021. Epub 2021/10/16.
[18] Yang L, Xue J, Yang Z, Wang M, Yang P, Dong Y, et al. Side effects of CDK4/6 inhibitors in the treatment of HR+/HER2- advanced breast cancer: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. Annals of palliative medicine. 2021;10(5):5590-9. Epub 2021/06/11.
[19] Tsukamoto F, Arihiro K, Takahashi M, Ito KI, Ohsumi S, Takashima S, et al. Multicenter retrospective study on the use of Curebest 95GC Breast for estrogen receptor-positive and node-negative early breast cancer. BMC cancer. 2021;21(1):1077. Epub 2021/10/07.
[20] Mao C, Patterson NM, Cherian MT, Aninye IO, Zhang C, Montoya JB, et al. A new small molecule inhibitor of estrogen receptor alpha binding to estrogen response elements blocks estrogen-dependent growth of cancer cells. J Biol Chem. 2008;283(19):12819-30. Epub 2008/03/14.
[21] Mao X, Cao B, Wood TE, Hurren R, Tong J, Wang X, et al. A small-molecule inhibitor of D-cyclin transactivation displays preclinical efficacy in myeloma and leukemia via phosphoinositide 3-kinase pathway. Blood. 2011;117(6):1986-97. Epub 2010/12/08.
[22] Zhang Y, Smuts JP, Dodbiba E, Rangarajan R, Lang JC, Armstrong DW. Degradation study of carnosic acid, carnosol, rosmarinic acid, and rosemary extract (Rosmarinus officinalis L.) assessed using HPLC. Journal of agricultural and food chemistry. 2012;60(36):9305-14. Epub 2012/08/14.
[23] Le Du F, Dieras V, Curigliano G. The role of tyrosine kinase inhibitors in the treatment of HER2+ metastatic breast cancer. Eur J Cancer. 2021;154:175-89. Epub 2021/07/20.
[24] Grieb BC, Agarwal R. HER2-Directed Therapy in Advanced Gastric and Gastroesophageal Adenocarcinoma: Triumphs and Troubles. Current treatment options in oncology. 2021;22(10):88. Epub 2021/08/24.

Inhibitory Effects of Small Molecule TPSF on Growth and Proliferative of Human Breast Cancer Cell Line MCF-7: A Laboratory Study

Kiavash Hushmandi [1], Elham Hoveizi [2*], Saad Gooraninejad [3], Mohammadreza Tabandeh [4,5]

[1] DVM Student, Faculty of Veterinary Medicine, - Stem cells and transgenic technology research center (STTRC), Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran, ORCID:0000-0001-5682-5392
[2] Associate Prof, Dept of Biology, Faculty of Science, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran, ORCID : 0000-0002-3285-5682
[3] Prof, Dept of Clinical Science, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran, ORCID : 0000-0001-8034-2438
[4] Associate Prof, Dept of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran, ORCID : 0000-0003-3258-8550
[5] Stem cells and transgenic technology research center (STTRC), Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

* (Corresponding author): e.hoveizi@scu.ac.ir

Received: July 2021 Accepted: December 2021

Abstract

Breast cancer among women cancers has been the first to suffer from mortality and morbidity. Today, small molecules are still dominating the field of drug innovation, because of their special properties. The aim of this study is the investigation of the growth inhibitory and anti-proliferation effects of TPSF (4-(4-Fluorophenyl)-4-oxobutyl]thio]-1,3,6,9-tetrahydro-1,3-dimethyl-6-thioxo-2H-purin-2-one) on MCF-7 breast cancer cell line. In this laboratory study, MCF-7 breast cancer cells were cultured in a medium containing serum 10% and the cells were treated with the concentrations of 0.5, 1, 2, 5, and 10 of TPSF in 1, 3, and 5 days. Then the inhibitory effects of TPSF on cell growth and proliferation were assessed by MTT assay. Molecular docking was performed using Molegro software. For data analysis, two-way ANOVA and Tukey's post hoc test were used. According to the results, TPSF significantly ($P \leq 0.001$) decreases the survival rate and proliferation of MCF-7 cells in a time and dose-dependent manner. So that, the cell viability of cells treated with concentrations of 0.5, 1, 2, 5, and 10 µM were 90, 79, 68, 50, and 90 % respectively after 24h that confirmed that cell viability significantly decreases ($P \leq 0.001$) depended on dose, and the concentration of 5 µM was determined as the IC50 concentration. The study of morphological showed changes consisting of cell shrinkage, nucleotide pigmentation, and fragmentation of chromatin. The docking results also confirmed the interaction of TPSF with HER2 and ER. TPSF inhibits the growth of breast cancer cells and can be regarded as an anticancer medicine.

Keywords: Small molecule, TPSF, Breast cancer, MCF-7 cell line.