

تغییر حیات رده های سلولی سرطان پستان در مجاورت یک مهارکننده

DOR: 20.1001.1.17359880.1400.14.2.7.6

مزدک جمشیدی^۱، فاطمه کشاورزی^۱، صبریه امینی^۱، علی قیصرزاده^۲، کامبیز داوری^۳

۱- گروه زیست شناسی، واحد سنندج، دانشگاه آزاد اسلامی، سنندج، ایران. gol.keshavarzi@gmail.com

۲- مرکز تحقیقات میکروب شناسی بالینی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام، ایلام، ایران

۳- گروه زیست شناسی سه بعدی، دانشکده علوم، دانشگاه ایلام، ایلام، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۹/۴/۱۵ تاریخ پذیرش: ۹۹/۷/۳۰

چکیده

زمینه و هدف: کارسینوم های پستان، تومورهای بسیار مهاجم با پیش آگهی ضعیف هستند که با فراوانی بیشتر زنان جوانتر (سن کمتر از ۵۰ سال) را درگیر می کنند. گرچه در ابتدا بسیار حساس به شیمی درمانی هستند، ولی به طور قابل توجهی مهاجم تر از تومورهای دیگر زیرگروه های مولکولی می باشند. مطالعه حاضر با هدف یافتن یک روش درمانی جدید این سرطان ها انجام شد. روش کار: اساس روش در مرحله اول ساخت یک مهار کننده گیرنده های سطح سلولی بود. سپس اثر این مهار کننده بر رده های سلولی سرطانی پستان با استفاده از تست های معمول بررسی شد.

یافته ها: یافته ها نشان داد که در غلظت های مناسب مهار کننده، حیات رده های سلولی مربوطه به طور قابل توجهی تغییر می یابد.

نتیجه گیری: مطالعه حاضر نشان داد که استفاده از این روش ها می تواند زمینه ساز درمان های آینده باشد.

واژه های کلیدی: تومورهای بسیار مهاجم پستان، روش درمانی، مهار کننده.

مقدمه

بیماری شامل زیر گروه های متعدد با نمای پاتوفیزیولوژیکی، پیامد و پاسخ به درمان خاص خود می باشد. چندگانگی این بیماری از این منظر جلب توجه می کند که نیاز به درمان درخور برای بیمار خاص بسته به مشخصه های مولکولی بدخیمی وجود دارد. سرطان پستان تریپل (Triple Negative Breast Cancer) TNBC با عدم بیان گیرنده رشدی همراه با عدم بیان گیرنده های استروژنی و پروژسترونی neu/2-HER مشخص می شود و بنابراین این درمان های هدف مند، روش مؤثری برای درمان این گروه خاص از بیماران سرطان پستان نمی باشند (۲۳، ۹). رژیم درمانی استاندارد برای TNBC هنوز به ثبت نرسیده و اطلاعات پیرامون آن کافی نیست. آمار TNBCs در آسیا و کشورهای غربی بین ۱۰ تا ۲۰ درصد کل سرطان های پستان است و در

سرطان پستان ۱۰٪ کل انواع سرطان ها را در جمعیت زنان و مردان تشکیل می دهد و دومین سرطان شایع پس از سرطان ریه می باشد. سرطان پستان شایع ترین سرطان در بین زنان بوده به طوری که ۲۲٪ کل انواع سرطان را در زنان شامل می شود و پنجمین عامل مرگ و میر ناشی از سرطان در میان زنان ایرانی گزارش شده است (۷). در این سرطان، سلول های بدخیم از بافت پستان منشا گرفته به طور نامنظم و فزاینده ایی تکثیر می یابند و بدون این که موجب عکس العمل تدافعی و تهاجمی در سیستم ایمنی بدن شوند از سیستم ایمنی و دفاعی عبور می کنند. سرطان پستان معمولاً به صورت یک توده بدنی درد دار یا بدون درد و سفت در قسمت فوقانی و خارجی پستان شروع می شود و بعد به غدد لنفاوی ناحیه گودی زیر بغل و بعد از آن در سرتاسر بدن گسترش می یابد (۸). این

آفریقایی تبارها با فراوانی بیشتری رخ میدهد (۱۱، ۱۰). کارسینوم های پستان تریپل نگاتیو، تومورهای بسیار مهاجم با پیش آگهی ضعیف هستند که با فراوانی بیشتر زنان جوان تر (سن کمتر از ۵۰ سال) را درگیر کرده، گرچه در ابتدا بسیار حساس به شیمی درمانی هستند، ولی به طور قابل توجهی مهاجم تر از تومورهای دیگر زیرگروه های مولکولی می باشند (۴). عدم وجود انتخاب درمانی مناسب، پژوهشگران را به سمت شناسایی مسیرهای مولکولی درگیر در تکثیر این تومورها، هدایت کرده است. روشن شدن این مکانیسم های مولکولی، گسترش مواد هدفمند اختصاصی را موجب شده که به طور امیدوارانه ای پیامد بیماران را بهبود خواهد بخشید. در سال های اخیر با توجه به پیشرفت هایی که در زمینه پتیدها صورت گرفته است این موضوع اهمیت ویژه ای پیدا کرده است. به طوری که بسیاری از این پتیدهای فعال توانایی و پتانسیل ضد سرطانی دارند که به مراتب، مؤثرتر از ترکیبات موجود می باشند. برخی از این پتیدها تحت مراحل مختلف کارآزمایی های بالینی هستند. بر طبق مطالعات مختلف، پتانسیل ضد سرطانی آن ها، عمدتاً ناشی از عملکرد آنتی اکسیدانتی، ضد تکثیری و ضد جهش آن ها است (۵، ۱). این پتیدها با مکانیسم های مختلفی چون آپوپتوز، تأثیر بر توازن توبولین- میکروتوبول، مهار رگ زایی، ضد تکثیر و سیتوتوکسیک، موجب تحریک مرگ سلولی می گردند (۱۳، ۱۲). تحقیقات بیشتری بر روی حالت واکنش این ترکیبات بر روی چرخه سلولی و یا آپوپتوز سلول- های سرطانی ضروری است (۱۴، ۲). بسیاری از پتیدها فعال زیستی می توانند از طریق مکانیسم های مختلف القا کننده آپوپتوز باشند. چون آپوپتوز معمولاً هیچ خطری و یا پاسخ ایمنی را به دنبال ندارد و راه بسیار مؤثری برای مرگ سلول های سرطانی و جلوگیری از سرطان محسوب می شوند. آپوپتوز مسیرهایی دارد که

خوشبختانه می توان هر یک از این مسیرها را به وسیله عوامل شیمیایی القاء نمود. این امر نگرش نوید بخشی را برای درمان سرطان پدید آورده است (۱۶، ۱۵). در این مطالعه تلاش بر آن بود که با بهره گیری از ابزار های علمی جدید نوعی از پتیدها که با گیرنده آندروژنی میان کنش دارند طراحی شود. پس از طراحی و ساخت، اثر این پتیدها بر آپوپتوز رده های سلول های سرطانی TNBC مورد ارزیابی قرار می گیرد. قدم اول در انجام مطالعه اطمینان کامل از بودن گیرنده آندروژن در سطح سلول های اپی تلیال طبیعی بوده است. مطالعات زیادی بر بودن این گیرنده ها روی استرومال وجود دارد. این گیرنده ها در سیتوزول سلول های هدف حضور دارند و به عنوان عوامل نسخه برداری وابسته به لیگاند انجام وظیفه می نمایند (۱۷). برخی مطالعات نشان داده اند که سطح خونی تستوسترون و سطح ادراری آن در زنان مبتلا به سرطان پستان افزایش یافته است و این امر مستقل از سطح استرادیول است (۶). دیده شده که سطوح پلاسمایی Dehydro epi androsterone زنان در Dehydro epiandrosterone sulfate (DHEAS) و نیز در زنان سالمی که منوپوز دارند و مبتلا به سرطان پستان هستند سطح این دو هورمون در آن ها بالا است. این مطالعه در زنان پره منوپوز نتایج دیگری داشته و نشان داده شده است که کمبود سطوح پلاسمایی DHEA و DHEAS با افزایش خطر سرطان همراه بوده است. شاید بتوان گفت در زنان پره منوپوز آندروژن ها اثر پروفیلاکتیک در بروز سرطان دارند (۱۸). در ادامه با فرض این که گیرنده آندروژنی در سطح سلول های پستانی وجود داشته باشد باید انتظار داشت که تکثیر سلول های اپی تلیوم پستانی توسط تستوسترون القا گردد. بر این اساس مطالعات انجام شده بر روی کشت سلولی ثابت گردید که

محافظت کننده، سطح رزین دو مرتبه هر کدام به مدت ۳۰ ثانیه با دی کلرومتان شستشو داده شد. رنگ آبی حاصل از تست نین-هیدرین نشان دهنده وجود گروه آمین آزاد نوع یک و حذف گروه Fmoc می باشد.

اتصال اولین آمینواسید به رزین

اولین اسید آمینه هر کدام از پپتیدها همراه با عامل کوپل کننده و فعال کننده HATU در یک لوله آزمایش ریخته شدند. که جهت حل نمودن آن ها از دی متیل فرمامید (هر کدام ۳ اکی والان)، با استفاده از حمام التراسونیک به طور کامل حل شدند. بعد از به دست آمدن یک محلول همگن، ۶ اکی والان DIEA به محلول اضافه شد، سپس محلول به دست آمده به رزین اضافه گردید و به مدت ۴۵ دقیقه جهت انجام واکنش به صورت ملایم هم زده شد. بعد از پایان واکنش، حلال و مواد اضافی به کمک پمپ خلاء از سطح رزین حذف گردید و رزین ۵ مرتبه هر کدام به مدت ۳۰ ثانیه با استفاده از ۱/۵ میلی لیتر دی متیل فرمامید و ۲ مرتبه هر کدام به مدت ۳۰ ثانیه با استفاده از ۱/۵ میلی لیتر دی کلرومتان شستشو داده شد. شستشوی رزین جهت پاک-سازی آن از تمامی معرف های باقی مانده انجام می شود. بعد از این که به کمک پمپ خلاء رزین کامل خشک شد، تست نین هیدرین جهت اطمینان از اتصال آمینواسید بر روی رزین انجام گردید. رنگ زرد نشان دهنده این است که گروه آمین آزاد وجود ندارد و واکنش کامل شده است. بعد از انجام تست نین هیدرین رزین مجدداً با حلال دی متیل فرمامید شستشو داده شد؛ تا برای حذف گروه Fmoc آمینواسید آماده شود.

محافظت زدایی از آمینواسید متصل شده به رزین

مراحل انجام کار مشابه آن چه که برای محافظت زدایی گروه Fmoc رزین توضیح داده شد، انجام شد. از تست نین هیدرین جهت اطمینان از محافظت زدایی

تستوسترون و بسیاری از آندروژن های آدرنال سبب افزایش رشد برخی از سلول ها می گردد (۱۹).

مواد و روش ها

طراحی و سنتز پپتیدها در فاز جامد

در این مطالعه دو پپتید با توالی های QPKHFTELYFKS (QPK) به عنوان پپتید ضد سرطان و MPFSTGKRKKWKMR (MPF) به عنوان کنترل سنتز شدند که مراحل سنتز آن ها به شرح زیر بود (۳):

آماده سازی رزین

پپتیدها در مقیاس ۵۰ میکرومول سنتز شدند. برای پپتیدهایی که دارای پایانه ی C اسیدی هستند از رزین ونگ و برای پپتیدهای دارای پایانه ی C آمیدی از رزین رینک آمید استفاده شد. در ابتدای این روش رزین موردنظر به مدت ۲۱ دقیقه همراه با دی کلرومتان در داخل ظرف واکنش قرار داده شد. بعد از این مدت دی کلرومتان با استفاده از پمپ خلاء از ظرف واکنش حذف شد و برای ۵ مرتبه هر کدام به مدت ۳۰ ثانیه ۱/۵ میلی لیتر دی متیل فرمامید بر روی رزین قرار گرفت. سرانجام با استفاده از پمپ خلاء حلال به طور کامل از روی رزین حذف شدند و بدین ترتیب رزین آماده انجام مراحل بعدی شد.

محافظت زدایی از گروه آمین

رزین گروه آمین اولین آمینواسید متصل بر روی رزین ونگ و گروه آمین رزین رینک آمید توسط Fmoc محافظت شد. Fmoc با استفاده از محلول ۲۱٪ پی پیریدین در دی متیل فرمامید حذف گردید. به طوری که ۲ میلی لیتر از محلول در ۲ مرحله هر کدام به مدت ۱۱ دقیقه به رزین اضافه گردید. بعد از انجام واکنش، رزین ۵ مرتبه هر کدام به مدت ۳۱ ثانیه با دی متیل فرمامید شستشو داده شد و در آخر، برای انجام تست نین-هیدرین، جهت اطمینان از حفاظت زدایی گروه

نارنجی نشان دهنده عدم حضور آمین آزاد می باشد اما در حضور آمین آزاد رنگ آبی تیره یا بنفش قابل مشاهده است.

کشت سلولی

جهت انجام این مطالعه از کشت رده های سلولی MDA-MB-453 و MDA-MB231 که به ترتیب گیرنده آندروژنی را زیاد و کم بیان می کنند، رده سلولی MDA-MB-468 که این گیرنده را بیان نمی کند و دو رده سلولی پروستاتی به نام های LNCaP و DU-145 به منظور کنترل های منفی و مثبت استفاده شد. همه سلول ها از بانک سلول Pasture، ایران خریداری شد. سلول ها در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و در جو مرطوب ۵ درصد CO₂ نگهداری شدند. سلول ها در DMEM کشت شدند که با ۱۰٪ سرم جنین گاو (FBS)، پنی سیلین ۱۰۰ (U / ml)، استرپتومایسین (۱۰۰ U / ml) و گلوتامین (۲ میلی متر) همراه بود. وقتی سلول ها به تلاقی ۷۰٪ رسیدند، سلول ها زیر کشت شدند.

آزمون MTT

در این مطالعه، از روش MTT یا Thiazolyl blue tetrazolium bromide جهت بررسی میزان سمیت پپتیدهای مورد مطالعه بر روی رده سلولی سرطان TNBC استفاده گردید. ابتدا ۱۸۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی با غلظت 5×10^4 سلول در هر میلی لیتر داخل خانه های پلیت ۹۶ خانه قرار گرفت، و پلیت ۹۶ خانه به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و اتمسفر مرطوب با ۵٪ CO₂ نگه داری شد. بعد از ۲۴ ساعت، سلول ها در معرض ۲۰ میکرولیتر از غلظت های مختلف نمونه ها (۱۰۰۰ μg/ml) قرار گرفتند و مجدداً به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. در روز بعد، ۲۰ میکرولیتر از محلول MTT به خانه های پلیت اضافه گردید و سلول ها به مدت ۳ ساعت در انکوباتور قرار گرفتند. بعد از گذشت زمان مناسب، مایع

استفاده شد؛ که رنگ آبی نشانه حذف گروه Fmoc است.

اتصال دومین آمینواسید و آمینواسیدهای بعدی به

رزین

بعد از آزاد شدن گروه آمین در اولین آمینواسید، دومین آمینواسید و آمینواسیدهای بعدی طبق روالی که در مرحله ی قبل توضیح داده شد به توالی پپتید اضافه گردیدند.

جدا کردن پپتید از روی رزین

پپتیدها با محلول (۹۵٪) TFA در آب به مدت سه ساعت هم زده شد

مراحل نهایی جمع آوری و تهیه پپتید

بعد از جدا کردن پپتید از روی رزین، حلال به وسیله گاز N₂ تبخیر شد. سپس به پپتید دی اتیل اتر اضافه و سانتریفیوژ انجام شد. اتر باقی مانده بر روی رسوب پپتید به صورت سرریز کردن جدا شد. این مرحله ی شست و شو با اتر ۵ بار تکرار گردید و در نهایت رسوب باقی مانده در آب و استونیتریل حل شد و داخل خشک کن انجمادی جهت خشک شدن قرار داده شد.

تست شناسایی نین هیدرین

یکی از متداول ترین تست های شناسایی جهت کنترل کیفی در انجام یا عدم انجام اتصالات و محافظت زدایی ها، وجود آمین آزاد یا عدم وجود آن تست نین هیدرین می باشد. واکنش نین هیدرین با آمین نوع اول ایجاد یک کمپلکس آبی-بنفش رنگی را می کند. رزین با حلال دی کلرومتان شستشو داده شد. کمتر از ۱ میلی گرم از آن به لوله ی شیشه ای کوچک انتقال داده شد. ۳ قطره از محلول (محلول نین هیدرین در اتانول) A، ۳ قطره از محلول B (۸۰ میلی گرم فنول در ۲۰ میلی لیتر اتانول) و ۳ قطره از محلول (محلولی از پتاسیم سیانید در آب با غلظت یک میلی مولار) C به داخل لوله کوچک افزوده و سپس لوله به مدت ۳ دقیقه در دمای ۱۲۰ درجه سانتی گراد قرار داده شد. دانه های رزین با رنگ زرد یا

روش Caspase activity assay

در مطالعه با استفاده از کیت خریداری شده از شرکت فرمتاز و طبق دستورالعمل شرکت سازنده اندازه گیری شد. بدین ترتیب که سلول های تیمار شده در تعداد مناسب (۴ میلیون سلول در هر چاهک) جمع آوری شد، به هر چاهک ۵۰ میکرولیتر بافر لیز سلولی سرد اضافه شد. سپس در ادامه به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد، نمونه ها در ۱۰۰۰۰ rpm سانتریفیوژ و سوپرناتانت آن ها در لوله ای جداگانه نگه داری شد. پس از تعیین غلظت پروتئین در نمونه ها با استفاده از روش برادفورد، نمونه ها رقیق شده تا غلظت پروتئین نام ۱۰۰ میکروگرم در ۵۰ میکرولیتر به دست آید. سپس به هر کدام از نمونه ها ۵ میکرولیتر سوبسترا با غلظت ۵ میلی مولار (غلظت نهایی ۲۰۰ میکرومولار) اضافه شده و سپس به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق انکوباسیون انجام شد. در نهایت جذب نمونه ها در ۴۰۰ نانومتر اندازه گیری شده و پس از استاندارد سازی نتایج به صورت Mean±SD گزارش شد. به منظور سنجش فعالیت کاسپاز ۳ در این مطالعه از روش رنگ سنجی استفاده گردید. به این صورت که کاسپاز ۳ سوبسترای پپتیدی کاسپاز-۳ (Ac-DEVD-pNA) را هیدرولیز می نماید که در انتهای واکنش پارانیتروآنیلین (pNA) تولید می گردد که با استفاده از اسپکتروفتومتری در طول موج ۴۰۵ نانومتر قابل ارزیابی می باشد. لذا سلول های تیمار شده را به تعداد یک میلیون در هر چاهک ریخته شدند، به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر بافر لیز سلولی اضافه و در ادامه به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد، نمونه ها در ۱۰۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد و سوپرناتانت آن ها در لوله ای جداگانه نگه داری شد، غلظت پروتئین در نمونه ها با استفاده از روش برادفورد، بررسی شد، به هر کدام از نمونه ها ۵ میکرولیتر سوبسترا با غلظت نهایی ۲۰۰ میکرومولار

روی هر خانه از پلیت به کمک سمپلر به آهستگی خارج شد و کریستال های فورمازان تشکیل شده در هر خانه توسط ۱۵۰ میکرولیتر محلول DMSO حل شدند. سپس جذب هر خانه توسط دستگاه میکروپلیت ریدر در طول موج 570 nm خوانده شد و میزان درصد زنده ماندن سلول ها محاسبه گردید. در این تست یک ردیف از خانه های پلیت به عنوان بلانک و یک ردیف به عنوان کنترل در نظر گرفته شد که درون خانه های بلانک ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت و درون خانه های کنترل ۱۸۰ میکرولیتر سوسپانسیون سلولی و ۲۰ میکرولیتر آب دیونیزه (حلال نمونه ها) قرار داشت. این تست ۳ بار تکرار شد.

بررسی تکثیر سلول ها با استفاده از آزمون BrdU

جهت بررسی اثرات پپتید مورد مطالعه پنج هزار سلول به هر چاهک پلیت ۹۶ خانه اضافه و به مدت ۱ شبانه انکوبه گردید. سپس سلول ها به صورت هم زمان با $1 \mu\text{M}$ BrdU و پپتیدها در غلظت های مشخص به مدت ۱۲ ساعت تیمار گردیدند (طبق دستورالعمل کیت Cell signaling). سپس طبق دستورالعمل کیت و با استفاده از بافر لیز کننده تعیبه شده در کیت، سلول ها به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق لیز شدند. محلول رویی دور ریخته شده و آنتی بادی اولیه (۱:۱۰۰۰) به چاهک ها اضافه و پلیت به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق انکوبه گردید. پلیت با بافر شستشوی تعیبه شده ۵ بار شسته شده و سپس آنتی بادی ثانویه (۱:۱۰۰۰) به چاهک ها اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. سپس چاهک ها تخلیه و ۵ بار دیگر شسته شدند. سوبسترای TMB به چاهک ها اضافه و پلیت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه گردید. واکنش با افزودن اسید سولفوریک تعیبه شده در کیت متوقف و میزان جذب نوری هر چاهک در ۴۵۰ نانومتر به دست آمد. نتایج به صورت میانگین جذب نوری هر چاهک نسبت به گروه کنترل ارائه گردید.

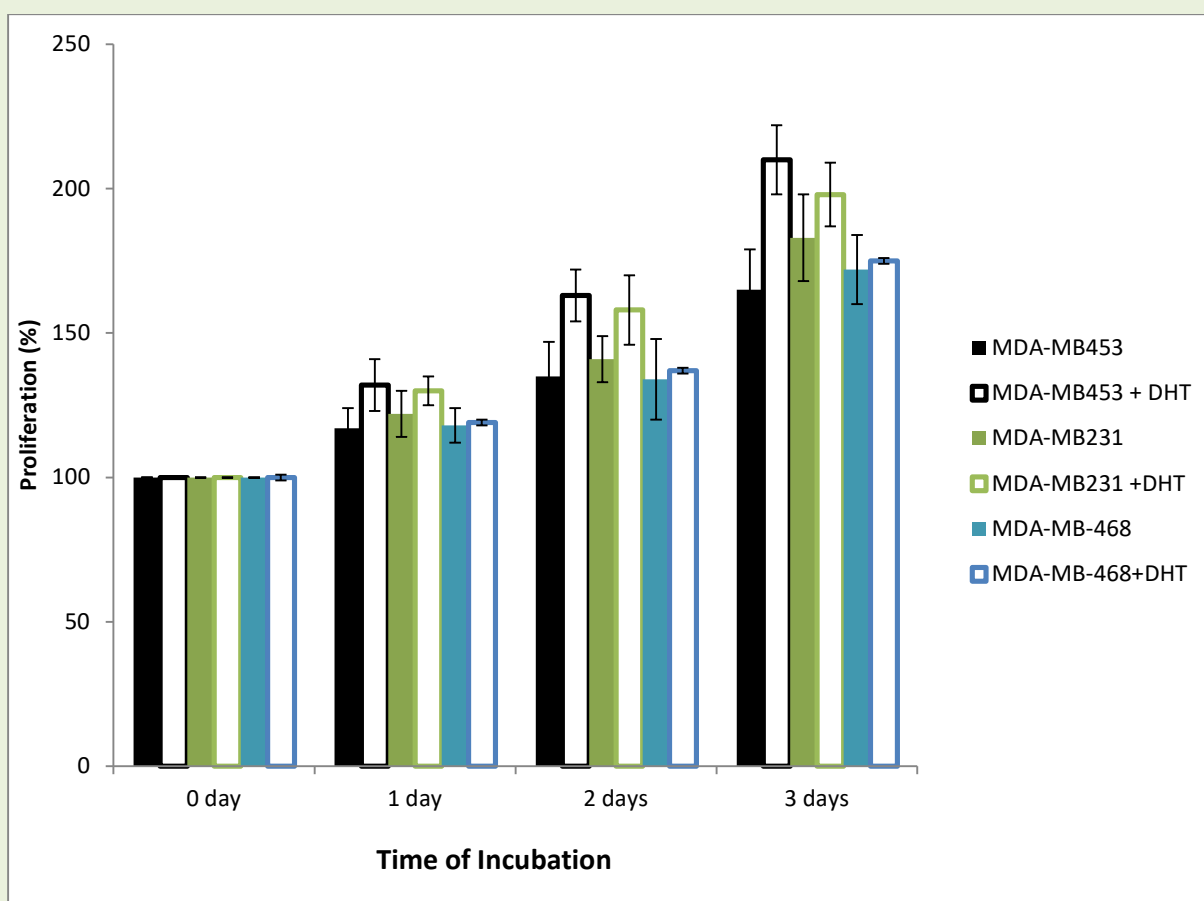
بیان نمی کند و دو رده سلولی پروستاتی به نام های LNCaP و DU-145 به منظور کنترل های منفی و مثبت استفاده شد. همان طور که در شکل ۱ دیده می شود، دی هیدرواپی اندسترون دیون یا DHT تکثیر سلول های دارای گیرنده آندروژنی را بیشتر از دیگر سلول ها افزایش می دهد. بر این اساس DHT بیشترین اثر را روی MDA-MB-453 و کم ترین اثر را روی MDA-MB-468 اعمال می نماید. همان طور که در این نمودار نیز دیده می شود اثر DHT بر روی تکثیر سلول های فوق وابسته به زمان می باشد.

اضافه و پس از ۱ ساعت انکوباسیون در دمای اتاق جذب نمونه ها در ۴۰۰ نانومتر اندازه گیری شد.

نتایج

بررسی اثر DHT بر روی تکثیر سلول ها

به منظور بررسی اثر گیرنده آندروژن بر روی سلول های سرطانی TNBC ابتدا لازم است اثر آندروژن بر روی میزان تکثیر این سلول ها مطالعه شود. به این منظور رده های سلولی MDA-MB-453 و MDA-MB-231 که به ترتیب گیرنده آندروژنی را زیاد و کم بیان می کنند، رده سلولی MDA-MB-468 که این گیرنده را



نمودار ۱- بررسی اثر DHT بر روی تکثیر رده های مختلف سلولی تا ۷۲ ساعت با استفاده از آزمون MTT.

درصد حیات رده های مختلف سلولی نسبت به سلول های تیمار نشده محاسبه گردید.

بیشترین تاثیر را بر روی فعالیت کاسپاز ۳ این رده سلولی داشته باشد. همان طور که در نمودار ۳ مشاهده می شود QPK در یک رفتار متناسب با غلظت فعالیت کاسپاز ۳ را در سلول هایی که گیرنده آندروژن بیشتری دارند، بیشتر افزایش داد. به طور مشابه سلول های فاقد این گیرنده (رده های سلولی MDA-MB-468 و DU-145) تحت تاثیر این پپتید قرار نگرفته اند. شایان ذکر است که MPF هیچ گونه تاثیر معنی داری بر فعالیت کاسپاز ۳ نداشته است (نمودار ۳).

بررسی اثر پپتید متصل شونده به گیرنده آندروژنی

بر روی تکثیر سلول ها با استفاده از آزمون BrdU
به منظور تایید اثر پپتید متصل شونده به گیرنده آندروژن بر روی تکثیر سلول های سرطانی TNBC از آزمون BrdU استفاده شد. QPKHFTELYFKS (QPK) به عنوان یک پپتید ضد سرطانی تکثیر سلول های بیان کننده گیرنده آندروژنی را مهار می نماید. از آن جایی که این پپتید اختصاصاً به گیرنده آندروژنی متصل می شود تاثیری بر روی دیگر سلول ها ندارد. مشابه آزمون های که قبلاً مورد بررسی قرار گرفتند MDA-MB-453 بیشترین و MDA-MB-468 کمترین تاثیر را از این پپتید پذیرفته اند. در حالی که QPK بر روی سلول های فاقد گیرنده آندروژنی (رده های سلولی MDA-MB-468 و DU-145) تاثیر چندانی نداشته است. شایان ذکر است که MPF در غلظت ۲۰۰ نانو مولار هیچ گونه تاثیر معنی داری بر روی تکثیر سلولی نداشته است (نمودار ۴).

بررسی اثر پپتید متصل شونده به گیرنده آندروژنی

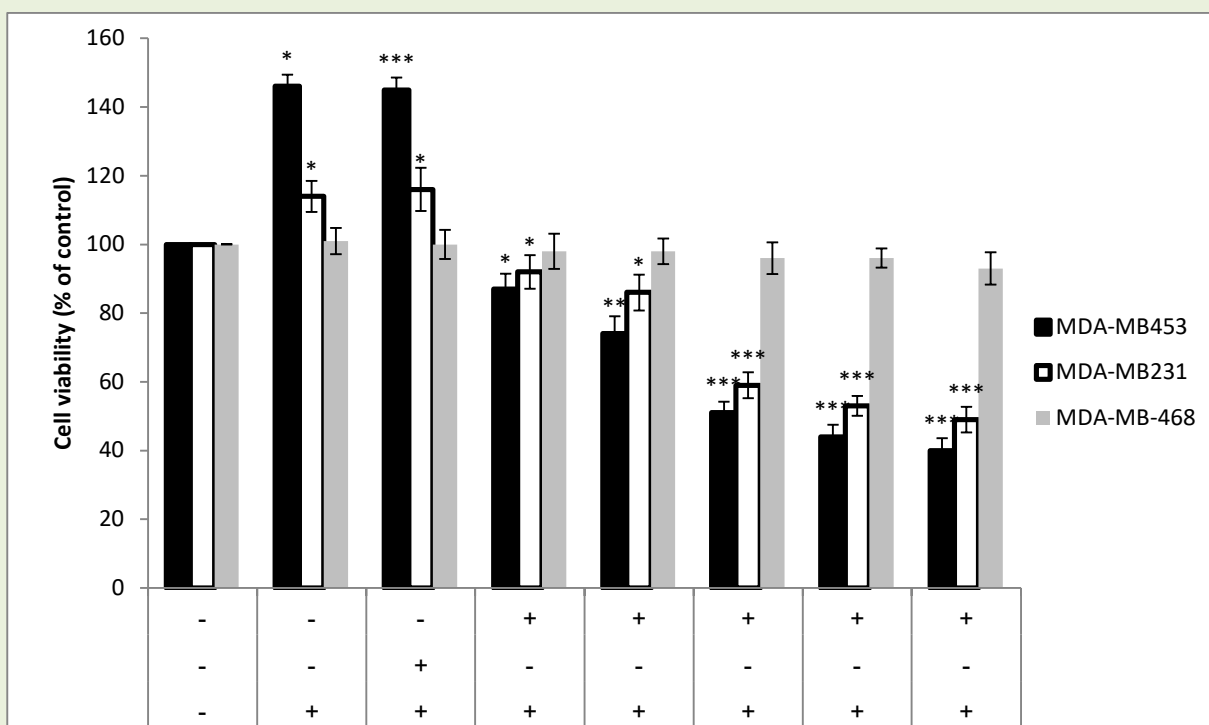
بر روی تکثیر سلول ها

به منظور بررسی اثر پپتید متصل شونده به گیرنده آندروژن بر روی سلول های سرطانی TNBC، دو پپتید با توالی های QPKHFTELYFKS (QPK) به عنوان پپتید ضد سرطان و MPFSTGKRKKWKMR (MPF) به عنوان کنترل سنتز شدند. جهت تکثیر سلول-های فوق DHT نیز لازم است لذا DHT به محیط کشت هم اضافه شد. از آن جایی که رده سلولی MDA-MB-453 بیشترین میزان گیرنده آندروژنی را دارد بیشتر تحت تاثیر QPK قرار گرفت، به عبارتی این معنی که QPK در یک رفتار وابسته به غلظت تکثیر سلول های دارای گیرنده آندروژنی را به طور معنی داری کاهش داد. این در حالی است که روی سلول های فاقد این گیرنده (رده-های سلولی MDA-MB-468 و DU-145) تاثیر چندانی نداشت. لازم به ذکر است که MPF در غلظت ۲۰۰ نانو مولار هیچ گونه تاثیر معنی داری بر روی تکثیر سلولی نداشته است (نمودار ۲).

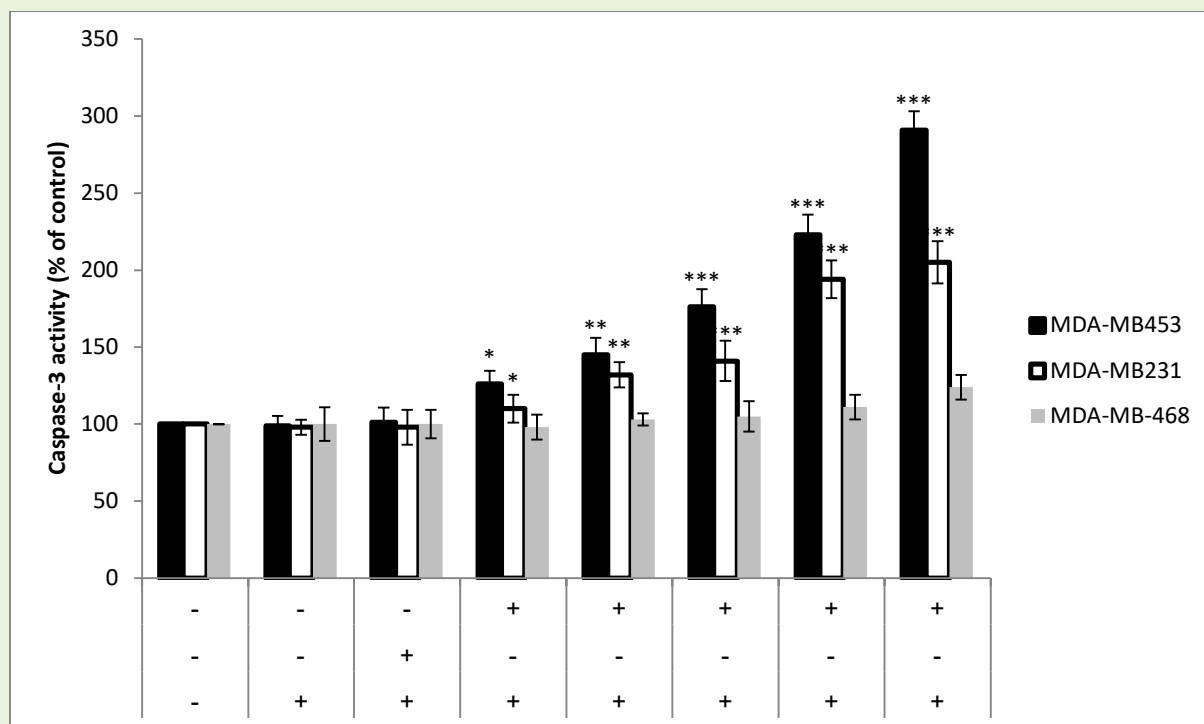
بررسی اثر پپتید متصل شونده به گیرنده آندروژنی

بر روی فعالیت کاسپاز ۳ در رده های مختلف سلولی

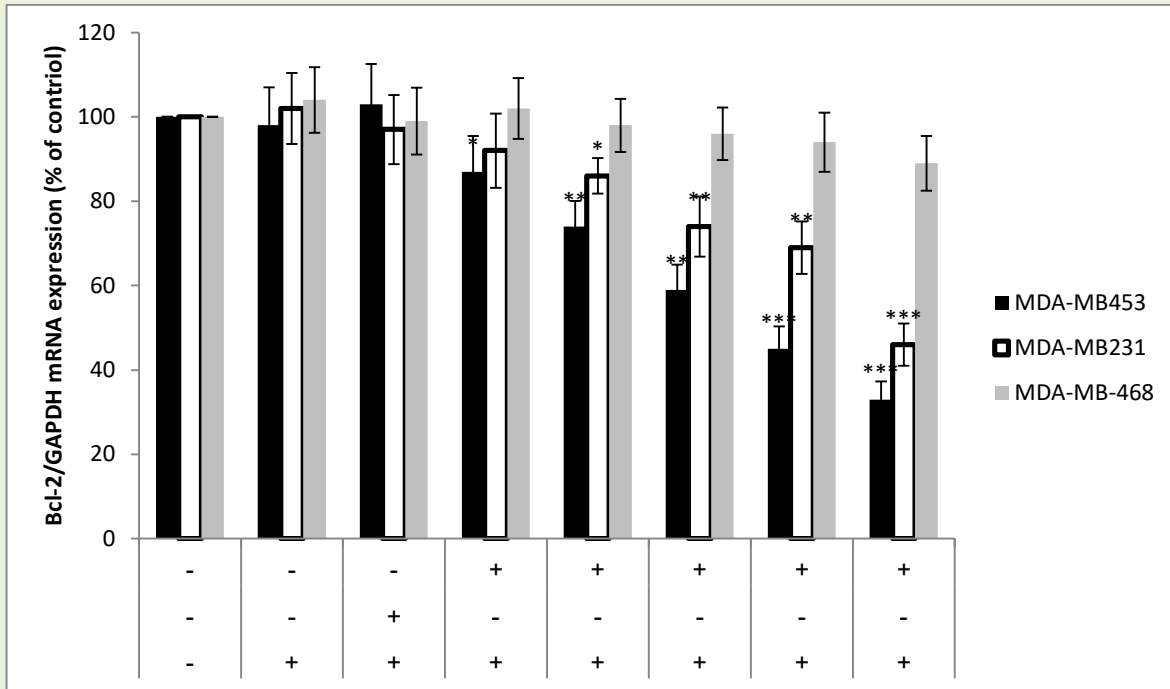
جهت بررسی اثر پپتید QPKHFTELYFKS (QPK) به عنوان پپتید ضد سرطان بر روی تغییرات فعالیت کاسپاز ۳، رده های مختلف سرطان TNBC مورد مطالعه قرار گرفت. همان طور که قبلاً نیز ذکر شد رده سلولی MDA-MB-453 بیشترین میزان گیرنده آندروژنی را دارد بنابراین قابل انتظار است که QPK



نمودار ۲- بررسی اثر پپتید QPK در حضور DHT در رده های مختلف سلولی طی ۲۴ ساعت اولیه با استفاده از آزمون MTT درصد حیات رده های مختلف سلولی نسبت به سلول های تیمار نشده محاسبه گردید. MPF نیز به عنوان کنترل منفی مورد استفاده قرار گرفت. * بیانگر $P < 0.05$ ، ** بیانگر $P < 0.01$ و *** بیانگر $P < 0.001$ می باشد.



نمودار ۳- بررسی اثر پپتید QPK بر روی فعالیت Caspase 3 در رده های مختلف سلولی طی ۲۴ ساعت اولیه. درصد فعالیت Caspase-3 در رده های مختلف سلولی نسبت به سلول های تیمار نشده محاسبه گردید. MPF نیز به عنوان کنترل منفی مورد استفاده قرار گرفت. * بیانگر $P < 0.05$ ، ** بیانگر $P < 0.01$ و *** بیانگر $P < 0.001$ می باشد.



نمودار ۴- بررسی اثر پپتید QPK بر روی تکثیر رده های مختلف سلولی طی ۲۴ ساعت اولیه با استفاده از آزمون BrdU
 درصد کاهش تکثیر سلولی بر روی رده های مختلف سلولی نسبت به سلول های بیمار نشده محاسبه گردید. MPF نیز به عنوان کنترل منفی مورد استفاده قرار گرفت. * بیانگر $P < 0.05$ ، ** بیانگر $P < 0.01$ و *** بیانگر $P < 0.001$ می باشد.

بحث و نتیجه گیری

نتایج حاصل از این مطالعه گواه آن است که دی هیدرو اپی اندستندینون یا DHT تکثیر سلول های دارای گیرنده آندروژنی (رده های سلولی MDA-MB-453) را بیش از دیگر سلول ها افزایش می دهد. علاوه بر این DHT بیشترین اثر را روی MDA-MB-453 و کمترین اثر را روی MDA-MB-468 اعمال می نماید. در رابطه با موارد بالینی نیز در مطالعه ای که توسط Bryan و همکاران انجام شد، نشان داد که درجه بدخیمی تومور در بیماران دارای گیرنده آندروژن پایین تر بالاتر است (۳). نتایج حاصل از این مطالعه حکایت از آن دارد که پپتید QPK از تکثیر سلول های سرطانی TNBC جلوگیری می نماید. این اثر کاملاً اختصاصی بوده است زیرا که سلول های با میزان بیان زیاد گیرنده آندروژن بیشتر مهار می شوند. به عنوان مثال رده سلولی MDA-

MB-453 بیشترین میزان گیرنده آندروژنی را دارد و بیشتر تحت تاثیر QPK قرار می گیرد. و این در حالی است که سلول های فاقد این گیرنده (رده های سلولی MDA-MB-468 و DU-145) تاثیر چندانی از QPK نگرفته اند. از آن جایی که مهار تکثیر ممکن است با افزایش آپوپتوز نیز همراه باشد در ادامه مطالعه اثر QPK بر روی پارامترهای کاسپاز ۳، پروتئین های Bax، Bcl-2 نیز بررسی شد. همین نتایج نیز برای این پارامترها به دست آمد. با توجه به اهمیت سرطان پستان و شیوع بالا و مرگ و میر ناشی از آن، اهمیت جستجوی داروی مناسب برای آن ضروری به نظر می رسد. به طور مثال، در آمریکا بین سال های ۱۹۹۸ تا ۲۰۱۲ حدود ۲۴۹۰۰۰ نفر بر اثر سرطان پستان جان خود را از دست دادند. Patil و همکاران در سال ۲۰۱۰ با استفاده از تکنیک کروماتوگرافی ماده خالص شده بربرین را از نمونه

سلول های سرطانی Cervical رده HeLa با استفاده از سوش MTT و روش فلوسایتمتری FCM بررسی نمودند و میزان بیان mRNA در این سلول ها را نیز با استفاده از روش های radioimmunity assay و RT-PCR بررسی کردند و نتایج نشان داد که نسبت Bcl2/Bax به طور قابل ملاحظه ای کاهش پیدا کرده و سیتوکروم C از میتوکندری آزاد شده که نشان دهنده فعال شدن مسیر میتوکندریایی بوسيله بربرین است در عین حال caspase-3 و caspase-8 در مسیر آپوپتوز فعال شدند و میزان بیان p53 افزایش پیدا کرد که مجموع این اثرات نشان دهنده فعالیت ضد توموری بربرین است (۲۱). مطالعه نشان داد که QPK به صورت معنی داری آپوپتوز را در سلول های سرطانی TNBC القا می نماید.

تشکر و قدردانی

مقاله حاضر از پایان نامه ۶۷ آقای مزدک جمشیدی دانشجوی دکتری بیوشیمی دانشگاه آزاد اسلامی واحد سنجید می باشد. نویسندگان از کلیه افرادی که در این بررسی همکاری داشتند، قدردانی می نمایند

تجاری تهیه کردند و اثرات آن را بر روی سلول های MCF-7 رده سرطان پستان و MCF-12F رده سلول های نرمال سینه اپیتلیال انسانی با استفاده از روش های MTT assay، Western blotting و Immunoblotting بررسی کردند و مشاهده شد که بربرین باعث القای آپوپتوز در سلول های MCF-7 از طریق افزایش سطح سیتوکروم C، افزایش فعالیت caspase-9، کاهش سطح Bcl-2 و بیان مجدد فاکتورهای P27 و P53 می شود (۲۰). هم چنین Mazumder و همکاران در سال ۲۰۱۱ اثرات سایتو توکسیک عصاره متانولی ساقه *Berberis aristata* و ریزوم *Hemidesmus indicus* را بر روی سلول های سرطانی سینه رده MCF-7 با استفاده از تکنیک های حذف تریپان آبی رنگ و phytochemical screening مورد بررسی قرار دادند و مشاهده شد که عصاره متانولی ساقه *Berberis aristata* و ریزوم *Hemidesmus indicus* بر روی سلول های MCF-7 اثرات قوی ضد سرطانی دارند (۲۲). Lu و همکاران نیز در سال ۲۰۱۰ اثر سمیت بربرین را بر روی

منابع

1. Anstey, EH., Shoemaker, ML., Barrera, CM., O'Neil, ME., Verma, AB., Holman DM. (2017). Breastfeeding and breast cancer risk reduction: implications for black mothers. *Am J Prev Med*, 53(3); S40-S6.
2. Azam, S., Lange, T., Huynh, S., Aro, AR., von Euler-Chelpin, M., Vejborg, I. (2018). Hormone replacement therapy, mammographic density, and breast cancer risk: a cohort study. *Cancer Causes Control*, 29(6); 495-505.
3. Bryan, RM., Mercer, R.J., Bennett, RC., Rennie, GC., Lie, TH., Morgan, FJ. (1984). Androgen receptors in breast cancer. *Cancer*. 54(11); 2436-40.
4. Bazire L, De Rycke Y, Asselain B, Fourquet A, Kirova Y. Risks of second malignancies after breast cancer treatment: long-term results. *Cancer/Radiothérapie*. 2017;21(1):10-5.
5. Brind, J., Condly, SJ., Lanfranci, A., Rooney, B. (2018). Induced abortion as an independent risk factor for breast cancer: a systematic review and meta-analysis of studies on south asian women. *Issues L & Med.*, 33;33-64.
6. Collins, LC., Cole, KS., Marotti, JD., Hu, R., Schnitt, SJ., Tamimi, RM. (2011). Androgen receptor expression in breast cancer in relation to molecular phenotype: results from the Nurses' Health Study. *Modern Pathology.*, 24(7);924-930.
7. Johnson, MC. (2010). Anatomy and physiology of the breast. *Management of breast diseases*, 1-36.
8. Giuliano, AE., Kirgan, DM., Guenther, JM., Morton DL. (1994). Lymphatic mapping and sentinel lymphadenectomy for breast cancer. *Ann Surg.*, 220(3); 391-395.
9. Satake, T., Matsuyama, M. (1991). Endocrine cells in a normal breast and non-cancerous breast lesion. *Pathol Int.*, 41(12); 874-8.
10. Kresovich, JK., Xu, Z., O'Brien, KM., Weinberg, CR., Sandler, DP., Taylor, JA. (2019). Methylation-based biological age and

- breast cancer risk. JNCI: Journal of the National Cancer Institute, 111(10); 1051-8.
11. Olsson, HL., Olsson, ML. (2020). The Menstrual cycle and risk of breast cancer: A Review. Front Oncol., 10; 33-98.
12. Kolak, A., Kamińska, M., Sygit, K., Budny, A., Surdyka, D., Kukiełka-Budny, B. (2017). Primary and secondary prevention of breast cancer. Ann Agric Environ Med., 24(4); 549-53.
13. Lee, KR., Hwang, IC., Han, KD., Jung, J., Seo, MH. (2018). Waist circumference and risk of breast cancer in Korean women: a nationwide cohort study. Int J Cancer., 142(8); 1554-9.
14. Yu, L., Tan, Y., Zhu, L. (2017). Dietary vitamin B2 intake and breast cancer risk: a systematic review and meta-analysis. Arch Gynecol Obstet., 295(3); 721-9.
15. Wendt, C., Margolin, S. (2019). Identifying breast cancer susceptibility genes—a review of the genetic background in familial breast cancer. Acta Oncol., 58(2); 135-46.
16. Rojas, K., Stuckey, A. (2016). Breast cancer epidemiology and risk factors. Clin Obstet Gynecol., 59(4); 651-72.
17. Hickey, T., Robinson, J., Carroll, J., Tilley, W. (2012). Minireview: the androgen receptor in breast tissues: growth inhibitor, tumor suppressor, oncogene? Molecular Endocrinology, 26(8); 1252-67.
18. Tworoger, SS., Missmer, SA., Eliassen, AH., Spiegelman, D., Folkerd, E., Dowsett, M. (2006). The association of plasma DHEA and DHEA sulfate with breast cancer risk in predominantly premenopausal women. Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers., 15(5); 967-71.
19. Gonzalez, LO., Corte, MD., Vazquez, J., Junquera, S., Sanchez, R., Alvarez, AC. (2008). Androgen receptor expression in breast cancer: relationship with clinic pathological characteristics of the tumors, prognosis, and expression of metalloproteases and their inhibitors. BMC Cancer., 8(1); 149-156.
20. Patil, JB., Kim, J., Jayaprakasha, G. (2010). Berberine induces apoptosis in breast cancer cells (MCF-7) through mitochondrial-dependent pathway. European Journal of Pharmacology., 645(1); 70-8.
21. Lu, B., Hu, M., Peng, J. (2010). Cytotoxicity of berberine on human cervical carcinoma HeLa cells through mitochondria, death receptor and MAPK pathways, and in-silico drug-target prediction. Toxicology in Vitro. 24(6); 1482-90.
22. Mazumder, PM. DS., Das, MK. (2011). Phyto-pharmacology of *Berberis aristata* DC: a review. Journal of Drug Delivery and Therapeutics, 1(2); 12-18.
23. Mukama, T., Kharazmi, E., Sundquist, K., Sundquist, J., Brenner, H., Fallah, M. (2020). Familial risk of breast cancer by dynamic, accumulative, and static definitions of family history. Cancer., 126(12); 2837-48.



Alteration Viability of Breast Cancer Cell Lines in the Vicinity of an Inhibitor

M. Jamshidi¹, **F. Keshavarzi**¹, S. Amini¹, A. Gheysarzadeh^{2,3}, K. Davari¹

1.Department of Biology, Sanandaj branch, Islamic Azad University, Sanandaj, Iran.

gol.keshavarzi@gmail.com

2.Clinical Microbiology Research Center, Ilam University of Medical Sciences, Ilam, Iran

3.Department of Biology, Faculty of Science, Ilam University, Ilam, Iran.

Received:2020.5.7

Accepted: 2020.21.10

Abstract

Introduction & Objective: Breast carcinomas are very invasive tumors with poor prognosis that are more common in younger women (less than 50 years old). Although initially sensitive to chemotherapy, they are significantly more aggressive than other tumors of the molecular subgroup. The aim of this study was to find a new treatment for these cancers.

Materials and Methods: The basis of the method was the construction of an inhibitor of cell surface receptors, in the first stage. Then, the effects of this inhibitor on breast cancer cell lines were examined by the routine tests.

Results: The results showed that at appropriate concentrations of inhibitor, the life of the respective cell lines is significantly altered.

Conclusion: The present study showed that the use of these methods can pave the way for future treatments.

Keywords: Highly Invasive Breast Tumors, Treatment, Inhibitors.