Archive of SID

مجله پزشکی کوثر
دوره ۱۲ ، شماره ۲ ، تابستان ۱۳۸۶
صفحات: ۱۲۷ – ۱۳۷

مقایسه دو روش رنگ‌سنجی MTT و تریپان‌بلو در تعیین سیتوتوکسیسیتی کال پروتکتین برسلول‌های سرطانی معده انسان در شرایط آزمایشگاهی

محمدعلی شکرگزار ✍ Ph.D. ، حکیمه زالی* M.Sc. ،
مصطفی رضایی‌طاویرانی Ph.D. ، امیر امان‌زاده*** DVM**

چکیـــده

هدف: سنجش میزان بقاء و تکثیر سلولی در تعیین میزان اثر داروهای ضدسرطانی بر روی سـلول‌هـا امـری مهم به نظر می‌رسد که در این خصوص روشهای متعددی استاندارد شده است. کال پروتکتین متـالوپروتئینی است که در سیتوزول نوتروفیل، ماکروفاژ، لنفوسیت، مونوسیت و سلولهای اجدادی ماکروفاژها وجود دارد و اثر مهاری آن در برخی سرطان‌ها گزارش شده است و نشان داده شده که کال پروتکتین می‌تواند به عنوان یـک عامل درمانی در سرطان مطرح باشد. کال پروتکتین دارای نقش‌های ضدباکتری، ضـد قـارچ، تعـدیل کننـده ایمنی وخواص ضدتکثیر و شیموتاکتیک می‌باشد. در این مطالعه دو روش رنگ سنجی MTT و تریپان‌بلـو در تعیین سیتوتوکسیسیتی کال پروتکتین برسلول‌های سرطانی معده انسان در شرایط آزمایشگاهی مقایسه شـده است.

روش بررسی: کال پروتکتین از سلول‌های نوتروفیل انسان با روشهای کروماتوگرافی تخلیص شد. در ایـن مطالعه از رده سلولی سرطان معده (AGS) در محیط کشت RPMI ، حاوی ۱۰٪ FBS استفاده شـده اسـت. تعداد سلول‌های مورد مطالعه در این آزمایش حدود ۱۰۰۰۰ سلول بوده است که در حضور غلظتهـای مختلـف ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ µg/ml از کال پروتکتین در فواصل زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت انکوبـه شـده‌انـد. جهت بررسی اثر مهاری کال پروتکتین بر رشد سلول از دو روش رنـگ سـنجی MTT assay و تریپـان‌بلـو (trypan blue) استفاده شده است.

یافته‌ها: نتایج حاصل از بررسی اثر کال پروتکتین بر میـزان مـرگ و میـر سـلولهای AGS نـشان داد کـه همبستگی معنی‌داری بین دو روش MTT و تریپان بلو وجود دارد (P<۰/۰۱) به طوری که LC_{50} این دارو در همه فواصل زمانی انکوباسیون در روش MTT پایین‌تـر از تریپـان‌بلـو مـی‌باشـد. LC_{50} کـال پـروتکتین بـر سلول‌های AGS در روش رنگ سنجی تریپان‌بلو در فواصل زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ سـاعت بـه ترتیـب ۱۴۱/۸، ۷۱ و ۳۳/۲۹µg/ml و در روش MTT ۹۶/۷۸، ۳۸/۶۶ و ۹/۸۶µg/ml بود. بعلاوه همبستگی (correlation) بین نتایج بدست آمده در دو روش رنگ سنجی در فواصل زمانی مختلف، خطی، مثبت و معنی‌دار محاسبه شد (p<۰/۰۱ تا p<۰/۰۰۱).

نتیجه‌گیری: نتایج حاصل از دو نوع روش مطالعه توکسیسیتی کال پروتکتین بر سلول‌های سرطانی معـده هماهنگ بوده ولی روش MTT از حساسیت بالاتری برخوردار می‌باشد و با توجه به اجـرای آسـانتر در روش MTT می‌توان این روش را مناسب، دقیق و سریع معرفی کرد.

واژه های کلیدی: کال پروتکتین، سرطان معده، اثر مهاری، تریپان بلو و MTT assay .

دریافت مقاله: ۸۵/۶/۱۶، اصلاح مقاله: ۸۶/۳/۵، پذیرش مقاله: ۸۶/۵/۱

✍ نویسنده مسئول: استادیار بانک سلولی ایران، انستیتو پاستور ایران،تهران ـایران
* کارشناس ارشد گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه خاتم
** استادیار گروه علوم پایه، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام
*** انستیتو پاستور ایران، بانک سلولی ایران
آدرس پست الکترونیکی: mashokrgozar@pasteur.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

بر آورد میزان تکثیر و بقاء سلول‌ها جهت تعیین میزان اثر داروها، آنتی‌بادی‌ها و سایتوکاین‌ها بر سلولهای نرمال و سرطانی عملیاتی است که می‌تواند توسط روشهای شمارش مستقیم و غیرمستقیم انجام شود. شمارش مستقیم با روش دستی یا اتوماتیک با استفاده از هموسیتومتر یا دستگاه شمارش ذرات که سلولها را به طور سریالی در چند قطب زمانی شمارش می‌کند، انجام می‌گیرد (۱). در روش غیر مستقیم از رادیو اکتیو (3H-thymidine) و رنگ‌های مختلف مثل نوترال رد، (dimethylthiazol diphenyl MTT (tetrazolium bromide و (2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide XTT (inner salt استفاده می‌شود و از آنجا که استفاده از مواد رادیواکتیو علیرغم حساسیت فوق‌العاده آن مشکلات خاصی را برای مصرف کننده ایجاد می‌کند، امروزه از روشهای رنگ‌سنجی بخاطر سهولت در بکارگیری و دقت کافی در حصول نتایج بیشتر استفاده می‌کنند (۲-۴). از طرفی در چند مطالعه نشان داده شده است که تفاوت قابل ملاحظه‌ای بین روشهای رنگ سنجی و رادیو اکتیو وجود ندارد و لذا روش رنگ سنجی می‌تواند به عنوان یک روش قابل اعتماد مطرح باشد (۵).

کال پروتکتین انسانی هترودایمری با دو زیر واحد ۱۰ و ۱۴ کیلو دالتونی است که متعلق به خانواده بزرگ پروتئینی S100 می‌باشد و در سیتوزول نوتروفیل، مونوسیت و ماکروفاژهای تحریک شده مشاهده شده است این پروتئین اثر مهاری بر رشد سلولهای سرطانی دارد و می‌توان آن را ازخون استخراج کرد. غلظت پلاسمایی کال پروتکتین در افراد سالم کمتر از ۱ µg/ml است و در شرایط التهابی، آلودگی به ویروس HIV و سرطان، غلظت پلاسمایی آن افزایش چشمگیری می‌یابد. در افراد مبتلا به بیماریهای التهابی روده در مدفوع افزایش می‌یابد و به علت پایداری آن در مدفوع و تأثیرپذیری ناچیز آن از عوامل محیطی، اخیراً به عنوان مارکر ارزشمندی باحساسیت و اختصاصی بودن بالا برای تشخیص عوارض التهابی روده بزرگ مطرح شده است (۶-۱۰). پژوهشهای انجام شده نشان می‌دهد که کال پروتکتین دارای فعالیت جلوگیری از رشد سلولی (Cytostatic activity) است. به نظر می‌رسد که قدرت بازدارندگی رشد سلولی این پروتئین با سینتیک تکثیر سلولی رابطه‌ای مستقیم دارد (۱۱،۶). همچنین نشان داده شده است که این پروتئین به ویژه از رشد و تکثیر برخی باکتریها، مخمر کاندیدا آلبیکانز و برخی سلولهای سرطانی جلوگیری می‌کند (۱۲،۷). در همین ارتباط طبق تحقیقات انجام شده در شرایط آزمایشگاهی (in vitro) نشان داده شده است که کال پروتکتین از رشد برخی رده‌های سلول سرطانی نظیر آدنوکارسینومای سینه موش، هپاتومای موش، ملانومای موش، فیبروسارکومای موش، استئوسارکومای خرگوش، آدنوکارسینومای سینه انسان و لوکمیای انسانی در محیط کشت جلوگیری می‌کند. این پروتئین اثرش را روی این سلولها از طریق اپوپتوز اعمال می‌کند (۸،۷). در واقع این پروتئین با مهار آنزیم کازئین کیناز باعث مهار فسفریلاسیون آنزیم توپوایزومراز که آنزیم کلیدی در همانندسازی DNA و تقسیم سلولی است می‌شود. همچنین کال پروتکتین از رشد ماکروفاژها، لنفوسیت‌های تحریک شده با میتوژن و نیز در غلظت‌ها و زمانهای بالاتر، از رشد سلولهای فیبروبلاست در محیط کشت جلوگیری می‌کند (۱۳-۱۵) . قابل ذکر اینکه اثر کال پروتکتین بر سلولهای سرطانی معده تاکنون مطالعه نشده است. در این مطالعه دو روش رنگ سنجی MTT و تریپان بلو در تعیین سیتوتوکسیسیتی کال پروتکتین بر سلولهای سرطانی معده انسان در شرایط آزمایشگاهی مقایسه شده است.

روش بررسی

سرم جنین گاوی Fetal calf serum (FCS) و محیط کشت RPMI (شرکت Gibco آلمان)، پنی سیلین، استرپتومایسین، فیلتر سر سرنگی ۲۲/. میکرومتر، تریپسین، سوکروز، دکستران، آگاروز، رنگ MTT و تریپان بلو (شرکت سیگما ,St. Louis) (MO, USA)، فلاسک T25 (شرکت NUNC دانمارک)، DTT، EDTA، PMSE و دیگر معرف‌ها و نمک‌ها با درجه خلوص بالا از شرکت‌های Merk (آلمان) و Q سفاروز، SP سفاروز از شرکت Pharmacia تهیه شده‌اند، از آب بدون یون برای انجام آزمایشات

www.SID.ir

Archive of SID

استفاده شده است.

۱. تهیه کال پروتکتین. نوتروفیل‌ها با روش خالص‌سازی معمول گلبول‌های سفید از خون تهیه شدند (۱۶). از دکستران و Nacl جهت جدا کردن پلاسما و از فایکول جهت جدا کردن انواع سلول‌های خونی و جداسازی گرانولوسیت‌ها استفاده شد. با روش سونیکاتور سلول‌ها لیز شدند که در این عمل با توجه به پاره شدن لیزوزوم‌ها، برای جلوگیری از اثر تخریبی آنزیم‌های لیزوزومی روی پروتئین‌ها از مواد مهارکننده آنزیمی شامل EDTA ۱mM ، mM ۱ DTT، PMSF ۰/۵mM و سوکروز ۰/۲ مولار استفاده شد. جهت خارج کردن بسیاری از محتویات سلول حتی غشاء اندامک‌ها از سانتریفوژ با دور بالا (۱۵۰۰۰ در ۲۰دقیقه) استفاده شد. محلول رویی شفاف یا مایل به قرمز و حاوی کلیه مواد حل شدنی درون سلولی از جمله نمک‌ها می‌باشد که آن را برداشته و رسوب دور ریخته شد. جهت خارج کردن نمک‌ها از محلول، از کیسه دیالیز استفاده شد و عمل دیالیز سه بار تکرار گردید که از محلول دیالیز شامل تریس (به منظور حفظ pH محیط)، EDTA و DTT استفاده شد. جهت جداسازی کال پروتکتین از سایر پروتئین‌ها از ستون کروماتوگرافی Q سفارز و SP سفارز استفاده شد. گروه عاملی Q سفارز آمین نوع سوم است و یک ستون تعویض آنیونی است که بعد از اتصال پروتئین به ستون آن را با بافر نمکی تریس شسته ،محلول خارج شده از ستون در مقادیر ۵ میلی لیتری جمع‌آوری شد. نمونه خارج شده اولیه، شامل تریس و فاقد پروتئین است ولی بعد از اضافه کردن نمک، پروتئین‌ها بر حسب چسبندگی به ستون از همدیگر جدا و از ستون خارج شدند. از هر نمونه مقداری برداشته و جذب آن در طول موج ۵۹۵ که جذب برادفورد است توسط دستگاه اسپکتوفتومتری خوانده شده است. در ۳ مورد از ۲۰ مورد نمونه جمع‌آوری شده جذب مناسب برای پروتئین وجود دارد. برای این سه نمونه الکتروفورز SDS PAGE گذاشته و وزن ملکولی نمونه تعیین شد. سپس باند اصلی دیالیز شد تا نمک‌های متصل به ستون جدا شود. با انجام سه بار دیالیز و حذف نمک‌ها با استفاده از بافر دیالیز استات که pH آن ۴/۵ و شامل استات، EDTA و DTT می‌باشد، بار پروتئین مثبت شده و در مرحله بعد جداسازی با ستون SP سفارز (سولفو پروپیل) انجام شد. گروههای عاملی این ستون SO_3 و S_2O_7 بوده و یک ستون تعویض کاتیونی است، با این ستون پروتئین‌های مورد نظر جدا و نمونه یک بار برای مدت ۱۰ساعت با PBS دیالیز گردید. نمونه بدست آمده با روش برادفورد تعیین غلظت شده و با فیلتر سر سرنگی ۰/۲۲ میکرومتر استریل شدند (۱۶).

۲. رده سلولی. رده سلولی انسانی AGS [human caucasian gastric adenocarcinoma (NCBI: C-131)] از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه شدند. سلولها در فلاسک T25 و در محیط کشت RPMI-1640 حاوی ۱۰٪ FBS ، در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد، حاوی ۵ درصد CO_2 و ۹۰ ٪ رطوبت کشت داده شدند پس از رشد و ازدیاد، سلولها به کمک تریپسین ۰/۲۵٪ جدا شده و پس از شمارش به میزان ۱۰۰۰۰ سلول به چاهکهای پلیت ۹۶ حفره‌ای منتقل شدند. در تمامی موارد برای هر آزمایش سه چاهک در نظر گرفته شده و کلیه آزمایشات دو بار تکرار شدند. از آنجا که سلولهای فوق چسبنده بوده و جهت ارزیابی بایستی در شرایط نرمال رشد قرار داشته باشند تمامی آزمایشات بعد از ۱۸ ساعت انکوباسیون در چاهکهای پلیت کشت سلول (چسبیدن کامل سلول به پلیت) انجام گرفت.

۳. انکوباسیون سلول ها با غلظت های مختلف کال پروتکتین. کال پروتکتین در غلظتهای ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ µg/ml در محیط کشت تهیه و در فواصل زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت با سلولهای AGS انکوبه شدند. سلولهایی که در غلظت صفر کال پروتکتین انکوبه شده بودند به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شدند.

٤. روشهای سنجش میزان فعالیت حیاتی و توکسیسیتی در رده‌های سلولی مجاور شده با کال پروتکتین با استفاده از رنگهای استاندارد. سنجش قابلیت حیات و رشد سلولها با روشهای مختلفی انجام می‌شود، از آن جمله روش تریپان بلو (۱۷) است که روشی آسان برای ارزیابی یکپارچگی غشاء سلولها و در نتیجه تکثیر یا مرگ آنها می‌باشد. روش دقیق دیگری که معمولاً برای بررسی بقاء سلولها بکار می‌رود استفاده از نمک زرد رنگ تترازولیوم (MTT assay) است که این نمک به وسیله سلولهای زنده جذب و سبب تشکیل

www.SID.ir

Archive of SID

کریستال‌های بنفش رنگ نا محلول فرمازان می‌گردد (۱۹،۱۸). این کریستال‌ها در خارج از سلول با افزودن یک شوینده حل می‌شوند. این رنگ با روشهای طیف سنجی قابل سنجش و اندازه‌گیری است. برای هر سلولی یک رابطه خطی میان تعداد سلولهای زنده و میزان جذب اندازه‌گیری شده وجود دارد که این رابطه امکان تعیین دقیق هر گونه تغییراتی را در میزان تکثیر سلول‌ها فراهم می‌سازد. در این تحقیق از دو روش تریپان بلو و MTT assay استفاده شد.

٤-١. رنگ آمیزی تریپان بلو. غشاء سلولهای زنده اجازه ورود رنگ‌های غیر الکترولیت را به درون سلول نمی‌دهد، اما سلولهای مرده به خوبی رنگ می‌گیرند (شکل ۱). جهت تعیین فعالیت حیاتی سلول (viability)، ۰/۱ میلی لیتر از سوسپانسیون سلولی (سلولهای کنترل و سلولهای انکوبه شده با غلظت‌های مختلف کال پروتکتین) با ۰/۱ میلی لیتر از محلول تریپان‌بلو (0.1% W/V in 0.15 M in PBS) (Sigma, USA) در یک حفره از پلیت ۹۶ حفره‌ای مخلوط شده بلافاصله با کمک یک هموسیتومتر (لام نئوبار) تعداد سلولهای رنگ گرفته (مرده) و سلولهای رنگ نشده (سلول‌های زنده) تعیین شدند (۱۷). سپس به کمک فرمولهای ذیل درصد فعالیت حیاتی و سیتوتوکسیسیتی مورد محاسبه قرار گرفتند.

$$\%\text{Viability} = \frac{\text{Number of viable cells}}{\text{Total number of cells counted}} \times 100$$

$$\%\text{Cytotoxicity} = 100 - \%\text{viable cells}$$

٤-٢. رنگ آمیزیMTT . این روش بر اساس احیائ رنگ MTT (dimethylthiazol diphenyl tetrazolium bromide) محلول به یک فراورده نامحلول (Formazan) بنفش آبی توسط فعالیت آنزیم ردوکتاز میتوکندری در سلولهای زنده استوار است (۲۱،۲۰) (شکل ۱). جهت تهیه محلول MTT با غلظت ۵mg/ml، ۵۰mg از پودرMTT در ۱۰ml ازPBS، M ۰/۱۵ حل شد و هنگام استفاده در رنگ‌آمیزی ۱۰ برابر با PBS رقیق گردید تا محلول MTT۰/۵ mg/ml به دست آید. لازم به ذکر است که پس از تهیه PBS ، محلول اتوکلاو گردید. پس از انکوباسیون سلول‌های AGS با غلظت‌های مختلف کال پروتکتین در فواصل زمانی ۲۴ و ۴۸ و ۷۲ ساعت، پلیت‌هایی که در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و CO_2 ۵ درصد انکوبه شده بودند با محلول MTT ۰/۵ mg/ml رنگ آمیزی، پس از ۳ تا ۵ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتیگراد مایع روئی سلولها برداشته شد و بجای آن ۲۰۰ میکرولیتر محلول ایزوپروپانل (Merck, Germany) به حفره‌های مربوطه اضافه شده، پلیت مربوطه بمدت ۱۰ الی ۱۵ دقیقه روی شیکر قرار گرفت. سپس پلیت مربوطه توسط یک میکروتیتر پلیت ریدر (ELISA-reader, Organon-Teknika, Netherland) در ۵۷۰ نانومتر قرائت شد. میزان توکسیسیتی ایجاد شده با استفاده از فرمول ذیل مورد محاسبه قرار گرفت.

$$\%\text{Cytotoxicity} = 1 - \frac{\text{mean absorbance of toxicant}}{\text{mean absorbance of negative control}} \times 100$$

$$\%\ \text{Viability} = 100 - \%\ \text{Cytotoxicity}$$

جهت کم کردن میزان خطای آزمایش در چند عدد از چاهکهای بدون سلول نیز رنگ MTT اضافه و سپس شستشو داده و همراه دیگر چاهکها میزان جذب آن خوانده شد و در نهایت از کل جذب‌ها کم گردید. قبل از انجام آزمایش اصلی، جهت بهینه کردن شرایط آزمایش و مشخص کردن تعداد سلول لازم برای هر چاهک و نیز زمان و غلظت مناسب کال پروتکتین، مطالعه اولیه با تعداد سلولهای کمتر و بیشتر از ۱۰۰۰۰، زمانهای انکوباسیون کمتر از ۲۴ ساعت (۶، ۱۲ و ۱۸ ساعت) و غلظتهای پایین‌تر از ۲۵µg/ml انجام گرفت. بر اساس تجارب بدست آمده، با توجه به محدود بودن فضا در چاهک کنترل، تعداد مناسب سلول برای چاهک نباید بیشتر از ۱۰۰۰۰ سلول باشد. چرا که پس از گذشت زمان ۷۲ ساعت به علت تکثیر بالا سلولها دچار مرگ و میر می‌شوند. در مورد غلظتهای مهارکنندگی کال پروتکتین مشاهده شد که غلظت‌های پایین‌تر از ۲۵µg/ml آن اثر مهاری بسیار کمی دارد. بر اساس این آزمایشات غلظتهای مناسب کال پروتکتین تعیین گردید. در مورد انتخاب زمان مناسب انکوباسیون جهت مشاهده اثر مهارکنندگی کال پروتکتین بر سلولهای مورد مطالعه نیز دیده شد که در فواصل کوتاه مدت ۶، ۱۲ و ۱۸ ساعتی تغییرات بقاء سلولی قابل ملاحظه نیست و فواصل زمانی ۲۴ ساعتی انتخاب گردید.

www.SID.ir

Archive of SID

۲-۵. تعیین LC_{50} کال پروتکتین در رده سلولی مورد آزمایش (میزان مرگ سلول ها به میزان ۵۰ درصد در غلظت خاصی از پروتئین). جهت تعیین دوز ۵۰٪ کشندگی عصاره‌ها روی رده‌های مختلف سلولی، تمامی اطلاعات بدست آمده (در صد توکسیسیتی) از کنترل‌ها و تست‌ها وارد برنامه کامپیوتری Pharm-PCS statistical package (Springer-Verlag, New York) شده، میزان دقیق LC_{50} مربوطه تعیین شد. از آنجائیکه آزمایشات مربوط به ارزیابی سیتوتوکسیسیتی سه بار تکرار می‌شد محاسبه $LC_{50} \pm SD$ امکان پذیر گردید.

۲-۶. آنالیزهای آماری (Statistical analysis). همه نتایج بدست آمده در این مطالعه بر اساس تعداد آزمایشات شش تایی استوار می‌باشد که با گرفتن میانگین و محاسبه انحراف معیار میزان تغییرات محاسبه شد. تست‌های مقایسه‌ای مورد استفاده نیز شامل T تست و محاسبه Pvalue بود که با استفاده از SPSS انجام شد و تست مقایسه‌ای در یک گروه با آنالیز واریانس یک طرفه محاسبه شد و $P<0/05$ در هر تست در نظر گرفته شد.

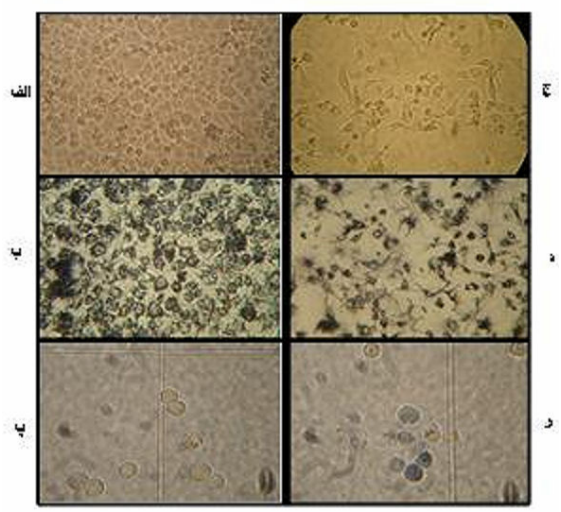
یافته‌ها

نتایج مربوط به تخلیص کال پروتکتین در مقاله‌ای جداگانه به چاپ رسیده است (۱۶) و در این مطالعه نتایج مربوط به اثرات بیولوژیک کال پروتکتین بر سلول‌های سرطانی با مقایسه دو روش رنگ سنجی تریپان بلو و MTT ارائه شده است.

در شکل ۱ رنگ آمیزی تریپان بلو و MTT در سلولهای کنترل و سلولهای انکوبه شده با دارو به نمایش در آمده است. میزان تکثیر سلولهای AGS تحت شیب غلظتی کال پروتکتین بین ۲۵ تا ۴۰۰µg/ml با دو روش رنگ سنجی اندازه‌گیری شد.

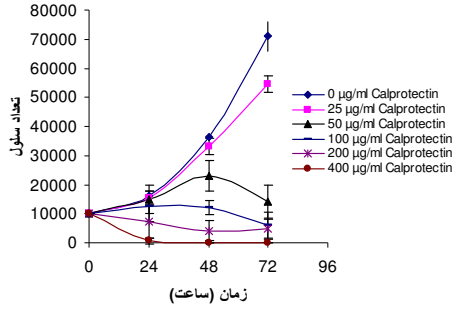
نمودار رشد سلولهای AGS در غیاب کال پروتکتین (کنترل منفی) و نیز غلظت‌های مختلف پروتئین مورد نظر با استفاده از رنگ آمیزی تریپان بلو وMTT به عنوان تابعی از زمان انکوباسیون به ترتیب در شکل ۲ و۳ نشان داده شده است.

درصد بقاء سلولهای سرطانی پس از تأثیر کال پروتکتین در غلظت‌های مختلف به عنوان تابعی از زمان انکوباسیون با روش رنگ‌آمیزی تریپان‌بلو و MTT در جدول های ۱ و۲ به نمایش گذاشته شده است.



شکل1

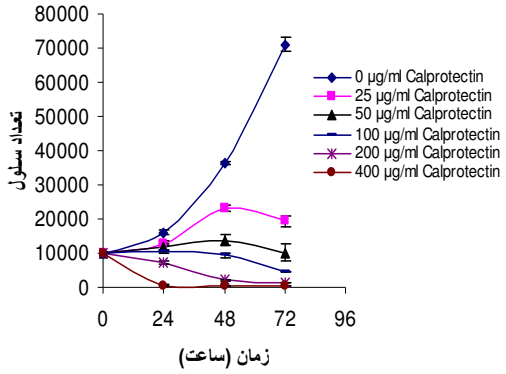
شکل ۱. سلول‌های AGS بعد از رنگ‌آمیزی با تریپان بلو و MTT.
الف-سلولهای کنترل (بدون اثر دارو)
ب- سلولهای کنترل (بدون اثر دارو) رنگ شده باMTT
پ- سلولهای کنترل (بدون اثر دارو) رنگ شده با تریپان بلو
ج- سلولهای انکوبه شده با دارو در غلظت LC_{50}
د- سلولهای انکوبه شده با دارو در غلظت LC_{50} رنگ شده با MTT
ر- سلولهای انکوبه شده با دارو در غلظت LC_{50} رنگ شده با تریپان بلو.



شکل۲. نمودار رشد سلولهای AGS در حضور غلظت‌های مختلف کال پروتکتین در فواصل زمانی مختلف به روش تریپان‌بلو.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۳. نمودار رشد سلولهای AGS بعد از اثر کال پروتکتین بر آنها در فواصل زمانی مختلف به روش MTT.

همانطور که در جدول ۱ و ۲ نشان داده شده است در غلظت صفر کال پروتکتین (کنترل) و در فواصل زمانی مختلف میزان بقاء سلولهای سرطانی ۹۶ تا ۹۸٪ با روش تریپان بلو و ۹۳ تا ۹۸٪ با روش MTT محاسبه شده است.

جدول ۱. میزان بقاء سلولهای AGS بعد از انکوباسیون با غلظت‌های مختلف کال پروتکتین در فواصل زمانی مختلف به روش تریپان‌بلو.

غلظت (µg/ml) / زمان (ساعت)	۰	۲۵	۵۰	۱۰۰	۲۰۰	۴۰۰
۲۴	*۹۸±۱	۹۷±۱/۵	۹۲/۷±۲/۵	۷۸±۲/۸	۴۵±۵	۴±۱/۷
۴۸	۹۷±۱/۷	۹۱/۶۷±۲/۸	۶۳/۳۳±۵/۷	۳۳/۳۳±۵/۷	۱۱/۷±۲/۸	۰
۷۲	۹۶±۲/۶	۹۱/۶۷±۲/۸	۲۰±۵	۸/۳۳±۲/۸	۶/۶۷±۲/۸	۰

* Mean±SD

جدول ۲. میزان بقاء سلول های AGS بعد از اثر غلظت های مختلف کال پروتکتین در فواصل زمانی مختلف به روش MTT.

غلظت (µg/ml) / زمان (ساعت)	۰	۲۵	۵۰	۱۰۰	۲۰۰	۴۰۰
۲۴	*۹۸±۱/۳	۸۰/۷۶±۱/۴	۷۳/۰۷±۰/۵	۶۵/۳۸±۱	۴۶/۱۷	۳/۸۴
۴۸	۹۴±۱/۴	۶۳/۸۲±۳/۹	۳۸/۱۲±۱/۵	۲۵/۷۰±۰/۱	۶/۲±۰/۲	۱/۰۶±۰/۲
۷۲	۹۳±۰/۷	۲۷/۳۳±۰/۸	۱۴/۲۷±۰/۱۷	۶/۶۶±۰/۳۴	۱/۷۳±۰/۰۵	۰/۹۵±۰/۰۵

* Mean±SD

در حالی که با افزایش غلظت کال پروتکتین میزان بقاء سلولهای سرطانی در هر دو روش بتدریج کاهش یافته و در غلظت ۴۰۰µg/ml بقاء سلولی به صفر می‌رسد.

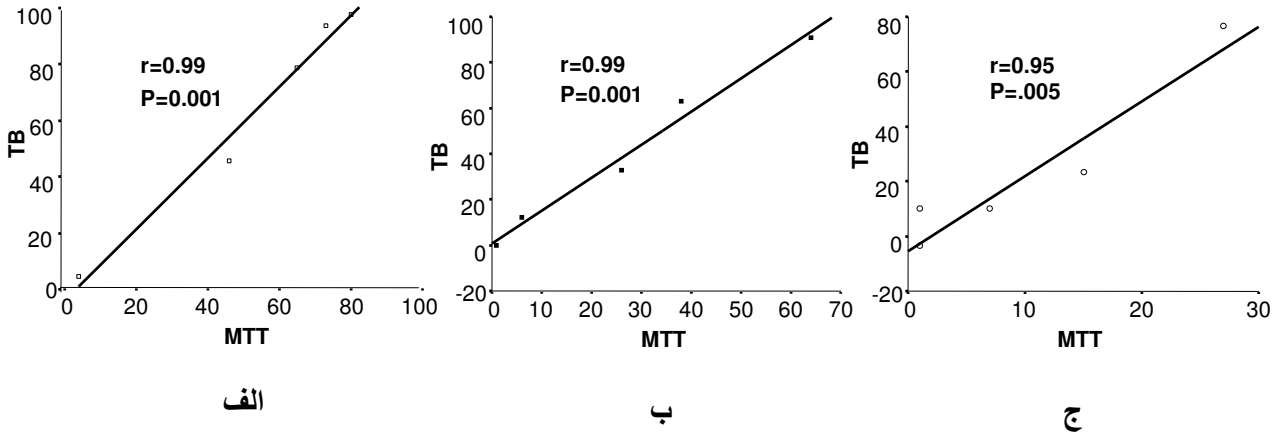
نکته قابل ملاحظه در این رابطه این است که همبستگی قابل ملاحظه‌ای بین نتایج بدست آمده در این رابطه از دو روش رنگ سنجی مشاهده می‌شود که این همبستگی از نوع خطی، مثبت و معنی‌دار می‌باشد ($p<۰/۰۰۱$ ، $p<۰/۰۰۱$ و $p<۰/۰۰۵$ به ترتیب مربوط به زمانهای ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت انکوباسیون سلولهای AGS با غلظتهای مختلف کال پروتکتین) (شکل ۴).

بعلاوه جداول ۱ و ۲ نشان می‌دهند که به طور قابل ملاحظه‌ای نتایج بدست آمده در دو روش با یکدیگر تفاوت داشته، به طوری که می‌توان روش MTT را نسبت به تریپان بلو حساس‌تر عنوان کرد.

در همین ارتباط LC_{50} کال پروتکتین بر سلولهای سرطانیAGS در فواصل زمانی مختلف در دو روش تریپان بلو و MTT محاسبه و مورد مقایسه قرار گرفت که در همه فواصل زمانی تفاوت معنی‌داری بین دو روش ملاحظه شد ($p<۰/۰۱$ تا $p<۰/۰۰۱$) (شکل ۵).

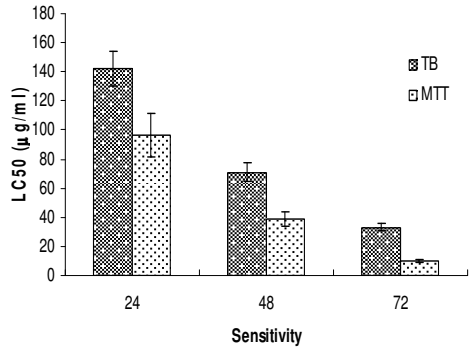
www.SID.ir

Archive of SID



شکل ٤ – نمودار رگرسیون اثر کال پروتکتین بر روی سلولهای AGS با دو روش رنگ سنجی تریپان بلو (TB) و MTT طی سه زمان مختلف انکوباسیون.

الف- انکوباسیون بعد از ٢٤ ساعت ب- انکوباسیون بعد از ٤٨ ساعت ج- انکوباسیون بعد از ٧٢ ساعت.



شکل ٥. مقایسه LC_{50} کال پروتکتین در طی سه زمان انکوباسیون بر روی سلولهای AGS با دو روش رنگ سنجی تریپان بلو (TB) و MTT.

LC50 بدست آمده در روش MTT در همه فواصل زمانی مطالعه شده پایین‌تر از روش تریپان بلو بوده (LC_{50} در فواصل زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در روش تریپان بلو به ترتیب ۱۴۱/۸، ۷۱ و ۳۳/۲۹µg/ml و در روشMTT به ترتیب ۹۶/۷۸، ۳۸/۶۶ و ۹/۸۶µg/ml محاسبه شد) و این نشان دهنده این مطلب است که روش MTT بطور قابل ملاحظه‌ای حساس‌تر از روش تریپان بلو می‌باشد.

بحـــث

در این مطالعه دو روش رنگ سنجی تریپان بلو وMTT جهت ارزیابی اثر کال پروتکتین بر رده سلول انسانی سرطان معده (AGS) مورد مقایسه قرار گرفتند. اساس رنگ‌آمیزی تریپان بلو بر جذب رنگ توسط سلولهای مرده است در حالی که سلولهای زنده اجازه ورود رنگ را به درون سلول نمی‌دهند و میزان توکیسیتی با شمارش مستقیم سلولهای زنده و مرده بدست می‌آید. محدودیت این روش آن است که سلولهای زنده نیز ممکن است رنگ را جذب کنند و این در شرایطی است که بیشتر از ۵ دقیقه در رنگ باقی بمانند. علاوه‌بر محدودیت در دقت این رنگ، مشکوک بودن به خواص کارسینوژنیک آن نیز استفاده از آن را محدود می‌کند. در رنگ‌آمیزی با MTT نمک زرد رنگ تترازولیوم به وسیله سلولهای زنده جذب و در اثر فعالیت آنزیم دهیدروژناز آزاد شده از میتوکندری‌های سالم، تبدیل به کریستال‌های بنفش رنگ نا

www.SID.ir

Archive of SID

محلول فرمازان می‌گردد (۲۲،۱۸) و به این ترتیب سلولهای فعال قادر به این تبدیل رنگ هستند (۲۱). البته میزان حساسیت این رنگ می‌تواند تحت تاثیر فاکتورهای ویژه‌ای از جمله حجم سلولی و مواد رنگی داخل سیتوپلاسم قرار گیرد (۱۸).

یکی از محدودیت‌های رنگ آمیزی با MTT نسبت به تریپان بلو در مواردی است که سلول دارای کلسترول بالاست و در چنین موردی درصد بقاء سلولها کاذب بوده و میزان جذب اندازه‌گیری شده کمتر از میزان واقعی آن است. زیرا در حضور کلسترول گرانولهای فرامازون از طریق اگزوسیتوز از سلول خارج می‌شوند در حالی که در همین شرایط و در رنگ آمیزی با تریپان بلو میزان بقاء سلولها بیشتر از رنگ‌آمیزی با MTT محاسبه خواهد شد (۲۱).

با توجه به نتایج بدست آمده (شکل ۲ و۳) مشاهده می‌شود که تکثیر سلولهای سرطانی AGS در حضور غلظت‌های مختلف کال‌پروتکتین در زمانهای مختلف انکوباسیون کاهش می‌یابد. در این شکل نشان داده شده است که اثر مهاری کال‌پروتکتین بر سلولهای ذکر شده به غلظت کال پروتکتین وابسته است بطوریکه دزهای بالاتر کال‌پروتکتین اثر مهاری شدیدتری را اعمال می‌کنند. تأثیر زمان انکوباسیون بر قدرت مهاری کال‌پروتکتین بگونه‌ای موثر است که در زمانهای انکوباسیون طولانی‌تر اثربخشی دزهای پایین‌تر کال‌پروتکتین چشمگیر بنظر می‌آید. گرچه اختلاف معنی‌دار بقاء سلولی ($P<۰/۰۵$) در سلولهای تحت اثر کال‌پروتکتین نسبت به کنترل در هر سه زمان با هر دو روش رنگ سنجی در همه غلظت‌ها به جز غلظت ۲۵ µg/ml در زمان انکوباسیون ۲۴ ساعت نیز آشکار است.

درصد بقاء سلولها در حضور غلظت‌های مختلف کال‌پروتکتین بصورت تابعی از زمان انکوباسیون در جداول ۱ و ۲ نمایش داده شده است، با توجه به این جداول ملاحظه می‌شود که بقا سلولها در حضور کال‌پروتکتین، نسبت به نمونه کنترل کاهش می‌یابد. در دو غلظت ۲۵ و ۵۰ µg/ml اختلاف نتایج در دو روش رنگ سنجی بیشتر آشکار است و در غلظت‌های بالاتر کال پروتکتین نتایج دارای انطباق بیشتری هستند.

در سلولهای مختلف سرطانی، غلظت مناسبی از کال‌پروتکتین که منجر به مهار سنتز DNA و رشد سلولی می‌شود ۵۰ تا ۲۰۰µg/ml و زمان لازم جهت اعمال اثر مهاری بر رشد سلولی از ۱۸ تا ۴۸ ساعت گزارش شده است (۸-۶، ۱۵، ۲۶-۲۳). در این مطالعه غلظتی از کال پروتکتین که تقریباً نصف سلولها (AGS) دچار مرگ و میر می‌شوند در طی سه زمان ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به ترتیب شامل ۹۶/۷۸، ۳۸/۶۶ و ۹/۸۶µg/ml تعیین شد.

جهت بررسی و مقایسه دقیق این دو روش در ارتباط با اثر کال پروتکتین بر AGS ، LC_{50} کال پروتکتین بر سلولهای سرطانی در دو روش محاسبه و مورد مقایسه قرار گرفتند که با توجه به نتایج رگرسیون هماهنگی قابل ملاحظه‌ای بین نتایج بدست آمده مشاهده می‌شود. گرچه در همه موارد LC_{50} بدست آمده در روش MTT پایین‌تر از روش تریپان بلو محاسبه شد و این نشان دهنده این مطلب است که روشMTT نسبت به روش تریپان‌بلو حساس‌تر می‌باشد. در همین ارتباط نتایج بررسی محققان دیگر نیز نشان داده که روشMTT نسبت به روشهای دیگر در سنجش توکسیسیتی سلولها دارای اختلاف معنی‌داری در غلظت LC_{50} مواد توکسیک می‌باشد (۲۷) و همواره LC_{50} بدست آمده با روش تریپان بلو نسبت به روشMTT بالاتر محاسبه می‌گردد (۲۹،۲۸). اما همبستگی خوبی بین نتایج این روش و روش رنگ سنجی تریپان بلو و تیمیدین نشاندار (^{3}H-thymidine) وجود دارد (۸). در سال ۲۰۰۲ مطالعه‌ای صورت گرفت که در آن سه روش سنجش توکسیسیتی تریپان بلو، نوترال رد و رادیواکتیو مورد مقایسه قرار گرفتند. این مطالعه نشان داد که نتایج حاصله از سه روش دارای همبستگی قابل ملاحظه‌ای بوده و از حساسیت قابل قبولی در خصوص تعیین میزان توکسیسیتی مواد بیولوژیک بر سلولها برخوردار می‌باشند ولی از آنجا که روشهای رنگ سنجی نسبت به روش رادیو اکتیو کم خطرتر و راحتر است این روشها بجای روش رادیو اکتیو پیشنهاد می‌گردد (۵). بنا به گزارش بسیاری از محققین، روش رنگ سنجی MTT روشی سریع، دقیق و آسان در تعیین حساسیت داروهای ضدسرطانی در طی پروسه درمان بیماران می‌باشد (۴، ۳۲- ۳۰) و می‌توان به عنوان یک روش روتین در درمان از آن استفاده کرد. با در نظر گرفتن نتایج بدست آمده در این مطالعه، نشان داده شد که کال‌پروتکتین در روش MTT بطور موثرتری (با غلظت کمتر یا LC_{50} پائین‌تر)

www.SID.ir

Archive of SID

نسبت به روش تریپان بلو باعث مهار رشد سلولهای سرطانی معده انسان شده است.

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از دو نوع روش مطالعه توکسیسیتی کال پروتکتین بر سلولهای سرطانی معده هماهنگ بوده و اثر سایتوتوکسیسیتی کال پروتکتین بر روی سلولهای سرطانی معده (AGS) را تأیید می‌کنند و با توجه به اینکه روش MTT نسبت به تریپان بلو حساس‌تر، دقیق‌تر و آسان‌تر می‌باشد می‌توان نتیجه گرفت که این روش، روشی کارآمد در بررسی نحوه عملکرد داروهای ضدسرطانی بر روی رده‌های سلولی می‌باشد.

تشکر و قدردانی. بدینوسیله از زحمات جناب آقای جلال‌الدین رادفر، سرکار خانم احمدی و آقای شیرخانی از کارکنان بانک سلولی انستیتو پاستور ایران که در این مطالعه ما را یاری نمودند تشکر و قدردانی می‌گردد.

References

1. Matsushita T, Brendzel AM, Shotola MA, Groh KR. Electrical determination of viability in saline-treated mouse myeloma cells. Biophys J 1982; 39(1): 41-47.

2. Goodwin CJ, Holt SJ, Downes S, Marshall NJ. Microculture tetrazolium assays: a comparison between two new tetrazolium salts, XTT and MTT. J Immunol Meth 1995; 179(1): 95-103.

3. Buttke TM, McCubrey JA, Owen TC. Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay to measure viability and proliferation of lymphokine-dependent cell lines. J Immunol Meth 1993; 157(1-2): 233-240.

4. Weichert H, Blechschmidt I, Schroder S, Ambrosius H. The MTT-assay as a rapid test for cell proliferation and cell killing: application to human peripheral blood lymphocytes (PBL). Allerg Immunol (Leipz) 1991; 37(3-4): 139-144.

5. Heidari M, Ghazi-Khansari M, Shokri F. Comparative measurement of in vitro T-2 toxin cytotoxicity using three different cytotoxicity assays. Toxicol Mech Meth 2003; 13: 153-155.

6. Yui S, Nakatani Y, Mikamim M. Calprotectin (S100A8/S100A9), an Inflammatory Protein Complex from Neutrophils with a Broad Apoptosis-Inducing Activity. Biol Pharm. Bull 2003; 26(6): 753-760.

7. Ghavami S, Kerkhoff C. Mechanism of apoptosis induced by s100A8/A9 in colon cancer cell lines; the role of ROS and the effect of metal ions. J Leuk Biol 2004; 76(6): 169-175.

8. Nakatani Y, Yamazaki M, Walter J, Chazin WJ, Yui S. Regulation of S100A8/A9 (calprotectin) binding to tumor cells by zinc ion and its implication for apoptosis-inducing activity mediators. Inflammation 2005; 5: 280–292.

9. Poullis A, Irwin AG, Dearing M, Gordon C, Britten AJ, Heenan S, Maxwell JD. Repeat planar white cell scanning to monitor short-term therapy of active inflammatory bowel disease: a methodological study and comparison with clinical scores and novel inflammatory markers. Eur J Gastroenterol Hepatol 2006; 18(6): 607-614.

10. Kido J, Hayashi N, Kataoka M, Shinohara Y, Nagata T. Norepinephrine stimulates calprotectin expression in human monocytic cells. J Periodon Res 2006; 41(3): 159-164.

11. Ishikawa k, Nakagawa A, Tanaka I, Suzuki M,

www.SID.ir

Archive of SID

Nishihira J. The structure of human MRP8, a member of the S100 calcium-binding protein family, by MAD phasing at 1.9 resolution. Acta. Cryst 2000; 56: 559-566.

12. Sohnle PG, Hunter MJ, Hahn B, Chazin WJ. Zinc-reversible antimicrobial activity of recombinant calprotectin (migration inhibitory factor-related proteins 8 and 14). J Infect Dis 2000; 182(4): 1272-1275.

13. Mikami M, Kitahara M, Kitano M, Ariki Y, Mimaki Y, Sashida Y, Yamazaki M, Yui S. Suppressive activity of lycoricidinol (narciclasine) against cytotoxicity of neutrophil-derived calprotectin, and its suppressive effect on rat adjuvant arthritis model. Biol Pharm Bull 1999; 22(7): 674-678.

14. Ryckman C, Vandal K, Rouleau P, Talbot M, Tessier FA. Proinflammatory activities of S100: proteins S100A8, S100A9, and S100A8/A9 induce neutrophil chemotaxis and adhesion. J Immunol 2003; 170: 3233-3242.

15. Yui S, Mikami M, Yamazaki M. Induction of apoptotic cell death in mouse lymphoma and human leukemia cell lines by a calcium-binding protein complex, calprotectin, derived from inflammatory peritoneal exudate cells. J Leuk Biol 1995; 58(6): 650-658.

16. Yousefi R, Ardestani SK, Saboury AA, Kariminia A, Zeinali M, Amani M. Investigation on the surface hydrophobicity and aggregation kinetics of human calprotectin in the presence of calcium. J Bioch Mol Biol 2005; 38(4): 407-413.

17. Moldeus T, Hogberg J, Orrhenius S, Fleischer S, and Packer L. Trypan blue dye exclusion method. Meth Enzym 1978; 52: 60-71.

18. Hayon T, Dvilansky A, Shpilberg O, Nathan I. Appraisal of the MTT-based assay as a useful tool for predicting drug chemosensitivity in leukemia. Leuk. Lymphoma 2003; 44(11): 1957-1962.

19. Francis D, Rapid RL. Colorometric assay for cell growth and survival: modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability J Immunol Meth 1986; 89: 271-277.

20. Francis D, and Rita L. Rapid colorometric assay for cell growth and survival. modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. J Immunol Meth 1986; 89: 271-277.

21. Ahmad S, Ahmad A, Schneider KB, White CW. Cholesterol interferes with the MTT assay in human epithelial-like (A549) and endothelial (HLMVE and HCAE) cells. Int. J Toxicol 2006; 25(1): 17-23.

22. Wang X, Ge J, Wang K, Qian J, Zou Y. Evaluation of MTT assay for measurement of emodin-induced cytotoxicity. Assay Drug Dev. Technol 2006; 4(2): 203-207.

23. Yui S, Mikami M, Yamazaki M. Purification and characterization of the cytotoxic factor in rat peritoneal exudates cells:its identification as calcium binding protein complex,calprotectin. J Leuk Biol 1995; 58: 307-316.

24. Yui S, Mikami M, Tsurumaki K, Yamazaki M. Growth-inhibitory and apoptosis inducing activities

www.SID.ir

Archive of SID

of calprotectin derived from inflammatory exudate cells on normal fibroblasts: regulation by metal ions. J Leuk Biol 1997; 61: 50-57.

25. Yui S, Mikami M, Kitahara M, Yamazaki M. The inhibitory effect of lycorine on tumor cell apoptosis induced by polymorphonuclear leukocyte-derived calprotectin. Immunopharmacology 1998; 40(2): 151-162.

26. Johne B, Fagerhol MK, Lyberg T, Prydz H, Brandtzaeg P, Naess-Anderen CF, Dale I. Functional and clinical aspects of the myelomonocyte protein calprotectin. J Clin Pathol Mol Pathol 1997; 50: 113-123.

27. Marks DC, Belov L, Davey MW, Davey RA, Kidman AD. The MTT cell viability assay for cytotoxicity testing in multidrug-resistant human leukemic cells. Leuk. Res 1992; 16(12): 1165-1167.

28. de Haan P, Heemskerk AE, Gerritsen A, de Boer EM, Sampat S, van der Raaij-Helmer EM, Bruynzeel DP. Comparison of toxicity tests on human skin and epidermoid (A431) cells using free fatty acids as test substances. Clin. Exp. Dermatol 1993; 18(5): 428-433.

29. Chan SC, Hui L, Chen HM. Enhancement of the cytolytic effect of anti-bacterial cecropin by the microvilli of cancer cells. Anticancer Res 1998; 18(6A): 4467-4474.

30. Fotakis G, Timbrell JA. In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. Toxicol Lett 2006; 5: 160(2): 171-177.

31. Ulukaya E, Colakogullari M, Wood EJ. Interference by anti-cancer chemotherapeutic agents in the MTT-tumor chemosensitivity assay. Chemotherapy 2004; 50(1): 43-50.

32. Yu KJ, Ng HT, Chao KC, Chang CC, Kan YY. Chemosensitivity testing of an ovarian cancer cell line: comparison of MTT assay and [3H]-thymidine incorporation. Zhonghua. Yi. Xue. Za. Zhi. (Taipei) 1991; 47(2): 79-85.

www.SID.ir