

The effect of sodium butyrate as a histone deacetylase inhibitor on the gene expression of *Bid* in HT-29 human colorectal cancer cell line

Najmeh Amiri¹, Flora Forouzesh¹, Ehsan Nazemalhosseini- Mojarad², Mahdi Shabani

¹ Department of Genetics, Faculty of Advanced Science and Technology, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran

² Department of Cancer, Gastroenterology and Liver Disease Research Center, Research Institute for Gastroenterology and Liver Diseases, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

³ Department of Immunology, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Abstract

Background: Sodium butyrate (NaBr), a histone deacetylase inhibitor, has emerged as a promising anticancer drug for multiple cancers. The aim of this study was to investigate the effect of sodium butyrate on the changes in the expression of the *Bid* gene in human colorectal cancer cell line.

Materials and methods: HT-29 cell line was cultured. Cells were treated with different concentration of NaBr (from 6.25 mM to 200mM) for 24, 48 and 72 hours. Cytotoxicity and IC₅₀ were evaluated by MTT assay. The effect of NaBr on *Bid* gene expression was examined by PCR and qRT-PCR.

Results: The IC₅₀ for 24, 48, and 72 hours were 95mM, 25mM and, 12.5mM respectively. Antiproliferative activity of NaBr was dependent on time and dose manner. The results of real time PCR showed that the expression of *Bid* gene in treated cells with IC₅₀ concentration increased significantly (p<0.05) in comparison with the control group.

Conclusion: The results showed that NaBr inhibited the growth and induced apoptosis in the HT-29 cell line which can be due to the increase in *Bid* gene expression. So, the change in expression of the apoptosis genes can effect by histone deacetylase inhibitors.

Keywords: Colorectal cancer, *Bid* gene, Sodium butyrate, HT-29.

Cited as: Amiri N, Forouzesh F, Nazemalhosseini- Mojarad E, Shabani M. The effect of sodium butyrate as a histone deacetylase inhibitor on the gene expression of *Bid* in HT-29 human colorectal cancer cell line. Medical Science Journal of Islamic Azad University, Tehran Medical Branch 2020; 30(1): 40-50.

Correspondence to: Flora Forouzesh

Tel: +98 22006660

E-mail: f8forouzesh@gmail.com

ORCID ID: 0000-0002-2747-3479

Received: 23 Jan 2019; **Accepted:** 28 May 2019

اثر سدیم بوتیرات به عنوان مهار کننده هیستون داستیلاز بر روی تغییر بیان ژن *Bid* در رده سلولی HT-29 سرطان کولون انسانی

نجمه امیری^۱، فلورا فروزش^۱، احسان ناظم الحسینی-مجرد^۲، مهدی شعبانی^۳

^۱ گروه ژنتیک، دانشکده علوم و فناوری های نوین، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
^۲ گروه سرطان، مرکز تحقیقات بیماری های گوارش و کبد، پژوهشکده بیماری های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
^۳ گروه ایمنولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

چکیده

سابقه و هدف: سدیم بوتیرات (*NaBr*) مهار کننده هیستون داستیلاز است که به عنوان داروی ضدسرطان امیدبخشی برای درمان سرطان های متعددی ظهور کرده است. هدف از این مطالعه، بررسی اثر *NaBr* بر روی تغییر بیان ژن *Bid* در رده سلولی سرطان کولون انسانی است.

روش بررسی: رده سلولی HT-29 کشت داده شد. سلول ها با غلظت های مختلف *NaBr* (۶/۲۵mM الی ۲۰۰mM) تیمار شدند و سمیت سلولی و IC₅₀ با تست MTT تعیین شد. سپس تغییرات بیان ژن *Bid* به صورت کیفی و کمی با روش های PCR و qRT-PCR بررسی شد. یافته ها: غلظت IC₅₀ مناسب برای تیمار سلول های HT-29 در زمان های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به ترتیب ۹۵mM، ۲۵mM و ۲/۵mM است و خاصیت ضد تکثیری *NaBr* وابسته به دوز و زمان است. نتایج حاصل از Real-time PCR نشان داد *NaBr* در غلظت IC₅₀ می تواند سبب افزایش معنی دار بیان ژن *Bid* شود ($p < 0.05$).

نتیجه گیری: نتایج نشان داد *NaBr* باعث مهار رشد و القا آپوپتوز در رده سلولی HT-29 می شود که می تواند ناشی از افزایش بیان ژن *Bid* باشد. لذا تغییر بیان ژن های آپوپتوزی می تواند تحت تاثیر مهارکننده های هیستون داستیلاز تغییر کند.

واژگان کلیدی: سرطان کولورکتال، ژن *Bid*، سدیم بوتیرات، HT-29.

مقدمه

می افتد. مسیر خارجی از طریق گیرنده مرگ FAS آغاز می شود و مسیر داخلی باعث آزاد شدن سیتوکروم C از میتوکندری و فعال شدن پیام های مرگ می شود. این دو مسیر توسط مولکول رابطی به نام BID به یکدیگر مرتبط می شوند. هر دو مسیر یک وجه اشتراک دارند که آن فعال کردن کاسپازها است. یک گروه از پروتئین های مهم تشکیل دهنده مسیر داخلی، پروتئین های خانواده Bcl2 هستند. خانواده Bcl2 خود شامل دو گروه، اعضای آنتی آپوپتوتیک؛ شامل Bcl1، Bcl2، Bclx1 و اعضای پروآپوپتوتیک؛ شامل Bak، Bax، Puma، Noxa، Bim و Bid است (۵-۲). BID جز خانواده Bcl2 است و فقط حاوی دومین BH3 است که برای ارتباط آن با پروتئین های خانواده Bcl-2 و برای فعالیت پیش

سرطان کولون (CRC) چهارمین عامل مرگ مرتبط با سرطان در جهان است. در اروپا، آمریکای شمالی، استرالیا و نیوزلند، این سرطان دومین عامل مرگ، بعد از سرطان ریه یا سینه است که آمار مرگ و میر ناشی از آن در حال افزایش است (۱). توانایی فرار از آپوپتوز یکی از علت های تغییر فیزیولوژی سلول و ایجاد سرطان است. آپوپتوز طی دو مسیر اصلی اتفاق

آدرس نویسنده مسئول: تهران، دانشکده علوم و فناوری های نوین، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، دکتر فلورا فروزش (email: f8forouzesht@gmail.com)
ORCID ID: 0000-0002-2747-3479
تاریخ دریافت مقاله: ۹۷/۱۱/۳
تاریخ پذیرش مقاله: ۹۸/۳/۷

رشد سلول سرطانی یا آپوپتوز در بدن (In vivo) و در محیط آزمایشگاه (In vitro) می‌شوند (۱۱). توسط داروهای اپی ژنتیکی، امکان بازگشت بیان نابجای ژن در ارتباط با بیماری‌های مختلف وجود دارد و همین امر آنها را برای هدف درمانی ضروری کرده است (۱۲). اسیدهای چرب کوتاه زنجیر (Short chain fatty acid: SCFA)، عمده محصول تخمیر باکتریایی حاصل از فیبرهای غذایی هضم نشده در روده بزرگ هستند. اسیدهای چرب کوتاه زنجیر، به خصوص پروپیونات و بوتیرات، در سلول‌های سرطانی کولون سبب جلوگیری از تکثیر سلول‌ها و القای آپوپتوز می‌شوند (۱۳). بوتیرات همچنین نقش خود را به عنوان مهارکننده هیستون داستیلاز، در تامین انرژی سلول‌های کولون، القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی کولون و کاهش التهاب روده‌ای ایفا می‌کند (۱۴). سدیم بوتیرات در روده انسان در غلظت بالا، به عنوان متابولیت‌های غذایی، وجود دارد. در محیط آزمایشگاه، سدیم بوتیرات نقش قدرتمندی را در مهار رشد و القای تمایز سلول‌های سرطانی و ایجاد آپوپتوز ایفا می‌کند (۱۵، ۱۶). بنابراین، سدیم بوتیرات به عنوان ماده‌ای که روی کاهش فاکتورهای خطری که در اتیولوژی سرطان کولون و ایجاد آدنوما درگیر هستند، در نظر گرفته می‌شود (۱۷). داروی ضدسرطان ایده‌آل، دارویی است که برای سلول‌های بدخیم سمی باشد و کمترین سمیت را برای سلول‌های طبیعی داشته باشد. امروزه، تعداد محدودی داروی قابل دسترس با این ویژگی برای مصرف بالینی وجود دارد؛ بنابراین، تولید داروهای انتخابی برای سرطان حائز اهمیت است (۱۳). داده‌ها نشان می‌دهند که سدیم بوتیرات روی بیان ژن، فعال کننده‌های رونویسی و استیلاسیون هیستون در سلول‌های سرطانی اثرگذار است، اما در سلول‌های طبیعی اثر بسیار کمی دارد (۱۸). با توجه به اهمیت مهار کننده‌های هیستون داستیلاز در سرطان‌ها و اثر آنها بر روی تغییرات بیان ژن‌ها، و همچنین اهمیت ژن Bid به عنوان رابط بین دو مسیر مرگ برنامه ریزی شده سلول، مرگ آپوپتوتیک، در این پژوهش اثر سدیم بوتیرات به عنوان مهارکننده هیستون داستیلاز بر روی تغییر بیان ژن Bid در رده سلولی سرطان کورکتال انسانی، HT-29 بررسی شد.

مواد و روشها

کشت سلول

رده سلولی HT-29 از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران تهیه و در محیط کشت RPMI-1640 (Gibco - انگلستان) با ۱۰٪ FBS (Biosera - کانادا) و آنتی بیوتیک‌های استرپتومایسین

مرگی آن مورد نیاز است. BID نقش مهمی در مسیر پیام رسانی آپوپتوز برعهده دارد، چرا که BID به واسطه پروتئین‌های Bcl2 مسیر پیام رسانی گیرنده‌های مرگ را به مسیر پیام رسانی میتوکندریایی مرتبط می‌کند. لیگاند‌های گیرنده‌های مرگ، کاسپاز ۸ را فعال می‌کنند، و متعاقباً کاسپاز ۸، پروتئین BID را برش می‌دهد و بخشی از C-terminal آزاد می‌شود که در آزاد سازی سیتوکروم C از میتوکندری همکاری می‌کند (۶).

با پیشرفت تومور، مقدار بیان Bcl2های آنتی آپوپتوتیک به صورت قابل ملاحظه‌ای افزایش پیدا می‌کند. پیش بینی می‌شود که بیان ژن Bid نیز افزایش پیدا کند. در سرطان‌های مختلف بیان این ژن مورد بررسی قرار گرفته که نشان می‌دهد این ژن در میان سرطان‌های مختلف مقدار بیان نسبتاً ثابتی دارد. تفاوت اندک بیان Bid در انواع سرطان‌ها نشان می‌دهد که موتاسیون Bid بسیار نادر است (چیزی در حدود ۱/۶) اما همین تفاوت با مقاومت بیمار نسبت به شیمی درمانی در ارتباط است. جهش در Bid که با حذف هلیکس‌های ۶، ۷ و ۸ همراه است باعث کاهش توانایی مولکول در القا آپوپتوز و مرگ سلولی می‌شود (۷). بیان پروتئین BID در انواع سرطان‌های انسانی بررسی شده است و نتایج نشان داده که بیان آن در سرطان‌های مختلف و مراحل مختلف پیشرفت تومور به طور قابل ملاحظه‌ای متفاوت است (۸).

شناسایی تغییرات قابل وراثت در بیان ژن که نتیجه وقایع اپی ژنتیکی است، سبب ارائه راه کارهایی برای پیشگیری، تشخیص زودرس و درمان سرطان است. استیلاسیون هیستون و متیلاسیون DNA تغییرات اپی ژنتیکی هستند که الگوهای اپی ژنتیکی آنها را می‌توان به عنوان عامل قابل وراثت در نظر گرفت، که ارسال صحیح وضعیت کروماتین و پروفایل بیان ژنی را در نسل‌های سلولی تامین می‌کنند. در سرطان‌های انسانی، الگو و سطوح متیلاسیون DNA و استیلاسیون هیستون، به طور چشمگیری تغییر می‌کند (۹). استیلاسیون هیستون‌ها، ساختار کروماتین را باز می‌کند و به فاکتورهای رونویسی اجازه فعالیت می‌دهد. آنزیم‌های هیستون داستیلازها (HDAC: Histone deacetylase)، به علت داستیلاسیون هیستون‌ها، سبب فشرده شدن کروماتین شده و می‌توانند به عنوان سرکوبگر رونویسی عمل کنند. مهارکننده‌های هیستون داستیلاز (HDACi: Histone deacetylase inhibitor) به صورت انتخابی رونویسی ژن را با تغییر در کروماتین و تغییرات ساختار پروتئین‌های دخیل در رونویسی، تغییر می‌دهند. HDACiها از لحاظ ساختاری، ترکیبات متنوعی هستند که به صورت عوامل ضدسرطانی عمل می‌کنند (۱۰) و سبب توقف

IC₅₀ (۶/۲۵Mm) بر رشد و تکثیر سلول‌های سرطانی و تعیین (half maximal inhibitory concentration)، از روش MTT استفاده شد. سپس درصد بقای سلول‌های تیمار شده با غلظت‌های مختلف سدیم بوتیرات از فرمول زیر محاسبه شد.

درصد بقا (%): (جذب نوری رنگ تولیدی در سلول‌های تیمار شده / جذب نوری رنگ تولیدی در سلول‌های تیمار نشده) × ۱۰۰
از سلول‌های تیمار شده با ۲۰٪ DMSO (Sigma-امریکا) به عنوان کنترل مثبت، و از سلول‌های تیمار نشده و سلول‌های تیمار شده با حلال سدیم بوتیرات (آب) به عنوان کنترل‌های منفی استفاده شد. جهت تعیین IC₅₀ از نرم افزار آنلاین the JavaScript version of PolySolve (07.20.2013) استفاده شد.

استخراج RNA و واکنش رونویسی معکوس (RT-PCR)

با توجه به غلظت IC₅₀، سلول‌های HT-29 در دو بازه زمانی ۲۴ ساعت و ۴۸ ساعت تحت تیمار با طیفی از غلظت‌های مختلف سدیم بوتیرات قرار گرفتند. به طوری که در بازه زمانی ۲۴ ساعت تحت تیمار با غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی مولار و در بازه زمانی ۴۸ ساعت تحت تیمار با غلظت‌های ۱۲/۵، ۲۵ و ۵۰ میلی مولار قرار گرفتند. از سلول‌های تیمار نشده به عنوان گروه کنترل استفاده شد. سپس RNA با استفاده از کیت (شرکت یکتا تجهیز آزما-ایران)، از سلول‌های تیمار شده و تیمار نشده به عنوان گروه کنترل استخراج شد. پس از استخراج RNA، کمیت و کیفیت آن به ترتیب توسط روش اسپکتروفتومتری و الکتروفورز ژل آگارز ۱٪ بررسی شد.

به منظور سنتز cDNA، از کیت (شرکت یکتا تجهیز آزما-ایران) استفاده شد. ابتدا ویال حاوی ۲۰۰۰ نانوگرم RNA به منظور باز شدن پیچ خوردگی‌های RNA، به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد در دستگاه ترموسیکلر (پندورف-آلمان) قرار گرفت. سپس بلافاصله روی یخ منتقل شد. پس از اضافه کردن ۴ میکرولیتر بافر 5X، ۱ میکرولیتر dNTP با غلظت 10mM، ۰/۵ میکرولیتر Rnasin و ۱ میکرولیتر آنزیم رونویسی معکوس (M-MLV) به آن، ویال مورد نظر با حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر، به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و سپس ۵ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد.

جهت بررسی صحت cDNA سنتز شده، واکنش PCR با پرایمر اختصاصی GAPDH به عنوان ژن خانه داری (Housekeeping gene) انجام شد. توالی پرایمر بالا دست ژن GAPDH، 5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3' و توالی پرایمر پایین دست ژن GAPDH، 5'-GAAGATGGTGATGGGATTTTC-3' با کد شناسایی (Accession no) ۱۰۱۴۲۷۷ است که قطعه ۲۲۶ جفت بازی را تکثیر می‌کند.

(۱۰۰ μg/ml) (Gibco-انگلستان) و پنی سیلین (۱۰۰ U/ml) (Gibco-انگلستان)، در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، ۵٪ Co2 و رطوبت ۹۵٪ کشت داده شد. پس از اینکه سلول‌ها ۸۰٪ سطح فلاسک را پر کردند، پاساژ داده شدند. سپس آزمایشات روی رده سلولی آغاز شدند.

شمارش و تعیین درصد سلول‌های زنده

شمارش سلولی به روش Trypan blue exclusion انجام شد. برای این منظور، ابتدا سلول‌ها توسط محلول 0.25% trypsin-EDTA (Gibco-انگلستان) تریپسینه شدند و پس از سانتریفیوژ به رسوب سلولی محیط کشت اضافه شد. ۲۵ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی با ۲۵ میکرولیتر رنگ تریپان بلو ۴٪ (Sigma-امریکا) مخلوط شد. پس از ۱ دقیقه، با استفاده از لام هموسیتمتر نفوبار و زیر میکروسکوپ نوری سلول‌ها شمرده شدند.

محاسبه درصد سلول‌های زنده با استفاده از فرمول زیر انجام شد:
۱۰۰ × (کل سلول شمارش شده / تعداد سلول زنده) = Viability (%)

سپس شمارش و تعیین درصد سلول‌ها در هر میلی لیتر از رابطه زیر محاسبه شد.

(ضریب رقت) × ۱۰^۴ × تعداد سلول شمارش شده در هر مربع لام هموسیتمتر نفوبار = تعداد سلول در هر میلی لیتر

بهینه سازی تعداد سلول

بهینه کردن تعداد سلول به این منظور است که مشخص شود در زمان‌های مختلف انکوباسیون (۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت) چه تعداد سلول مناسب است. یعنی باید تعداد مناسب سلول را قبل از گذاشتن تست‌های تیمار در زمان‌های مختلف انکوباسیون مشخص کرد. زیرا سرعت رشد هر سلول متفاوت است. برای این منظور رقت‌های سلولی مختلف از ۴۰۰ هزار سلول الی ۲۰ هزار سلول در پلیت ۹۶ حفره کاشته شد و در سه زمان مختلف ۲۴ ساعت، ۴۸ ساعت و ۷۲ ساعت داخل انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. برای هر حفره با تعداد مشخص سلول، سه تکرار در نظر گرفته شد. پس از زمان انکوباسیون، میزان بقای سلول‌ها با روش رنگ سنجی MTT (Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide) مورد ارزیابی قرار گرفت.

بررسی سمیت سلولی توسط تست MTT

جهت بررسی سمیت غلظت‌های مختلف سدیم بوتیرات (۲۰۰mM، ۱۵۰mM، ۱۰۰mM، ۵۰mM، ۲۰mM، ۱۲/۵mM)

جهت انجام واکنش PCR، اجزای واکنش در حجم ۲۵ میکرولیتر تهیه شد که شامل ۲/۵ میکرولیتر بافر 10X، ۰/۷۵ میکرولیتر Mgcl2 با غلظت 50mM، ۰/۵ میکرولیتر dNTP با غلظت 10mM، ۰/۷۵ میکرولیتر پرایمر فرادست (10 pmol)، ۰/۷۵ میکرولیتر پرایمر فرودست (10 pmol)، ۰/۱ میکرولیتر آنزیم Taq، ۱۸/۷۵ میکرولیتر dH2O و ۱ میکرولیتر cDNA است. PCR با برنامه دمایی، مرحله آغاز ۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، مراحل اصلی واکنش شامل ۳۰ چرخه که قسمت باز شدن دو رشته ۳۵ ثانیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، اتصال پرایمرها به مدت ۴۰ ثانیه در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد و طولی سازی به مدت ۳۵ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد. همچنین طولی سازی نهایی به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد در دستگاه ترموسیکلر (اپندورف-آلمان) انجام شد.

بررسی ژن Bid با روش Conventional PCR

جهت بررسی کیفی ژن Bid در سلول‌های تحت تیمار با غلظت‌های متفاوت سدیم بوتیرات و سلول‌های تیمار نشده، واکنش PCR با پرایمرهای Bid با توالی فرادست 5'_AAGTGGCTGGGCTGGCAAG_3' و فرودست 5'_CCAGTGGCGACAGAATCCG_3' انجام شد (۲۱). اجزای واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر تهیه شد که شامل ۲/۵ میکرولیتر بافر 10X، ۱/۵ میکرولیتر Mgcl2 با غلظت 50mM، ۰/۵ میکرولیتر dNTP با غلظت 10mM، ۰/۷۵ میکرولیتر پرایمر فرادست (10 pmol)، ۰/۷۵ میکرولیتر پرایمر فرودست (10 pmol) و ۱۷/۷۵ میکرولیتر Taq، ۱۷/۷۵ میکرولیتر dH2O و ۱ میکرولیتر cDNA است. میکروتیوب‌ها جهت انجام PCR در دستگاه ترموسیکلر (اپندورف-آلمان) با برنامه دمایی، مرحله آغاز ۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، مراحل اصلی واکنش شامل ۴۰ چرخه که قسمت باز شدن دو رشته، ۴۵ ثانیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، اتصال پرایمرها به مدت ۴۰ ثانیه در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد و طولی سازی به مدت ۴۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد. همچنین طولی سازی نهایی به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد.

بررسی کمی بیان ژن Bid با استفاده از تکنیک qReal Time-PCR

به منظور بررسی کمی بیان ژن Bid quantitative Real Time-PCR با استفاده از کیت PrimeScript™ RT reagent Kit (TAKARA_ژاپن) و دستگاه Rotor gene (آلمان_Qiagen) انجام شد. اجزای واکنش طبق دستورالعمل کیت شامل ۱۰ میکرولیتر مخلوط سایبرگرین فلوروسنت، ۱ میکرولیتر پرایمر فرادست (10 pmol)، ۱ میکرولیتر پرایمر فرودست (10 pmol)، ۷

میکرولیتر dH2O و ۱ میکرولیتر cDNA است، تهیه شد. از ژن بتا 2 میکروگلوبولین (β2m) به عنوان کنترل داخلی استفاده شد که توالی پرایمر فرادست شامل 5'-TGCTGTCTCCATGTTTGATGTATCT-3' و توالی پرایمر فرودست شامل 5'-TCTCTGCTCCCCACCTCTAAG-3' با کد شناسایی KP129981.1 است. لازم به ذکر است که همه واکنش‌ها به صورت دوتایی در استریپ‌های ۸ تایی انجام شدند. برنامه حرارتی Real Time-PCR برای هر دو ژن، عبارت بود از مرحله باز شدن ابتدایی دو رشته به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، باز شدن دو رشته، به مدت ۵ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد و اتصال پرایمرها به مدت ۳۴ ثانیه در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد، که توسط دستگاه Rotor gene (Qiagen_آلمان) انجام شد.

روش آماری

برای کمی سازی نسبی روش‌های مختلفی استفاده می‌شود که یکی از آنها روش Ct (cycle threshold) مقایسه‌ای است. در این روش مقدار هدف نرمال شده نسبت به یک کنترل داخلی و نسبت به یک کالیبراتور با استفاده از فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$ محاسبه می‌شود. هنگام استفاده از روش Ct مقایسه‌ای، می‌توان با استفاده از داده‌های حاصل در طول آزمایش PCR، یعنی مقادیر Ct، آنها را مستقیماً نسبت به یک مرجع درونی نرمال کرد و دیگر نیازی به تهیه منحنی استاندارد برای ژن هدف و کنترل درونی در تمام نمونه‌های آزمایشی نیست.

در این پژوهش، ابتدا میزان take off و میزان تکثیر (amplification) با استفاده از نرم افزار Rotor gene 2013 به دست آمد، سپس با استفاده از نرم افزار Rest آنالیز آماری داده‌ها انجام شد و سطح آماری کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

بهینه کردن تعداد سلول

بهینه سازی تعداد سلول مناسب در سه بازه زمانی ۲۴ ساعت، ۴۸ ساعت و ۷۲ ساعت برای رده سلولی HT-29 از رقت ۴۰۰ هزار الی ۲۰ هزار سلول انجام شد. جذب نوری (OD) مناسب ناشی از رشد و تعداد مناسب سلول‌ها در طول موج ۵۴۶/۶۳۰nm، بین ۱ الی ۱/۵ است. نتایج حاصل از تست MTT، تعداد مناسب سلول جهت تیمار در زمان های انکوباسیون ۲۴ ساعت، ۴۸ ساعت و ۷۲ ساعت را به ترتیب ۸۰ هزار سلول، ۵۰ هزار سلول و ۵۰ هزار سلول نشان داد (نمودار ۱).

بررسی سمیت سلولی غلظت‌های مختلف سدیم بوتیرات

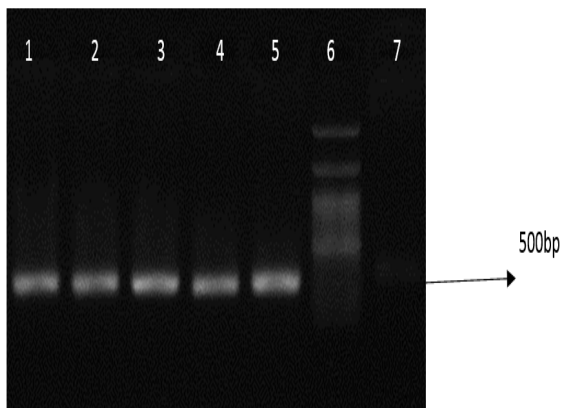
بعد از تیمار رده سلولی HT-29 با غلظت‌های مختلف سدیم بوتیرات (۲۰۰mM، ۱۵۰mM، ۱۰۰mM، ۵۰mM، ۲۰mM)، غلظت IC_{50} توسط تست MTT در طول موج ۵۴۶/۶۳۰nm مورد ارزیابی قرار گرفت. طبق نتایج به دست آمده، IC_{50} برای تیمار ۲۴ ساعت، ۴۸ ساعت و ۷۲ ساعت به ترتیب غلظت‌های ۹۵mM، ۲۵mM و ۱۲/۵mM تعیین شد (نمودار ۲).

نتایج نشان داد که افزایش غلظت سدیم بوتیرات از غلظت IC_{50} در زمان تیمار ۲۴ ساعت، ۴۸ ساعت و ۷۲ ساعت برای سلول‌ها سمی است و باعث مرگ آنها می‌شود.

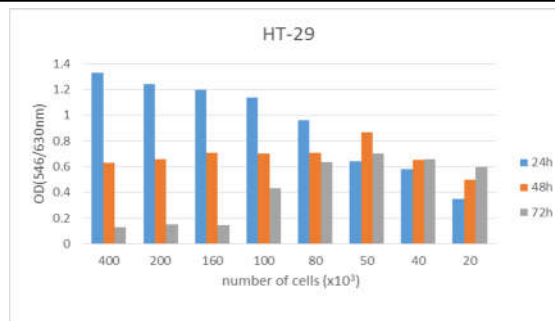
استخراج RNA و سنتز cDNA

پس از تیمار رده سلولی HT-29 با غلظت‌های مختلف سدیم بوتیرات (۲۰۰mM، ۱۵۰mM، ۱۰۰mM، ۵۰mM، ۲۰mM)، در دو بازه زمانی آنکوباسیون ۲۴ ساعت و ۴۸ ساعت، استخراج RNA از سلول‌های تیمار شده و همچنین از نمونه کنترل (سلول‌های تیمار نشده) صورت گرفت. نتایج بررسی کیفیت و کمیت RNA استخراجی توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر و الکتروفورز حاکی از خلوص بالا و عدم وجود آلودگی RNA استخراج شده بود.

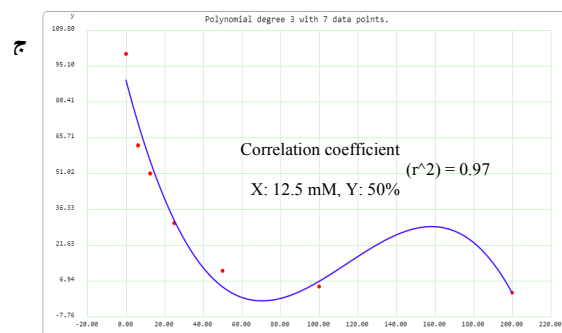
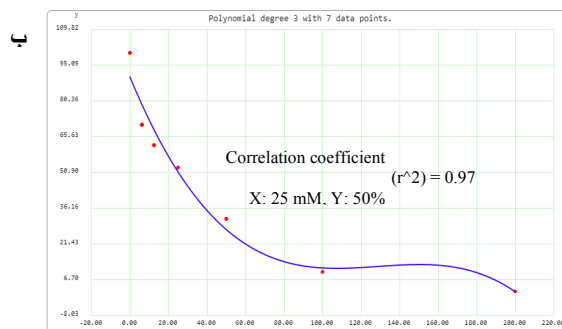
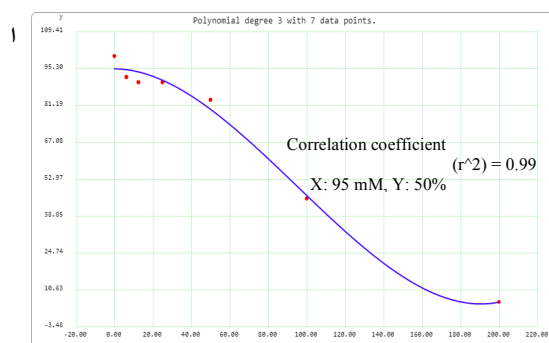
پس از استخراج RNA از نمونه‌ها، cDNA سنتز و به منظور تأیید ساخته شدن cDNA، با پرایمر GAPDH، PCR انجام شد. قطعه تکثیر شده توسط این پرایمرها ۲۲۶ جفت باز است (شکل ۱).



شکل ۱. الکتروفورز محصول PCR ژن GAPDH بر روی ژل ۱/۱٪. چاهک ۱: سلول‌های HT-29 تیمار نشده، چاهک‌های ۲ الی ۵: به ترتیب سلول‌های HT-29 تیمار شده با غلظت‌های ۲۰۰mM، ۱۵۰mM، ۱۰۰mM، ۵۰mM، چاهک ۶: شاخص وزن مولکولی ۱۰۰bp (SMOBio-DM2300)، چاهک ۷: کنترل منفی (بدون template)، اندازه قطعه تکثیر شده ۲۲۶ جفت باز است.



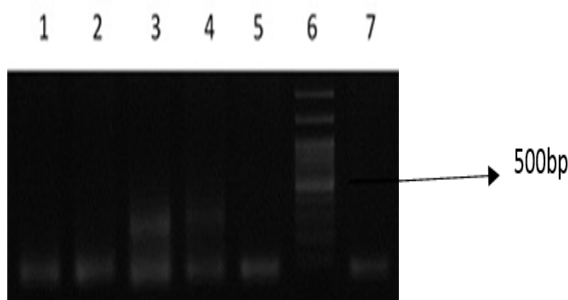
نمودار ۱. بهینه سازی تعداد سلول HT-29 جهت تیمار در زمان آنکوباسیون ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت با استفاده از تست MTT



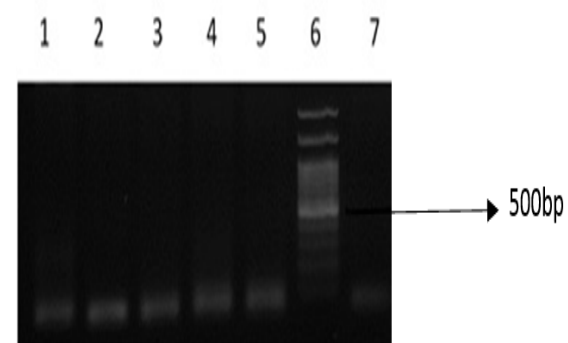
نمودار ۲. تعیین غلظت IC_{50} سدیم بوتیرات در سه بازه زمانی آنکوباسیون ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت جهت تیمار رده سلولی HT-29. محور افقی (x)، نماینده غلظت (میلی مولار) و محور عمودی (y)، نماینده درصد بقا سلولی. الف) IC_{50} برای تیمار ۲۴ ساعت رده سلولی HT-29، ب) IC_{50} برای تیمار ۴۸ ساعت رده سلولی HT-29، ج) IC_{50} برای تیمار ۷۲ ساعت رده سلولی HT-29.

بررسی ژن Bid با روش Conventional PCR

برای بررسی کیفی ژن Bid در رده سلولی HT-29 تیمار شده با غلظت‌های مختلف سدیم بوتیرات و سلول‌های تیمار نشده در بازه زمانی ۲۴ و ۴۸ ساعت انکوباسیون، PCR با پرایمر Bid انجام شد و برای مشاهده نتیجه، محصول آنها بر روی ژل آگارز ۱٪/۱/۵ بارگیری شد. قطعه ژن تکثیر شده مورد نظر ۱۳۷ جفت باز است (شکل‌های ۲ و ۳).



شکل ۲. الکتروفورز محصول PCR ژن Bid بر روی ژل ۱٪/۱/۵ زمان تیمار ۲۴ ساعت. چاهک ۱: سلول‌های HT-29 تیمار نشده، چاهک-های ۲ الی ۵: به ترتیب سلول‌های HT-29 تیمار شده با غلظت‌های ۲۰۰mM، ۱۵۰mM، ۱۰۰mM، ۵۰mM. چاهک ۶: شاخص وزن مولکولی ۱۰۰bp (SMOBio-DM2300)، چاهک ۷: کنترل منفی (بدون template) و باندی که در چاهک کنترل منفی مشاهده می‌شود مربوط به پرایمر دایمر است. اندازه قطعه تکثیر شده و مورد نظر ۱۳۷ جفت باز است.

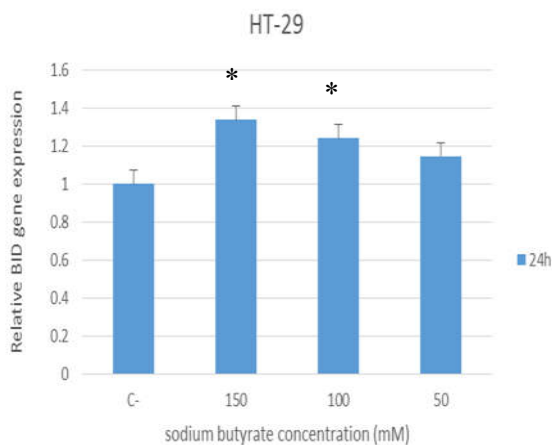


شکل ۳. الکتروفورز محصول PCR ژن Bid بر روی ژل ۱٪/۱/۵ زمان تیمار ۴۸ ساعت. چاهک ۱: سلول‌های HT-29 تیمار نشده، چاهک-های ۲ الی ۵: به ترتیب سلول‌های HT-29 تیمار شده با غلظت‌های ۲۰۰mM، ۱۵۰mM، ۱۰۰mM، ۵۰mM. چاهک ۶: شاخص وزن مولکولی ۱۰۰bp (SMOBio-DM2300)، چاهک ۷: کنترل منفی (بدون template) و باندی که در چاهک کنترل منفی مشاهده می‌شود مربوط به پرایمر دایمر است. اندازه قطعه تکثیر شده و مورد نظر ۱۳۷ جفت باز است.

بررسی کمی تغییر بیان ژن Bid

به منظور بررسی کمی بیان ژن Bid، qReal Time-PCR انجام شد و تغییرات بیان در سلول‌های HT-29 تیمار شده با غلظت‌های مختلف سدیم بوتیرات و سلول‌های HT-29 تیمار نشده (گروه کنترل) با هم مقایسه شد. از ژن بتا ۲ میکروگلوبولین ($\beta 2m$) به عنوان کنترل داخلی استفاده شد. برای این منظور با توجه به غلظت IC_{50} به دست آمده در دو زمان مختلف تیمار، سلول‌ها تحت تیمار با غلظت‌های مختلف سدیم بوتیرات قرار گرفتند. به طوری که در بازه زمانی ۲۴ ساعت، سلول‌های HT-29 با غلظت‌های ۵۰mM، ۱۰۰mM و ۱۵۰mM تیمار شدند و در بازه زمانی ۴۸ ساعت، تحت تیمار با غلظت‌های ۱۲/۵mM، ۲۵mM، ۵۰mM و ۱۰۰mM قرار گرفتند. به منظور اطمینان از اختصاصی بودن عمل پرایمرها، منحنی ذوب با استفاده از نرم افزار Rotor gene به دست آمد.

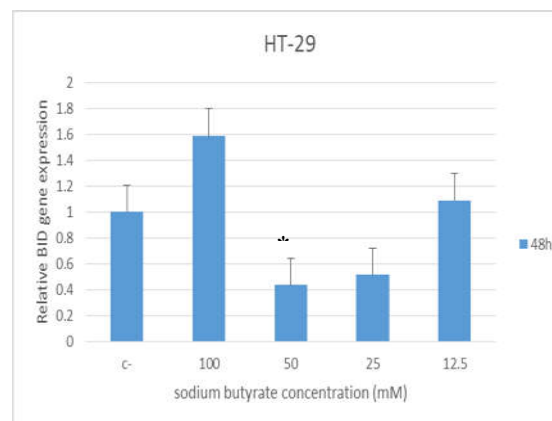
نتایج حاصل از بررسی کمی تغییر بیان ژن Bid نشان داد که در بازه زمانی ۲۴ ساعت تیمار رده سلولی HT-29، در غلظت‌های ۱۵۰mM و ۱۰۰mM در مقایسه با سلول‌های تیمار نشده افزایش معنی‌دار ($p < 0.05$) بیان ژن Bid مشاهده شد که افزایش ۱/۳ برابری را نسبت به گروه کنترل نشان داد. با توجه به نتایج حاصل در این پژوهش، غلظت IC_{50} برای رده سلولی HT-29 در بازه زمانی تیمار ۲۴ ساعته، غلظت ۱۰۰ میلی مولار سدیم بوتیرات به دست آمد و در این غلظت، افزایش معنی‌دار بیان ژن Bid در مقایسه با گروه کنترل مشاهده شد (نمودار ۳).



نمودار ۳. مقایسه میزان بیان ژن Bid در رده سلولی HT-29 تیمار شده با غلظت‌های ۵۰mM، ۱۰۰mM و ۱۵۰mM سدیم بوتیرات در بازه زمانی ۲۴ ساعت. کنترل منفی یا C-، سلول‌های تیمار نشده است. * نشان دهنده تغییر معنی‌دار ($p < 0.05$) است.

تکثیر سلولی به عنوان بخشی از فرآیند طبیعی تکامل ایفای نقش می‌کند (۲۱،۲۰). تدابیر آپوپتوتیک برای کشتن سلول‌های توموری، شامل القای مستقیم مولکول‌های پروآپوپتوتیک و تعدیل پروتئین‌های آنتی آپوپتوتیک یا بازسازی عملکرد ژن‌های مهار کننده رشد تومورها است (۲). نقص در آپوپتوز نقش مهمی در تشکیل تومورها و ایجاد نئوپلازی بازی می‌کند و به هم خوردن تنظیم آن باعث مقاومت به شیمی درمانی و پرتو درمانی می‌شود. این روند ممکن است باعث افزایش متاستاز شود (۴،۳). BID مولکول رابطی است که مسیر مرگ محیطی را به آپوپتوز مرکزی (میتوکندریایی) مرتبط می‌کند (۲۲). BID، عضوی از خانواده Bcl-2 است و مولکولی اساسی در تنظیم تومورزایی با واسطه افزایش آپوپتوز، زنده ماندن و تکثیر است. با توجه به این عملکردهای متنوع BID، این مولکول در پاسخ به استرس دو نقش متفاوت دارد (۶). بیان پروتئین BID در انواع سرطان‌های انسانی بررسی شده است و نتایج نشان داده که بیان آن در سرطان‌های مختلف و مراحل مختلف پیشرفت تومور بطور قابل چشمگیری متفاوت است. در سال ۲۰۰۲، Krajewska و همکارانش بیان Bid را در انواع متفاوت سرطان‌های انسانی به وسیله ایمونوهیستوشیمیایی بررسی کردند و نشان دادند در سرطان‌های مختلف و مراحل مختلف پیشرفت تومور، بیان این پروتئین به طور واضح متفاوت است. به طوری که در آدنوکارسینومای اولیه کولورکتال افزایش بیان معنی‌دار در مقایسه با اپیتلیوم نرمال مشاهده شد (۸). قابل بازگشت بودن تغییرات اپی ژنتیکی، آن را به عنوان راهی بالقوه برای درمان سرطان معرفی می‌کند. تعدادی از ترکیباتی که مورد اهداف درمانی هستند، آنزیم‌هایی هستند که استیل‌اسیون هیستون، متیل‌اسیون هیستون و متیل‌اسیون DNA را تنظیم می‌کنند، که در بدخیمی‌های هماتولوژیکی و تومورهای سخت، اثر قابل توجهی دارند (۲۳). HDACها، با داستیل‌کردن هیستون‌ها، سبب فشرده شدن کروماتین شده و می‌توانند به عنوان سرکوبگر رونویسی عمل کنند. در مقابل، HDACi به صورت انتخابی رونویسی ژن را توسط تغییر در کروماتین و تغییرات ساختار پروتئین‌های دخیل در رونویسی، تغییر می‌دهند (۲۴). سدیم بوتیرات اسید چرب اشباع چهار کربنه است که در دیواره روده انسان در غلظت بالا، حاصل از متابولیت‌های غذا، وجود دارد و به عنوان HDACi، اثرات ضد توموری آن و مهار رشد نشان داده شده است (۱۶). در این پژوهش، اثر سدیم بوتیرات بر روی تغییر بیان ژن Bid، که نقش منحصر به فردی به عنوان رابط بین

نتایج حاصل از بررسی تغییر کمی بیان ژن Bid در بازه زمانی ۴۸ ساعت تیمار رده سلولی HT-29 نشان داد که در غلظت ۱۰۰mM افزایش بیان در مقایسه با سلول‌های تیمار نشده، معنی‌دار ($p < 0.05$) بود، به طوری که افزایش بیان ۱/۵ برابری نسبت به گروه کنترل مشاهده شد. در غلظت ۵۰mM در مقایسه با سلول‌های تیمار نشده، کاهش بیان معنی‌دار ($p < 0.05$) مشاهده شد که کاهش ۰/۴۴ برابری را نسبت به گروه کنترل نشان داد (نمودار ۴).



نمودار ۴. مقایسه میزان بیان ژن Bid در رده سلولی HT-29 تیمار شده با غلظت‌های ۱۰۰mM، ۵۰mM، ۲۵mM، ۱۲/۵mM و ۰mM سدیم بوتیرات در بازه زمانی ۴۸ ساعت. کنترل منفی یا C-، سلول‌های تیمار نشده هستند. * نشان دهنده تغییر معنی‌دار ($p < 0.05$) است.

با توجه به نتایج حاصل از این پژوهش، غلظت IC_{50} برای رده سلولی HT-29 در بازه زمانی تیمار ۴۸ ساعته، غلظت ۲۵ میلی مولار سدیم بوتیرات به دست آمد و در این غلظت، تغییر معنی‌دار بیان ژن Bid در مقایسه با گروه کنترل مشاهده نشد، ولی در غلظت ۱۰۰ میلی مولار نسبت به گروه کنترل، افزایش معنی‌داری مشاهده شد. با توجه به اینکه در هر دو بازه زمانی انکوباسیون (۲۴ ساعت و ۴۸ ساعت)، در سلول‌های تیمار شده با غلظت ۱۰۰ میلی مولار افزایش بیان ژن Bid در مقایسه با سلول‌های تیمار نشده مشاهده شد به نظر می‌رسد این غلظت می‌تواند دوز موثر در تغییر بیان ژن مربوطه و فعال شده آپوپتوز و متعاقب آن مرگ سلول‌های سرطانی باشد.

بحث

توانایی فرار از آپوپتوز یکی از علت‌های تغییر فیزیولوژی سلول و ایجاد سرطان است. آپوپتوز برای کنترل تعداد سلول‌ها و

مسیر خارجی و مسیر داخلی آپوپتوز دارد، در رده سلولی سرطان کولورکتال انسانی HT-29، مورد بررسی قرار گرفت. پس از تیمار رده سلولی HT-29 با غلظت‌های مختلف سدیم بوتیرات، IC₅₀ در زمان تیمار ۲۴ ساعت، ۴۸ ساعت و ۷۲ ساعت به ترتیب، غلظت ۹۵mM، ۲۵mM و ۱۲/۵mM به دست آمد. اثر ضد تکثیری سدیم بوتیرات وابسته به دوز و زمان تیمار است. زیرا با افزایش دوز تیمار، اثر سمیت آن بر روی سلول‌ها افزایش می‌یابد. در سال ۲۰۰۷، Pajak و همکارانش، با بررسی اثر سدیم بوتیرات روی بیان ژن cFLIP_L در رده سلولی Colo205، نشان دادند که کمترین غلظت سدیم بوتیرات که غیر سمی است و یا دارای کمترین سمیت در بازه زمانی تیمار ۶ ساعت، ۱۲ ساعت و ۲۴ ساعت است، غلظت ۲mM است و غلظت‌های ۴mM و ۸mM در زمان تیمار ۶ ساعت، ۱۲ ساعت و ۲۴ ساعت می‌تواند سبب افزایش مرگ سلولی شود (۲۵). در سال ۲۰۱۴، Tailor و همکارانش نشان دادند که غلظت‌های ۱-۵mM سدیم بوتیرات در بازه زمانی تیمار ۲۴ ساعت و ۴۸ ساعت می‌تواند سبب افزایش مرگ سلولی در دو رده سلولی HCT-119 و SW480 شود (۱۶). در سال ۲۰۱۴، Yamamura و همکارانش با بررسی اثر سدیم بوتیرات روی رده سلولی HSC-3 سرطان دهان دریافتند که غلظت ۳mM در بازه زمانی تیمار ۲۴ ساعت می‌تواند سبب مرگ سلولی در این رده شود (۲۶). در سال ۲۰۱۶، Han و همکارانش با بررسی اثر سدیم بوتیرات روی سلول‌های سرطانی مئانه، دریافتند که غلظت ۱mM از این ماده در زمان تیمار ۲۴ ساعت می‌تواند سبب مرگ سلول‌های سرطانی شود (۲۷). در سال ۲۰۱۸، Ghiaghi و همکارانش اثر سدیم بوتیرات را بر روی رده سلولی HT-29 مورد بررسی قرار دادند و غلظت مؤثر سدیم بوتیرات برای کاهش ۵۰ درصدی این سلول را به ترتیب برای سه بازه زمانی ۲۴ ساعت، ۴۸ ساعت و ۷۲ ساعت، ۶۵mM، ۱۸/۶mM و ۹/۲mM گزارش کردند (۲۸). مقایسه نتایج حاصل از این تحقیق با مطالعات دیگران نشان می‌دهد که پاسخ سلول‌های مختلف به دارو در دوزهای متفاوت صورت می‌گیرد که ناشی از تفاوت مخزن ژنی و پاسخ متفاوت سلول به دارو است. با توجه به اینکه پاسخ به دارو در هر رده سلول متفاوت است و اثر دارو در رده‌های مختلف متفاوت است، لذا برای هر رده سلولی باید دوز مناسب انتخاب شود و IC₅₀ تعیین گردد و براساس آن غلظت‌ها جهت تیمار دارویی انتخاب شود.

داده‌ها نشان می‌دهند که سدیم بوتیرات روی بیان ژن، فعال کننده‌های رونویسی و استیل‌اسیون هیستون در سلول‌های سرطانی اثرگذار است، اما در سلول‌های طبیعی اثر بسیار کمی دارد (۱۸).

در بررسی وجود و عدم وجود ژن Bid به روش PCR در رده سلولی HT-29 تیمار شده با غلظت‌های مختلف سدیم بوتیرات در زمان تیمار ۲۴ ساعت، مشخص شد که در غلظت‌های ۱۵۰mM و ۱۰۰mM باند مربوط به این ژن وجود دارد، در حالی که در سلول‌های تیمار نشده (گروه کنترل) و غلظت‌های ۲۰۰mM و ۵۰mM باندی مشاهده نشد. در زمان تیمار ۴۸ ساعت، در غلظت ۱۰۰mM باند ضعیفی مشاهده شد، در حالی که در سلول‌های تیمار نشده و غلظت‌های ۲۰۰mM، ۱۵۰mM و ۵۰mM باندی مشاهده نشد. با توجه به اینکه این پروتئین خاصیت آپوپتوتیک دارد، در نتیجه غلظتی از دارو مورد نظر است که باعث بیان این ژن شده است و در نتیجه سبب القا آپوپتوز می‌شود که در مورد رده سلولی HT-29، غلظت ۱۰۰mM در بازه زمانی ۲۴ ساعت و ۴۸ ساعت مناسب است. نتایج حاصل از این تحقیق برای اولین بار گزارش شده است و تاکنون مطالعه‌ای در این زمینه منتشر نشده است. Renshaw و همکارانش بیان ژن Bid را در بسیاری از بافت‌ها از جمله کلیه، جفت، غدد فوق کلیه، پروستات، ریه، طحال، مغز، قلب، بیضه، ماهیچه‌های اسکلتی، کولون، تیروئید و نوتروفیل‌ها مشاهده کردند. بیان این ژن همچنین در رده‌های سلولی 293T، Jurkat، Cos، HeLa و HL60 دیده شده است (۶).

در بررسی تغییرات کمی بیان ژن Bid در رده سلولی HT-29 در زمان تیمار ۲۴ ساعت، در غلظت‌های ۱۵۰mM و ۱۰۰mM افزایش معنی‌دار بیان ژن Bid در مقایسه با سلول‌های تیمار نشده (گروه کنترل) مشاهده شد ($P < 0.05$). در زمان تیمار ۴۸ ساعت، در غلظت ۱۰۰mM نسبت به سلول‌های تیمار نشده افزایش معنی‌دار بیان ژن Bid مشاهده شد ($P < 0.05$). در سال ۲۰۰۲، Krajewska و همکارانش بیان پروتئین Bid را در انواع متفاوت سرطان‌های انسانی به وسیله روش‌های ایمنونوهیستوشیمیایی بررسی کردند و نشان دادند در سرطان‌های مختلف و مراحل مختلف پیشرفت تومور، به طور واضحی مقدار بیان این پروتئین متفاوت بوده است. بیان ایمنونوهیستوشیمیایی Bid در ۱۰۰ مورد آدنوکارسینوما اولیه کولورکتال اندازه گیری شد. در مقایسه با اپی‌تلیوم نرمال، مقدار Bid در ۳۴ مورد از ۶۰ مورد کارسینوما افزایش یافته بود ($P = 0.002$) (۸).

در این پژوهش به بررسی تغییر بیان ژن Bid در رده سلولی HT-29 به صورت کیفی و کمی در حضور غلظت‌های مختلف سدیم بوتیرات به عنوان یک HDACi پرداخته شد. با توجه به اینکه در هر دو بازه زمانی انکوباسیون (۲۴ ساعت و ۴۸ ساعت)، در سلول‌های تیمار شده با غلظت ۱۰۰ میلی مولار

تشکر و قدردانی

این مقاله مستخرج از پایان نامه خانم نجمه امیری در مقطع کارشناسی ارشد با کد پژوهشی ۱۳۶۳۰۵۵۳۹۵۱۰۰۲ است که در مرکز تحقیقات بیماریهای گوارش و کبد، پژوهشکده بیماریهای گوارش و کبد دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تهران، ایران و مرکز تحقیقات ژنومیکس دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران به انجام رسید.

افزایش بیان ژن *Bid* در مقایسه با سلول های تیمار نشده به عنوان گروه کنترل مشاهده شد، به نظر می رسد این غلظت می تواند دوز موثر در تغییر بیان ژن مربوطه و فعال شدن آپوپتوز و متعاقب آن مرگ سلول های سرطانی باشد. با توجه به نتایج به دست آمده، سدیم بوتیرات می تواند به عنوان یک داروی هیستون داستیلاز سبب توقف رشد و تکثیر سلول های سرطانی از طریق اثر بر بیان ژن آپوپتوتیک شود.

REFERENCES

- Hijova E, Chmellarova A. Short chain fatty acids and colonic health. *Bratisl Lek Listy* 2007;108:354.
- Pecorino L, Editor. *Molecular biology of cancer: mechanisms, targets, and therapeutics*. 3rd ed. UK: Oxford University Press; 2012.
- Wong RS. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *J Exp Clin Cancer Res* 2011;30:87.
- Lowe SW, Lin AW. Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis* 2000;21:485-95.
- Korsmeyer SJ, Wei MC, Saito MT, Weiler S, Oh KJ, Schlesinger PH. Pro-apoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAX into pores that result in the release of cytochrome c. *Cell Death Differ* 2000;7:1166.
- Renshaw SA, Dempsey CE, Barnes FA, Bagstaff SM, Dower SK, Bingle CD, et al. Three novel Bid proteins generated by alternative splicing of the human Bid gene. *J Biol Chem* 2004;279:2846-55.
- Lee JH, Soung YH, Lee JW, Park WS, Kim SY, Cho YG, et al. Inactivating mutation of the pro-apoptotic gene BID in gastric cancer. *J Pathol* 2004;202:439-45.
- Krajewska M, Zapata JM, Meinhold-Heerlein I, Hedayat H, Monks A, Bettendorf H, et al. Expression of Bcl-2 family member Bid in normal and malignant tissues. *Neoplasia* 2002;4:129-40.
- Vaissière T, Sawan C, Herceg Z. Epigenetic interplay between histone modifications and DNA methylation in gene silencing. *Mutat Res* 2008;659:40-8.
- Karamouzis MV, Konstantinopoulos PA, Papavassiliou AG. The activator protein-1 transcription factor in respiratory epithelium carcinogenesis. *Mol Cancer Res* 2007;5:109-20.
- Gui CY, Ngo L, Xu WS, Richon VM, Marks PA. Histone deacetylase (HDAC) inhibitor activation of p21WAF1 involves changes in promoter-associated proteins, including HDAC1. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:1241-6.
- Szyf M. Epigenetics, DNA methylation, and chromatin modifying drugs. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2009;25:49.
- Yagi A, Byung PY. Putative anti-cancer action of *Aloe vera* via butyrate fermentation. *J Gastroenterol Hepatol* 2017;21;6:2419-24.
- McNabney S, Henagan T. Short chain fatty acids in the colon and peripheral tissues: a focus on butyrate, colon cancer, obesity and insulin resistance. *J Nutr* 2017;9:1348.
- Avivi-Green C, Polak-Charcon S, Madar Z, Schwartz B. Different molecular events account for butyrate-induced apoptosis in two human colon cancer cell lines. *J Nutr* 2002;132:1812-8.
- Taylor D, Hahm ER, Kale RK, Singh SV, Singh RP. Sodium butyrate induces DRP1-mediated mitochondrial fusion and apoptosis in human colorectal cancer cells. *Mitochondrion* 2014;16:55-64.
- Kotunia A, Wolinski J, Laubitz D, Jurkowska M, Rome V, Guilloteau P, et al. Effect of sodium butyrate on the small intestine development in neonatal piglets feed by artificial sow. *J Physiol Pharmacol* 2004;55:59-68.
- Paskova L, Trtkova KS, Fialova B, Benedikova A, Langova K, Kolar Z. Different effect of sodium butyrate on cancer and normal prostate cells. *Toxicol In Vitro* 2013;27:1489-95.
- Sadat Kia F, Nazemalhosseini-Mojarad E, Forouzes F. A quantitative investigation of the Bid gene expression in biopsies from colorectal adenomas. *J Dent (Tehran)* 2018;76:120-8.
- Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000;407:770.
- Evan GI, Vousden KH. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature* 2001;411:342.
- Yin XM. Bid, a BH3-only multi-functional molecule, is at the cross road of life and death. *Gene* 2006;369:7-19.

23. Ellis L, Atadja PW, Johnstone RW. Epigenetics in cancer: targeting chromatin modifications. *Mol Cancer Ther* 2009;15:35-7163.
24. Dokmanovic M, Marks PA. Prospects: histone deacetylase inhibitors. *J Cell Biochem* 2005;96:293-304.
25. Pajak B, Orzechowski A, Gajkowska B. Molecular basis of sodium butyrate-dependent proapoptotic activity in cancer cells. *Adv Med Sci* 2007;52.
26. Yamamura T, Matsumoto N, Matsue Y, Okudera M, Nishikawa Y, Abiko Y, et al. Sodium butyrate, a histone deacetylase inhibitor, regulates Lymphangiogenic factors in oral cancer cell line HSC-3. *Anticancer Res* 2014;34:1701-8.
27. Han MH, Choi YH. Effects of sodium butyrate, a histone deacetylase inhibitor, on TRAIL-mediated apoptosis in human bladder cancer cells. *Life Sci* 2016;26:431-8.
28. Ghioghi M, Forouzes F, Rahimi H. Effect of sodium butyrate on LHX1 mRNA expression as a transcription factor of HDAC8 in human colorectal cancer cell lines. *Avicenna J Med Biotechnol* 2019;11:23-28.