بررسی اثر مشتقات پکتینی در القای مرگ برنامه ریزی شده یا آپوپتوز در دودمان سلولی سرطان پروستات انسانی DU145

سارا دشت بزرگی[۱]، حوری سپهری [۱،*]، بهرام گلیایی [۲] ، لادن دلفی[۱] و احسان جان زمین[۳]

[۱]تهران، دانشگاه تهران، پردیس علوم، دانشکده زیست شناسی، بخش فیزیولوژی جانوری

[۲]تهران، دانشگاه تهران، مرکز تحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک

[۳] تهران، پژوهشکده رویان ACECR ، مرکز سلولهای بنیادی و زیست شناسی تکوینی

تاریخ دریافت: ۸۹/۴/۱۶ تاریخ پذیرش: ۹۰/۲/۳۱

چکیده

مواد پکتینی، پلی ساکارید های پیچیده غنی از زیر واحد های گالاکتوز می باشند. مطالعات نشان داده است که، این مواد قادر به القای آپوپتوز در سلولهای سرطانی هستند. تحقیق حاضر جهت بررسی اثر آپوپتوزی اسید پکتیک (AP) و پکتین مرکبات (CP) روی دودمان سلولی سرطان پروستات انسانی DU145 ، که وابسته به آندروژن می باشد، صورت گرفته است. با تغییر pH و دما نمونه های تغییر یافته ای از اسید پکتیک و پکتین مرکبات به دست آمد و اثر این مواد (MAP (modified acid pectic)) MCP و (modified citrus pectin) و نیز روی سلولهای مذکور مورد بررسی قرار گرفت. اثر آپوپتوتیکی این مواد پکتینی با Pectasol، به عنوان کنترل مثبت در القای آپوپتوز روی این سلولها، مقایسه گردید. درصد آپوپتوز سلولها پس از تیمارهای مختلف، به وسیله رنگ آمیزی آکریدین اورنج و اتیدیوم برماید و همچنین بررسی سیکل سلولی با استفاده از تکنیک فلوسایتومتری، مورد بررسی قرار گرفت. نتیجه این مطالعه نشان می دهد که، غلظت ۵ mg/ml از محلولهای AP، MCP و ۱ mg/ml از Pectasol میزان بالای آپوپتوز را در سلولهای سرطانی DU145 نسبت به کنترل القاء می کند ($p < 0.001$). در حالی که MAP با همین دُز قدرت آپوپتوتیکی کمی را نشان می دهد. در ضمن، درصد نکروز سلولها، توسط رنگ آمیزی آکریدین اورنج و اتیدیوم برماید، مطالعه گردید. میزان آپوپتوز سلولها نسبت به میزان نکروز آنها به مراتب بالاتر می باشد. نتیجه این پژوهش نشان داد که، CP قدرت القای آپوپتوز در سلولهای DU145 را ندارد و پس از آنکه به وسیله pH و دما تغییر پیدا می کند (MCP) دارای قدرت آپوپتوتیک می شود. درحالی که، AP یا پکتین سیب بدون تغییر دارای این قدرت است و اگر تغییر داده شود، یعنی به مولکولهای کوچکتر تبدیل گردد این قدرت را به طور معنی دار از دست می دهد. این مسأله می تواند حاکی از برتری پکتین سیب به پکتین مرکبات باشد؛ پکتین سیب، مولکولی کوچکتر از پکتین مرکبات دارد و در بخش خوراکی این میوه قرار دارد و بدون نیاز به شکسته شدن توسط تغییرات دما و pH قادر به القای آپوپتوز در سلولهای سرطانی تحت تیمار خود می باشد، در حالی که پکتین مرکبات دارای مولکولی بزرگ است که به صورت طبیعی قادر به القای آپوپتوز در سلولهای سرطانی پروستات DU145 نمی باشد. در ضمن این پکتین در پوست غیر خوراکی آن بوده و نیاز به شکسته شدن توسط دما و pH، برای القای آپوپتوز در سلولهای سرطانی تحت تیمار خود دارد.

واژه های کلیدی: آپوپتوز، اسید پکتیک، پکتین مرکبات، سلولهای DU145

* نویسنده مسئول، تلفن تماس ۰۲۱۶۱۱۱۲۶۲۶ ، پست الکترونیکی: hsepehri@khayam.ut.ac.ir

مقدمه

مرگ برنامه ریزی شده یا آپویتوز به فرآیند فعال وابسته به انرژی، آغاز شده بوسیله محرکهای مختلف درون سلولی و برون سلولی اطلاق می‌شود. سلولهای زنده با روندی سازمان یافته در مرگ خود شرکت می‌کنند. آپوپتوز در

Archive of SID

www.SID.ir

مقایسه با مرگ سازمان نیافته سلول، یعنی نکروز، فرآیندی به دقت سازمان‌دهی شده و هوشمند می‌باشد. از خصوصیات بارز آپوپتوز قطعه قطعه شدن DNA و هسته می باشد که در نکروز این حالت مشاهده نمی شود (۲۵).

با توجه به اینکه کربوهیدراتها در سطح خارجی غشاء سلول وجود دارند، می توانند برای سلول فاکتور های تشخیصی مناسبی در محیط اطرافش باشند. سلولها از طریق کربوهیدراتهای موجود در سطح خود با ماتریکس خارج سلولی و سلولهای مشابه و یا متفاوت ارتباط برقرار می کنند (۲۶). بنابراین ترکیبات کربوهیدراتی مولکولهای مناسبی برای مطالعه روی سلولهای سرطانی می باشند (۴، ۵، ۶، ۷ و ۱۷). به کاربردن یک زنجیره قندی کوتاه یا بلند، می تواند فرآیند بازشناسی طبیعی سلولها را تحت تأثیر قرار دهد و به این صورت مانع پیشرفت تومور شود (۱۸). این ممانعت از راههای زیر صورت می پذیرد:

- دخالت این ترکیبات در ارتباط بین سلول با سلول دیگر و یا سلول با ماتریکس خارج سلولی
- دخالت این ترکیبات قندی در ممانعت از آنژیوژنز در سلولهای سرطانی
- جلوگیری از تهاجمی شدن تومور و متاستازی شدن آنها

پکتینها از مواد اصلی تشکیل دهنده دیواره سلولی در سلولهای گیاهی هستند. این ماده پلی ساکارید بسیار منشعب و پیچیده است و دارای تعداد زیادی زیر واحدهای گالاکتوزید می باشد (۱۸).

از پکتین مرکبات ((Citrus pectin (CP)) پس از تغییرات در دما و pH ، نوعی پکتین تغییر یافته (Citrus Modified) Pectin (MCP) تهیه می شود که می تواند علاوه بر مهار رشد سلولهای سرطانی، از طریق القای آپوپتوز در این سلولها، باعث مهار متاستاز و مهاجرت آنها به سایر نقاط بدن گردد (۱۱، ۱۲، ۱۳ و ۱۴). شکسته شدن این پلی ساکارید در طی تغییرات دما و pH انجام شده و بدین ترتیب مولکولی کوتاه تر ایجاد می شود. کوتاه تر شدن زنجیره های CP می تواند عامل مؤثری در افزایش قدرت آپوپتوتیکی و آنتی متاستازیکی MCP نسبت به CP باشد (۲۰ و ۲۱).

تحقیقات نشان داده که، شکسته شدن ملکول CP به وسیله تغییر در دما باعث القای آپوپتوز و با تغییر در pH باعث جلوگیری از متاستاز می شود. با ترکیب این دو روش، می توان هر دو پتانسیل فعالیت آپوپتوتیکی و ضد متاستازی را در CP ایجاد کرد (۱۰).

در سال ۲۰۰۳ اثر آپوپتوزی ترکیبات پکتینی بر روی سلولهای ادنوکارسینومای کولون انسانی HT29 توسط محققین نشان داده شد (۱۹). در سال ۲۰۰۵ نیز در بررسی اثر MCP روی دودمانهای سلولی میلوما (multiple myeloma cell line) مشاهده کردند که این کربوهیدرات قادر به القای آپوپتوز در این دودمانهای سلولی، که مقاوم به سایر روشهای متداول درمانی هستند، می باشد. در ضمن، این محققین نشان دادند که، MCP قادر به القای آپوپتوز در سلولهای طبیعی لنفوسیت نیست (۸).

پس از آن، در سال ۲۰۰۷ اثر آپوپتوتیکی FPP (fractionated pectin powder)، که با اثر دادن حرارت از پکتین مرکبات (CP) حاصل می شود، روی سلولهای سرطان پروستات انسانی LNCaP و LNCaP C4-2 نشان داده شد (۱۶). در ضمن، در این پژوهش مشاهده کردند که، مواد پکتینی قادر به القای آپوپتوز در سلولهای طبیعی بدن مثل اندوتلیال رگی HUVEC، نیستند. پس از آن محققین در سال ۲۰۱۰ اثر آپوپتوزی دو نوع از پکتین مرکبات تغییر یافته (Pectasol-C و Pectasol) را بر دو دودمان سلولی سرطان پروستات انسانی وابسته به آندروژن (LNCaP) و غیر وابسته به آندروژن (PC3) نشان دادند (۲۷).

Archive of SID

www.SID.ir

اسید پکتیک یا آلفا دی پلی گالاکتورونیک اسید، پکتینی است که در دیواره سلولهای گیاهی یافت می شود.

بررسیهای انجام شده نشان داده است که، اسید پکتیک روی دودمان سلولی GH3/B6، که سلولهای توموری هیپوفیز موش می باشند، اثر آپوپتوزی دارد (۳).

با توجه به این نکته که سرطان پروستات شایع ترین نوع سرطان در مردان می باشد و همچنین نظر به کاربرد مشتقات پکتینی در جلوگیری از پیشرفت و رشد سلولهای سرطانی و این ویژگی اسید پکتیک که در مقایسه با پکتین مرکبات ساختار ساده تری دارد.

تحقیق حاضر اثر آپوپتوزی یا نکروزی این ماده روی دودمان سلولی سرطان پروستات را مورد بررسی قرار می دهد. از میان دودمانهای سلولی سرطان پروستات که معمولا" در تحقیقات مورد استفاده قرار می گیرند (PC3، DU145، LNCaP)، دودمان سلولی DU145 انتخاب شد. این دودمان سلولی غیر وابسته به آندروژن است.

در معالجه سرطان از شیمی درمانی استفاده می شود که معمولا" دارای عوارض جانبی است. بنابراین اگر موادی طبیعی بتوانند مقدار دُز مؤثر این دارو های شیمیایی را کاهش دهند قدم مهمی در این راه برداشته شده است. در این تحقیق، با تغییر pH و دما در اسید پکتیک (پکتین سیب) و پکتین مرکبات، مشتق تغییر یافته ای از این دو نوع پکتین به دست آمد و اثر آپوپتوزی هر دو پکتین قبل و بعد از تغییر، روی سلولهای سرطان پروستاتDU145، مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روشها

کشت سلولهای DU145: سلولهای DU145 به صورت یک لایه (monolayer) در محیط کشت RPMI 1640 و ۱۰ درصد سرم جنین گاو غیر فعال شده کشت داده شدند.

تهیه پکتین تغییر یافته: تهیه MCP از CP با توجه به روش انجام شده توسط آوراهام راز (Avraham Raz) و همکارانش در سال ۲۰۰۲ صورت پذیرفت (۲۲). این روش به طور خلاصه بدین صورت انجام می گیرد، محلول ۱/۵ درصد CP به pH ۱۰ رسانده می شود و در دمای ۵۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱ ساعت نگهداری می گردد و سپس pH آن تا ۳ کاهش می یابد. پس از یک شب نگهداری در محیط آزمایشگاه در روز بعد اتانل ۹۵ درصد به آن اضافه شده و در دمای ۲۰- به مدت ۲ ساعت انکوبه می گردد. محلول ژلاتینی حاصل از روی کاغذ صافی (Whatman) عبور داده شده و در دمای محیط خشک می شود.

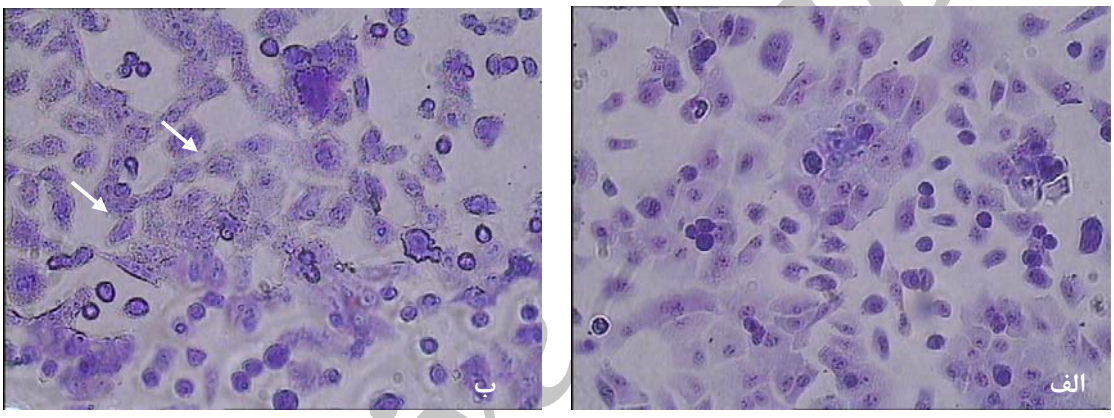
اثر دادن مشتقات پکتینی: مشتقات پکتینی به کار رفته در این تحقیق عبارتند از : AP (Acid Pectic) ، MAP (Modified Acid Pectic) ، CP، MCP و Pectasol (MCP تجارتی). به منظور تعیین اثر غلظتهای مختلف مشتقات پکتینی بر سلولهای DU145 ، تعداد $۱۰^{۶}$ × ۰/۵ سلول به همراه ۱ml محیط کامل در هر یک از چاهکهای مولتی دیشهای ۱۲ خانه ای کشت داده شدند. مدت زمان پیش انکوباسیون برای سلولها ۲۴ ساعت در نظر گرفته شد. بعد از این مدت محیط رویی سلولها خارج و محیطهای حاوی غلظتهای mg/ml ۰/۰۱، ۰/۱، ۰/۵، ۱، ۳، ۵ مشتقات پکتینی به آنها اضافه گردید. مدت انکوباسیون تیمارهای مذکور ۲۴ و ۴۸ ساعت در نظر گرفته شد.

رنگ آمیزی سلولها با روش گیمسا: به منظور رنگ آمیزی گیمسا، سلولها روی لامل کوچک به قطر ۱ سانتیمتر کشت داده می شوند. سلولها پس از شستشو با PBS به وسیله متانول به مدت ۱۰ دقیقه تثبیت می گردند. در این رنگ آمیزی، رنگ گیمسا با غلظت ۰/۸ درصد مورد استفاده قرار گرفت. سلولها با استفاده از میکروسکوپ نوری مشاهده و عکسبرداری شدند (۲۳).

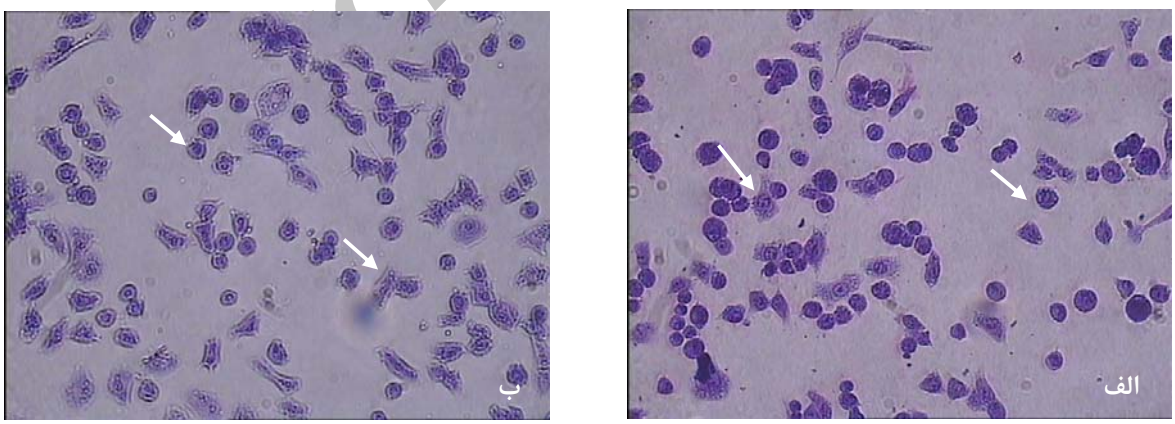
Archive of SID
www.SID.ir

رنگ آمیزی هسته با اکریدین اورنج و اتیدیوم برماید: تعلیق یا سوسپانسیون سلولهای تیمار شده با مواد پکتینی در PBS انجام گرفت. به این سلولها محلول اکریدین اورنج/ اتیدیوم برماید با غلظت ۱۰۰ µg/ml اضافه گردید و به وسیله میکروسکوپ فلورسانس مشاهده شدند. برای تعیین درصد سلولهای آپوپتوتیک حداقل ۳۰۰ سلول شمارش شد.

بررسی چرخه سلولی: سلولهای تیمار شده با مواد پکتینی به وسیله اتانول ۷۰ درصد سرد به مدت ۲ ساعت تثبیت می گردند. سپس به آنها ۱ml محلول PI MASTER MIX که حاوی ۴۰µl PI(Propidium Iodide)، ۱۰µl RNase، ۹۵۰µl PBS می باشد، اضافه شده و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه می گردند. پس از آن، توسط دستگاه فلوسایتومتری مورد بررسی قرار گرفته و داده ها توسط نرم افزار WINMDI آنالیز شدند.

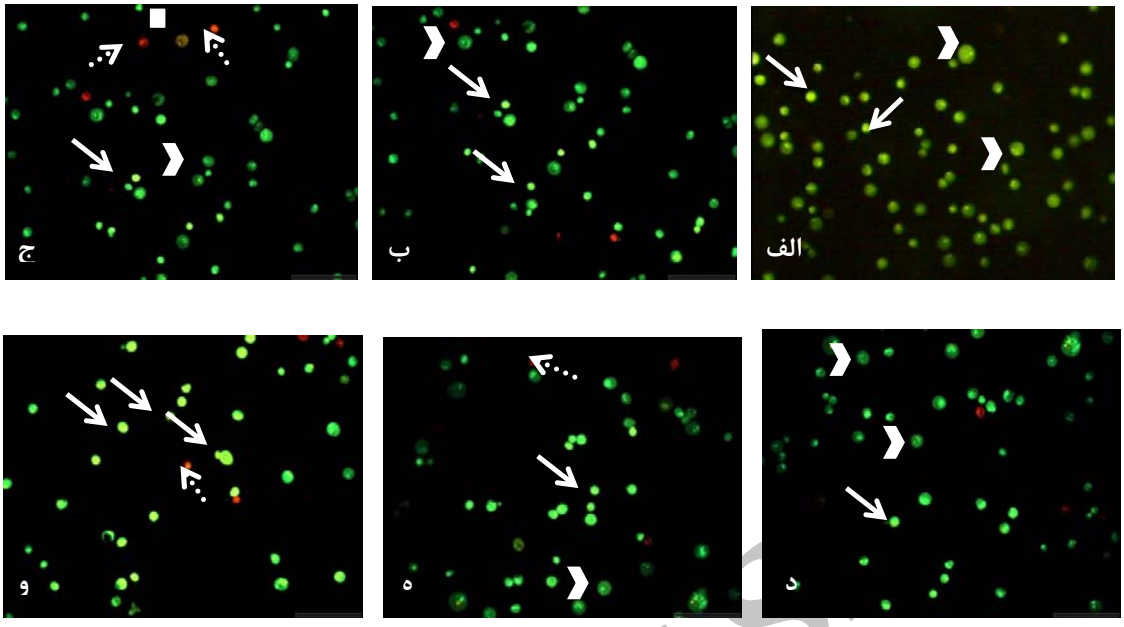


شکل ۱- در تصویر الف، مورفولوژی طبیعی سلولهای DU145 بدون هیچ تیمار ویژه ای، به وسیله رنگ آمیزی گیمسا، قابل مشاهده می باشد. در تصویر ب، تغییرات مورفولوژیکی سلولها پس از تیمار با ۵ mg/ml اسید پکتیک و رنگ آمیزی گیمسا، نشان داده شده است. کاهش حجم سلول ، گرانوله شدن سلولها و همچنین چروکیده شدن غشای سلولها در این تصویر قابل مشاهده می باشد.



شکل ۲- *تغییرات مورفولوژیکی سلولها پس از تیمار با ۵ mg/ml MCP*. کاهش حجم سلول، گرانوله شده سلولها و چروکیده شدن غشای سلولی در این تصاویر، قابل مشاهده می باشد. (MCP=Modified Citrus Pectin)

www.SID.ir



شکل ۳- نمونه هایی از تصاویر میکروسکوپ فلورسنت از سلولهای DU145، پس از تیمار با بالاترین غلظتهای مشتقات پکتینی و رنگ آمیزی با اتیدیوم برماید و آکریدین اورنج. (**الف**) سلولهای DU145 به عنوان کنترل منفی، (**ب**) این سلولها پس از ۴۸ ساعت تیمار با AP ۵ mg/ml، (**ج**) پس از ۴۸ ساعت تیمار با MAP ۵ mg/ml، (**د**) پس از ۴۸ ساعت تیمار با CP ۵ mg/ml، (**ه**) پس از ۴۸ ساعت تیمار با MCP ۵ mg/ml، (و) پس از ۴۸ ساعت تیمار با Pectasol ۳ mg/ml را نشان می دهد. در این شکلها سلولهایی که در مراحل آپوپتوز اولیه (Early apoptotic cells) هستند توسط پیکانهای سفید (↖) و سلولهایی که در مراحل آپوپتوز پیشرفته (Late apoptotic cells) می باشند توسط پیکانهای خط چین سفید (⇢) نشان داده شده اند. در ضمن (■) سفید سلولهای نکروزی و (❱) سفید سلولهای طبیعی را نشان می دهند. (AP=Acid pectic، MAP=Modified Acid Pectic، CP=Citrus Pectin، MCP=Modified Citrus Pectin)

آنالیز آماری: آنالیزهای آماری با استفاده از نرم افزار SPSS 13 و تست پارامتریک ANOVA یک طرفه انجام شده است.

$P \leq ۰/۰۵$ به عنوان اختلاف معنی دار محاسبه شده است و نتایج به صورت SEM ± میانگین (n =۳) نشان داده شده است.

نتایج

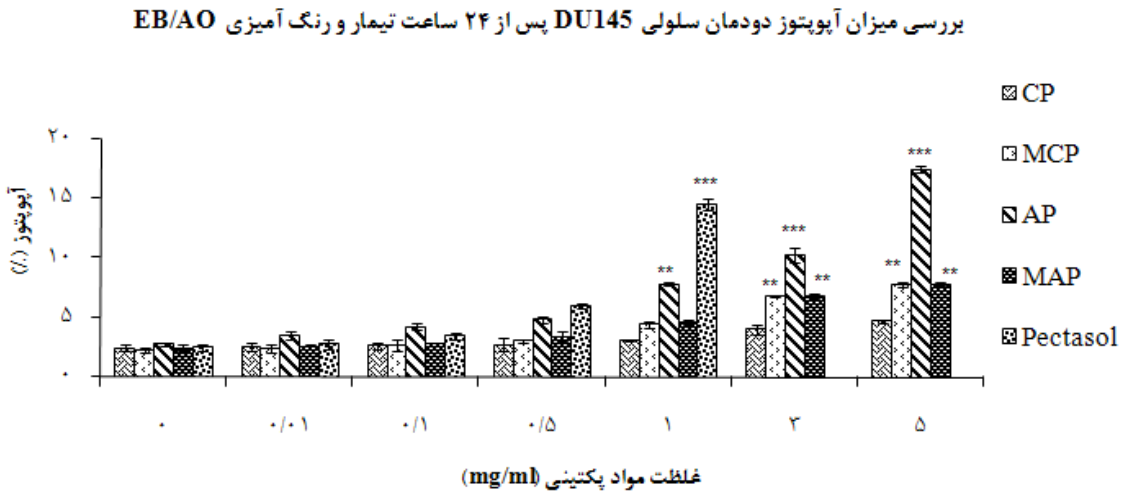
رنگ آمیزی سلولها با روش گیمسا: به منظور بررسی دقیق تر تغییرات مورفولوژیکی سلولهای DU145 پس از تیمار مشتقات پکتینی، تعداد ۵×۱۰^{۵} سلول را روی لامل کوچک به قطر ۱ سانتیمتر کشت داده و سپس توسط غلظتهای ۰/۰۱، ۰/۱، ۰/۵، ۱، ۳ و ۵ mg/ml از مشتقات پکتینی تیمار شد. پس از گذشت ۴۸ ساعت از تیمار سلولها، آنها را رنگ آمیزی گیمسا نموده و به وسیله میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفت. مورفولوژی سلولها پس از این مدت در نمونه شاهد کاملاً طبیعی است و سلولها به کف فلاسک چسبیده و کشیده شده اند و برخی از سلولها نیز در حال تقسیم می باشند. غلظتهای مختلف CP تغییر خاصی در مورفولوژی سلولها ایجاد نکردند. در نمونه های با غلظت پایین AP، MAP، MCP، Pectasol (۰/۰۱، ۰/۱، ۰/۵ mg/ml) نیز تغییری در مورفولوژی نسبت به سلولهای شاهد مشاهده نگردید. اما سلولهای تحت تیمار با غلظتهای بالای اسید پکتیک، MCP و Pectasol (۱، ۳ و ۵ mg/ml) تغییرات مورفولوژیکی زیر را نشان دادند:

- تغییرات عمده در حالت طبیعی غشای سلولی و گرانوله شدن سلولها

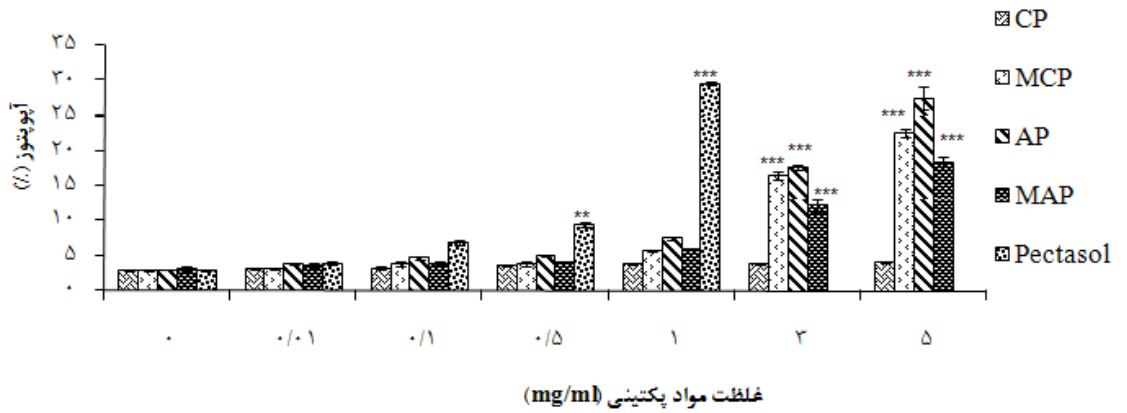
Archive of SID
www.SID.ir

- چروکیده شدن غشای هسته
- کاهش حجم سلول

در ضمن تعدادی از سلولها از کف فلاسک جدا شده و شناور می باشند. این تغییرات مورفولوژیکی در سلولها در یک حالت وابسته به دُز افزایش می یابد (شکل ۱ و ۲).

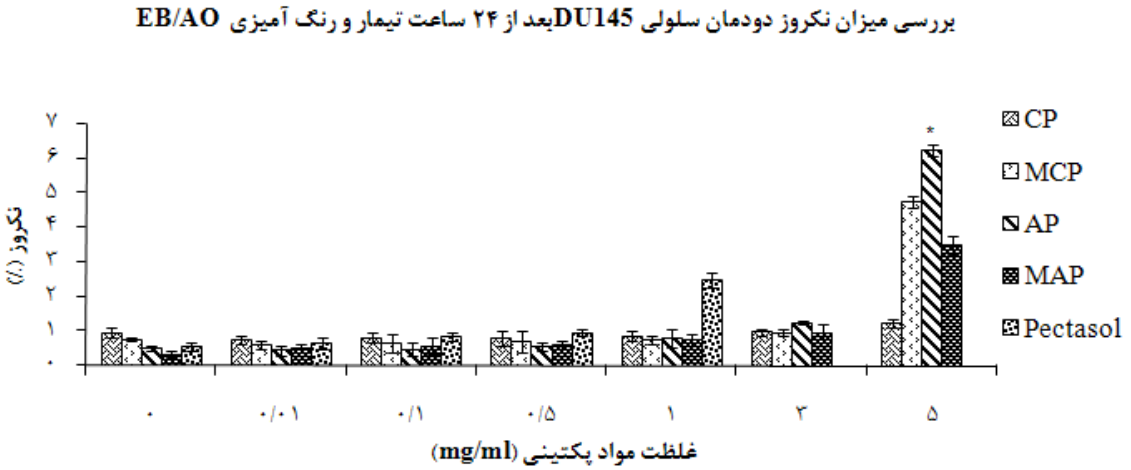


شکل۴- مقایسه اثر غلظتهای متفاوت مشتقات پکتینی مورد استفاده در این تحقیق بر درصد آپوپتوز سلولهای DU145 پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون، (early apoptosis+late apoptosis). مقادیر ارائه شده معادل mean±S.E.M می باشند($p<0.001$ = ***، $p<0.01$ = ** و n=3) (AP=Acid pectic، MAP=Modified Acid Pectic، CP=Citrus Pectin، MCP=Modified Citrus Pectin)

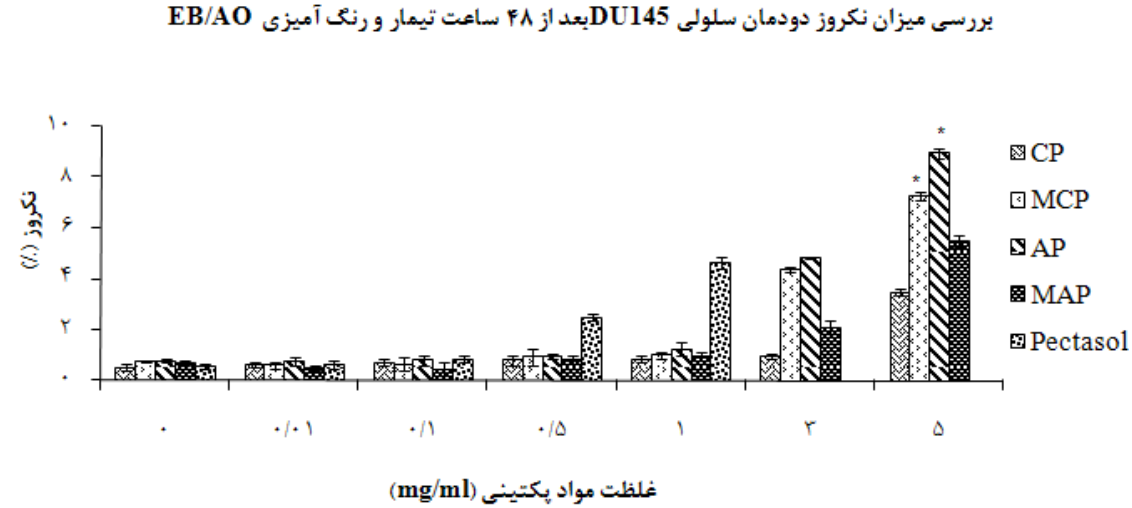


شکل ۵- مقایسه اثر غلظتهای متفاوت مشتقات پکتینی مورد استفاده در این تحقیق بر درصد آپوپتوز سلولهای DU145 پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون، (early apoptosis+late apoptosis). مقادیر ارائه شده معادل mean±S.E.M می باشند($p<0.001$ = ***، $p<0.01$ = ** و n=3) (AP=Acid pectic، MAP=Modified Acid Pectic، CP=Citrus Pectin، MCP=Modified Citrus Pectin)

www.SID.ir



شکل ۶- اثر غلظتهای متفاوت مشتقات پکتینی بکار رفته در این تحقیق، بر درصد نکروز سلولهای DU145 پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون. همانطور که ملاحظه می شود، فقط غلظت Pectasol ۳ mg/ml و AP ۵ mg/ml باعث افزایش معنی دار درصد سلولهای نکروز شده گردید ($p<0.05$ = *) .
(MCP=Modified Citrus Pectin ،CP=Citrus Pectin ،MAP=Modified Acid Pectic ،AP=Acid pectic)



شکل ۷- اثر غلظتهای متفاوت مشتقات پکتینی بکار رفته در این تحقیق، بر درصد نکروز سلولهای DU145 پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون. همانطور که ملاحظه می شود، غلظت Pectasol ۳ mg/ml ($p<0.01$ = **) و غلظت AP ۵ mg/ml و MAP($p<0.05$ = *) افزایش معنی دار درصد سلولهای نکروز شده را نشان دادند. (AP=Acid pectic، MAP=Modified Acid Pectic، CP=Citrus Pectin، MCP=Modified Citrus Pectin)

www.SID.ir

رنگ آمیزی هسته با اکریدین اورنج و اتیدیوم برماید: همان طور که در دیاگرامهای ارائه شده در شکلهای ۴ و ۵ نشان داده شده است، CP در هیچ کدام از غلظتهای تیمار شده، در زمانهای ۲۴ و ۴۸ ساعت، افزایش معنی داری در درصد آپوپتوز سلولهای DU145 نسبت به گروه کنترل نشان نداده است. اما سایر مواد پکتینی در حالتی وابسته به دُز و زمان، باعث افزایش درصد سلولهای آپوپتوتیک، نسبت به سلولهای کنترل، شدند ($p<0.001$). در ضمن، غلظتهای ۱، ۳ و ۵ mg/ml MCP در زمانهای ۲۴ و ۴۸ ساعت، نسبت به CP، تغییر معنی دار در درصد آپوپتوز سلولهای DU145 نشان دادند ($p<0.001$). نکته جالب توجه در این است که، AP در هر دو زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت، نسبت به نوع تغییر یافته آن یعنی MAP، قادر است درصد بالاتری از آپوپتوز را در سلولهای تحت تیمار خود القاء کند ($p<0.001$). Pectasol نیز به عنوان کنترل مثبت، در هر دو زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت افزایش معنی داری در درصد آپوپتوز سلولهای DU145 نشان داد ($p<0.001$). (شکل ۴ و ۵).

علاوه بر این، درصد نکروز سلولهای DU145 پس از تیمار با مشتقات پکتینی و رنگ آمیزی EB/AO قابل اندازه گیری است. درصد نکروز این سلولها پس از تیمار های مذکور، چندان بالا نمی باشد و همچنان اثر آپوپتوزی مواد مذکور بیشتر از اثرات نکروزی آنها می باشد (شکل ۶ و ۷).

در شکل ۳ نمونه هایی از تصاویر سلولهای DU145، پس از تیمار با مشتقات پکتینی و رنگ آمیزی با اتیدیوم برماید و آکریدین اورنج نشان داده شده است. عکسها توسط میکروسکوپ فلورسنت گرفته شده است.

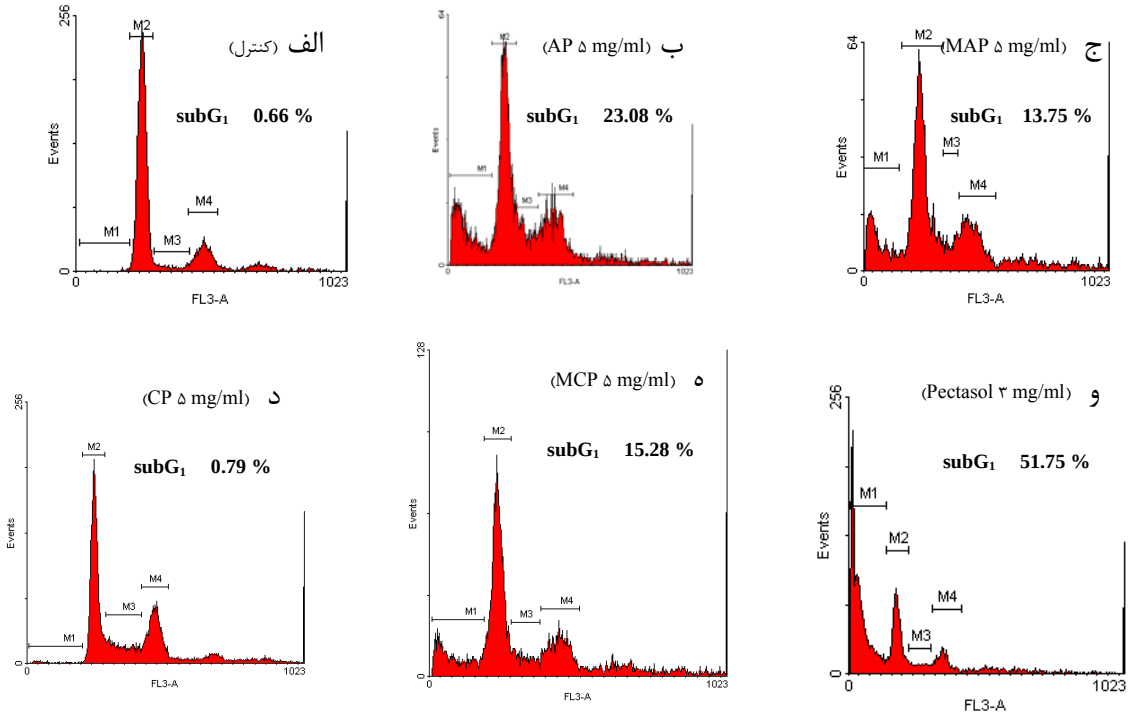
بررسی چرخه سلولی: در طی آپوپتوز DNA کروموزومی توسط آنزیم اندونوکلوئاز به قطعات نوکلئوزومی تجزیه می شود. این قطعات از سلول نشت کرده و محتوای DNA سلولهای آپوپتوتیک از محتوای DNA سلولها در فاز G_1 چرخه سلولی کمتر می باشد. بنابراین آپوپتوز معمولا" با فاز $subG_1$ و یا پیش G_1 در چرخه سلولی همراه است. به همین منظور چرخه سلولی در سلولهای کنترل، سلولهای تیمار شده با مشتقات پکتینی به کار رفته در این تحقیق مورد بررسی قرار گرفت. در این روش سلولها پس از فیکس شدن و رنگ آمیزی توسط رنگ PI به وسیله دستگاه فلوسایتومتری مورد بررسی قرار گرفتند (۲۵).

رنگ PI قادر به برقراری اتصال با DNA و RNA در سلولهای فیکس شده می باشد، به همین منظور در رنگ آمیزی سلولها از RNase نیز استفاده شد تا با از بین رفتن RNA تنها محتوای DNA سلول مورد بررسی و اندازه گیری قرار گیرد (۲۵).

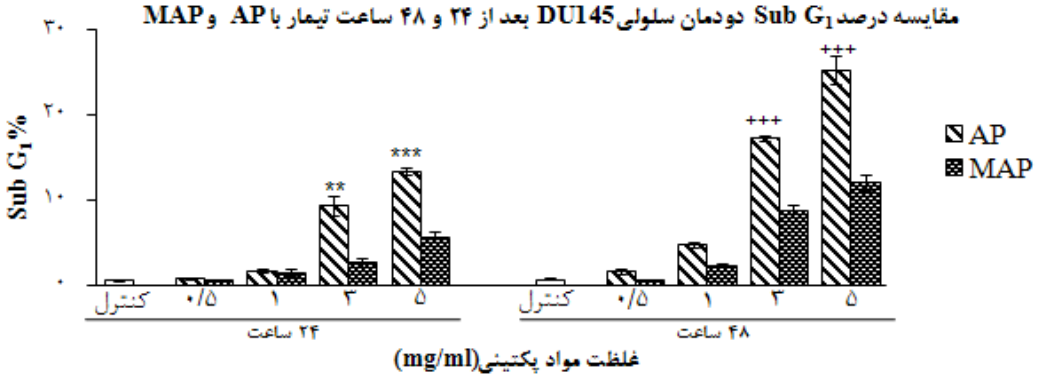
در شکل ۸ نمونه ای از دیاگرام چرخه سلولی سلولهای DU145، ارائه شده توسط دستگاه فلوسایتومتری، برای غلظتهای مؤثر مشتقات پکتینی به کار رفته در این تحقیق و سلولهای کنترل، نشان داده شده است. نتایج بررسی چرخه سلولی با استفاده از روش فلوسایتومتری نیز مؤید نتایج به دست آمده از رنگ آمیزی فلورسنت سلولها می باشد. بدین صورت که، AP نسبت به نوع تغییر یافته آن یعنی MAP، در هر دو زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت، درصد بالاتری از آپوپتوز را در سلولهای تحت تیمار نشان می دهد ($p<0.001$) (شکل ۹). در حالی که، در زمانهای ۲۴ و ۴۸ ساعت، MCP نسبت به CP، باعث ایجاد تغییر معنی دار در درصد آپوپتوز سلولهای DU145 می گردد ($p<0.001$) (شکل ۱۰). در شکل ۱۱ میزان آپوپتوز القاء شده در سلولهای DU145، پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت تیمار با غلظتهای مختلف AP، MAP و Pectasol ، به عنوان کنترل مثبت، با هم مقایسه شده اند. در شکل ۱۲ نیز میزان القای آپوپتوز توسط غلظتهای مختلف CP، MCP و Pectasol، به عنوان کنترل مثبت پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت تیمار، با هم مقایسه شده اند.

Archive of SID

www.SID.ir

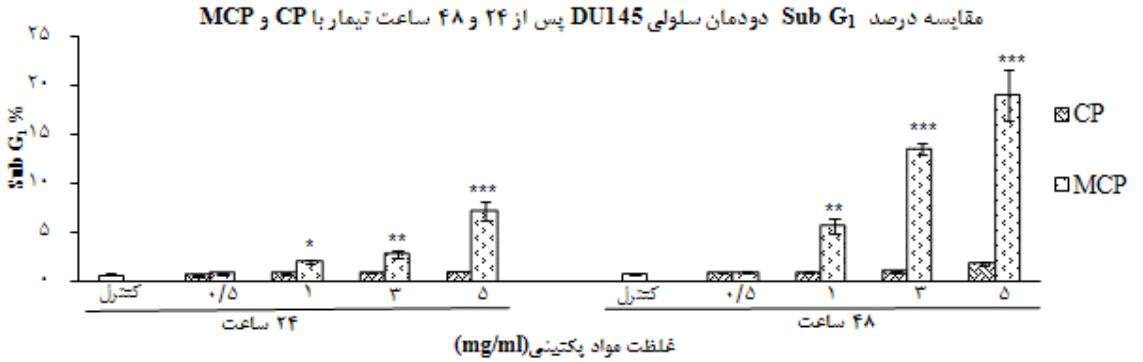


شکل۸- هیستوگرام ارائه شده توسط دستگاه فلوسایتومتری برای سلولهای DU145. درصد Sub G_1 بیانگر درصد آپوپتوز در این سلولها می باشد. (الف) مربوط به سلولهای کنترل، (ب) AP ۵ mg/ml، (ج) MAP ۵ mg/ml، (د) CP ۵ mg/ml، (ه) MCP ۵ mg/ml، (و) Pectasol ۳ mg/ml پس از ۴۸ ساعت تیمار می باشد. (AP=Acid pectic، MAP=Modified Acid Pectic، CP=Citrus Pectin، MCP=Modified Citrus Pectin)

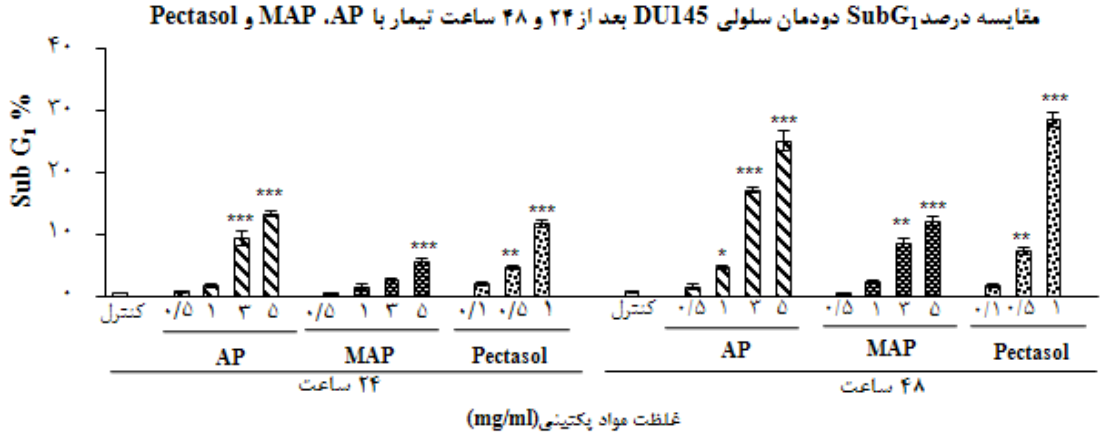


شکل۹- مقایسه اثر غلظتهای متفاوت AP و MAP بر درصد فاز Sub G_1 (آپوپتوز) سلولهای DU145 پس از ۲۴و ۴۸ ساعت انکوباسیون. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون غلظتهای ۳ mg/ml و ۵ AP نسبت به غلظت ۵ MAP mg/ml بصورت معنی دار افزایش فاز Sub G_1 در سلولهای تحت تیمار را نشان دادند($p<0.001$ = ***). نسبت به غلظت ۵ mg/ml MAP و ۳ AP نسبت به غلظت ۵ mg/ml MAP و ۳ بصورت معنی دار افزایش فاز Sub G_1 در سلولهای تحت تیمار را نشان دادند. ($p<0.001$ = +++) نسبت به غلظت متناظر و n=3). مقادیر ارائه شده معادل mean±S.E.M می باشند. (AP=Acid pectic، MAP=Modified Acid Pectic)

www.SID.ir



شکل ۱۰- مقایسه اثر غلظتهای متفاوت CP و MCP بر درصد فاز Sub G_1 (آپوپتوز) سلولهای DU145 پس از ۲۴و ۴۸ ساعت انکوباسیون. غلظتهای ۱، ۳ و ۵ mg/ml MCP نسبت به غلظتهای متناظر CP بصورت معنی دار افزایش فاز Sub G_1 در سلولهای تحت تیمار را نشان می دهند. مقادیر ارائه شده معادل mean±S.E.M می باشند. (*** = $p<0.001$ و $n=3$) (MCP=Modified Citrus Pectin ،CP=Citrus Pectin)



شکل ۱۱- مقایسه اثر غلظتهای متفاوت AP و MAP نسبت به غلظتهای متفاوت Pectasol بر درصد فاز Sub G_1 (آپوپتوز) سلولهای DU145 پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت انکوباسیون. غلظتهای ۱ mg/ml و ۳ Pectasol نسبت به تمام غلظتهای AP و MAP بصورت معنی دار افزایش فاز Sub G_1 در سلولهای تحت تیمار را نشان می دهند. مقادیر ارائه شده معادل mean±S.E.M می باشند. (*** = $p<0.001$ نسبت به کنترل و $n=3$) (MAP=Modified Acid Pectic ،AP=Acid pectic)

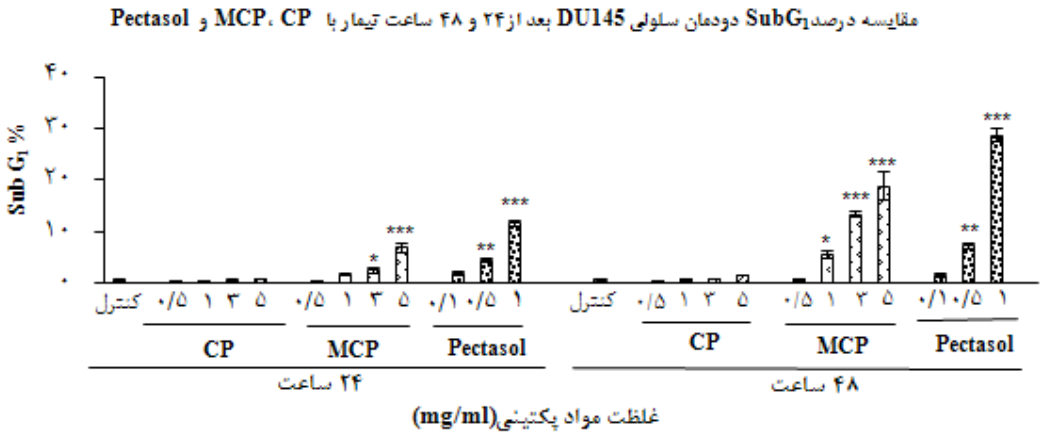
بحث

مطالعات بر روی اثر پکتین سیب یا اسید پکتیک (AP) بر دودمان سلولی GH3/B6 نشان داده است که، این ماده قادر به افزایش قدرت ترشحی این سلولها در زمانهای انکوباسیون کوتاه مدت (۳۰ دقیقه) می باشد (۱)، اما افزایش زمان انکوباسیون با تراکم بالای پکتین سیب در این سلولها، همراه با تغییرات مورفولوژیکی و نیز کاهش میزان ترشح پایه پرولاکتین می باشد (۱ و ۲۴). پس از آن بررسی به سوی مطالعه اثرات پکتین سیب (AP) به عنوان القاء کننده آپوپتوز روی سلولهای GH3/B6 l متمرکز گردید (۲).

در پژوهش حاضر نشان داده می شود که، پکتین سیب، بدون تغییر، قادر به ایجاد اثرات آپوپتوتیکی بالا در سلولهای سرطانی پروستات DU145 می باشد. همان طور که ذکر شد پکتین سیب، مولکولی کوچک است که قادر به القای آپوپتوز در سلولهای تحت تیمار خود می باشد. اگر این ملکول را تحت تأثیر دما و pH هیدرولیز کرده، یعنی

www.SID.ir

تبدیل به مولکولهای کوچکتر نموده، فاقد این اثر می گردد و یا با قدرت بسیار کمتری عمل می نماید. نتایج بررسی سیکل سلولی و رنگ آمیزی فلورسنت در این مطالعه، هر دو مؤید این مسئله بودند؛ به طوری که همواره میزان آپوپتوز القاء شده توسط AP در حد معنی داری بیشتر از MAP مشاهده شد.



شکل۱۲- مقایسه اثر غلظتهای متفاوت CP و MCP نسبت به غلظتهای متفاوت Pectasol بر درصد فاز $Sub\ G_1$ (آپوپتوز) سلولهای DU145 پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت انکوباسیون. غلظتهای mg/ml ۱ و ۳ Pectasol نسبت به تمام غلظتهای CP و MCP بصورت معنی دار افزایش فاز $Sub\ G_1$ در سلولهای تحت تیمار را نشان می دهند. مقادیر ارائه شده معادل mean±S.E.M می باشند. ($p<0.001$ = *** نسبت به کنترل و n=3)
(MCP=Modified Citrus Pectin ،CP=Citrus Pectin)

نتایج این مطالعه برای پکتین مرکبات (CP)، که مولکولی بزرگتر از پکتین سیب دارد، نشان می دهد که برخلاف پکتین سیب، این پکتین را باید به وسیله دما و pH هیدرولیز کرده تا مولکول آن کوچکتر گردد و پتانسیل القای آپوپتوز را در سلولهای سرطان پروستات DU145، دارا شود. نتایج بررسی سیکل سلولی و رنگ آمیزی فلورسنت در این پژوهش نشان داد، پکتین مرکبات (CP)، قادر به القای آپوپتوز در سلولهای سرطان پروستات انسانی DU145 نمی باشد. در حالی که، پکتین مرکبات تغییر یافته (MCP) افزایش معنی داری در میزان آپوپتوز القاء شده در سلولهای تحت تیمار نسبت به CP، نشان می دهد. بنابراین، امتیاز پکتین سیب به پکتین مرکبات بدین ترتیب ثابت می گردد. علاوه بر این، پکتین سیب از قسمت خوراکی آن به دست می آید در حالی که، پکتین مرکبات در پوست غیر خوراکی آن می باشد.

محققین دیگر از جمله آوراهام راز و همکارانش نیز در سال ۱۹۹۴ به این نتیجه رسیدند که قدرت آپوپتوتیک در CP وجود ندارد و هنگامی که به وسیله دما و pH هیدرولیز گردد و به صورت مولکولهای کوچکتر در آید (MCP)، دارای این قدرت می شود (۱۵).

در این مطالعه Pectasol به عنوان کنترل مثبت در تمام تستهای آپوپتوز پاسخ مثبت نشان داد. دبرا مهنن (Debra Mohnen) و همکارانش در سال ۲۰۰۷ نیز اثر آپوپتوزی Pectasol را روی سلولهای سرطان پروستات LNCaP نشان دادند (۱۶). پس از آن در سال ۲۰۱۰ محققین نشان دادند که Pectasol قادر به القای آپوپتوز در دو دودمان سلولی سرطان پروستات انسانی وابسته به آندروژن (LNCaP) و غیر وابسته به آندروژن (PC3) می باشد که تأیید کننده یافته های پژوهش حاضر است (۲۷).

مکانیسم القای آپوپتوز در سلولهای سرطانی، توسط مشتقات پکتینی هنوز به خوبی مشخص نشده است. اما

Archive of SID
www.SID.ir

پیشنهاد شده که اثرات آپوپتوتیکی و همچنین ضد متاستازی مواد پکتینی از طریق اتصال آنها به گالکتین ۳ (لکتین متصل شونده به گالاکتوزید) در سطح سلولهای سرطانی، صورت می گیرد (۱۰). گالکتینها پروتئینهای متصل شونده به کربوهیدراتها هستند که روی سطح سلولهای سرطانی وجود دارند. این مولکولها قادرند ارتباطات سلول به سلول را توسط اتصال به مولکولهای گلیکولیپیدی و گلیکوپروتئینی سطح سلولهای سرطانی راه اندازی کنند(۱۸).

جولی الرهورست (Julie Ellerhorst) و همکارانش در سال ۱۹۹۹ نشان دادند که، دودمان سلولی DU145 قادر به بیان گالکتین ۳ می باشد (۹). محققین گالکتین ۳ را به عنوان رسپتور مواد پکتینی معرفی می کنند (۲۰و ۲۱). بنابراین، این فرضیه مطرح می شود که، مشتقات پکتینی مؤثر در القای آپوپتوز که در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفته اند (AP، MCP، MAP و Pectasol)، احتمالا" از طریق میانکنش با گالکتین ۳ سطح سلولهای DU145 این اثر را اعمال نموده اند.

مطالعات نشان داده است که، اثرات آپوپتوزی و همچنین ضد متاستازی مشتقات پکتینی از جمله پکتین مرکبات تغییر یافته (MCP) هیچ گونه سمیت سلولی به همراه ندارد (۱۵). در ضمن محققین در سال ۲۰۰۷ نشان دادند که مواد پکتینی قادر به القای آپوپتوز در سلولهای طبیعی بدن یعنی اندوتلیال رگی (HUVEC) نیستند. با توجه به اینکه، سلولهای اندوتلیال رگی در تماس مستقیم با مواد وارد شده در خون می باشند، مؤثر نبودن این مواد بر القای آپوپتوز در این سلولها از اهمیت ویژه ای برخوردار است (۱۶).

بهر حال، استفاده از پکتینها در درمان سرطانهای مختلف روز به روز بیشتر می شود، اما مکانیسم القای آپوپتوز توسط این مواد هنوز به خوبی شناخته نشده است و نیاز به پژوهشهای عمیق تر دارد. محققین در سال ۲۰۰۹ فرضیه جدیدی را بیان کردند که مواد پکتینی با دخالت گالکتین ۳ از طریق القای آنوئیکیز (Anoikies) (مرگ سلولی در اثر از دست دادن پیوندهای سلولی) باعث مرگ سلولهای سرطانی می شوند (۱۰). اخیرا" نیز مطالعه روی دو دودمان سلولی پروستات انسانی LNCaP که فاقد گالکتین ۳ و PC3 که دارای این رسپتور می باشد، القای آپوپتوز توسط Pectasol را به مهار مسیر MAP kinase و افزایش سطح بیان پروتئین پروآپوپتوتیک Bim و نهایتا" شکسته شدن پروکاسپاز ۳ نسبت داده است (۲۷).

علاوه بر این، پیچیدگی ساختاری این پلی ساکاریدها و تغییراتی که طی پروسه استخراج از گیاهان و همچنین ایجاد تغییر به وسیله pH و حرارت، در ساختار اولیه آنها ایجاد می شود، هنوز روشن نشده و نیاز به مطالعه بیشتر دارد.

تقدیر و تشکر

این تحقیق توسط بودجه پژوهشی دانشگاه تهران- پردیس علوم انجام یافته است. از سرکار خانم دکتر آمنه رضایوف به خاطر کمک و راهنمایی بی دریغشان در انجام آنالیز آماری و سرکار خانم کاملیا سیامکی، کارشناس آزمایشگاه بیولوژی مولکولی مرکز تحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک دانشگاه تهران به خاطر مساعدت و همکاری صمیمانه شان کمال تشکر و قدردانی به عمل می آید.

منابع

۱. اسلیمی، دلارام. سپهری، حوری. گلیایی، بهرام. رسولی، یاسمن. خویی، سمیده (۱۳۸۵). مقایسه اثر اسید پکتیک و هورمون آزاد کننده تیروتروپین بر میزان ترشح پرولاکتین توسط سلولهای GH3/B6 هیپوفیز موش صحرایی. مجله علوم دانشگاه تهران. ۳۲(۴):۳۵۹-۳۵۵

۲. عطاری، فرنوش. سپهری، حوری. اژدری، سهیلا. گلیایی، بهرام. دلفی، لادن (۱۳۸۸). القای آپوپتوز و نکروز به وسیله اسید پکتیک

Archive of SID
www.SID.ir

در دودمان سلولی هیپوفیزی GH3/B6 . مجله زیست شناسی ایران. ۲۲(۳):۵۰۵-۴۹۸

modified citrus pectin. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 37(5): 833–841

15. Inohara H. and Raz A. (1994) Effects of natural complex carbohydrates (citrus pectin) on murine melanoma cell properties related to galectin-3 functions. *Glycoconjugate J*. 11(6): 527-532
16. Mohnen D, Jackson CL, Dreaden TM, Theobald LK, Tran NM, Beal TL, *et al.* (2007) Pectin induces apoptosis in human prostate cancer cells: correlation of apoptotic function with pectin structure. *Glycobiology*. vol. 17(8): 805–819
17. Liu Y, Ahmad H, Luo Y, Gardiner DT, Gunasekera RS, McKeehan WL, *et al.* (2001) Citrus pectin: characterization and inhibitory effect on fibroblast growth factor receptor interaction. *J. Agric. Food Chem.* 49(6): 3051–3057
18. Nangia-Makker P, Conklin J, Hogan V, Raz A. (2002) Carbohydrate-binding proteins in cancer, and their ligands as therapeutic agents. *Trends in molecular medicine*. 8(4): 187-192
19. Olano-Martin E, Rimbach GH, Gibson GR, Rastall RA. (2003) Pectin and Pectic oligosaccharides induce apoptosis in *in vitro* human colonic adenocarcinoma cells. *Anticancer research.* 23(1A): 341-346
20. Pienta KJ, Naik H, Akhtar A, Yamazaki K, Replogle TS, Lehr J, *e.t al.* (1995) Inhibition of spontaneous metastasis in a rat prostate cancer model by oral administration of modified citrus pectin. *J.Natl.Cancer Inst.* 87(5): 348–353
21. Platt, D. and Raz, A. (1992) Modulation of the lung colonization of B16-F1 melanoma cells by citrus pectin. *J. Natl. Cancer Inst.* 84(6): 438–442
22. Pratima Nangia-Makker, Victor Hogan, Yuichiro Honjo, sara Baccarini, Larry Tait, Avraham Raz, *et. al.* (2002) Inhibition of human cancer cell growth and metastasis in nude mice by oral intake of modified citrus pectin. *J Natl Cancer Inst.* 94(24):1854-1862
23. R.Ian Freshney. (2006) Characterization. Culture of Animal Cells. New Jersy: John Wiley & Sons; 247-280
24. Sepehri, H. Zoraghi, R. Haeri Rouhani, A. (2000) Effect of Pectic Acid and β-glucan on prolactin secretion by ovine pituitary explants. Iran.Int.J.Sci. 1: 99-109
25. Sergio Huerta, Emily J. Goulet, Sara Huerta-Yepez, Edward H. Livingston. (2007) Screening and Detection of Apoptosis. *Journal of Surgical Research* 139(1): 143–156

3. Attari F, Sepehri H, Delphi L, Goliaei B. (2009) Apoptotic and Necrotic effects of Pectic Acid on rat pituitary GH3/B6 tumor cells. *Iranian Biomedical Journal.* 13(40): 163-70
4. Avivi-Green C, Madar Z, Schwartz B. (2000) Pectin-enriched diet affects distribution and expression of apoptosis cascade proteins in colonic crypts of dimethylhydrazine-treated rats. *Int. J. Mol. Med.* 6(6): 689–698
5. Avivi-Green C, Polak-Charcon S, Madar Z, Schwartz B. (2000) Apoptosis cascade proteins are regulated in vivo by high intracolonic butyrate concentration: correlation with colon cancer inhibition. *Oncol Res.* 12(2): 83-95
6. Avivi-Green C, Polak-Charcon S, Madar Z, Schwartz B. (2000) Dietary regulation and localization of apoptosis cascade proteins in the colonic crypt. *J Cell Biochem.* 77(1): 18-29
7. Chang WC, Chapkin RS, Lupton JR. (1997) Predictive value of proliferation, differentiation and apoptosis as intermediate markers for colon tumorigenesis. *Carcinogenesis.* 18(4): 721-730
8. Chauhan D, Li G, Podar K, Hideshima T, Neri P, He D, *et al.* (2005) A novel carbohydrate-based therapeutic GCS-100 overcomes bortezomib resistance and enhances dexamethasoneinduced apoptosis in multiple myeloma cells. *Cancer Res.* 65(18): 8350-8358
9. Ellerhorst J, Nguyen T, Cooper DN, Lotan D, Lotan R. (1999) Differential expression of endogenous galectin-1 and galectin-3 in human prostate cancer cell lines and effects of overexpressing galectin-1 on cell phenotype. *Int J oncol.* 14(2): 217-224
10. Glinsky VV. and Raz A. (2009) Modified citrus pectin anti-metastatic properties: one bullet, multiple targets. *carbohydrate research.* 344(14): 1788-91
11. Hayashi A, Gillen AC, Lott JR. (2000) Effects of daily oral administration of quercetin chalcone and modified citrus pectin. *Altern. Med. Rev.* 5(6): 546–552
12. Heitman DW, Hardman WE, Cameron IL. (1992) Dietary supplementation with pectin and guar gum on 1,2- dimethylhydrazineinduced colon carcinogenesis in rats. *Carcinogenesis.* 13(5): 815-818
13. Hensel, A. and Meier, K. (1999) Pectins and xyloglucans exhibit antimutagenic activities against nitroaromatic compounds. *Planta Med.* 65(5): 395–399
14. Hsieh, T.C. and Wu, J.M. (1995) Changes in cell growth, cyclin/kinase, endogenous phosphoproteins and nm23 gene expression in human prostatic JCA-1 cells treated with

Archive of SID
www.SID.ir

26. Smith-Barbaro P, Hanson D, Reddy BS. (1981) Carcinogen binding to various types of dietary fiber. *J. Natl.Cancer Inst.* 67(2): 495–497

27. Yan J & Katz A. (2010) PectaSol-C modified citrus pectin induces apoptosis and inhibition of proliferation in human and mouse androgen-dependent and- independent prostate cancer cells. *Integr Cancer Ther*. 9(2):197-203.

Effect of Pectic Substances in Induction of Apoptosis in Human Prostate cell line DU145

Dasht Bozorgi S.[1], Sepehri H.[1], Goliae B.[2], Delphi L.[1] and Jan Zamin E.[3]

[1]Animal Physiology Dept., School of Biology, University College of Science, University of Tehran, Tehran, I.R. of Iran

[2] Institute of Biophysics and Biochemistry, University of Tehran, Tehran, I.R. of Iran

[3]Stem Cells and Developmental Biology Dept., Royan Institute for Stem Cell Biology and Technology, ACECR, Tehran, I.R. of Iran

Abstract

Pectic substances are complex polysaccharides, rich in galactoside residues, capable of combining with the carbohydrate-binding domain of galectin-3. It has been shown that these biomaterials can induce apoptosis in tumurigenic cells, possibly via interaction with galectin-3. In the present study the apoptotic effect of pectic acid (AP) and citrus pectin (CP) on the human prostate cancer cells DU145, which express galectin-3, is investigated.PA and CP were modified by alteration in the temperature and pH, and the apoptotic effect of such modified CP (MCP) and AP (MAP) was studied. We also used commercially available modified citrus pectin, Pectasol, as positive control. DU145 cells were treated by different concentration of AP, MAP, CP, MCP, and Pectasol in periods of 24 and 48 hours. The percentage of apoptotic cells, after these treatments were investigated using Acridine orange/ Ethidium bromide staining and Cell cycle analysis. These investigations showed that AP, MAP, MCP can induce high percentage of apoptosis compared to control group ($p<0.001$). In addition, fluorescent staining showed that percentage of apoptotic cells were higher than necrotic cells. We demonstrated that, AP without any modification induced apoptosis, yet CP should be modified to have such value. It may be a dominant point for AP as an edible pectin, while citrus pectinase is in the non-edible peal and should be modified to have such property.

Keywords: Apoptosis, Acid Pectic, Citrus Pectin, Modified Citrus Pectin, DU145 cell line

Archive of SID

www.SID.ir