اثر پکتین تغییر یافته مرکبات (MCP) بر فرآیند رگزایی سلولهای HUVEC و دودمان سلولی سرطان پروستات انسانی DU145

الهام حضوری[۱] ، حوری سپهری[۱*]، لادن دلفی[۱]، سارا دشت بزرگی[۱] و بهرام گلیایی[۲]

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

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

تاریخ دریافت: ۹۰/۱۱/۱۰ تاریخ پذیرش: ۹۲/۴/۳۱

چکیده

مواد پکتینی، پلی ساکارید های غنی از زیر واحد های گالاکتوز می باشند و به گیرنده خود گالکتین-۳ پیوند می شوند، این مواد قادر به القای آپوپتوز و مهار متاستاز در سلولهای سرطانی از طریق میانکنش با گیرنده می باشند. پژوهش حاضر اثر پکتین تغییر یافته مرکبات (MCP) بر کاهش رگزایی سلولهای HUVEC و سلولهای سرطان پروستات انسانی DU145 را بررسی می کند. پکتین مرکبات به کمک گرما و pH تغییر یافته است. این بررسی به وسیله اثر محیط کشت رویی سلولهای DU145 قبل و بعد از تیمار با MCP در زمانهای ۲۴ و ۴۸ ساعت انجام گرفته است که حاوی عوامل مؤثر برای رگزایی و مهاجرت سلولی است زیرا پس از افزودن آن به محیط کشت سلولهای HUVEC (دودمان سلولی آندوتلیال) رگزایی و مهاجرت آنها تشدید می گردد. در حالی که اگر جداسازی محیط کشت پس از تیمار آنها به وسیله MCP باشد، کاهش رگزایی و مهاجرت در سلولهای HUVEC دیده می شود. پژوهشها نشان می دهد که MCP بر ترشح فاکتور های رشد رگزا نظیر VEGF که از سلولهای سرطانی DU145 ترشح می شوند اثر مهاری دارد و با کاهش رگزایی در سلولهای HUVEC و عدم مهاجرت و متاستاز آنها همراه است. در این مطالعه برای سلولهای HUVEC، به عنوان کنترل منفی، از PEITC (Phenethyl Isothiocyanate) که مهاجرت سلولهای رگزا را متوقف می کند و از فاکتور رشد VEGF، که خاصیت رگزایی را در این سلولها افزایش می دهد، به عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

واژه های کلیدی: *رگزایی، پکتین تغییر یافته، MCP ، دودمان سلولی DU145، سلولهای HUVEC، VEGF*

* نویسنده مسئول، تلفن: ۶۱۱۱۲۶۲۶ ، پست الکترونیکی: hsepehri@khayam.ut.ac.ir

مقدمه

آنژیوژنزیس یا رگزایی فرآیند فیزیولوژیک شرکت کننده در بهبود زخم، رشد و تکوین جنین، زایمان و تکثیر آندومتر می‌باشد. رگزایی همچنین فرآیند اساسی در تکثیر، گسترش و متاستاز سلولهای سرطانی است (۲ و۱۳). زمانی که اندازه تومور کمتر از ۰/۵mm است، مواد غذایی و اکسیژن مورد نیاز سلولهای سرطانی از طریق انتشار تأمین می شود (avascular stage)، اما هنگامی که اندازه تومور بیش از ۰/۵mm باشد، مواد غذایی و اکسیژن حاصل از انتشار به اندازه کافی به سلولها نخواهد رسید و در این زمان سلولهای سرطانی شروع به تولید فاکتورهای رگزایی از جمله VEGF، FGF2 و PDGF می کنند (vascular stage) (۲و۳). تومور تا زمانی که بتواند با ترشح فاکتورهای رگزا باعث رشد رگهای جدید شود، درمرحله کمون می ماند. فرآیند رگزایی شامل مراحل ترشح فاکتور رگزا ، قرار گیری آن روی گیرنده، تخریب غشاءی اولیه و

Archive of SID
www.SID.ir

مهاجرت سلولهای اندوتلیالی به سوی تومور می باشد (۷ و ۱۳).

یکی از مواد اصلی تشکیل دهنده دیواره سلولی در سلولهای گیاهی پکتینها می باشند که در میان پلی ساکاریدها بیشترین پیچیدگی ساختاری را دارا هستند . پکتین مرکبات اغلب در گوشت و پوست مرکباتی مثل گریپ فروت ، پرتقال و لیمو یافت می شود. این ماده، پلی ساکارید بسیار منشعب و پیچیده به همراه تعداد زیادی زیر واحدهای گالاکتوزید است و به وسیله تغییر pH یا دما می توان آن را به صورت پکتین تغییر یافته در آورد (۱۲). تحقیقات نشان داده است که، MCP باعث القای آپوپتوز در سلولهای سرطانی شده و از مهاجرت آنها جلوگیری می کند. بنابراین مانع بروز متاستاز می گردد (۴). در سلولهای سرطانی، Gal -3 باعث اتصال سلولها به اندوتلیوم رگهای خونی می‌گردد، بنابراین Gal -3 می‌تواند در متاستاز سلولهای سرطانی نقش مهمی ایفا کند(۱). MCP در سطح سلولهای سرطانی به Gal-3 متصل و مانع از اتصال آن به سایر گیرنده های سطح سلولی (که بر روی سلولهای دیگر مستقر می باشند) می‌شود. مطالعات نشان می دهند که گیرنده Gal -3 عامل القای حرکت و مهاجرت سلولهای اندوتلیال بر روی ماتریژل و ایجاد شبکه های شبه مویرگی دراین سلولها به صورت *in vitro* می باشد . MCP با مهار Gal-3، مانع مهاجرت سلولهای اندوتلیال و شکل گیری شبکه های شبه مویرگی می گردد. در مدلهای سرطانی، تغذیه با MCP سبب مهار رگزایی و مهار متاستاز می‌شود (۴).

در پژوهش حاضر اثر پکتین تغییر یافته مرکبات در سلولهای سرطانی پروستات DU145 در موارد زیر مورد بررسی قرار گرفته است:

- بررسی اثر پکتین مرکبات تغییر یافته بر درصد زیستایی سلولهای سرطانی DU145 و سلولهای آندوتلیالی HUVEC
- بررسی اثر MCP در میزان رگزایی سلولهای HUVEC
- بررسی اثر این ماده روی مهاجرت سلولهای HUVEC

در این مطالعه نشان داده شده است که به کاربردن MCP روی دودمان سلولهای سرطان پروستات DU145 می تواند مهاجرت آنها را مهار کند و از متاستازی شدن آنها جلوگیری نماید. بنابراین شاید بتوان با دسترسی به داروهای غیرشیمیایی مؤثر در مهار متاستاز، با توجه به کم بودن اثرات جانبی این مواد، از آنها در از بین بردن این سلولها استفاده کرد و میزان مصرف داروهای شیمیایی را کاهش داد.

مواد و روشها

کشت سلول: در اینجا، به منظور رشد و تکثیر سلولهای DU145 از محیط RPMI 1640 ، که به آن ۱۰ درصد سرم جنین گاو اضافه شده بود، استفاده گردید. کشت سلولهای HUVEC در محیط DMEM/HamsF12 حاوی ۲۰ درصد سرم جنین گاو صورت گرفت. برای سترون کردن محیط و جلوگیری از آلودگی، پنی سیلین با غلظت UI/ml ۱۰۰ و استرپتومایسین با غلظت µg/ml ۱۰۰ به محیط اضافه و pH مناسب برای آن بین ۷/۲–۷ تنظیم گردید.

آماده سازی پکتین تغییریافته مرکبات: تهیه پکتین تغییر یافته با توجه به روش انجام شده توسط آوراهام راز صورت گرفت. برای این منظور محلول ۱/۵ درصد پکتین تهیه گردید، سپس pH محلول حاصل توسط NaOH ۳ نرمال به ۱۰ رسانده شد و پس از یک ساعت انکوباسیون در دمای ۵۵ درجه سانتی گراد، توسط محلول HCL، روی pH ۳ تنظیم گردید. محلول حاصل به مدت یک شبانه روز در دمای محیط نگهداری و سپس به آن اتانل اضافه گردید. محلول ژلاتینی حاصل در نهایت پس از عبور از کاغذ صافی، خشک و به عنوان MCP مورد استفاده قرار گرفت (۱۰).

Archive of SID

www.SID.ir

تعیین درصد زیستایی: به منظور تعیین درصد زیستایی سلولها از روش تریپان بلو استفاده شد. ابتدا تعداد ۲×۱۰^{۵} سلول در ظروف ۲۴ چاهکی کشت داده شد و بعد از ۲۴ ساعت پیش انکوباسیون، سلولهای DU145 و HUVEC با غلظتهای مختلف MCP (۱ g/ml، ۰/۵، ۰/۱، ۰/۰۵، ۰/۰۱) تیمار شدند. در مورد سلولهای HUVEC علاوه بر MCP از PEITC (Phenethyl Isothiocyanate) (با غلظت ۶/۸ mM و ۳/۴) به عنوان کنترل منفی و VEGF (ng/ml ۴۰ ، ۳۰ و ۱۵) به عنوان کنترل مثبت استفاده شده است (۱۴ و ۱۵). پس از طی دوره های زمانی ۲۴ و ۴۸ ساعت انکوباسیون سلولها توسط تریپان بلو ۴ درصد ، رنگ آمیزی و درصد سلولهای زنده به وسیله میکروسکوپ نوری تعیین گردید.

کشت سه بعدی سلولهای HUVEC: به منظور کشت سه بعدی سلولهای HUVEC از کلاژل (ژل کلاژن) استفاده شد. برای تهیه این ژل ابتدا کلاژن نوع I (Sigma) در اسید استیک ۰/۱ مولار محلول و پس از افزودن µl ۱۰۰محیط کشت ۱۰X، pH آن توسط NaOH نرمال روی ۷ تنظیم گردید. محلول حاصل در ظروف کشت ۹۶ چاهکی ریخته و به منظور ایجاد ژل به مدت ۲۰ –۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد نگهداری شد.

بعد از آماده شدن کلاژل ، تعداد۱×۱۰^{۴} سلول در هر چاهک برای ۴۸ ساعت کشت داده شد. در این مدت کم کم شبکه های شبه مویرگی شروع به ظاهر شدن می کنند. سپس محیط رویی سلولهای DU145 که از قبل به مدت ۲۴ ساعت با غلظتهای مختلف MCP تیمار شده بود، با محیط رویی سلولهای HUVEC جابه جا گردید و شکل گیری شبکه‌های شبه مویرگی طی مدت زمان ۴۸ ساعت، توسط میکروسکوپ فاز معکوس مورد بررسی قرار گرفت.

بررسی مهاجرت سلولهای HUVEC: تعداد ۵×۱۰^{۵} سلول در ظروف کشت ۲۴ چاهکی کشت داده شد، سپس با کمک چاقوی جراحی به کف هر چاهک خراشی داده شد و سلولها با تراکمهای مختلف MCP مورد تیمار قرار گرفتند. مهاجرت سلولهای HUVEC به منظور پر کردن خراش به مدت ۴۸ ساعت ، توسط میکروسکوپ فاز معکوس دنبال شد.

تجزیه و تحلیل آماری: تجزیه و تحلیل های آماری با استفاده از نرم افزار SPSS و تست پارامتریک ANOVA یک طرفه و دو طرفه انجام شد. نتایج به صورت SEM± میانگین (n =۳) نشان داده شده است.

نتایج

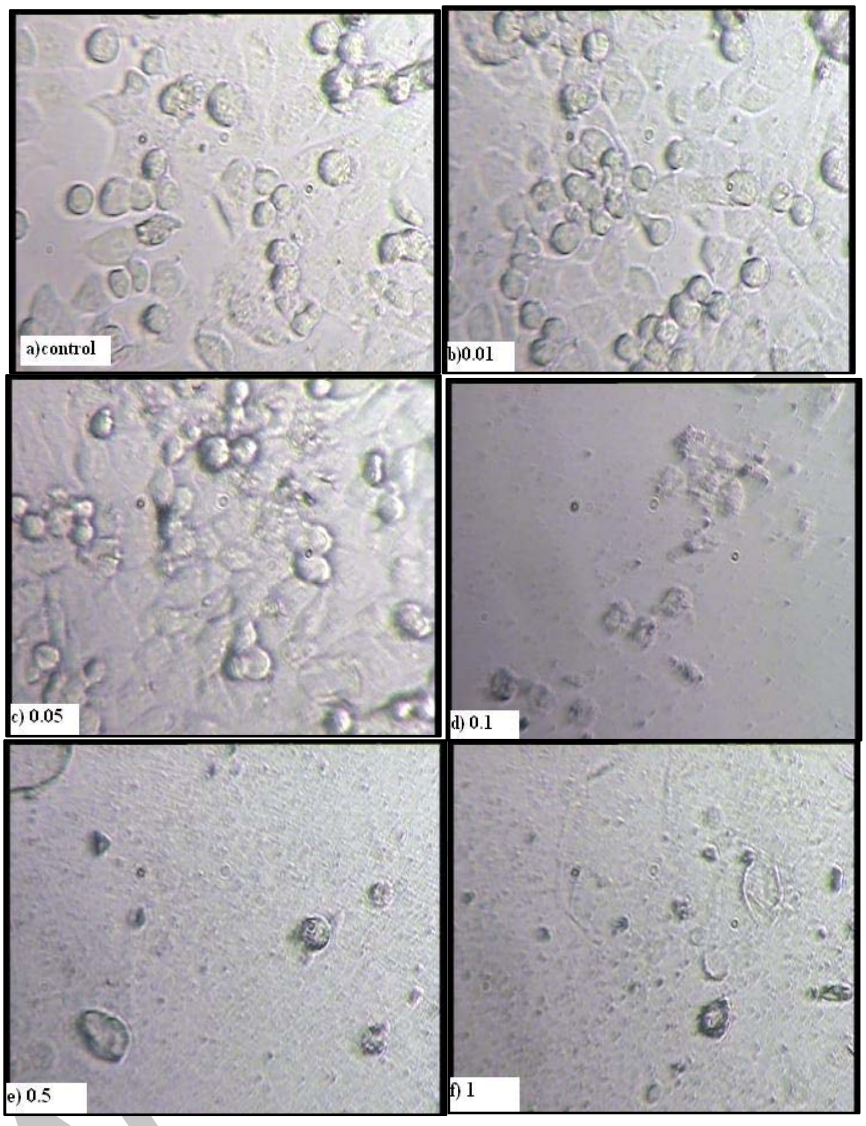
اثر MCP بر ریخت‌شناسی سلولی: ریخت شناسی سلولهای DU145 پس از ۴۸ ساعت در نمونه شاهد به صورت تک لایه، چسبیده به کف فلاسک و در حال تقسیم مشاهده می شوند. در نمونه های با غلظت پایینMCP (۰/۰۱ و g/ml ۰/۰۵) تغییری در ریخت شناسی سلولها نسبت به سلولهای شاهد مشاهده نشد. اما در نمونه هایی که با غلظتهای بالای MCP (۰/۱، ۰/۵، و g/ml ۱) تیمار شده بودند، تغییرات قابل ملاحظه ای در شکل آنها دیده شد (شکل ۱):

- تغییرات عمده در حالت طبیعی غشاءی سلولی و گرانوله شدن سلولها
- کاهش حجم سلول

در مورد سلولهای HUVEC ، پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت انکوباسیون، سلولهای گروه کنترل به صورت تک لایه به ته ظرف می چسبند (شکل a-۲). در انکوباسیون ۴۸ ساعت و در غلظتهای پایین MCP (۰/۰۱، ۰/۰۵ و g/ml ۰/۱) تغییری در شکل آنها نسبت به سلولهای شاهد مشاهده نگردید. در حالی که غلظتهای بالای MCP (۰/۵، و g/ml ۱) تغییر در شکل سلولها شامل چروکیده شدن غشاء، گرانوله شدن سیتوپلاسم و جدا شدن سلولها از کف فلاسک می باشد (شکل۲).

Archive of SID

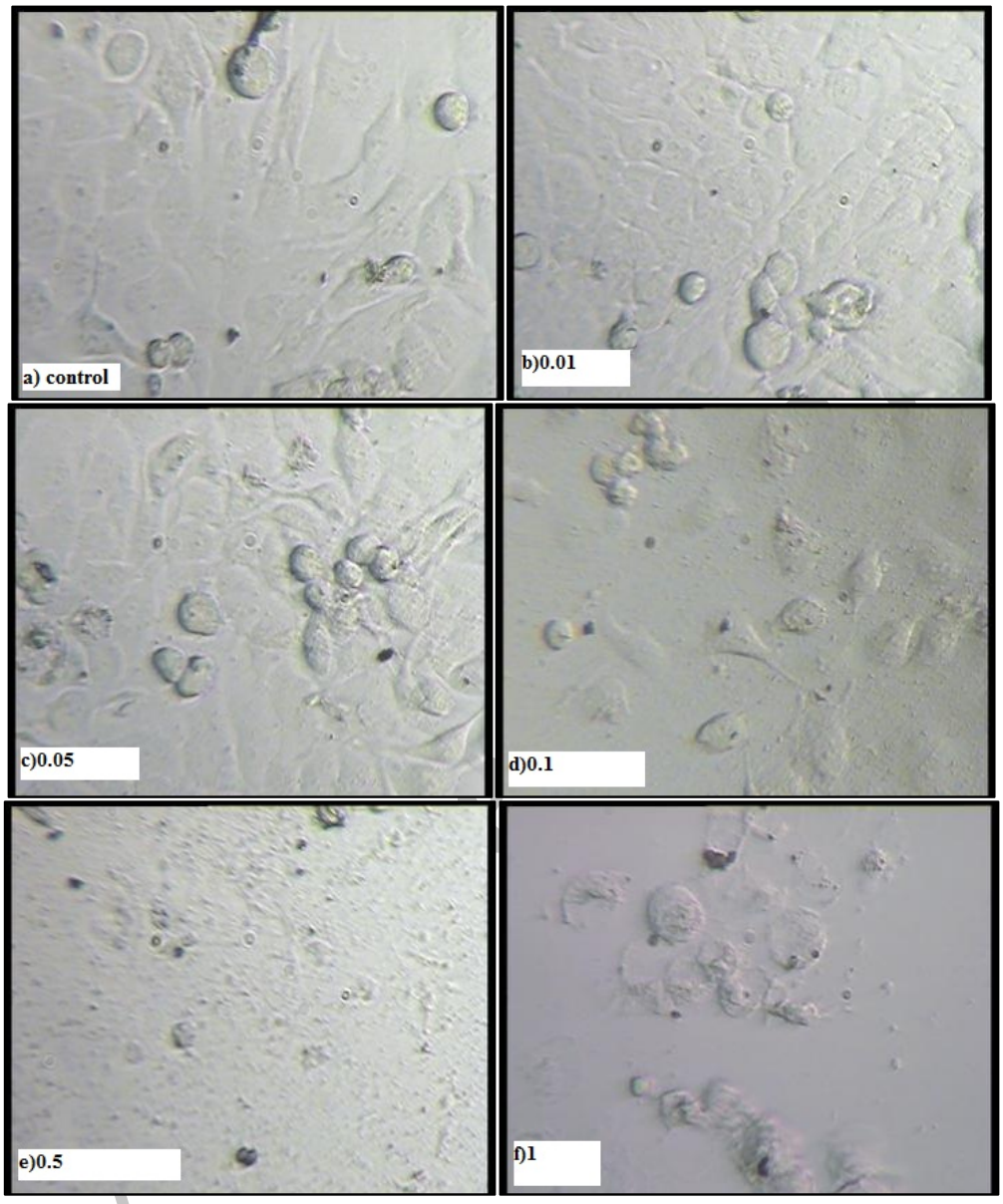
www.SID.ir



شکل ۱ – مورفولوژی سلولهای DU145 پس از ۴۸ ساعت تیمار با غلظتهای مختلف MCP(mg/ml) – با افزایش غلظت MCP سلولها چروکیده شده و در سیتوپلاسم آنها گرانولهایی مشاهده می‌شود.

اثر MCP بر درصد زیستایی سلول: در زمانهای ۲۴ ساعت و ۴۸ ساعت غلظتهای ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۵، ۱ g/ml MCP کاهش معنی دار درصد زیستایی سلولهای DU145 نسبت به گروه کنترل مشاهده گردید (نماد *** برای p< ۰/۰۰۱ و نماد ** برای p۰/۰۱). بررسی آماری توسط آزمون ANOVA دو طرفه می باشد. کاهش درصد زیستایی سلولهای DU145 وابسته به دز (p<۰/۰۰۱) و وابسته به زمان (p<۰/۰۰۱) است، اما اختلاف معنی دار بین دو زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت انکوباسیون دیده نشد. بنابراین می توان نتیجه گیری کرد که، MCP در حالت وابسته به دز و در زمان ۲۴ ساعت سبب کاهش بقای سلولهای DU145 می گردد (شکل۳).

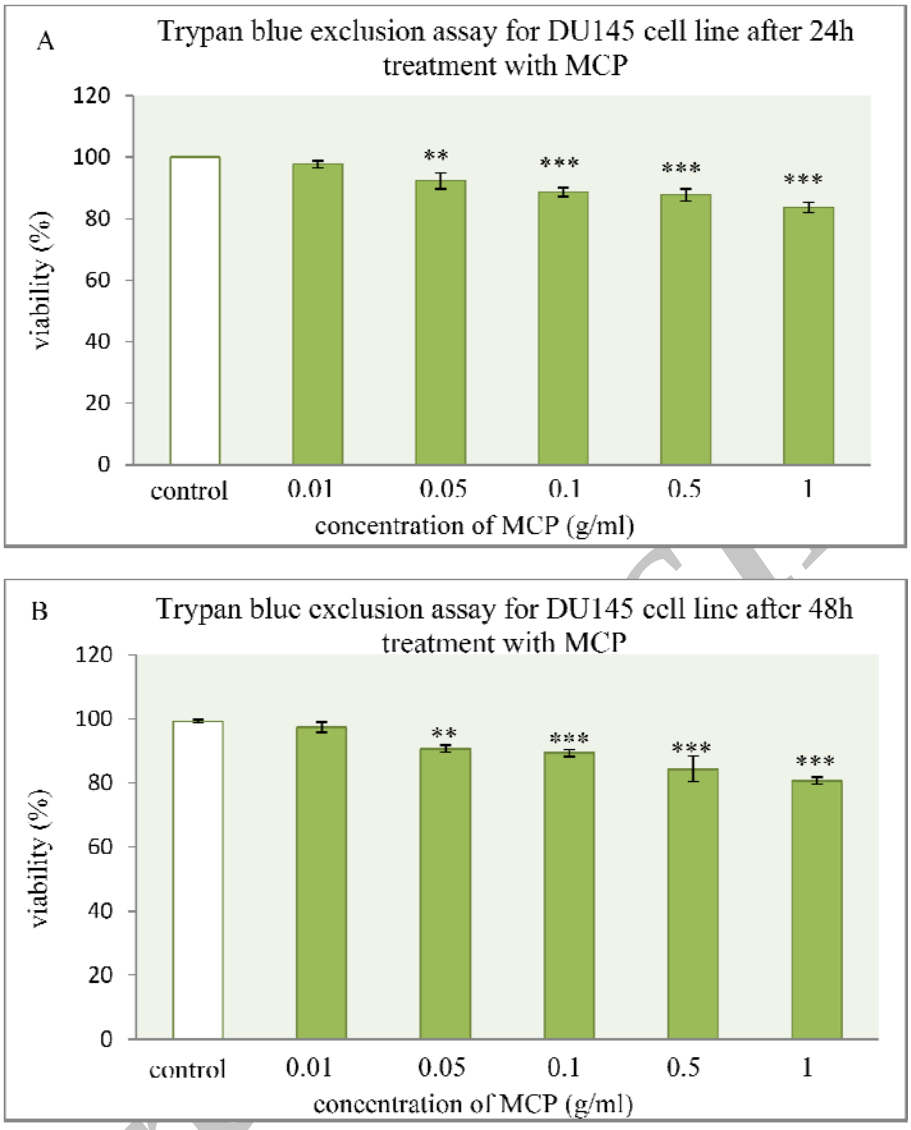
www.SID.ir



شکل ۲ – مورفولوژی سلولهای HUVEC پس از ۴۸ ساعت تیمار با غلظتهای مختلف MCP (mg/ml) – غشاءی سلولهای HUVEC در انکوباسیون با MCP تغییر کرده و با افزایش غلظت این ماده از سطح فلاسک جدا می‌شوند.

در مورد سلولهای HUVEC، غلظتهای ۰/۵ و ۱ g/ml از MCP پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت سبب کاهش معنی دار درصد زیستایی سلولها نسبت به گروه کنترل می گردد. نتایج آزمون ANOVA دو طرفه نشان می دهد که، کاهش درصد زیستایی سلولهای HUVEC وابسته به غلظت ($p<۰/۰۰۱$) و وابسته به زمان($p<۰/۰۰۱$) است. اما اختلاف معنی دار بین دو انکوباسیون ۲۴ و ۴۸ ساعت وجود ندارد. بنابراین تأثیر MCP وابسته به تراکم می باشد و انکوباسیون ۴۸ ساعت سبب کاهش بقای سلولهای HUVEC می شود (شکل ۴).

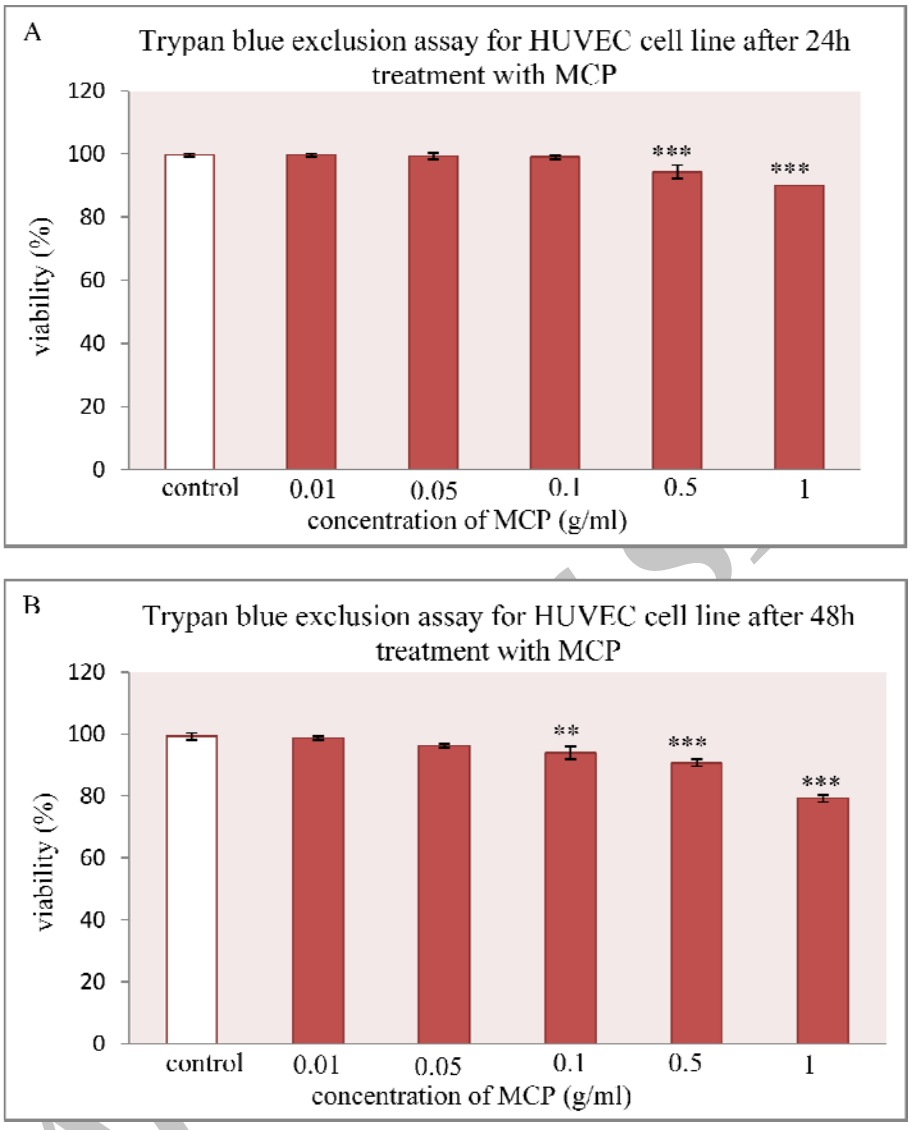
www.SID.ir



شکل ۳ – تغییر درصد زیستای سلولهای DU145 پس از تیمار با غلظتهای مختلف MCP توسط رنگ‌آمیزی تریپان بلو- انکوباسیون به مدت۲۴ ساعت (A) و ۴۸ ساعت(B) می باشد. *** یعنی دارا بودن p< ۰/۰۰۱ و ** p<۰/۰۱، n=۳.

کشت سه بعدی سلولهای HUVEC به منظور تشکیل شبکه های شبه مویرگی: به منظور تشکیل شبکه های شبه مویرگی، سلولهای HUVEC روی کلاژل یا ژل کلاژن کشت داده شدند. پس از ۲۴ ساعت قرار گیری سلولها روی ژل کلاژن در صورت مناسب بودن شرایط، سلولها به هم چسبیده و شروع به تقسیم می کنند. در طی این مدت برخی از سلولها کشیده می شوند. پس از۴۸ ساعت این سلولها روی کلاژل، شبکه های شبه مویرگی قابل مشاهده تشکیل می‌دهند (شکل۵). برای جستجوی بهترین زمان مشاهده شبکه‌های مویرگی، انکوباسیونبه مدت ۷۲ ساعت نیز انجام شد. پس از این زمان به دلیل تکثیر سلولی، فضاهای خالی بین سلولها پر شده به طوری که مشاهده شبکه های سه بعدی امکان پذیر نمی باشد (شکلb-۵). بنابراین زمان مناسب برای مشاهده شبکه های شبه مویرگی ۲۴ تا ۴۸ ساعت است.

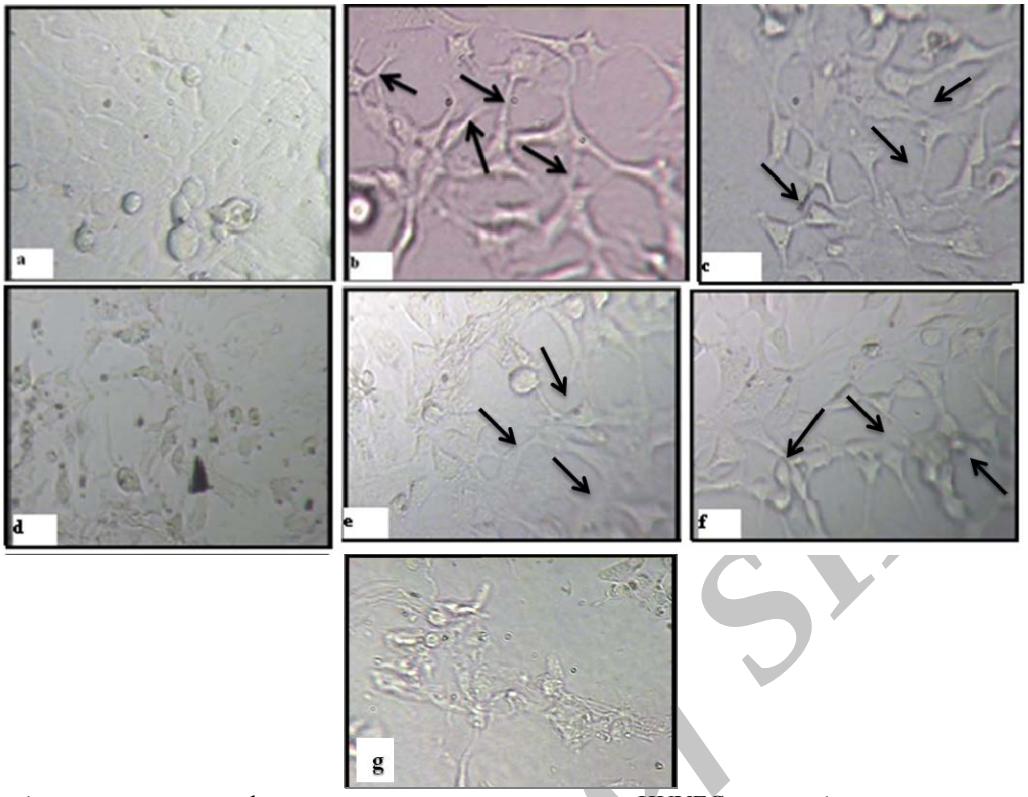
www.SID.ir



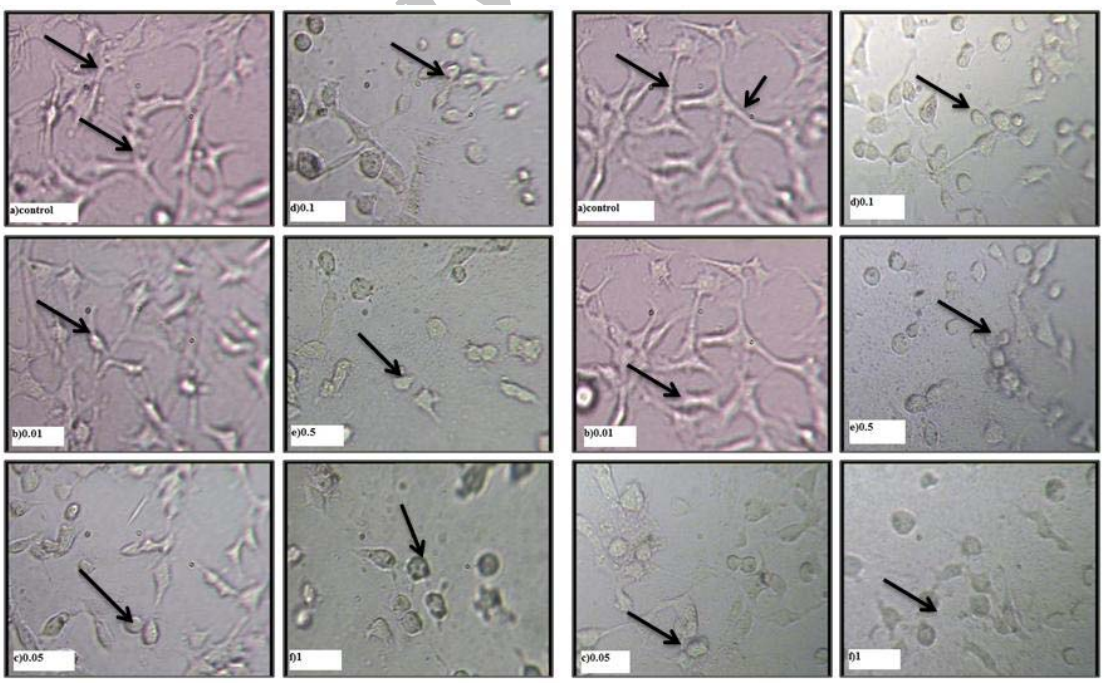
شکل ۴ – تغییرات درصد زیستایی سلولهای HUVEC پس از تیمار با غلظتهای مختلفMCP توسط رنگ‌آمیزی تریپان بلو– انکوباسیون به مدت۲۴ ساعت (A) و ۴۸ ساعت(B) می باشد. *** یعنی دارا بودن ۰/۰۰۱ >p و ** ۰/۰۱>p، n=۳.

تأثیر مشتقات پکتینی بر ترشح فاکتورهای رگزایی در سلولهای DU145: برای این منظور ابتدا سلولهای DU145 با تراکمهای مختلف MCP به مدت ۲۴ ساعت تیمار شد، سپس محیط رویی آنها جمع آوری گردید. پس از آن این محیطها که حاوی تراکمهای مختلف MCP می باشند، روی سلولهای HUVEC ریخته شد و شکل گیری شبکه های شبه مویرگی پس از ۴۸ ساعت، مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که تشکیل شبکه های شبه مویرگی در این سلولها کاهش می یابد. این کاهش رگزایی وابسته به تراکم MCP می باشد. نتایج مؤید این نظر است که در اثر کاهش ترشح فاکتورهای رگزایی توسط سلولهای DU145 پس از تیمار با MCP رگزایی در این سلولها به طور قابل ملاحظه ای مهار می گردد (شکل ۶).

www.SID.ir



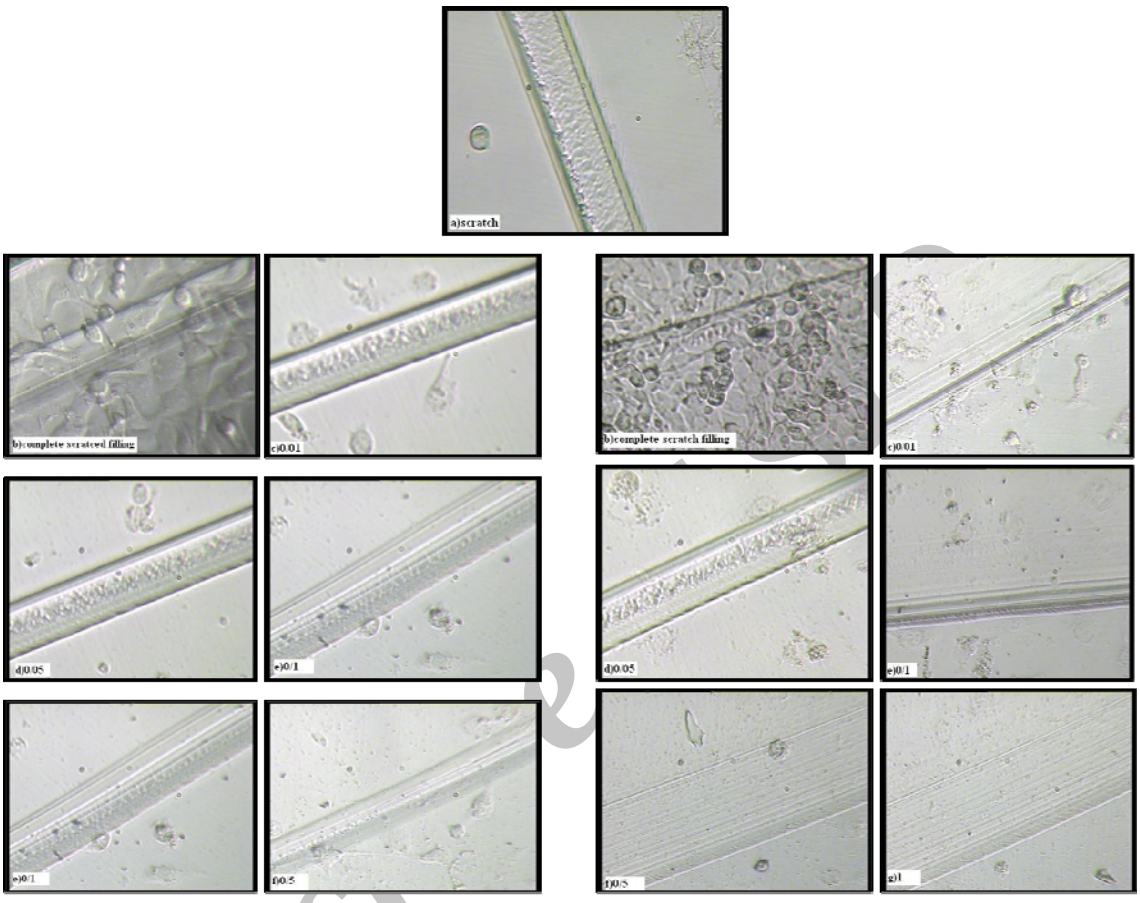
شکل۵- تشکیل شبکه‌های شبه مویرگی سلولهای HUVEC روی بستر کلاژن: a- سلولها در محیط دوبعدی، b- تشکیل شبکه‌های شبه مویرگی پس از۲۴ ساعت انکوباسیون، c- تشکیل شبکه‌های شبه مویرگی پس از۲۴ ساعت انکوباسیون با VEGF(30 ng\ml) d-. تشکیل شبکه‌های شبه مویرگی پس از۲۴ ساعت انکوباسیون با(PITEC (6/8mM، f- تشکیل شبکه‌های شبه مویرگی پس از۴۸ ساعت انکوباسیون با VEGF(30 g،ng\ml)- تشکیل شبکه‌های شبه مویرگی پس از۴۸ ساعت انکوباسیون با (PITEC (6/8mM



انکوباسیون ۲۴ ساعت انکوباسیون ۴۸ ساعت

www.SID.ir

شکل ۶ – شکل گیری شبکه های شبه مویرگی در سلولهای HUVEC پس از تیمار با محیط رویی سلولهای DU145 حاوی غلظتهای مختلف MCP (mg/ml): a–تشکیل شبکه‌های مویرگی در نمونه کنترل، b– در غلظت ۰/۰۱ از این ماده تغییر چشمگیری در تشکیل شبکه‌های مویرگی مشاهده نمی‌شود، c– کاهش تشکیل شبکه‌های مویرگی در غلظت ۰/۰۵، d– کاهش تشکیل شبکه‌های مویرگی در غلظت ۰/۱، e و f– مهار تشکیل شبکه‌های مویرگی در غلظتهای ۰/۵ و ۱.



انکوباسیون ۲۴ ساعت **انکوباسیون ۴۸ ساعت**

شکل۷ – مهاجرت سلولهای HUVEC در انکوباسیون با غلظتهای مختلف MCP (mg/ml): a–ایجاد خراش در فلاسک، b– پر شدن کامل خراش در نمونه کنترل، c– پر شدن نسبی خراش در غلظت ۰/۰۱، d– کاهش شدید مهاجرت سلولها به سوی ناحیه خراش در غلظت۰/۰۵، e، f و g– مهار مهاجرت سلولی به سوی خراش و عدم پر شدن خراش توسط سلولها در غلظتهای ۰/۱، ۰/۵ و ۱.

تأثیر مشتقات پکتینی بر مهاجرت سلولهای HUVEC:

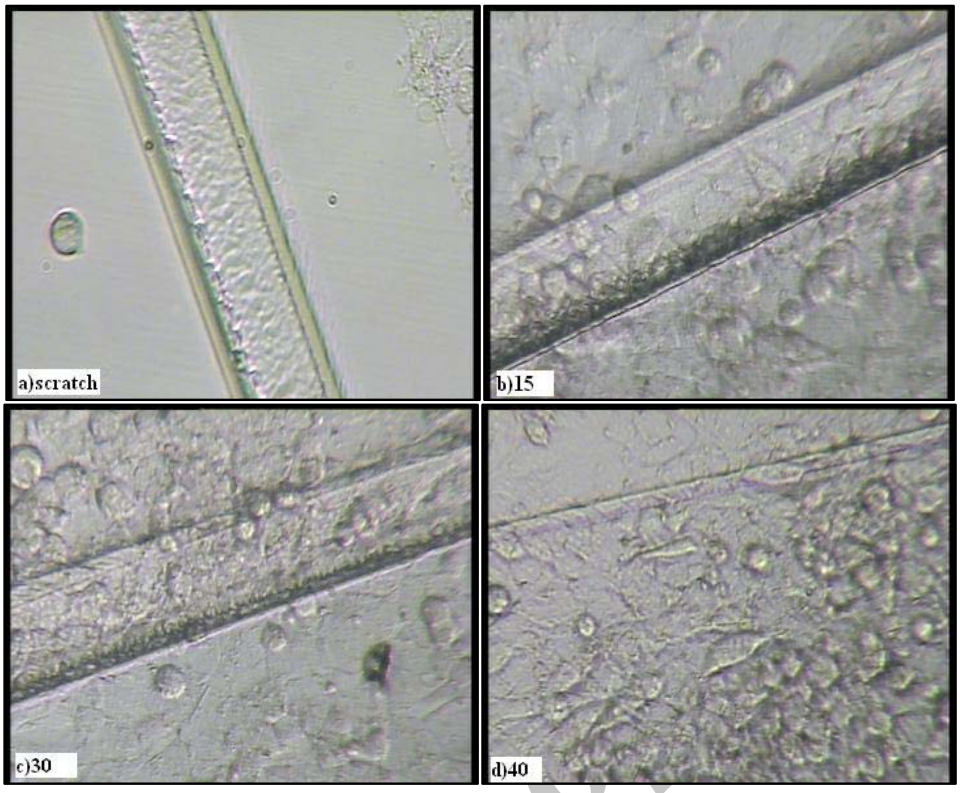
خراش ایجاد شده در سطح کشت سلولهای HUVEC در دو مورد بررسی گردید:

۱. با اضافه کردن محیط رویی کشت سلولهای DU145 بدون افزودن MCP (گروه شاهد)

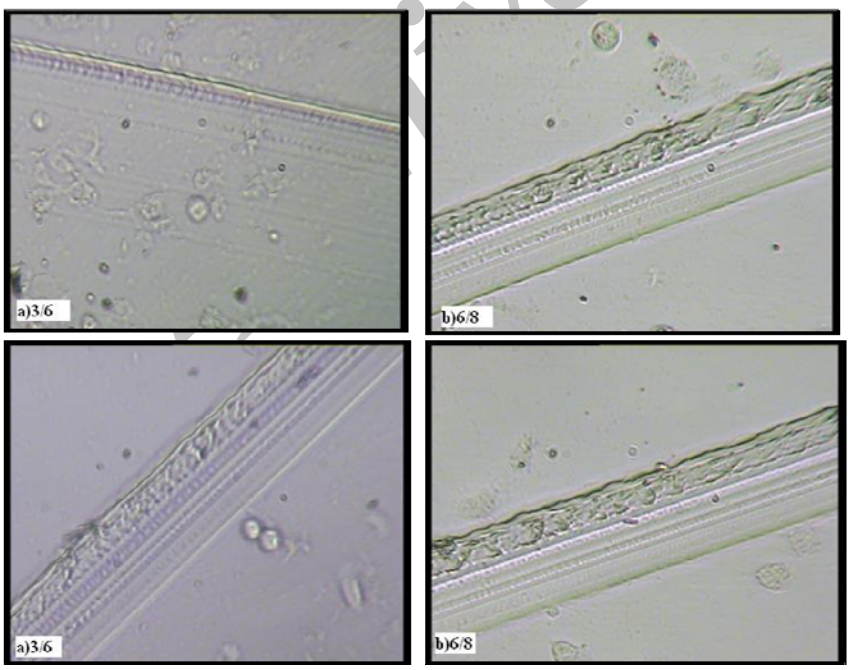
۲. با افزودن محیط رویی کشت سلولهای DU145 با افزودن MCP (گروه تجربی)

۳. با تراکمهای متفاوت MCP و انکوباسیون ۲۴ و ۴۸ ساعت، کاهش قابل ملاحظه پر شدن خراش توسط سلولهای HUVEC نشان داده شد (شکل ۷). شکل های ۸ و ۹ مهاجرت سلولی در حضور فاکتور VEGF بعنوان کنترل مثبت و PITC بعنوان کنترل منفی نشان می دهند.

www.SID.ir



شکل ۸ - تحریک مهاجرت سلولهای HUVEC پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون توسط غلظتهای مختلف VEGF (ng/ml) - ایجاد خراش، b- ۱۵، c- ۳۰، d-غلظت ۴۰ موجب مهاجرت شدید سلولها به سوی خراش و پر کردن آن می باشد . d پر شدن کامل خراش توسط سلولها را نشان می دهد.



شکل ۹- مهار مهاجرت سلولهای HUVEC پس از انکوباسیون با غلظتهای مختلف PEITC (mM): a- ۳/۶، b- ۶/۸ مهار مهاجرت سلولها توسط PEITC نشان داده شده است.

www.SID.ir

بحث

سرکوب تومورهای سرطانی و جلوگیری از متاستازی شدن آنها از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. به دلیل متفاوت بودن سلولهای سرطانی درمانها اغلب برای انواع مختلف این سلولها موفقیت‌آمیز نبوده است. پژوهشهای اخیر نشان داده‌اند که پکتینها در دامنه وسیعی از انواع سرطانها می-توانند مؤثر باشند و سلولهای توموری را مستقیماً به طرف آپوپتوز یا توقف چرخه سلولی سیر دهند (۱ و ۹). پکتین مرکبات دارای مولکولی با زنجیره طویل است. این مولکول هنگامی روی سلولها مؤثر است که کوتاه تر گردد. به همین منظور آن را به کمک دما و pH به مولکولهای کوچکتر تبدیل می کنند (۱۱). در سال ۲۰۰۲ آوراهام راز و همکارانش دریافتند که MCP با اتصال به گیرنده Gal-3 می تواند باعث مهار مهاجرت سلولهای سرطان سینه (۵) و همچنین مهار رگزایی در این سلولها شود (۸). از آنجایی که این مواد در سطح سلولها دارای گیرنده می‌باشند می-توانند گزینه مناسبی در درمان سرطان باشند و سلولها را از متاستازی شدن بازدارند. این ترکیبات با روشهای مختلفی می توانند مانع پیشرفت تومور شوند. دخالت این ترکیبات قندی در جلوگیری از آنژیوژنز (رگزایی)، ممانعت از تهاجمی شدن تومور و ایجاد متاستاز و همچنین در ارتباط بین سلولها و ماده خارج سلولی دیده می شود (۸).

نتایج حاصل از این پژوهش نشان می‌دهد که MCP سبب کاهش زیستایی سلولهای سرطانی می‌شود در حالی که این اثر در مورد سلولهای غیرسرطانی HUVEC اندک است.

بنابراین می توان نتیجه گرفت که مواد پکتینی باعث کاهش درصد زیستایی سلولهای سرطانی شده و بر سلولهای طبیعی و غیر سرطانی اثر ندارند. این نتیجه مانند تحقیقات دبرا مهنن و همکارانش می باشد. آنها نشان دادند تیمار سلولهای HUVEC به مدت ۴۸ ساعت با پکتین مرکبات تغییر یافته با حرارت (FPP)، اثر آپوپتوزی در آنها ندارد (۵ و۶).

به منظور بررسی اثر MCP در فرآیند رگزایی، غلظتهای مختلف این ماده با تیمار ۲۴ ساعت، بر سلولهای سرطان پروستات DU145 انجام گرفت و سپس محیط رویی این سلولها روی سلولهای HUVEC اضافه گردید. نتایج نشان می دهد که رگزایی در سلولهای HUVEC مهار می گردد. علت این کاهش رگزایی به واسطه اثر مهاری MCP روی ترشح فاکتور های رشد مؤثر در رگزایی می باشد که سلولهای سرطانی قادر به سنتز و ترشح آن هستند (۹). کاهش رگزایی توسط MCP در این سلولها با به کار بردن محلول رویی سلولهای DU145 بدون MCP (کنترل)، با PEITC به عنوان کنترل منفی و VEGF کنترل مثبت مقایسه شد. پس از مقایسه نتایج به دست آمده در همه محیطها، این نتیجه گیری تأیید گردید.

تقدیر و تشکر

این تحقیق با حمایت مالی شورای پژوهشی پردیس علوم دانشگاه تهران صورت گرفته است. بدین صورت از سرکار خانمها دکتر آمنه رضایوف و کاملیا سیامکی برای همکاری صمیمانه تشکر و قدردانی می گردد.

منابع

1. 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):689–98.
2. Bamias A, Dimopoulos MA. (2003). "Angiogenesis in human cancer : implications in cancer therapy". *European Journal of Internal Medicine* 14: 459–469.
3. Folkman J. (1995). "Tumor angiogenesis in the Molecular Basis of Cancer". *Phil-adelphia:Saunders.* pp.206–32.
4. Glinsky VV & Raz A. (2009). "Modified citrus pectin anti-metastatic properties: one bullet, multiple targets". *Carbohydr Res.* 344(14):1788-91.
5. Inohara H & Raz A. (1994). "Effects of natural complex carbohydrates (citrus pectin) on murine

Archive of SID

www.SID.ir

melanoma cell properties related to galectin-3 functions". *Glycoconjugate J*. 11(6):527-32.
6. Jackson CL, Dreaden TM, Theobald LK, Tran NM, Beal TL, Eid M, Gao MY, Shirley RB, Stoffel MT, Kumar MV & Mohnen D. (2007)."Pectin induces apoptosis in human prostate cancer cells: correlation of apoptotic function with pectin structure". *Glycobiology.*, 17(8):805-19.
7. Jiménez JA, Kao C, Raikwar S, Gardner TA. (2006) "Current status of anti-angiogenesis therapy for prostate cancer". *Urol Oncol.* 24(3):260-8.
8. Nangia-Makker P, Conklin J, Hogan V, Raz A. (2002). "Carbohydrate binding proteins in cancer , and ligands as therapeutic agents". *Trends Mol Med*. 8(4):187-92.
9. Nangia-Makker P, Hogan V, Honjo Y, Baccarini S, Tait L, Bresalier R & Raz A. (2002) "Inhibition of Human cancer cell Growth and metastasis in Nud Mice by Oral intake of modified Citrus pectin". *journal of the National cancer Institute*, 18;94(24):1854-62.
10. Ornitz, D. M. & Itoh, N. (2001). "Fibroblast growth factors". *Genome Biology* 2(3):REVIEWS3005.1-12.
11. Platt D, Raz A. (1992)."Modulation of the lung colonization of B16-F1 melanoma cells by citrus pectin". *J. Natl. Cancer Inst.* 84(6): 438–42.
12. Prior BM, Yang HT & Terjung RL.(2004). "What makes vessels grow with exercise training?". *J Appl Physiol* 97(3):1119-28.
13. Rubanyi, G.M. (2000) "Angiogenesis in health and disease basic mechanisms and clinical application". *M.Dekker, Inc., New York – Basel*. PP 250-300.
14. Shweiki D, Itin A, Soffer D & Keshet E. (1992)."Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis". *Nature*, 359(6398):843-5.
15. Xiao D & Singh SV. (2007)."PhenethylIsothiocyanate Inhibits Angiogenesis In vitro and Ex vivo". *Cancer Res.*, 67(5):2239-46.

Archive of SID

Effect of MCP on angiogenesis in HUVEC cells and Human Prostate cancer cell line DU145

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

[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

Abstract

Pectins are polysaccharide rich in galactoside residues which bind to receptor Galactin-3. It has been shown pectins induce apoptosis and inhibit metastasis in tumurigenic cell via Galactin-3. In the present study, the effect of Modified Citrus Pectin (MCP) on prostate cancer cells, DU- 145 is under investigation.The citrus pectin was modified with PH and temperature alternation. Its effect on DU145 and HUVEC cells viability was studied. Thus MCP effect on angiogenesis was studied via the treatment of DU145 media on user cells. This goal, the tube formation was followed with phase contrast microscopy in a 48h period. Finding the effect of MCP on the cells migration was investigated. Our results showed that MCP is capable of decreasing DU145 viability. Indeed, this material can inhibit angiogenesis which it may be due to reduction of angiogenic factors such as VEGF in DU145 cells. Beside these, MCP showed a decreasing effect on cells migration in HUVEC cells.

Key words: Angiogenesis, MCP, DU145, HUVEC, VEGF

www.SID.ir