

بررسی تأثیر ویسفاتین بر روی فعالیت سیرتوئین ۱ در رده‌ی سلولی MCF-7 سرطان پستان

کیارش بهروزفر^۱، میترا نوربخش^{۲*}، محمد اعلائی^۱

۱- گروه بیوشیمی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

۲- گروه بیوشیمی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران.

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۴/۰۴/۳۰

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۴/۰۱/۲۰

چکیده

زمینه و هدف: سرطان پستان شایع‌ترین سرطان و دومین علت مرگ و میر ناشی از سرطان در میان زنان است. یکی از تغییراتی که در بیماران مبتلا به سرطان پستان مشاهده می‌شود، بالا رفتن ویسفاتین یا نیکوتین آمید فسفوریبوزیل ترانسفراز در بافت توموری و خون این بیماران است. میزان ویسفاتین و فعالیت (سیرتوئین ۱) SIRT1 در سلول‌های سرطانی مختلف افزایش یافته است و میزان آن‌ها با پیش‌آگهی سرطان همبستگی دارد. هدف از مطالعه‌ی کنونی بررسی تأثیر ویسفاتین بر روی فعالیت سیرتوئین ۱ در رده‌ی سلولی MCF-7 سرطان پستان است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه به منظور بررسی اثر ویسفاتین بر روی فعالیت SIRT1 در سلول‌های MCF-7، پس از کشت سلول‌ها، تیمار توسط ویسفاتین در زمان‌های ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت انجام گرفت. در ادامه سلول‌ها را با استفاده از کیت استخراج هسته‌ای لیز کرده و غلظت پروتئین توتال آن‌ها به روش برادفورد اندازه‌گیری شد. در نهایت میزان فعالیت SIRT1 با استفاده از کیت اندازه‌گیری فعالیت SIRT1 و دستگاه اسپکتروفلورومتری اندازه‌گیری گردید.

نتایج: یافته‌های حاصل از این مطالعه نشان می‌دهد که میزان فعالیت SIRT1 به دنبال تیمار با ویسفاتین پس از ۱۲ ساعت و ۲۴ ساعت در مقایسه با نمونه‌های کنترل معنادار نبوده ولی فعالیت SIRT1 در ۴۸ ساعت به میزان حدوداً ۲ برابر نمونه‌ی کنترل افزایش می‌یابد.

نتیجه‌گیری: ویسفاتین اثرات ضدآپوپتوتیک خود را از طریق افزایش فعالیت SIRT1 اعمال می‌کند. نتایج نشان می‌دهد که این اثرات بعد از ۲۴ ساعت اتفاق می‌افتد.

کلمات کلیدی: ویسفاتین، سیرتوئین ۱، سرطان پستان

مقدمه

مرحله‌ی بعد توسط NMN آدنیلیل ترانسفراز (NMNAT) به NAD تبدیل می‌شود (۲). بنابراین فرم داخل سلولی این پروتئین که عموماً NAMPT نامیده می‌شود خاصیت آنزیمی داشته و واکنشی کلیدی در سنتز NAD را کاتالیز می‌کند. نقش سایتوکایینی این پروتئین نیز مورد مطالعه قرار گرفته و تأثیر آن در سلول‌های اندوتلیال و در پاتوژنز بیماری‌های عروقی بررسی شده است (۳). در سال‌های اخیر ترشح ویسفاتین به عنوان یک آدیپوکاین از بافت چربی و عملکرد خارج سلولی و اثرات هورمونی آن مورد توجه قرار گرفته است ولی هنوز تردیدها و تناقضات بسیاری در این زمینه وجود دارد.

ویسفاتین یا PBEF (Pre-B cell colony-enhancing factor)، پروتئینی با ۴۹۱ اسیدآمینو است که اولین بار در سال ۱۹۹۴ به عنوان یک سایتوکاین شناسایی و از سلول‌های لنفوسیت جدا و کلون شد (۱). بعدها مشخص شد که این پروتئین همان آنزیم نیکوتین آمید فسفوریبوزیل ترانسفراز (NAMPT) است که در سنتز NAD نقش دارد. این آنزیم با انتقال یک گروه فسفوریبوزیل از ۵-فسفوریبوزیل ۱-پیروفسفات (PRPP) به نیکوتین آمید، نیکوتین آمید مونونوکلئوتید (NMN) تولید می‌کند که NMN در

* نویسنده‌ی مسئول: میترا نوربخش، گروه بیوشیمی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران.
Email: m_nourbakhsh@yahoo.com



ارگان‌سیم‌های مختلف بدن می‌باشد (۱۳). نقش‌های مهم SIRT1 در بدن شامل بیوژنز میتوکندریایی در بافت‌های مختلف (۱۴)، تنظیم متابولیسم کلاسترول و لیپید (۱۵، ۱۶)، افزایش حساسیت به انسولین (۱۷) و تنظیم ریتم‌های سیرکادین در بدن است (۱۸). مطالعات مختلف نشان می‌دهد که سطوح SIRT1 در بیماری‌های مختلف مثل سرطان، بیماری‌های اتوایمیون و نورودژنراتیو افزایش می‌یابد که نشان‌دهنده اهمیت این آنزیم در ایجاد و پیشرفت این بیماری‌ها است (۱۹-۲۱). در سرطان پستان SIRT1 برای رشد وابسته به استروژن سلول سرطانی نیاز است و افزایش آن موجب افزایش بقای سلول سرطانی پستان می‌شود (۲۲). با توجه به این که NAD به عنوان سوبسترای SIRT1 به کار می‌رود، از این طریق می‌تواند باعث تحریک فعالیت SIRT1 در سلول شود (۲۳). بررسی‌های انجام شده بر روی پروموتور بعضی ژن‌های هدف در رده‌ی سلولی MCF-7 مربوط به NAMPT نشان می‌دهند که این آنزیم‌ها از طریق برهم‌کنش با SIRT1، فعالیت دآستیلازی SIRT1 بر روی پروموتور ژن‌های هدف را فعال می‌کنند (۲۴). باتوجه به خاصیت ضدآپوپتوتیک ویسفاتین و نقش آن در افزایش تکثیر سلول‌های سرطانی، می‌توانیم یک هم‌سوایی را بین عملکرد SIRT1 و Visfatin مشاهده کنیم (۲۵). این می‌تواند نشان‌دهنده‌ی وجود ارتباط بین این دو پروتئین در سلول باشد. از سوئی دیگر باتوجه به اینکه Visfatin یک آدیپوکاین خارج سلولی است، این که فرم ترشحی این پروتئین با فعالیت آنزیمی خود بر سلول تأثیر می‌گذارد و یا این که با تأثیر بر گیرنده‌های سطح سلول و فعال کردن مسیرهای انتقال پیام داخل سلولی باعث بقای سلول و تکثیر آن می‌شود هنوز مورد بحث است. در حال حاضر در مورد ارتباط بین این دو پروتئین مطالعات کمی انجام شده و در نتیجه نکات مبهم زیادی در مورد مکانیسم ارتباطی بین این دو وجود دارد که نیاز به بررسی‌های بیشتری دارد. با توجه به اهمیت آپوپتوز در کنترل و درمان سرطان منجمله سرطان پستان و نقش ویسفاتین در پیشبرد سرطان پستان، و همچنین با توجه به این که مکانیسم عملکردی ویسفاتین در آپوپتوز در سلول‌های سرطان پستان و ارتباط آن با عوامل موثر بر آپوپتوز مثل SIRT1 تاکنون مورد بررسی قرار نگرفته است، هدف از این مطالعه بررسی تأثیر ویسفاتین بر فعالیت SIRT1 در رده‌ی سلولی MCF-7 سرطان پستان است.

ویسفاتین خاصیت آنتی‌آپوپتوتیک داشته و در التهاب تأثیر دارد. مطالعات متعدد حاکی از آنند که سطح ویسفاتین در بیماری‌های مختلف نظیر دیابت، بیماری‌های کلیوی، بیماری‌های استخوانی و سرطان تغییر می‌کند و به همین دلیل به عنوان یک فاکتور تشخیصی و پیش‌آگهی مطرح است. سطح پلاسمایی ویسفاتین در ارتباط با BMI، دورکمر، حجم چربی بدن، گلوکز خون و تری‌گلیسرید تغییر می‌کند (۴). افزایش بافت چربی با افزایش ترشح سایتوکاین‌های پیش‌التهابی و آدیپوکاین‌هایی از جمله ویسفاتین، سبب افزایش ریسک ابتلا به سرطان می‌شود (۵). محققین در مطالعات اپیدمیولوژیک گوناگون ویسفاتین را در سرطان‌های مختلف بررسی کرده و دریافتند که ویسفاتین در این سرطان‌ها افزایش معنی‌داری داشته و با پیش‌آگهی این سرطان‌ها ارتباط قابل توجهی دارد (۵). مطالعه‌ای که اخیراً بر روی سرم افراد مبتلا به سرطان پستان انجام شده نشان از نقش ویسفاتین در افزایش ریسک ابتلا به سرطان پستان است (۶). سرطان پستان شایع‌ترین سرطان در میان زنان در سراسر جهان و دومین علت مرگ و میر ناشی از سرطان در زنان است. ۲۳٪ از کل موارد جدید سرطان و ۱۴٪ از مرگ و میر ناشی از سرطان مربوط به سرطان پستان است. نیمی از موارد مربوط به این سرطان و نزدیک به ۶۰٪ از مرگ و میر ناشی از آن در کشورهای در حال توسعه رخ می‌دهد (۷). عوامل گوناگون نظیر هورمون‌ها و فاکتورهای رشد در بروز و پیشرفت این بیماری مؤثر شناخته شده‌اند (۸). چاقی نیز از ریسک فاکتورهای این سرطان محسوب می‌شود (۹) به طوری که مطالعات نشان داده‌اند زنان با چربی دور کمر کمتر از ۳۹٪، کمتر به سرطان پستان مبتلا می‌شوند (۱۰). NAMPT همان طور که گفته شد در تولید NAD و مصرف نیکوتینامید در سلول نقش دارد. NAD حاصل از فعالیت این آنزیم می‌تواند علاوه بر مشارکت در متابولیسم سلول، به عنوان سوبسترا برای آنزیم‌های دآستیلاز مورد استفاده قرار بگیرد. یک گروه از این آنزیم‌ها سیرتوین‌ها هستند که خانواده‌ای از پروتئین دآستیلازهای وابسته به NAD می‌باشند. این آنزیم‌ها اولین بار از مخمرها جدا شدند و با فعالیت دآستیلازی خود، موجب مهار رونویسی در جایگاه‌های ژنی مختلف مثل تلومرها و DNA ریپوزومی می‌شوند (۱۱، ۱۲) از میان سیرتوین‌ها، در مطالعات SIRT1 بیشتر مورد توجه قرار گرفته است و دارای عملکردهای بیولوژیک متنوعی در

مواد و روش‌ها

اندازه گیری فعالیت SIRT1: بعد از تعیین غلظت پروتئینی نمونه‌ها با استفاده از روش رنگ سنجی برادفورد، حجم‌های مساوی از نمونه‌ها را در چاهک‌های ۹۶ خانه ریخته و سپس NAD، سوبسترای فلورسانس استیله، بافر اندازه گیری و developer موجود در کیت را طبق حجم‌های ذکر شده در دستورالعمل کیت اندازه گیری فعالیت SIRT1 (Abcam, UK) به چاهک‌ها اضافه گردید. در نهایت میزان نور فلورسانس تابشی را بعد از گذشت یک ساعت در نشر ۳۴۰ و تابش ۴۴۰ به وسیله دستگاه اسپکتروفلورومتر اندازه گرفته شد و با استفاده از میزان پروتئین موجود در هر نمونه آن‌ها یکسان‌سازی صورت گرفت.

آنالیزهای آماری: پس از انجام آزمایشات و جمع‌آوری داده‌ها، آنالیز آماری به کمک نرم افزار SPSS و با استفاده از آزمون آماری ANOVA One way انجام شده و $p < 0.05$ معنی دار در نظر گرفته می‌شود.

نتایج

میزان فعالیت SIRT1 در نمونه‌های تیمار شده نسبت به کنترل ۱/۹۷ برابر افزایش داشته است (اختلاف معنادار است و P value کمتر از 0.0001). همچنین فعالیت SIRT1 در تیمار با رزوراترول به عنوان کنترل مثبت نسبت به نمونه‌ی کنترل ۱/۶۴ برابر افزایش یافته است (اختلاف معنادار است P value: 0.002) و سیرتینول به عنوان کنترل منفی در مقایسه با نمونه‌ی کنترل اختلاف معناداری نداشته است (P value: 0.996). نمودار ۱ درصد فعالیت SIRT1 در نمونه‌های تیمار شده با ویسفاتین رزوراترول و سیرتینول و نمونه‌ی کنترل را نشان داده می‌دهد. داده‌های حاصل از مقایسه‌ی بین میزان فعالیت SIRT1 در هر ساعت در شکل ۲ نشان می‌دهد که با وجود این که نتایج حاصل از فعالیت SIRT1 در ساعت‌های ۱۲ و ۲۴ در مقایسه با نمونه‌های کنترل معنادار نشده (به ترتیب ۰/۶۸۳۴ و ۱/۰۵ برابر و P value به ترتیب 0.148 و 0.969) ولی فعالیت SIRT1 در ۴۸ ساعت به میزان ۱/۹۷ برابر نسبت به نمونه‌ی کنترل افزایش یافته است (اختلاف معنادار P value کمتر از ۰/۰۰۰۱).

کشت سلول: سلول‌های رده‌ی سلولی MCF-7 (پاستور ایران) توسط محیط کشت RPMI-1640 (Gipco, USA) غنی شده با FBS ۱۰٪ (ATCC, USA) و همراه با آنتی بیوتیک‌های پنی-سیلین و استرپتومايسن کشت (Gipco, USA) داده می‌شوند. سلول‌ها در محیط مرطوب و در دمای ۳۷ درجه و $5\% \text{ CO}_2$ در انکوباتور رشد داده می‌شوند. برای تیمار با ویسفاتین (Peprotech, USA)، سلول‌ها به مدت ۱۲ ساعت در محیط فاقد سرم کشت داده شده و سپس به منظور بررسی تاثیر ویسفاتین بر روی فعالیت SIRT1 در طول زمان، سلول‌ها با غلظت 50 ng/ml ویسفاتین در زمان‌های ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت تیمار شد. انتخاب این بازه‌های زمانی به منظور بررسی تاثیر ویسفاتین بر روی تغییرات فعالیت SIRT1 در طول زمان است.

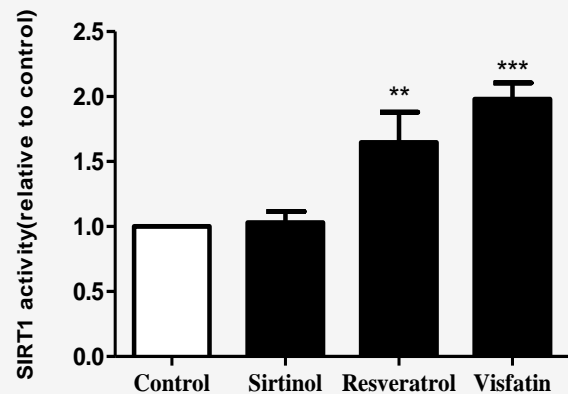
تهیه‌ی لیزات سلول‌ها با استفاده از کیت استخراج هسته‌ای: به منظور جمع‌آوری سلول‌ها فلاسک‌ها دوبار توسط PBS سرد شسته و به همراه PBS در میکروتیوپ‌ها جمع‌آوری شد. سپس سوسپانسیون سلولی با دور 1500 rpm به مدت ۶ دقیقه سانتریفیوژ شده و محلول رویی دور ریخته شد. محلول DTT را به نسبت ۱ به ۱۰۰۰ با بافر (Abcam, Pre extraction) (UK) مخلوط و به میزان ۱۰۰ میکرولیتر به ازای هر میلیون سلول به رسوب سلولی اضافه نموده و سلول‌ها به خوبی در بافر لیز حل کرده و به مدت ۱۰ دقیقه بر روی یخ قرار داده شد. هر ۵ دقیقه یک بار آن را ورتکس کرده و در نهایت آن را با دور 12000 rpm به مدت ۱ دقیقه سانتریفیوژ نموده و محلول رویی حاوی عصاره‌ی سیتوپلاسمی به یک میکروتیوپ دیگر منتقل گردید. محلول Nuclear extraction buffer (Abcam, UK) یا بافر استخراج هسته‌ای را به میزان ۱۰ میکرولیتر به ازای هر میلیون سلول به رسوب سلولی اضافه نموده و سلول‌ها به خوبی در آن حل کرده و به مدت ۱۵ دقیقه بر روی یخ قرار داده و هر ۳ دقیقه یک بار آن را ورتکس کرده و در نهایت با دور 14000 rpm به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه آن را سانتریفیوژ نموده و سپس محلول رویی جدا شد و به نسبت مساوی با عصاره‌ی سیتوپلاسمی مخلوط گردید.



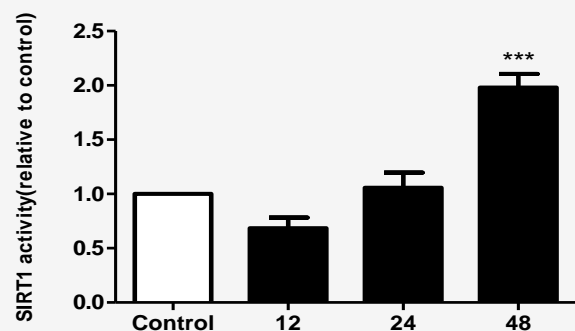
ویسفاتین بالاتری نسبت به نمونه‌های حساس به شیمی درمانی هستند و بنابراین احتمال ارتباط ویسفاتین با مقاومت به درمان مطرح گردید (۲۶).

Nakajima و همکاران در سال‌های ۲۰۰۹ و ۲۰۱۰ به ترتیب روی سرطان معده و کولورکتال کار کردند و نشان دادند که سطح ویسفاتین با پیشرفت بیماری به تدریج افزایش می‌یابد (۲۷، ۲۸). Lee و همکاران در سال ۲۰۱۱ نشان دادند که بیان بالای ویسفاتین در بافت تومور پستان با بقای ضعیف و احتمال بیشتر عود بیماری در ارتباط است. به همین دلیل این گروه پیشنهاد کردند که ویسفاتین می‌تواند به عنوان یک فاکتور مستقل پیش آگهی سرطان پستان مورد بررسی قرار گیرد (۲۹، ۳۰). براساس یافته‌های Yi-Chen Lee و همکاران در سال ۲۰۱۱ بیان بالای ویسفاتین با وخامت سرطان بافت پستان ارتباط مستقیمی دارد. همچنین این آدیپوکاین با سرطان‌های کولون، معده، پروستات و مری در ارتباط است. بررسی‌های انجام شده در سال ۲۰۱۱ در بیماران مبتلا به سرطان پستان نشان داد که مقدار سرمی ویسفاتین در این بیماران بالاتر از افراد سالم بوده و به طور مستقل از سایر آدیپوکاین‌ها و پارامترهای متابولیک، با ابتلا به سرطان پستان در دوران یائسگی ارتباط دارد (۳۱). مقدار ویسفاتین در نمونه‌های بافتی از سرطان پستان که به شیمی درمانی مقاوم هستند بالاتر از نمونه‌های حساس به شیمی درمانی بوده و افزایش بیان ویسفاتین با بقای ضعیف و احتمال بیشتر عود بیماری در ارتباط است (۳۲). در مجموع ویسفاتین در سلول‌های مختلف دارای خواص آنتی آپوپتوتیک بوده و در التهاب نقش دارد (۲).

NAMPT یا ویسفاتین داخل سلولی به عنوان آنزیم کلیدی در تولید NAD در داخل سلول محسوب شده و اثر آنتی آپوپتوتیک خود را از طریق افزایش فعالیت آنزیم‌های دآستیلازی مثل SIRT1 اعمال می‌کند (۳۳). SIRT1 با سرطان‌های مختلفی مانند سرطان پروستات، پستان، کولون و سرطان‌های پوستی غیرملائنومیایی مشاهده شده است (۳۴-۳۶). مطالعات نشان می‌دهد که افزایش فعالیت SIRT1 می‌تواند در افزایش مقاومت دارویی در سلول‌های سرطانی نقش داشته باشد. با وجود اثرات سرطان زایی گفته شده، اثرات ضد سرطانی نیز برای SIRT1 گزارش شده است. در مطالعه‌ی حیوانی انجام شده بر روی موش-های ترانسژنیک دارای ژن SIRT1 مشاهده شده که القای بیان



نمودار ۱. فعالیت Sirt1 سلول‌های MCF-7 تیمار شده با ویسفاتین، رزوراترول، سیرتینول و نمونه‌ی کنترل. فعالیت Sirt1 در نمونه‌ی تیمار شده با ویسفاتین و رزوراترول اختلاف معناداری داشته است. اختلاف معنادار با *، P value تا ۰/۰۱ با ** و P value تا ۰/۰۰۱ با *** نشان داده شده است.



نمودار ۲. سنجش میزان فعالیت SIRT1 در سلول‌های MCF-7 تیمار شده با ویسفاتین در زمان‌های ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت. اختلاف معنادار با *، P value تا ۰/۰۱ با ** و P value تا ۰/۰۰۱ با *** نشان داده شده است. P value 12h:0.148

بحث و نتیجه‌گیری

برای اولین بار Samal و همکاران در سال ۱۹۹۴ cDNA ویسفاتین را به عنوان یک سایتوکاین و عاملی که می‌تواند بلوغ پیش سازهای سلول‌های B را در حضور اینترلوکین ۷ و فاکتور سلول بنیادی القاء نماید تولید و آن را کلون کردند (۱). Figueira و همکاران در سال ۲۰۰۵ نشان دادند نمونه‌های بافت سرطان پستان که به شیمی درمانی مقاومند دارای مقادیر

میزان فعالیت SIRT1 از نمونه‌ی کنترل اختلاف معناداری پیدا کرد. فرضیه‌ای که می‌تواند برای توجیه این پدیده مطرح باشد تغییرات در میزان NAD موجود در سلول در ساعت‌های مختلف است. در ساعت‌های ابتدایی سطح NAD در سلول به علت وجود مواد غذایی و Nicotinamide به عنوان سوبسترای مورد نیاز برای تولید NAD، در محیط کشت بالاتر است و به همین نسبت میزان فعالیت SIRT1 در سلول میزان بیشتری را نشان می‌دهد ولی به تدریج با مصرف NAD توسط سلول میزان فعالیت SIRT1 هم به دنبال کاهش می‌یابد. موضوعی که اینجا مطرح است کمتر بودن میزان فعالیت SIRT1 در سلول‌های تیمار شده با ویسفاتین در ۱۲ ساعت نسبت به نمونه‌ی کنترل در همان ساعت است که در ادامه توجیه احتمالی برای آن را ذکر می‌گردد.

مطالعات متعددی در مورد اثرات ویسفاتین به صورت مستقل از مسیر تولید NAD بر روی سلول‌ها انجام شده است. در سال ۲۰۰۸ Yankum li و همکاران تاثیر ویسفاتین بر روی ماکروفاژ موشی را مورد بررسی قرار دادند و مشاهده کردند که ویسفاتین با غلظت ۵۰ ng/ml (غلظتی که ما نیز در این طرح از آن استفاده کردیم) از طریق القای ترشح IL-6 از سلول‌های ماکروفاژی موجب فعال شدن مسیر JAK2 و فسفریلاسیون STAT3 می‌شود. در این مطالعه ویسفاتین به همراه Fk866 به عنوان مهارکننده‌ی تولید NAD، به سلول‌های ماکروفاژی داده شده و مشاهدات حاکی از آن است که ویسفاتین خارج سلولی موجب فعال شدن مسیر IL-6/JAK2/STAT3 به صورت مستقل از NAD می‌شود (۴۳). در سال ۲۰۱۳ بررسی ویسفاتین سرمی و فعالیت STAT3 در بافت سرطانی پستان، ارتباط مستقیمی بین فسفریلاسیون و فعالیت STAT3 با مقادیر ویسفاتین سرمی در بیماران مبتلا به سرطان پستان را نشان می‌دهد (۴۴). همچنین در سال ۲۰۰۹ jee young kim و همکاران در مطالعه‌ای بر روی سلول‌های اندوتلیال مشاهده کردند که تیمار آن‌ها با ویسفاتین موجب افزایش ترشح IL-6 و فعال شدن مسیر JAK2/STAT3 می‌شود (۴۵). Lauren و همکاران نیز در سال ۲۰۱۱ فعال بودن مسیر IL-6/JAK2/STAT3 را در سلول‌های CD44+ و CD24- سرطان پستان گزارش کردند (۴۶). IL-6 با اتصال به گیرنده‌اش و فعال کردن gp130 و JAK2 علاوه بر فسفریلاسیون STAT3 موجب

SIRT1 در این موش‌ها، آن‌ها را در برابر آسیب‌های متابولیک مصرف غذاهای پرچرب و پرکالری محافظت می‌کند. همچنین مانع پیشرفت سرطان ناشی از پیری می‌شود. با این وجود این نیز مشاهده شده است که افزایش بیش از حد بیان SIRT1 می‌تواند موجب افزایش تومورزایی در بعضی از بافت‌ها شود (۳۷).

مطالعات بر روی سرطان‌های گلیوبلاستوما، کلیه، پروستات، تخمدان و هیپاتوکارسینوما مدل حیوانی کاهش بیان SIRT1 را در این سرطان‌ها نشان می‌دهد (۳۸). همچنین استفاده از Resveratrol به عنوان فعال کننده‌ی SIRT1 در سلول‌های سرطانی دچار موتاسیون BRCA1 موجب القای آپوپتوز و مهار رشد توموری می‌شود (۳۹). Firestein و همکاران پروتئین B-catenin را در سلول‌های سرطانی کولون و Wang RH و همکاران Survivi را در سلول‌های سرطانی دارای جهش BRCA1 به عنوان پروتئین‌های سرطان‌زایی معرفی کردند که SIRT1 ممکن است از طریق مهار بیان آن‌ها اثرات ضد سرطانی‌اش را اعمال کند (۳۹، ۴۰). مطالعاتی که بر روی ویسفاتین خارج سلولی در سلول‌های بتا پانکراس و کبد موش انجام شده، نشان می‌دهد که ویسفاتین از طریق موجب افزایش NAD در داخل این سلول‌ها می‌شود (۴۱، ۴۲). مطالعات اخیر بر روی سلول‌های آدیپوسیت نشان می‌دهد که سرکوب ویسفاتین در این سلول‌ها موجب کاهش مقادیر NAD و به دنبال آن مهار فعالیت SIRT1 می‌شود (۴۲). با توجه به وابستگی SIRT1 به NAD و اثرات ضد آپوپتوتیک مشابهی که با ویسفاتین دارد و با توجه به این که تاکنون ارتباط ویسفاتین با SIRT1 در سلول‌های MCF-7 سرطان پستان مطالعه نشده است، ما در این طرح به بررسی تاثیر ویسفاتین بر روی فعالیت SIRT1 پرداختیم.

در این مطالعه تیمار با ویسفاتین در زمان‌های ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت انجام شد. در زمان‌های ۱۲ و ۲۴ ساعت تغییرات در فعالیت SIRT1 معنادار نبود ولی در ۴۸ ساعت افزایش معناداری به میزان ۲ برابر نمونه‌ی کنترل مشاهده شد. در ۱۲ ساعت ابتدایی فعالیت SIRT1 در نمونه‌های کنترل بالاتر از نمونه‌ی تیمار شده‌ی همان ساعت بوده ولی در ساعت‌های بعدی میزان فعالیت SIRT1 به مرور افزایش یافته و به همین ترتیب نمونه‌های کنترل هم کاهش یافت و در ۲۴ ساعت تقریباً به یک میزان رسید و در ۴۸ ساعت



Schuster و همکاران بر روی سلول‌های رده‌ی سلولی کبدی HepG2 انجام شد نشان داد که رزوراترول در سلول‌های سرطانی کبدی به عنوان فعال کننده‌ی SIRT1 محسوب نشده و این اثر در سلول‌های غیر سرطانی و اولیه‌ی کبدی مشاهده می‌شود (۵۵). با توجه به این که رزوراترول در گذشته و در مطالعات گوناگون به عنوان فعال کننده‌ی اصلی SIRT1 شناخته شده است (۵۶، ۵۷). این داده‌ها کمی با روش اندازه گیری SIRT1 با استفاده از فلورومتر تناقض داشته و استفاده از رزوراترول به عنوان کنترل مثبت را دچار اشکال می‌کند. با این وجود با توجه به این که داده‌های ما در ساعات ابتدایی به جای افزایش فعالیت، کاهش محسوسی را در میزان فعالیت SIRT1 نشان می‌دهد، فرضیه‌ی اثر زمینه‌ای در این مطالعه تاحدودی غیرمحمتمل به نظر می‌رسد ولی با این وجود در مطالعات بعدی می‌توان برای اطمینان از آن میزان NAD را به عنوان سوبسترای آنزیم SIRT1 در داخل سلول به دنبال تیمار با ویسفاتین سنجش نمود.

با توجه به نتایج این مطالعه، افزایش معناداری در میزان فعالیت SIRT1 در سلول‌های MCF-7 تیمار شده با ویسفاتین مشاهده شد که می‌تواند تا حدودی بیانگر مکانیسم آنتی-آپوپتوتیک ویسفاتین بر روی سلول MCF-7 سرطان پستان از طریق افزایش فعالیت SIRT1 باشد. شناخت بهتر مکانیسم عمل ویسفاتین در سلول‌های سرطانی می‌تواند در آینده به عنوان هدفی برای درمان سرطان پستان به کار گرفته شود. با توجه به وجود سوبستراهای متعدد در سلول برای SIRT1، شناخت این سوبستراها و بررسی تاثیر ویسفاتین بر روی آن‌ها به منظور شناسایی بهتر مکانیسم اثرگذاری ویسفاتین بر روی سلول سرطانی ضروری بوده و می‌تواند در مطالعات بعدی مورد توجه قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

این مقاله مستخرج از پایان‌نامه‌ی آقای کیارش بهروزفر دانشجوی کارشناسی ارشد بیوشیمی بالینی است و نویسندگان این مقاله کمال تشکر را به خاطر حمایت‌های مالی و اجرایی دانشگاه علوم پزشکی تهران اعلام می‌دارند.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ گونه تعارض منافی را اعلام نکرده‌اند.

فعال شدن مسیرهای PI3-K/Akt و MAPK در انواع سرطان‌ها مانند سرطان پروستات، مالتیپل میولما و دهانه‌ی رحم می‌شود (۴۷-۴۹).

فعال شدن این مسیرها به صورت سریع و در طول ۲۴ ساعت اتفاق می‌افتد. با توجه به این که فسفریلاسیون‌های متعدد این مسیرها نیازمند مصرف ATP و انرژی است، بنابراین سلول برای تولید این مقدار انرژی نیازمند مصرف NAD و NADH می‌باشد. به دلیل وابستگی فعالیت SIRT1 به NAD برای انجام واکنش دآستیلایسون، مصرف NAD به وسیله‌ی این مسیرها ممکن است موجب کاهش فعالیت SIRT1 در ساعات‌های اولیه شود که در ادامه با تولید NAD بیشتر توسط ویسفاتین این اثر به تدریج جبران شده و در ۴۸ ساعت فعالیت SIRT1 را به میزان ۲ برابر نمونه‌ی کنترل بالا می‌برد. مشابه این اثر در تاثیر IGF-1 بر روی سلول‌های عضلانی قلب مشاهده شد. در این مطالعه IGF-1 علاوه بر فعال کردن مسیرهای PI3k/Akt و MAPK موجب کاهش فعالیت SIRT1 نیز می‌شود (۵۰).

مطالعات درباره‌ی افزایش فعالیت SIRT1 به دنبال القای ویسفاتین به سلول در رده‌های سلولی دیگر به ندرت مشاهده شده است، با این وجود مطالعات بر روی سلول‌های عضلات صاف عروقی نشان می‌دهد که تاثیری که ویسفاتین بر روی بقای این سلول‌ها می‌گذارد تا حدودی از طریق افزایش فعالیت SIRT1 است (۵۱).

داده‌های متناقضی از تاثیر رزوراترول به عنوان فعال کننده‌ی SIRT1 بر روی فعالیت SIRT1 گزارش شده است. به عنوان مثال در مطالعه‌ای این فرضیه مطرح می‌شود که در روش سنجش فعالیت SIRT1 به روش فلورومتری، اثر مشاهده شده یک اثر زمینه‌ای محسوب شده و به علت اتصال فلوروفور به سوبسترای آنزیم موجب تولید نور فلورسانس کاذب شده و فعالیت SIRT1 را بالاتر نشان می‌دهد (۵۲). مطالعاتی که در سال ۲۰۰۵ بر روی سنجش فعالیت SIRT1 مخمر و انسان انجام شد، نشان داد که در حضور رزوراترول به عنوان فعال کننده‌ی SIRT1 و در شرایطی که سوبسترای فلوروسانس (Fluor de Lys-substrate) مورد استفاده در سنجش فعالیت SIRT1 در محیط وجود نداشته باشد، واکنش دآستیلایسون در سوبستراهای فاقد فلوروسانس اتفاق می‌افتد (۵۳، ۵۴). مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۴ توسط Susanne

References

- Samal B, Sun Y, Stearns G, Xie C, Suggs S, McNiece I. Cloning and characterization of the cDNA encoding a novel human pre-B-cell colony-enhancing factor. *Molecular and cellular biology*. 1994;14(2):1431-7.
- Schweiger M, Hennig K, Lerner F, Niere M, Hirsch-Kauffmann M, Specht T, et al. Characterization of recombinant human nicotinamide mononucleotide adenylyl transferase (NMNAT), a nuclear enzyme essential for NAD synthesis. *FEBS letters*. 2001;492(1):95-100.
- Kim SR, Bae SK, Choi KS, Park SY, Jun HO, Lee JY, et al. Visfatin promotes angiogenesis by activation of extracellular signal-regulated kinase 1/2. *Biochemical and biophysical research communications*. 2007;357(1):150-6.
- Olszanecka-Glinianowicz M, Kocelak P, Janowska J, Skorupa A, Nylec M, Zahorska-Markiewicz B. Plasma visfatin and tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) levels in metabolic syndrome. *Kardiol Pol*. 2011;69(8):802-7.
- Bi T-q, Che X-m. Nampt/PBEF/visfatin and cancer. *Cancer biology & therapy*. 2010;10(2):119-25.
- Assiri A, Kamel HF, Hassanien MF. Resistin, Visfatin, Adiponectin, and Leptin: Risk of Breast Cancer in Pre-and Postmenopausal Saudi Females and Their Possible Diagnostic and Predictive Implications as Novel Biomarkers. *Disease markers*. 2015.
- Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*. 2011;61(2):69-90.
- Germain D. Estrogen carcinogenesis in breast cancer. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2011;40(3):473-84, vii.
- Calle EE, Rodriguez C, Walker-Thurmond K, Thun MJ. Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. *N Engl J Med*. 2003;348(17):1625-38.
- Cleary MP, Maihle NJ. The role of body mass index in the relative risk of developing premenopausal versus postmenopausal breast cancer. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1997;216(1):28-43.
- Smith JS, Brachmann CB, Celic I, Kenna MA, Muhammad S, Starai VJ, et al. A phylogenetically conserved NAD⁺-dependent protein deacetylase activity in the Sir2 protein family. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2000;97(12):6658-63.
- Frye RA. Phylogenetic classification of prokaryotic and eukaryotic Sir2-like proteins. *Biochemical and biophysical research communications*. 2000;273(2):793-8.
- Silva JP, Wahlestedt C. Role of Sirtuin 1 in metabolic regulation. *Drug discovery today*. 2010;15(17):781-91.
- Gerhart-Hines Z, Rodgers JT, Bare O, Lerin C, Kim S-H, Mostoslavsky R, et al. Metabolic control of muscle mitochondrial function and fatty acid oxidation through SIRT1/PGC-1 α . *The EMBO journal*. 2007;26(7):1913-23.
- Purushotham A, Schug TT, Xu Q, Surapureddi S, Guo X, Li X. Hepatocyte-specific deletion of SIRT1 alters fatty acid metabolism and results in hepatic steatosis and inflammation. *Cell metabolism*. 2009;9(4):327-38.
- Rodgers JT, Puigserver P. Fasting-dependent glucose and lipid metabolic response through hepatic sirtuin 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2007;104(31):12861-6.
- Banks AS, Kon N, Knight C, Matsumoto M, Gutiérrez-Juárez R, Rossetti L, et al. SirT1 gain of function increases energy efficiency and prevents diabetes in mice. *Cell metabolism*. 2008;8(4):333-41.
- Nakahata Y, Kaluzova M, Grimaldi B, Sahar S, Hirayama J, Chen D, et al. The NAD-Dependent Deacetylase SIRT1 Modulates CLOCK-Mediated Chromatin Remodeling and Circadian Control. *Cell*. 2008;134(2):329-40.
- Huffman DM, Grizzle WE, Bamman MM, Kim J-s, Eltoum IA, Elgavish A, et al. SIRT1 is significantly elevated in mouse and human prostate cancer. *Cancer research*. 2007;67(14):6612-8.
- Prozorovski T, Schulze-Topphoff U, Glumm R, Baumgart J, Schröter F, Ninnemann O, et al. Sirt1 contributes critically to the redox-dependent fate of neural progenitors. *Nature cell biology*. 2008;10(4):385-94.
- Deng C-X. SIRT1, is it a tumor promoter or tumor suppressor? *International journal of biological sciences*. 2009;5(2):147.
- Elangovan S, Ramachandran S, Venkatesan N, Ananth S, Gnana-Prakasam JP, Martin PM, et al. SIRT1 is essential for oncogenic signaling by estrogen/estrogen receptor α in breast cancer. *Cancer research*. 2011;71(21):6654-64.
- Zhang T, Kraus WL. SIRT1-dependent regulation of chromatin and transcription: Linking NAD metabolism and signaling to the control of cellular functions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*. 2010;1804(8):1666-75.
- Zhang T, Berrocal JG, Frizzell KM, Gamble MJ, DuMond ME, Krishnakumar R, et al. Enzymes in the NAD⁺ salvage pathway regulate SIRT1 activity at target gene promoters. *Journal of Biological Chemistry*. 2009;284(30):20408-17.



25. Sonoli S, Shivprasad S, Prasad C, Patil A, Desai P, Somannavar M. Visfatin—a review. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2011;15(1):9-14.
26. Folgueira MAAK, Carraro DM, Brentani H, da Costa Patrão DF, Barbosa EM, Netto MM, et al. Gene expression profile associated with response to doxorubicin-based therapy in breast cancer. *Clinical Cancer Research*. 2005;11(20):7434-43.
27. Nakajima TE, Yamada Y, Hamano T, Furuta K, Matsuda T, Fujita S, et al. Adipocytokines as new promising markers of colorectal tumors: adiponectin for colorectal adenoma, and resistin and visfatin for colorectal cancer. *Cancer science*. 2010;101(5):1286-91.
28. Nakajima TE, Yamada Y, Hamano T, Furuta K, Gotoda T, Katai H, et al. Adipocytokine levels in gastric cancer patients: resistin and visfatin as biomarkers of gastric cancer. *Journal of gastroenterology*. 2009;44(7):685-90.
29. Lee Y-C, Yang Y-H, Su J-H, Chang H-L, Hou M-F, Yuan S-SF. High visfatin expression in breast cancer tissue is associated with poor survival. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*. 2011;20(9):1892-901.
30. Lee H, Kim KR, Noh SJ, Park HS, Kwon KS, Park B-H, et al. Expression of DBC1 and SIRT1 is associated with poor prognosis for breast carcinoma. *Human pathology*. 2011;42(2):204-13.
31. Housa D, Housova J, Vernerova Z, Haluzik M. Adipocytokines and cancer. *Physiological research*. 2006;55(3):233.
32. Bi T, Che X. Nampt/PBEF/visfatin and cancer. *Cancer Biol Ther*. 2010;10(2):119-25.
33. Sommer G, Garten A, Petzold S, Beck-Sickingher A, Bluher M, Stumvoll M, et al. Visfatin/PBEF/Nampt: structure, regulation and potential function of a novel adipokine. *Clinical Science*. 2008;115:13-23.
34. Vaziri H, Dessain SK, Eaton EN, Imai S-I, Frye RA, Pandita TK, et al. hSIR2SIRT1 functions as an NAD-dependent p53 deacetylase. *Cell*. 2001;107(2):149-59.
35. Stükel W, Peh BK, Tan YC, Nayagam VM, Wang X, Salto-Tellez M, et al. Function of the SIRT1 protein deacetylase in cancer. *Biotechnology journal*. 2007;2(11):1360-8.
36. Hida Y, Kubo Y, Murao K, Arase S. Strong expression of a longevity-related protein, SIRT1, in Bowen's disease. *Archives of dermatological research*. 2007;299(2):103-6.
37. M S, editor. Sirt1 transgenic and cancer models. 102nd Annual Meeting of the American Association for Cancer Research; 2011; Orlando, Florida. Philadelphia (PA):: AACR.
38. Wang R-H, Sengupta K, Li C, Kim H-S, Cao L, Xiao C, et al. Impaired DNA damage response, genome instability, and tumorigenesis in SIRT1 mutant mice. *Cancer cell*. 2008;14(4):312-23.
39. Wang R-H, Zheng Y, Kim H-S, Xu X, Cao L, Lahusen T, et al. Interplay among BRCA1, SIRT1, and Survivin during BRCA1-associated tumorigenesis. *Molecular cell*. 2008;32(1):11-20.
40. Firestein R, Blander G, Michan S, Oberdoerffer P, Ogino S, Campbell J, et al. The SIRT1 deacetylase suppresses intestinal tumorigenesis and colon cancer growth. *PloS one*. 2008;3(4):e2020.
41. Revollo JR, Körner A, Mills KF, Satoh A, Wang T, Garten A, et al. Nampt/PBEF/visfatin regulates insulin secretion in β cells as a systemic NAD biosynthetic enzyme. *Cell metabolism*. 2007;6(5):363-75.
42. Gouranton E, Romier B, Marcotorchino J, Tourniaire F, Astier J, Peiretti F, et al. Visfatin is involved in TNF α -mediated insulin resistance via an NAD⁺/Sirt1/PTP1B pathway in 3T3-L1 adipocytes. *Adipocyte*. 2014;3(3):180-9.
43. Li Y, Zhang Y, Dorweiler B, Cui D, Wang T, Woo CW, et al. Extracellular Nampt promotes macrophage survival via a nonenzymatic interleukin-6/STAT3 signaling mechanism. *Journal of Biological Chemistry*. 2008;283(50):34833-43.
44. Shyng-Shiou F, Yuan Y-JC, Yi-Chen Lee, Ming-Feng Hou. editor. Visfatin promotes malignant breast cancer behavior through activation of STAT3. [abstract] In: Proceedings of the 104th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research; 2013 Apr 6-10; Washington, DC. Philadelphia (PA): AACR; Cancer Res.
45. Kim J-Y, Bae Y-H, Bae M-K, Kim S-R, Park H-J, Wee H-J, et al. Visfatin through STAT3 activation enhances IL-6 expression that promotes endothelial angiogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*. 2009;1793(11):1759-67.
46. Marotta LL, Almendro V, Marusyk A, Shipitsin M, Schemme J, Walker SR, et al. The JAK2/STAT3 signaling pathway is required for growth of CD44⁺ CD24⁻ stem cell-like breast cancer cells in human tumors. *The Journal of clinical investigation*. 2011;121(7):2723.
47. Heinrich P, Behrmann I, Haan S, Hermanns H, Muller-



- Newen G, Schaper F. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem j.* 2003;374:1-20.
48. Yang L, Wang L, Lin H-K, Kan P-Y, Xie S, Tsai M-Y, et al. Interleukin-6 differentially regulates androgen receptor transactivation via PI3K-Akt, STAT3, and MAPK, three distinct signal pathways in prostate cancer cells. *Biochemical and biophysical research communications.* 2003;305(3):462-9.
49. Wei L-H, Kuo M-L, Chen C-A, Chou C-H, Cheng W-F, Chang M-C, et al. The anti-apoptotic role of interleukin-6 in human cervical cancer is mediated by up-regulation of Mcl-1 through a PI 3-K/Akt pathway. *Oncogene.* 2001;20(41):5799-809.
50. Vinciguerra M, Santini MP, Claycomb WC, Ladurner AG, Rosenthal N. Local IGF-1 isoform protects cardiomyocytes from hypertrophic and oxidative stresses via SirT1 activity. *Aging (Albany NY).* 2010;2(1):43.
51. Van der Veer E, Ho C, O'Neil C, Barbosa N, Scott R, Cregan SP, et al. Extension of human cell lifespan by nicotinamide phosphoribosyltransferase. *Journal of Biological Chemistry.* 2007;282(15):10841-5.
52. Behr D, Wu J, Cumine S, Kim KW, Lu SC, Atangan L, et al. Resveratrol is not a direct activator of SIRT1 enzyme activity. *Chemical biology & drug design.* 2009;74(6):619-24.
53. Borra MT, Smith BC, Denu JM. Mechanism of human SIRT1 activation by resveratrol. *Journal of Biological Chemistry.* 2005;280(17):17187-95.
54. Kaeberlein M, McDonagh T, Heltweg B, Hixon J, Westman EA, Caldwell SD, et al. Substrate-specific activation of sirtuins by resveratrol. *Journal of Biological Chemistry.* 2005;280(17):17038-45.
55. Schuster S, Penke M, Gorski T, Petzold-Quinque S, Damm G, Gebhardt R, et al. Resveratrol differentially regulates NAMPT and SIRT1 in hepatocarcinoma cells and primary human hepatocytes. *PloS one.* 2014;9(3):e91045.
56. Zhu X, Liu Q, Wang M, Liang M, Yang X, Xu X, et al. Activation of Sirt1 by resveratrol inhibits TNF- α induced inflammation in fibroblasts. *PloS one.* 2011;6(11):e27081.
57. Lagouge M, Argmann C, Gerhart-Hines Z, Meziane H, Lerin C, Daussin F, et al. Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1 α . *Cell.* 2006;127(6):1109-22.



Original Article

The Activity of Sirtuin 1 in MCF-7 Breast Cancer Cell Line: The Effects of VisfatinBehrouzfar K¹, Nourbakhsh M^{2*}, Alaiee M¹

1- Department of Clinical Biochemistry, School of medicine, Tehran University of medical sciences, Tehran, Iran.

2- Department of Clinical Biochemistry, School of medicine, Iran University of medical sciences, Tehran, Iran.

Received: 09 Apr 2015

Accepted: 21 Jul 2015

Abstract

Background & Objectives: Breast cancer is the most common cancer and the second leading cause of cancer deaths among women. Obesity, hormones, and growth factors are the risk factors for this kind of cancer. One of the changes observed in patients suffering from breast cancer is the elevated Visfatin or nicotinamide phosphoribosyl transferase (NAMPT) in their tumor tissues and blood. The increased activity of Visfatin and SIRT1 (Sirtuin 1) in breast cancer and many other cancers has been determined, and its value is correlated with cancer prognosis. The aim of the present study is to investigate the effects of Visfatin on SIRT1 activity in MCF-7 breast cancer cell line.

Materials & Methods: In this study, in order to investigate the effects of Visfatin on SIRT1 activity in MCF-7 cells, cells were treated after cell culture by Visfatin for 12, 24, and 48 hours. Subsequently, the cells were lysed by nuclear extraction kit, and their total protein concentrations were measured by Bradford assay. Finally, we estimated the general activity of SIRT1 by measuring the SIRT1 activity with the assay kit via spectrofluorometric device.

Results: The findings of this research show that SIRT1 activity is not significantly changed following Visfatin treatments for 12 and 24 hours. However, after 48 hour, Visfatin increases SIRT1 activity about 2 times more than control group.

Conclusion: The antiapoptotic effects of Visfatin are exerted by increasing SIRT1 activity in MCF-7 cells, and these effects happen after 24 hours.

Keywords: Visfatin, SIRT1, Breast cancer

* Corresponding author: Mitra Nourbakhsh, Department of Clinical Biochemistry, School of medicine, Iran University of medical sciences, Tehran, Iran.

Email: m_nourbakhsh@yahoo.com