

بررسی اثر ضد تکثیری متیل-۳-پنتیل-۶-متوکسی پرودیجینین در سلول‌های سرطانی کبدی

محمدرضا سام^۱، رضا عبدی ینکجه^۲

تاریخ دریافت ۱۳۹۴/۱۱/۲۸ تاریخ پذیرش ۱۳۹۵/۰۱/۲۹

چکیده

پیش‌زمینه و هدف: هیاتوسلولار کارسینوما اغلب به روش‌های درمانی کلاسیک مقاوم است؛ بنابراین یافتن ترکیبات درمانی جدید با منشأ طبیعی و کم‌ترین میزان سمیت، جهت درمان آن حائز اهمیت است. در این زمینه نشان داده شده است که متیل-۳-پنتیل-۶-متوکسی پرودیجینین (پرودیجیوسین) دیواره سلولی باکتری سراسیا مارسنس به‌عنوان ترکیبی قدرتمند در مهار تکثیر سلول‌های بدخیم در انواع مختلفی از سرطان‌ها عمل می‌کند. در این مطالعه، فعالیت‌های ضد تکثیری پرودیجیوسین در رده سلولی سرطانی کبد (HepG2) در بازه‌های زمانی و دوزهای مختلفی از آن مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش کار: سلول‌های بدخیم در غلظت‌های ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰، ۶۰۰ نانومول از پرودیجیوسین به مدت ۲۴ الی ۷۲ ساعت تیمار شدند. سپس میزان رشد سلولی با استفاده از آزمون MTT مورد بررسی قرار گرفت. همچنین پس از ۴۸ ساعت تیمار با غلظت‌های ذکر شده پرودیجیوسین، شمارش سلولی و میزان آپوپتوز به ترتیب با استفاده از هموسایتمتر و آزمون فلوسایتمتری تعیین گردید.

یافته‌ها: بر مبنای نتایج حاصل از آزمون MTT، در غلظت‌های افزایش‌یافته از پرودیجیوسین، میزان رشد سلول‌های تیمار شده نسبت به سلول‌های تیمار نشده به‌طور قابل‌ملاحظه‌ای به‌طور وابسته به دوز و زمان کاهش می‌یابد. به‌طور ویژه پس از ۷۲ ساعت تیمار با غلظت‌های ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰ و ۶۰۰ نانومول پرودیجیوسین، میزان رشد سلول‌ها در مقایسه با سلول‌های کنترل تیمار نشده به ترتیب $2 \pm 44\%$ ، $3 \pm 33\%$ درصد، $5 \pm 27\%$ درصد و $5 \pm 27\%$ درصد اندازه‌گیری شد. همچنین به‌طور وابسته به غلظت، تعداد سلول‌ها با افزایش غلظت پرودیجیوسین کاهش می‌یابد. به‌ویژه پس از ۴۸ ساعت تیمار با ۶۰۰ نانومول پرودیجیوسین، تعداد سلول‌ها در مقایسه با سلول‌های کنترل تیمار نشده به میزان ۷۷ درصد کاهش می‌یابد. همچنین، میزان آپوپتوز تأخیری در رنج غلظتی استفاده‌شده از پرودیجیوسین به میزان ۹۷.۴-۳۷ درصد محاسبه گردید.

بحث و نتیجه‌گیری: پرودیجیوسین میزان تکثیر سلولی را در سلول‌های سرطانی کبد کاهش می‌دهد و این کاهش به‌واسطه القا آپوپتوز توسط پرودیجیوسین در این سلول‌هاست؛ بنابراین این ترکیب ممکن است به‌عنوان عاملی قدرتمند در کاهش تکثیر سلول‌های بدخیم سرطان کبد مطرح گردد. **کلیدواژه‌ها:** هیاتوسلولار کارسینوما، پرودیجیوسین، سراسیا مارسنس، تکثیر سلولی، آپوپتوز

مجله پزشکی ارومیه، دوره بیست و هفتم، شماره ششم، ص ۴۶۵-۴۵۸، ششم ۱۳۹۵

آدرس مکاتبه: ارومیه، خیابان شهید بهشتی، گروه زیست‌فناوری سلولی و مولکولی، پژوهشکده زیست‌فناوری، دانشگاه ارومیه، تلفن: ۰۴۴-۳۳۴۴۰۱۹۹

Email: m.sam@urmia.ac.ir

مقدمه

علاوه بر سلول‌های سرطانی، سلول‌های سالم و طبیعی را نیز از بین می‌برند و متأسفانه پس از مدتی کارایی خود را نیز از دست می‌دهند؛ بنابراین محققان بر روی داروهای طبیعی باهدف جایگزینی آن‌ها با داروهای سنتتیک شیمیایی تمرکز کرده‌اند و یافتن ترکیبات درمانی جدید با منشأ طبیعی و حداقل عوارض درمانی که بتوانند به‌صورت هدفمند سلول‌های سرطانی را از بین ببرند، اهمیت بالایی پیدا کرده است. در این میان استفاده از متابولیت‌های ثانویه باکتریایی نظر بسیاری از محققان را به خود جلب کرده است. یکی از این ترکیبات،

کارسینوما سلول‌های کبدی از سرطان‌های شایع در جهان است که سالانه در حدود ۶۰۰ هزار نفر از این بیماری فوت می‌شوند (۱). اگرچه در سالیان اخیر پیشرفت‌های مهمی در رابطه با تشخیص زودهنگام و روش‌های درمانی حاصل شده است، بااین‌وجود هنوز مرگومیر فراوانی بابت عود و بازگشت بیماری روی می‌دهد (۲). امروزه بیشتر داروهای ضد سرطان قابل‌دسترس و تجاری، به‌طور شیمیایی سنتز شده‌اند و اثرات جانبی بالایی بر فرد بیمار دارند و

^۱ گروه بیوتکنولوژی سلولی و مولکولی دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران (نویسنده مسئول)^۲ گروه بیوتکنولوژی سلولی و مولکولی دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

اتریش و سایر مواد شیمیایی از شرکت مرک آلمان خریداری گردیدند.

آماده‌سازی پرودیجیوسین و تیمار سلولی:

پرودیجیوسین در اتانول حل گردید تا استوک $20 \mu\text{g/ml}$ از آن تهیه گردد. سپس در دمای 80°C درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. برای تمامی آزمایشات، از محلول استوک پرودیجیوسین، غلظت‌های 100 الی 600 نانو مولار تهیه گردید.

شمارش سلولی:

سلول‌های HepG2 به تعداد 5×10^5 سلول در هر چاهک یک پلیت ۶ خانه‌ای دارای ۲ میلی‌لیتر محیط کشت کامل، در دمای 37°C درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور کشت داده شدند. پس از ۲۴ ساعت محیط کشت هر چاهک با محیط کشت کامل و تازه تهیه شده حاوی غلظت‌های 100 ، 400 و 600 نانو مول پرودیجیوسین تعویض شد و پلیت به مدت ۴۸ ساعت دیگر در انکوباتور مرطوب دارای ۵ درصد CO_2 قرار گرفت. سپس سلول‌های چسبیده به کف چاهک‌ها با استفاده از محلول تریپسین جدا شده و شمارش سلولی با استفاده از لام هموسایتومتر و در زیر میکروسکوپ معکوس انجام گرفت.

آزمون تکثیر سلولی:

سلول‌های HepG2 به تعداد 5×10^3 در هر چاهک یک پلیت ۹۶ خانه‌ای قرار داده شدند. پس از ۲۴ ساعت، سلول‌ها در محیط کشت کامل در غلظت‌های 100 الی 600 نانومولار پرودیجیوسین به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تیمار گردیدند و میزان تکثیر سلولی با استفاده از آزمون MTT مورد بررسی قرار گرفت. برای هر چاهک ۱۰ میکرولیتر محلول MTT (5mg/ml در بافر فسفات) به محیط کشت سلول‌ها اضافه شد و سلول‌ها به مدت ۴ ساعت در دمای 37°C درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. سپس محیط کشت هر چاهک با 200 میکرولیتر دی متیل سولفوکساید جهت انحلال کریستال‌های فورمازان تشکیل شده جایگزین گردید. میزان جذب نوری هر چاهک با دستگاه اسپکتوفتومتر (State fox, USA) در طول موج 492 نانومتر اندازه‌گیری شد و نتایج با استفاده از فرمول $(A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}}) / (A_{\text{control}} - A_{\text{blank}}) \times 100\%$ محاسبه شدند و به صورت درصدی از رشد سلول‌های کنترل تیمار نشده نشان داده شدند.

سنجش آپوپتوز:

سلول‌های HepG2 در حضور و عدم حضور غلظت‌های 100 ، 400 و 600 نانومولار پرودیجیوسین به مدت ۴۸ ساعت کشت داده شدند. سپس، سلول‌ها با استفاده از تریپسین از کف چاهک جدا گردیده و با بافر فسفات استریل دو بار مورد شستشو قرار گرفتند.

متیل-۳-پنتیل-۶-متوکسی پرودیجیوسین (پرودیجیوسین) دیواره سلولی باکتری سراسیا مارسنس است که خواص ضد تکثیری آن در انواع مختلفی از سلول‌های بدخیم نشان داده شده است (۳-۶). خانواده پرودیجیوسین که در ساختار مولکولی همه آن‌ها اسکلت پیرولیل پیرومتن^۱ دیده می‌شود، رنگ‌دانه‌هایی هستند که از لحاظ زیستی فعال بوده و دارای ویژگی‌هایی مانند القا آپوپتوز و فعالیت ضد توموری می‌باشند (۷). این خانواده شامل پرودیجیوسین، آندسیل پرودیجیوسین و سیکلو پرودیجیوسین هست که در اکثر رده‌های سلولی سرطانی اثر سمی دارد (۸) و نشان داده شده است که این ترکیبات بر سلول‌های سالم و طبیعی اثر سمی اندکی دارند (۳، ۴). به خاطر این سیتوتوکسیتی انتخالی، خانواده پرودیجیوسین‌ها به عنوان عوامل ضد سرطانی، امیدهای فراوانی را به وجود آورده‌اند. امروزه معلوم شده است که اثر سیتوتوکسیتی خانواده پرودیجیوسین بر سلول‌های بدخیم عمدتاً از طریق اسیدی شدن سیتوپلاسم، توقف چرخه سلولی با افزایش بیان p21، آسیب به مولکول DNA با مهار آنزیم‌های توپوایزومراز I و II و القا آپوپتوز از مسیر مستقل از p53 انجام می‌شود (۱۰، ۹، ۴). در این زمینه نشان داده شده است که پرودیجیوسین اثرات آپوپتوزی خود را با تنظیم بیان ژن‌های مرتبط با آپوپتوز نشان می‌دهد (۵، ۱۰)؛ بنابراین با توجه به مزایای ذکر شده از پرودیجیوسین و نیز عوارض جانبی بالای داروهای شیمی‌درمانی، در این پژوهش، اثر پرودیجیوسین دیواره سلولی باکتری سراسیا مارسنس بر تکثیر سلول‌های سرطانی کبدی و القا آپوپتوز در این سلول‌ها مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش کار

رده سلول‌های سرطانی HepG2 و شرایط کشت آن:

رده سلولی سرطانی HepG2 از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران خریداری شد و در محیط کشت سلولی RPMI-1640 حاوی درصد ۱۰ سرم جنین گاوی (PAA, Austria)، 100 u/ml پنی‌سیلین و $100 \mu\text{g/ml}$ استرپتومایسین، ۲ میکرومول L گلوتامین (Roche, Germany) و ۲۰ میکرومول بافر HEPES در دمای 37°C درجه سانتی‌گراد در انکوباتور CO_2 دار و مرطوب نگهداری شد.

مواد شیمیایی و کیت‌ها:

پرودیجیوسین از شرکت سیگما آمریکا خریداری شد. محلول Trypsin-EDTA (به نسبت ۰.۲۵ درصد تریپسین و ۰.۰۲ درصد EDTA) و کیت Annexin V Fluos برای سنجش آپوپتوز از شرکت Roche آلمان خریداری شدند. پودر MTT از شرکت آتوسل

¹ Pyrrolylpyrromethene

اثر پرودیجیوسین بر تکثیر و رشد سلول‌های سرطانی کبد:
 نتایج آزمون MTT نشان دادند که در تیمار سلول‌های HepG2 با غلظت‌های ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰ و ۶۰۰ نانو مولار پرودیجیوسین به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، میزان تکثیر سلولی به‌طور معنی‌داری و به‌صورت وابسته به دوز و زمان کاهش می‌یابد. به‌طوری‌که پس از ۷۲ ساعت تیمار سلولی در غلظت‌های ذکر شده از پرودیجیوسین به ترتیب ۴۴ درصد، ۳۳ درصد، ۲۷ درصد و ۲۷ درصد رشد سلولی نسبت به سلول‌های کنترل نشده مشاهده گردید (نمودار ۲).

اثر پرودیجیوسین بر القا آپوپتوز در سلول‌های سرطانی کبد:
 به‌منظور بررسی اثر پرودیجیوسین بر القا آپوپتوز در سلول‌های بدخیم، این سلول‌ها با غلظت‌های ۱۰۰، ۴۰۰ و ۶۰۰ میکرومولار پرودیجیوسین تیمار شدند و جهت بررسی با فلوسایتومتر آماده گردیدند. پرودیجیوسین در غلظت‌های استفاده شده، آپوپتوز را در سلول‌های سرطانی HepG2 به‌طور وابسته به دوز القاء می‌کند و میزان نکروز مشاهده شده در این غلظت‌ها پایین می‌باشد. پلات فلوسایتومتری و میزان آپوپتوز اولیه، آپوپتوز ثانویه و نکروز سلول‌های تیمار شده به ترتیب در نمودار ۳ و جدول ۱ نشان داده شده است.

در مرحله بعدی سلول‌ها در تعداد 5×10^5 در بافر بایندینگ دارای رنگ Annexin V-FITC قرار داده شده و در محل تاریک در دمای اتاق به مدت ۲۰ دقیقه انکوبه شدند. جهت تمایز سلول‌های با غشای آسیب‌دیده محلول Propidium iodide به سوسپانسیون سلولی قبل از آنالیز توسط دستگاه فلوسایتومتر (FACScan, USA) اضافه شد.

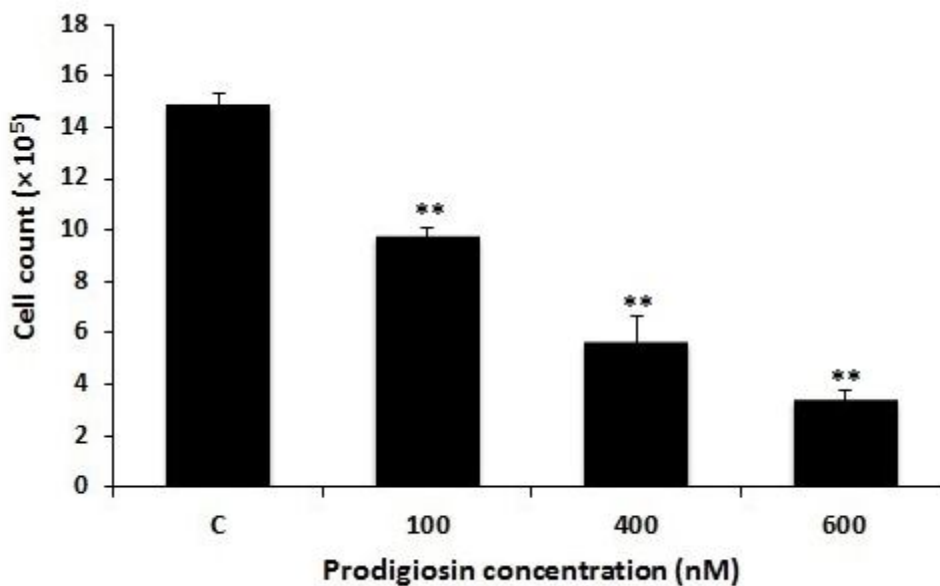
آنالیز آماری:

نتایج ارائه شده حاصل میانگین دوبر آزمايش \pm انحراف معیار بود. جهت مقایسه میانگین‌ها از آنالیز واریانس (ANOVA) استفاده گردید. ارزش عددی P کم‌تر از ۰.۰۵ معنادار در نظر گرفته شد. همه آنالیزهای آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS نوع ۱۵ انجام شدند.

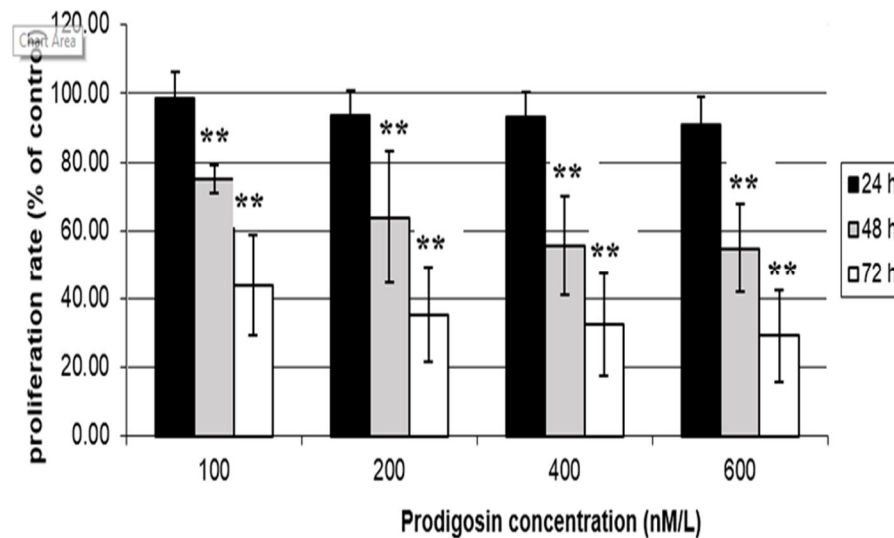
یافته‌ها

اثر پرودیجیوسین بر تعداد سلول‌ها:

پس از ۴۸ ساعت تیمار سلولی توسط پرودیجیوسین، تعداد سلول‌ها به‌طور معناداری و به‌طور وابسته به دوز کاهش یافت و در غلظت‌های صفر (کنترل بدون تیمار)، ۱۰۰، ۴۰۰ و ۶۰۰ نانو مول پرودیجیوسین به ترتیب تعداد سلول‌ها به 1.49×10^5 ، 9.7×10^4 و 5.6×10^4 رسید (نمودار ۱).

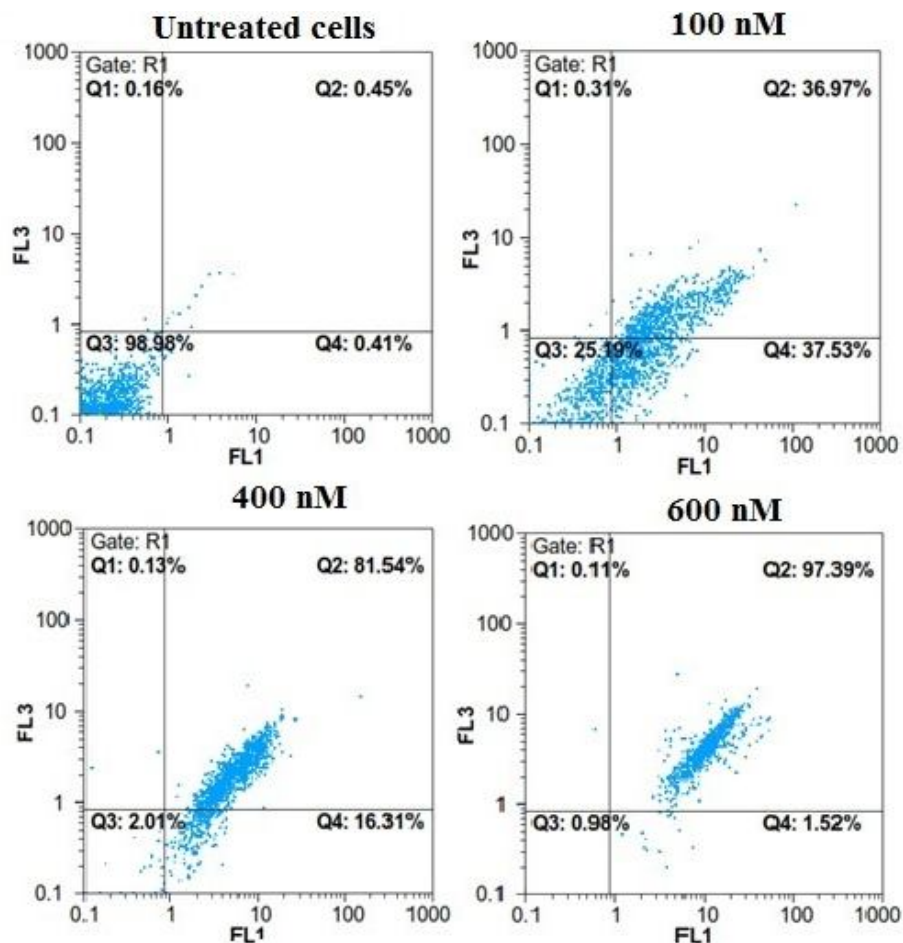


نمودار (۱): تعداد سلول‌های شمارش شده HepG2 در غلظت‌های مختلف پرودیجیوسین در بازه زمانی ۴۸ ساعت پس از تیمار. نتایج میانگین حداقل دو بار آزمايش \pm انحراف معیار است. میزان معناداری نسبت به نتایج سلول‌های کنترل تیمار نشده محاسبه و نشان داده شده است. **P<0.01, * P<0.05 vs. untreated control cells



نمودار (۲): میزان رشد و تکثیر سلول‌های تیمار شده HepG2 در غلظت‌های ذکر شده از پرودیجوسین در بازه‌های زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از تیمار. نتایج میانگین حداقل دو بار آزمایش \pm انحراف معیار است. میزان معناداری نسبت به نتایج سلول‌های کنترل تیمار نشده محاسبه و نشان داده شده است.

**P<0.01 vs. untreated control cells



نمودار (۳): پلات فلوسایتومتری مربوط به میزان آپوپتوز و نکروز در سلول‌های HepG2 در غلظت‌های مختلف از پرودیجوسین. Q1: سلول‌های پری نکروتیک؛ Q2: سلول‌های آپوپتوزی ثانویه و نکروزی؛ Q3: سلول‌های زنده و Q4: سلول‌های آپوپتوز اولیه.

جدول (۱): میزان آپوپتوز و نکروز ایجاد شده در سلول‌های HepG2 پس از ۴۸ ساعت تیمار با غلظت‌های مختلف پرودیجوسین

پرودیجوسین (nM)	(انحراف معیار ± میانگین: % نکروز/آپوپتوز)			
	سلول‌های زنده	آپوپتوز اولیه	آپوپتوز ثانویه	نکروز
(سلول‌های کنترل تیمار نشده) ۰	۱.۴ ± ۹۹	۰.۱ ± ۰.۴	۰.۱۴ ± ۰.۵	۰.۱ ± ۰.۱
۱۰۰	۱ ± ۲۴.۵ **	۱.۴ ± ۳۷.۸ **	۱.۷ ± ۳۷.۹ **	۰.۱ ± ۰.۲
۴۰۰	۰.۵ ± ۲ **	۲.۲ ± ۱۴.۷ **	۲.۱ ± ۸۳.۲ **	۰.۱ ± ۰.۲
۶۰۰	۰.۲ ± ۱ **	۰.۲ ± ۱.۶ **	۰.۳ ± ۹۷.۵ **	۰.۱ ± ۰.۱

** P<0.01 vs. untreated control cells

بحث و نتیجه‌گیری

امروزه سرطان کبد یکی از معضلات مهم و اساسی بهداشت و درمان در سراسر جهان می‌باشد. درمان این سرطان مستلزم جراحی، شیمی‌درمانی و پرتودرمانی می‌باشد. اگرچه شیمی‌درمانی و پرتودرمانی راهکارهای مناسبی می‌باشند و در چند دهه اخیر عمدتاً به علت ترکیبات دارویی جدید و برنامه‌های دارویی پیشرفت کرده‌اند اما عوارض جانبی بسیاری دارند و سلول‌های سرطانی در اکثر موارد نسبت به داروهای شیمی‌درمانی و یا پرتوهای یونیزان مقاومت نشان داده و به تکثیر خود ادامه می‌دهند. در این زمینه نشان داده شده است که استفاده زیاد از این روش‌ها نیز منجر به مرگ غیراختصاصی یا نکروز می‌شود. به همین علت ضروری است که درمان‌های مکمل دیگری جهت افزایش کارایی درمان به کار گرفته شوند (۱۱).

فعالیت ضد سرطانی پرودیجوسین‌ها اولین بار از طریق اثر سیکلوپرودیجوسین بر روی سلول‌های هیپاتوکارسینوما Huh-7 نشان داده شد (۱۲). بررسی اثر پرودیجوسین بر روی فعال‌سازی مسیر مرگ سلولی ناشی از استرس شبکه آندوپلاسمی در رده‌های سلولی سرطانی پستان، نشان می‌دهد که پرودیجوسین با القاء استرس در شبکه آندوپلاسمی باعث مرگ سلولی می‌شود (۱۳). همچنین اثر آنتی‌متاستازی آن از طریق مهار مسیرهای مختلف مؤثر در فرآیند تهاجم سلولی مانند مهار اتصال سلول‌ها به یکدیگر و سرکوب فعالیت پروتئین ماتریکس متالوپروتئیناز ۲ است (۱۴).

در این مطالعه، پرودیجوسین موجب کاهش تعداد سلول‌ها به‌طور وابسته به دوز گردید. نشان داده شده است که این ترکیب موجب توقف چرخه سلولی و آپوپتوز سلول‌های بدخیم می‌گردد (۱۵، ۱۶)؛ بنابراین کاهش تعداد سلول‌ها پس از تیمار با پرودیجوسین می‌تواند ماحصل توقف چرخه سلولی، کاهش تکثیر سلول‌ها و یا مرگ سلولی باشد. در این زمینه، بر مبنای نتایج مطالعه ما، پس از ۷۲ ساعت تیمار با پرودیجوسین، رشد و تکثیر سلول‌های بدخیم در غلظت ۶۰۰ نانو مولار از پرودیجوسین، بیشترین کاهش را نشان داد که می‌توان این کاهش را به فعال شدن بهتر مکانیسم آپوپتوز در سلول‌های بدخیم در تیمار با غلظت بالاتر پرودیجوسین در بازه زمانی طولانی‌تر نسبت داد. در این زمینه در مطالعات سایر

محققان نیز نشان داده شده است که پرودیجوسین به‌صورت وابسته به دوز و زمان تعداد سلول‌های بدخیم و میزان تکثیر آن‌ها را کاهش می‌دهد که از این نظر با نتایج به‌دست‌آمده در مطالعه حاضر هم‌خوانی دارد (۱۷).

بر مبنای نتایج به‌دست‌آمده از شمارش و تکثیر سلولی، پرودیجوسین می‌تواند کاندید مناسبی به‌عنوان داوری کاهنده تکثیر سلولی در سلول‌های سرطانی کبد محسوب گردد که در این زمینه مطالعات و آزمون‌های بیشتری لازم است تا کارایی آن در محیط *In vivo* نیز بررسی گردد.

همچنین بر مبنای نتایج فلوسایتومتری معلوم گردید که پرودیجوسین در غلظت‌های مختلف با القاء آپوپتوز و نه از طریق نکروز، سلول‌های سرطانی HepG2 را مهار می‌کند و این یافته، مزیت بسیار مهم این ماده را در نابودی سلول‌های سرطانی در مقایسه با داروهای شیمی‌درمانی که بیشتر با القا نکروز باعث از بین رفتن سلول‌های بدخیم می‌شوند نشان می‌دهد. در این زمینه نشان داده شده است که پرودیجوسین با القا آپوپتوز در سلول‌های سرطانی کولورکتال باعث مرگ سلولی می‌گردد (۱۷) که در این مورد نتایج به‌دست‌آمده از مطالعه ما با نتایج مطالعه Hassankhani سازگار است (۱۷).

نشان داده شده است که پرودیجوسین از مسیر غیروابسته به p53 موجب القا آپوپتوز می‌گردد (۱۸). با توجه به اینکه در ۵۰ درصد موارد ژن p53 در سلول‌های سرطانی دچار جهش شده است، القا آپوپتوز توسط پرودیجوسین از این نظر می‌تواند حائز اهمیت باشد، چراکه اکثر داروهای شیمی‌درمانی جهت القا حداکثر مرگ سلولی نیاز به عملکرد ژن p53 بدون جهش دارند (۱۹).

با توجه به نتایج ما، پرودیجوسین به‌طور وابسته به دوز تکثیر سلولی و القا آپوپتوز را افزایش می‌دهد؛ بنابراین احتمالاً بتوان از این ماده به‌عنوان داروی مناسب ضد تکثیر سلول‌های سرطانی کبد همراه با داروهای شیمی‌درمانی یا پرتودرمانی استفاده کرد. با این‌وجود مطالعات بیشتری از جمله استفاده از مدل‌های حیوانی (*in vivo*) که می‌تواند بخشی از سؤالات در این زمینه را پاسخ دهد توصیه می‌گردد.

تشکر و قدردانی

این تحقیق با حمایت و پشتیبانی دانشگاه ارومیه انجام شده است که بدین‌وسیله نویسندگان مقاله حاضر از مسئولین محترم تشکر و قدردانی می‌نمایند.

References:

- Whang-Peng J, Cheng A-L, Hsu C, Chen C-M. Clinical development and future direction for the treatment of hepatocellular carcinoma. *J Experimen Clin Med* 2010;2(3):93-103.
- Wörns MA, Galle PR. Future perspectives in hepatocellular carcinoma. *Dig Liver Dis* 2010;42 Suppl 3:S302-309.
- Sumathi C, MohanaPriya D, Swarnalatha S, Dinesh, GM, Sekaran G. Production of prodigiosin using tannery fleshing and evaluating its pharmacological effects. *Sci World J* 2014; 2014:1-8.
- Francisco R, Pe´rez-Toma´s R, Gime´nez-Bonafe´ P, Soto-Cerrato V, Gime´nez-Xavier P, Ambrosio S. Mechanisms of prodigiosin cytotoxicity in human neuroblastoma cell lines. *Eur J Pharmacol* 2007; 572:111-9.
- Ho T-F, Peng Y-T, Chuang S-M, Lin S-C, Feng B-L, Lu C-H, et al. Prodigiosin down-regulates survivin to facilitate paclitaxel sensitization in human breast carcinoma cell lines. *Toxicol Appl Pharmacol* 2009;235(2):253-60.
- Ho T-F, Ma C-J, Lu C-H, Tsai Y-T, Wei Y-H, Chang J-S, et al. Undecylprodigiosin selectively induces apoptosis in human breast carcinoma cells independent of p53. *Toxicol Appl Pharmacol* 2007;225(3):318-28.
- Chang C-C, Chen W-C, Ho T-F, Wu H-S, Wei Y-H. Development of natural anti-tumor drugs by microorganisms. *J Biosci Bioeng* 2011;111(5):501-11.
- Pandey R, Chander R, Sainis KB. Prodigiosins as anti cancer agents: living up to their name. *Curr Pharm* 2009; 15: 732-41.
- Campàs C, Dalmau M, Montaner B, Barragán M, Bellosillo B, Colomer D, et al. Prodigiosin induces apoptosis of B and T cells from B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2003;17(4):746-50.
- Soto-Cerrato V, Viñals F, Lambert JR, Pérez-Tomás R. The anticancer agent prodigiosin induces p21 WAF1/CIP1 expression via transforming growth factor-beta receptor pathway. *Biochem Pharmacol* 2007;74(9):1340-1349.
- Krishna R, Mayer LD. Multidrug resistance (MDR) in cancer. Mechanisms, reversal using modulators of MDR and the role of MDR modulators in influencing the pharmacokinetics of anticancer drugs. *Eur J Pharm Sci* 2000;11(4):265-83.
- Yamamoto C, Takemoto H, Kuno K, Yamamoto D, Tsubura A, Kamata K, et al. Cycloprodigiosin hydrochloride, a new H(+)/Cl(-) symporter, induces apoptosis in human and rat hepatocellular cancer cell lines in vitro and inhibits the growth of hepatocellular carcinoma xenografts in nude mice. *Hepatology* 1999;30(4):894-902.
- Pan M-Y, Shen Y-C, Lu C-H, Yang S-Y, Ho T-F, Peng Y-T, et al. Prodigiosin activates endoplasmic reticulum stress cell death pathway in human breast carcinoma cell lines. *Toxicol Appl Pharmacol* 2012;265(3):325-34.
- Zhang J, Shen Y, Liu J, Wei D. Antimetastatic effect of prodigiosin through inhibition of tumor invasion. *Biochem. Pharmacol* 2005; 69: 407-14.
- Sam S, Sam MR, Esmaellou M, Safaralizadeh R. Effective Targeting Survivin, Caspase-3 and MicroRNA-16-1 Expression by Methyl-3-pentyl-6-methoxyprodigiosene Triggers Apoptosis in Colorectal Cancer Stem-Like Cells. *Pathol Oncol Res* 2016;

16. Perez-Tomas, R, and Montaner, B.: Effects of the proapoptotic drug prodigiosin on cell cycle-related proteins in Jurkat T cells. *Histol. Histopathol* 2003; 18: 379–85.
17. Sam S, Sam MR, Esmaeillo M, Safaralizadeh R. Effective Targeting Survivin, Caspase-3 and MicroRNA-16-1 Expression by Methyl-3-pentyl-6-methoxyprodigosene Triggers Apoptosis in Colorectal Cancer Stem-Like Cells. *Pathol Oncol Res* 2016;
18. Hassankhani R, Sam MR, Esmaeilou M, Ahangar P. Prodigiosin isolated from cell wall of *Serratia marcescens* alters expression of apoptosis-related genes and increases apoptosis in colorectal cancer cells. *Med Oncol* 2015;32:366.
19. Montaner, B, Navarro, S, Piqué M, Vilaseca M, Martinell M, Giralt E, et al. Prodigiosin from the supernatant of *Serratia marcescens* induces apoptosis in haematopoietic cancer cell lines. *British. J. pharmacol* 2000; 131: 585– 93.
20. Montaner B, Perez-Tomas R. Prodigiosin-induced apoptosis in human colon cancer cells. *Life Sci* 2001; 68: 2025–36.

EVALUATING THE ANTI-PROLIFERATIVE EFFECT OF 2-METHYL-3-PENTYL-6-METHOXYPRODIGININE IN HEPATOCELLULAR CARCINOMA CELLS

Mohammad Reza Sam^{1*}, Reza Abdi Yenkejeh²

Received: 17 Feb, 2016; Accepted: 18 Apr, 2016

Abstract

Background & Aims: Hepatocellular carcinoma remains often refractory to classic therapies. Therefore, the search for new natural compounds with minimal toxicity is of particular interest in treatment of liver cancer. In this context, it has been shown that 2-methyl-3-pentyl-6-methoxyprodiginine isolated from cell wall of *Serratia marcescens* has powerful growth inhibitory effects against different kinds of cancer cells. In this study, we investigated the anti-proliferative effect of prodigiosin on the human hepatocellular carcinoma HepG2 cells on a dose-response and time-course basis.

Materials & Methods: Malignant cells were treated with various concentrations of prodigiosin (100, 200, 400 and 600 nM) and incubated for 24 to 72 h. After treatments, proliferation-rates were determined by MTT assay. Following 48 h treatments with indicated concentrations of prodigiosin, cell number and apoptotic rates were also measured by hemocytometer and flow cytometer respectively.

Results: Treatment of cells with increasing concentrations of prodigiosin significantly decreased proliferation-rates in a dose-and time-dependent manner compared to untreated cells. Specifically, Following 72 h treatments with 100, 200, 400 and 600 nM prodigiosin proliferation-rates were found to be $44 \pm 2\%$, $33 \pm 4\%$, $27 \pm 3\%$ and $27\% \pm 5\%$ for indicated concentrations of prodigiosin respectively. We also found that the cell numbers were decreased in a dose-dependent manner. Specifically, 48 h treatment with 600 nM prodigiosin resulted in 77% decrease in cell number compared to untreated cells. An increase in the number of apoptotic cells (late), ranging from 37 to 97.4 %, was also observed with increasing prodigiosin concentrations.

Conclusion: Prodigiosin decreases proliferation of hepatocellular carcinoma cells with induction of apoptosis in these cells. Therefore, this compound may provide a powerful growth inhibitory agent on proliferation of hepatocellular carcinoma cells.

Keywords: Hepatocellular carcinoma, Prodigiosin, *Serratia marcescens*, Cell proliferation, Apoptosis

Address: Department of Cellular and Molecular Biotechnology, Institute of Biotechnology, Urmia University, Shahid Beheshti Street, Urmia, Iran. P. O. Box: 165.

Tel: +98-4433440199

E-mail: m.sam@urmia.ac.ir; s_mohammadreza@yahoo.com

SOURCE: URMIA MED J 2016; 27(6): 465 ISSN: 1027-3727

¹ Department of Cellular and Molecular Biotechnology, Institute of Biotechnology, Urmia University, Urmia, Iran (Corresponding Author)

² Department of Cellular and Molecular Biotechnology, Institute of Biotechnology, Urmia University, Urmia, Iran