

Effect of valproic acid on extrinsic (DR4, DR5, FAS, FAS-L, TRAIL) and intrinsic (BAX, BAK and APAF1, Bcl-2, and Bcl-xL) apoptotic pathways, cell viability and apoptosis in hepatocellular carcinoma PLC/PRF5 cell line

Sanaei M, Kavooosi F*

Research Center for Non-Communicable Diseases, Jahrom University of Medical Sciences, Jahrom, I.R. Iran.

Received: 2020/05/18 | Accepted: 2020/10/13

Abstract:

Background: Histone acetylation and deacetylation play an important role in transcription and gene expression. The acetylation status of histones and non-histone proteins is determined by histone acetyl-transferases (HATs) and histone deacetylases (HDACs). Histone deacetylase inhibitors (HDACIs) induce various molecular and extracellular effects, leading to potent anti-cancer activities. The current study was designed to investigate the effect of valproic acid (VPA) on extrinsic and intrinsic apoptotic pathways, cell viability, and apoptosis in hepatocellular carcinoma PLC/PRF5 cell line.

Materials and Methods: The hepatocellular carcinoma PLC/PRF5 was cultured. When cells approximately became 80% confluent, 3×10^5 cells were seeded into 96 and 24-well plates. After 24 h, the medium was replaced with the medium contains VPA (except control groups which were treated with DMSO). After 24, 48, and 72 h, to determine cell viability, cell apoptosis and gene expression, MTT assay, flow cytometry and Real-time quantitative RT-PCR (qRT-PCR) were done respectively.

Results: VPA inhibited cell viability, induced apoptosis, decreased Bcl-2, and Bcl-xL and increased DR4, DR5, FAS, FAS-L, TRAIL, BAX, BAK and APAF1 significantly.

Conclusion: It seems that VPA can play its role through intrinsic and extrinsic apoptotic pathways in hepatocellular carcinoma PLC/PRF5 cell line.

Keywords: Valproic acid, Apoptotic pathway, Hepatocellular carcinoma, PLC/PRF5 CELL line

*Corresponding Author

Email: kavooosifraidoon@gmail.com

Tel: 0098 917 391 4117

Fax: 0098 715 426 5814

Conflict of Interests: *No*

Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences, February, 2021; Vol. 24, No 6, Pages 601-609

Please cite this article as: Sanaei M, Kavooosi F. Effect of valproic acid on extrinsic (DR4, DR5, FAS, FAS-L, TRAIL) and intrinsic (BAX, BAK and APAF1, Bcl-2, and Bcl-xL) apoptotic pathways, cell viability and apoptosis in hepatocellular carcinoma PLC/PRF5 cell line. *Feyz* 2021; 24(6): 601-9.

اثر والپروئیک اسید بر بیان ژن‌های مسیر خارجی (DR4, DR5, FAS, FAS-L, TRAIL) و مسیر داخلی آپوپتوز (BAX, BAK and APAF1, Bcl-2, and Bcl-xL)، میزان زنده بودن سلول و آپوپتوز سلولی در سرطان کبد رده سلولی PLC/PRF5

مقصومه سنائی جهرمی^۱، فریدون کاوسی^{۲*}

خلاصه:

سابقه و هدف: استیل‌اسیون و داستیل‌اسیون هیستون، نقش مهمی در نسخه‌برداری و بیان ژن بازی می‌کنند. وضعیت استیل‌اسیون پروتئین‌های هیستونی و غیرهیستونی به‌وسیله آنزیم‌های هیستون استیل ترانس فراز (histone acetyl-transferases, HATs) و هیستون داستیل‌از (histone deacetylases, HDACs) تعیین می‌شود. مهارکننده‌های آنزیم‌های هیستون داستیل‌از، اثرات مولکولی و خارج سلولی مختلفی القا می‌کنند که منجر به ایفای نقش ضدسرطانی آن‌ها می‌شود. این تحقیق به منظور بررسی اثر داروی والپروئیک اسید بر بیان ژن‌های مسیر خارجی و مسیر داخلی آپوپتوز، میزان زنده بودن سلول و آپوپتوز در سرطان کبد رده سلولی PLC/PRF5 طراحی شد.

مواد و روش‌ها: سلول‌های سرطانی کبد رده PLC/PRF5 کشت داده شدند و پس از این‌که هم‌پوشانی سلول‌ها به حدود ۸۰ درصد رسید، سلول‌ها با تریپسین جمع‌آوری گردیدند و پس از شستشو، در پلیت با غلظت 3×10^5 کشت داده شدند. پس از ۲۴ ساعت، محیط کشت با محیط حاوی داروی والپروئیک اسید تیمار شدند (گروه کنترل فقط DMSO دریافت کردند). ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از تیمار کردن، به منظور تعیین میزان زنده بودن سلول، سلول‌های آپوپتوتیک و بیان ژن، به ترتیب تکنیک‌های MTT، فلوسیتومتری و Real-time انجام شد.

نتایج: والپروئیک اسید به‌طور معنی‌داری باعث مهار رشد سلولی، القای آپوپتوز، کاهش بیان ژن‌های Bcl-2, and Bcl-xL و افزایش بیان ژن‌های DR4, DR5, FAS, FAS-L, TRAIL, BAX, BAK and APAF1 گردید.

نتیجه‌گیری: به‌نظر می‌رسد والپروئیک اسید نقش آپوپتوزی خود را از طریق مسیرهای آپوپتوزی داخلی و خارجی در سرطان کبد ایفا می‌کند. **واژگان کلیدی:** والپروئیک اسید، مسیر آپوپتوز، سرطان کبد، رده سلولی PLC/PRF5

دو ماه‌نامه علمی - پژوهشی فیض، دوره بیست و چهارم، شماره ۶، بهمن - اسفند ۱۳۹۹، صفحات ۶۱۰-۶۰۱

مقدمه

مهارکننده‌های آنزیم‌های هیستون داستیل‌از، اثرات مولکولی و خارج سلولی مختلفی القا می‌کنند که منجر به ایفای نقش ضدسرطانی آن‌ها می‌شود. این ترکیبات می‌توانند پاسخ‌های بیولوژیک مختلفی شروع کنند که منجر به مهار رشد سلولی سلول‌های سرطانی می‌شود. این داروها می‌توانند از دو مسیر مختلف باعث ایجاد آپوپتوز در سلول‌های سرطانی شوند که شامل مسیر داخلی یا به عبارتی میتوکندریال (intrinsic/mitochondrial) و مسیر خارج سلولی یا مسیر به‌واسطه گیرنده مرگ (death receptor) است. این داروها با تغییر شکل ساختار DNA و به‌وسیله تغییر در پروتئین‌های دخیل در نسخه‌برداری، به‌طور انتخابی باعث تغییر بیان ژن می‌شوند [۲]. همچنان که ذکر شد، داروهای مهارکننده آنزیم‌های هیستون داستیل‌از از طریق افزایش بیان ژن‌های مسیر داخلی آپوپتوز سلولی (BAX, BAK and APAF1) و مسیر خارجی آپوپتوز (DR5, FAS, TRAIL, FAS-L, and TNF- α) و کاهش بیان ژن‌های ضدآپوپتوز نقش خود را ایفا می‌کنند [۳]. ترکیبات مهارکننده آنزیم‌های هیستون داستیل‌از، طبیعی و ساختگی هستند که گروه‌های مختلف آنزیم‌های هیستون داستیل‌از را هدف قرار می‌دهند. چند گروه از این ترکیبات شناسایی شده‌اند، از جمله:

استیل‌اسیون و داستیل‌اسیون هیستون، یک نقش مهم در نسخه‌برداری و بیان ژن بازی می‌کنند. وضعیت استیل‌اسیون پروتئین‌های هیستونی و غیرهیستونی به‌وسیله آنزیم‌های هیستون استیل ترانس فراز (histone acetyl-transferases, HATs) و هیستون داستیل‌از (histone deacetylases, HDACs) تعیین می‌شود. آنزیم‌های هیستون استیل ترانس فراز، گروه‌های استیل را به لیزین می‌افزایند و آنزیم‌های هیستون داستیل‌از عمل عکس انجام می‌دهند. در واقع، استیل‌اسیون هیستون باعث باز شدن ساختار کروماتین و در نتیجه فعال شدن نسخه‌برداری ژن‌ها می‌شود [۱].

۱. مربی، مرکز تحقیقات بیماری‌های غیرواگیر، دانشگاه علوم پزشکی جهرم، جهرم، ایران
۲. دانشیار، مرکز تحقیقات بیماری‌های غیرواگیر، دانشگاه علوم پزشکی جهرم، جهرم، ایران

* نشانی نویسنده مسئول:

دانشگاه علوم پزشکی جهرم، جهرم، فارس، ایران، کد پستی ۷۴۱۴۸-۴۶۱۹۹

تلفن: ۰۹۱۷۳۹۱۴۱۱۷ | دونهویس: ۰۷۱۵۴۴۴۰۸۲۳

پست الکترونیک: kavosifraidoon@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۲/۲۹ | تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۹/۷/۲۲

(Bcl-xL)، میزان زنده‌بودن سلول (viability) و آپوپتوز سلولی در سرطان کبد رده سلولی PLC/PRF5 مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

این کار تحقیقاتی در کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی جهرم با کد IR.JUMS.REC.1394.188 به تصویب رسیده است. سلول‌های سرطانی کبد رده PLC/PRF5 از بانک سلولی انستیتو پاستور کشور جمهوری اسلامی ایران (Cell Bank of Iran-Pasteur Institute) خریداری شدند و در محلول Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) که با سرم گاوی (fetal bovine serum, FBS) غنی شده است و حاوی آنتی‌بیوتیک شامل پنی‌سیلین (penicillin G sodium)، استرپتومایسین (streptomycin sulfate) و آمفوتریسین (amphotericin B) بود، در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. داروی والپروئیک اسید و دیگر مواد لازم از قبیل تریپسین (trypsin-EDTA)، MTT، محیط کشت (DMEM)، آنکسین (Annexin-V-FITC) و پروپیدیوم آیویدید (propidium iodide, PI) و کیت بیان ژن (Total RNA extraction Kit) (TRIZOL reagent) and Real-time polymerase chain reaction (PCR) kits از سیگما (Sigma) خریداری شد.

تعیین سلول‌های زنده به‌وسیله تکنیک MTT

Determination of cell viability by MTT assay
ابتدا سلول‌های سرطانی کبد کشت داده شدند و پس از این‌که هم‌پوشانی سلول‌ها به حدود ۸۰ درصد رسید، سلول‌ها با تریپسین جمع‌آوری گردیدند و پس از شستشو، در پلیت‌های ۹۶ خانه با غلظت 3×10^5 کشت داده شدند. پس از ۲۴ ساعت، محیط کشت با محیط حاوی داروی والپروئیک اسید با غلظت‌های مختلف (۰/۱، ۵، ۱۰ و ۲۰ میکرومول) جایگزین شد و سلول‌ها با این دارو تیمار (تریپت) شدند (گروه کنترل فقط DMSO دریافت کردند). ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از تیمار کردن (تریپت)، سلول‌های گروه‌های آزمایش و کنترل با PBS شستشو داده شدند و سپس محلول MTT برای مدت ۴ ساعت اضافه شد. پس از ۴ ساعت، کریستال‌های رنگی ایجادشده با DMSO حل گردید و میزان رنگ ایجادشده با طول موج ۵۷۰ مورد بررسی قرار گرفت. برای اطمینان بیشتر هر آزمایش ۳ بار تکرار شد.

تعیین سلول‌های آپوپتوتیک به‌وسیله تکنیک فلوسیتومتری.
Determination of apoptotic cells by flow cytometry assay
برای تعیین میزان آپوپتوز سلولی، سلول‌های سرطانی کبد در پلیت‌های ۲۴ خانه با غلظت 3×10^5 کشت داده شدند. پس از گذشت

الف) هیدروکسامیک اسیدهای ارگانیک

ب) بنزامیدها مثل MS-275

ج) اسیدهای چرب کوتاه زنجیر مثل والپروئیک اسید (valproic acid, VPA)

د) تتراپتیدهای حلقوی [۴]. گزارش شده است که ترکیبات مهارکننده آنزیم‌های هیستون داستیلاز (VPA, SAHA and TSA) می‌توانند باعث القای آپوپتوز از طریق تعدیل تنظیم‌کننده‌های آپوپتوز از قبیل Bcl-2, BclXL, Mcl-1, BclXs, Apaf-1, NOXA, TRAIL-R1, TRAIL-R2, caspase 8 شوند [۵]. به‌علاوه، TSA از طریق افزایش بیان پروتئین‌های پروآپتوتیک مثل Bax و کاهش بیان پروتئین‌های ضدآپوپتوز از قبیل Bcl-2 and Bcl-xL باعث القای آپوپتوز در سرطان کولون رده سلولی HT29 cells HT116 می‌گردد [۶]. تحقیقات آزمایشگاهی نشان داده است که TSA از طریق کاهش بیان ژن‌های Bcl-2, Mcl-1, and Bcl-XL باعث متوقف شدن سلول‌های سرطانی پانکراس در فاز G1-M می‌شود [۷]. چندین مطالعه نشان داده‌اند که اغلب سرطان‌های کبد hepatocellular carcinoma, HCCs)، ژن گیرنده مرگ (Fas) و لیگاند آن را (FasL) بیان می‌کنند [۸]. پیش‌تر، اثر TSA و VPA را بر روی سرطان‌های کبد و کولون گزارش شد [۹-۱۴]. مطالعات آزمایشگاهی نشان داده‌اند که داروهای مهارکننده آنزیم هیستون داستیلاز از طریق فعال‌کردن مسیر داخل سلولی (میتوکندریال) باعث مهار رشد سلولی و ایجاد آپوپتوز در سلول‌های سرطانی کبد رده HeG2 و SMMC-7721 می‌شوند [۱۵]. تحقیقات نشان داده است که والپروئیک اسید از طریق فعال کردن هر دو مسیر داخل سلولی و خارج سلولی آپوپتوز باعث القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی کبد رده HepG2 می‌گردد [۱۶]. داروی ساها (SAHA) با افزایش بیان DR5 و TRAIL و فعال‌کردن کاسپاز ۸ که اجزای مسیر آپوپتوز خارج سلولی هستند، باعث ایجاد آپوپتوز در سلول‌های سرطانی کبد رده HepG2, HepG3B, and SK-Hep1 می‌شود [۱۷]. با توجه به این‌که اثر داروهای مهارکننده آنزیم‌های هیستون داستیلاز به‌صورت وابسته به دوز، وابسته به زمان و وابسته به سلول است و نیز اثر گزارش‌شده این ترکیبات بر روی بعضی از رده‌های سلولی سرطان کبد، نمی‌توان به رده‌های دیگر تعمیم داد و گزارشی مبنی بر اثر داروی والپروئیک اسید بر مسیر داخل سلولی و خارج سلولی آپوپتوز در رده سلولی PLC/PRF5 یافت نشده است. بنابراین در این تحقیق اثر داروی والپروئیک اسید را بر بیان ژن‌های مسیر خارجی (DR4, DR5, FAS, FAS-L, TRAIL) و مسیر داخلی آپوپتوز (BAX, BAK and APAF1, Bcl-2, and

نتایج

نتیجه تعیین میزان سلول‌های زنده

سلول‌های سرطانی کبد با داروی والپروئیک اسید با غلظت‌های مختلف (۰/۱، ۵، ۱۰ و ۲۰ میکرومول) برای مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تربیت شدند و سپس به وسیله تکنیک MTT میزان سلول‌های زنده مشخص شد. همچنان‌که در شکل شماره ۱ مشخص شده است، والپروئیک اسید با تمام غلظت‌های استفاده شده به صورت وابسته به دوز و زمان توانست رشد سلولی را به صورت معنی‌داری مهار کند ($P < 0/001$). دوز مؤثر این ترکیب که توانست رشد ۵۰ درصد سلول‌ها را مهار کند ۵ میکرومول بود.

نتیجه تعیین آپوپتوز سلولی

برای تعیین سلول‌های آپوپتوتیک، سلول‌های سرطانی کبد با داروی والپروئیک اسید (۵ میکرومول) برای مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تربیت شدند. سپس با استفاده از رنگ‌آمیزی آنکسین و پروپیدیوم آیدید میزان سلول‌های آپوپتوتیک مشخص شد (شکل شماره ۲). همچنان‌که در شکل شماره ۳ نشان داده شده است، این ترکیب به طور معنی‌داری به صورت وابسته به زمان باعث ایجاد آپوپتوز شد ($P < 0/001$). درصد سلول‌های آپوپتوتیک پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به ترتیب ۲۲/۰۷، ۳۱/۹ و ۹۸/۳۲ بود ($P < 0/001$). حداکثر میزان آپوپتوز پس از ۷۲ ساعت مشاهده شد.

نتیجه تعیین بیان ژن

نتیجه تعیین بیان ژن نشان داد که داروی والپروئیک اسید (۵ میکرومول) می‌تواند به صورت معنی‌داری باعث کاهش بیان ژن‌های Bcl-2, and Bcl-xL و افزایش ژن‌های TRAIL, DR4, DR5, FAS, FAS-L, BAX, BAK and APAF1 شود (شکل‌های شماره‌های ۴ و ۵). میزان بیان ژن‌های مزبور در جدول‌های شماره‌های ۲ و ۳ مشخص شده است.

مدت‌زمان ۲۴ ساعت محلول کشت با محلول حاوی داروی والپروئیک اسید با غلظت ۵ میکرومول جایگزین شد (به جز گروه کنترل که DMSO دریافت کردند). پس از گذشت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت از تربیت، تمام سلول‌ها با استفاده از تریپسین جمع‌آوری گردیدند و با محلول PBS شستشو داده شدند و سپس با آنکسین و پروپیدیوم آیدید رنگ‌آمیزی انجام و سلول‌های آپوپتوتیک با دستگاه FACScan™ flow cytometer شمارش شد.

تعیین میزان بیان ژن با استفاده از تکنیک ریل تایم

Determination of gene expression by real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (Real-time RT-PCR)

برای تعیین میزان بیان ژن، سلول‌های سرطانی کبد در پلیت‌های ۲۴ خانه با غلظت 3×10^5 کشت داده شدند. پس از گذشت مدت‌زمان ۲۴ ساعت محلول کشت با محلول حاوی داروی والپروئیک اسید با غلظت ۵ میکرومول جایگزین شد (به جز گروه کنترل که DMSO دریافت کردند). پس از گذشت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت از تربیت، تمام RNA سلول‌ها به وسیله کیت RNeasy mini kit طبق پروتکل مربوطه استخراج گردید و به منظور حذف DNA ژنومی، RNA به دست آمده با کیت RNase-free DNase تربیت شد. غلظت RNA با استفاده از دستگاه بیوفلومترومتر (BioPhotometer) تعیین گردید. با استفاده از کیت RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit از RNA حاصل cDNA ساخته شد و در نهایت با استفاده از سایبرگرین، Real-time RT-PCR انجام شد. از ژن GAPDH به عنوان کنترل استفاده شد. توالی پرایمرهای استفاده شده، در جدول شماره یک مشخص شده است.

جدول شماره ۱- توالی پرایمرهای استفاده شده و رفرنس‌های مربوطه

Primer	Primer sequences (5' to 3')	Product length	Reference
TRAIL Forward	CCAGAGGAAGAAGCAACACATTG	96	20
Reverse	GCCCACTCTTGATGATTCCC		
DR4 Forward	CTCGAGAAGTTTGTCGTCGTCGGGGT	70	19
Reverse	GAG-CTCCCGTTCTTCTCCGACTC		
DR5 Forward	CTCGAGGTCTGCTGTTGGTGAGT	71	19
Reverse	GAGCTCGGGAATTTACACCAAGTGGAG		
FAS Forward	AGG-ACA-TGG-CTT-AGA-AGT-GGA-AAT-A	80	23
Reverse	TAC-AAA-AAA-AGT-TTG-GTT-TAC-ATC-TGC		
FAS-L Forward	GGC-CCA-TTT-AAC-AGG-CAA-GT	73	23
Reverse	CAG-GAC-AAT-TCC-ATA-GGT-GTC-TTC		
BAX Forward	GGGGACGAAGTGGACAGTAA	122	18
Reverse	CAGTTGAAGTTGCCGTCAGA		
BAK Forward	GCCCAGGACACAGAGGAGGTTTTC	528	21
Reverse	AAACTGGCCCAACAGAACCACACC		

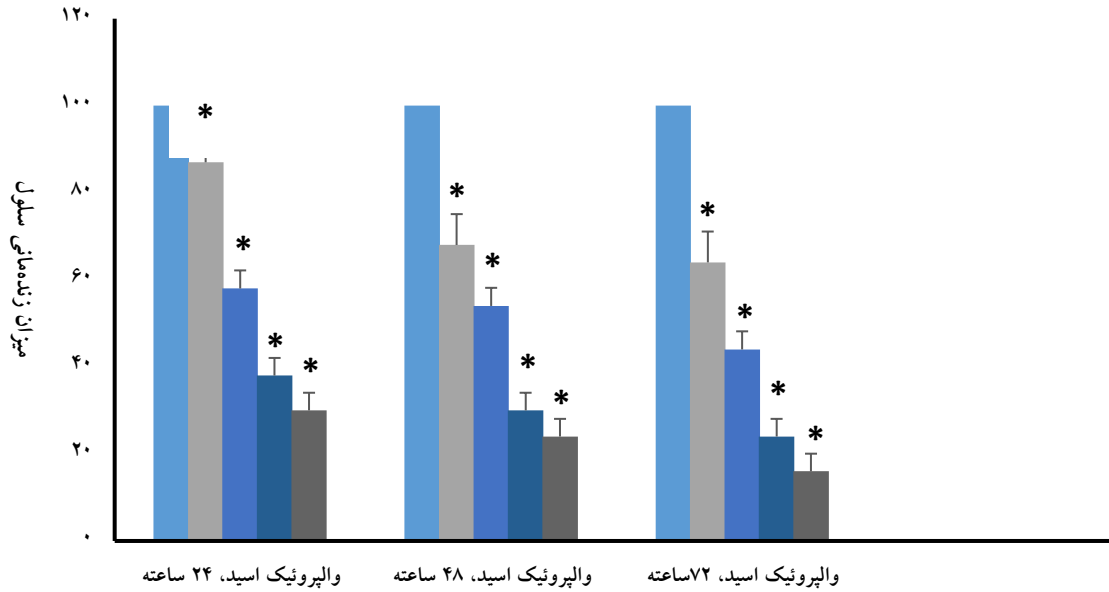
Primer	Primer sequences (5' to 3')	Product length	Reference
APAF1 Forward Reverse	AAA AGG GGA TAG AAC CAG AGG TGG TGC GGC ACC TCA AGT CTT C	68	24
Bcl-2 Forward Reverse	TGTGTTCACAAACGGGATTCA GGCTGGGCACATTTACTGTT	136	18
Bcl-xL Forward Reverse	GTTCCCTTTCCTTCCATCC TAGCCAGTCCAGAGGTGAG	123	22
GAPDH Forward Reverse	GAGTCAACGGATTTGGTCTG GACAAGCTTCCCCTTCTCAG	131	18

جدول شماره ۲- اثر داروی والپروئیک اسید (۵ میکرومول) بر روی بیان ژنهای مسیر خارجی آپوپتوز سلولی.

Cell line	Gene	Drug	Dose (μ M)	Duration (h)	Relative gene expression level	P-value
PLC/PRF5	DR4	VPA	5	24	1.8	0.001
PLC/PRF5	DR4	VPA	5	48	2.1	0.001
PLC/PRF5	DR4	VPA	5	72	2.5	0.001
PLC/PRF5	DR5	VPA	5	24	2.1	0.001
PLC/PRF5	DR5	VPA	5	48	2.4	0.001
PLC/PRF5	DR5	VPA	5	72	2.8	0.001
PLC/PRF5	FAS	VPA	5	24	2.4	0.001
PLC/PRF5	FAS	VPA	5	48	2.7	0.001
PLC/PRF5	FAS	VPA	5	72	3.1	0.001
PLC/PRF5	FAS-L	VPA	5	24	2.3	0.001
PLC/PRF5	FAS-L	VPA	5	48	2.5	0.001
PLC/PRF5	FAS-L	VPA	5	72	2.9	0.001
PLC/PRF5	TRAIL	VPA	5	24	2.7	0.001
PLC/PRF5	TRAIL	VPA	5	48	3.1	0.001
PLC/PRF5	TRAIL	VPA	5	72	3.3	0.001

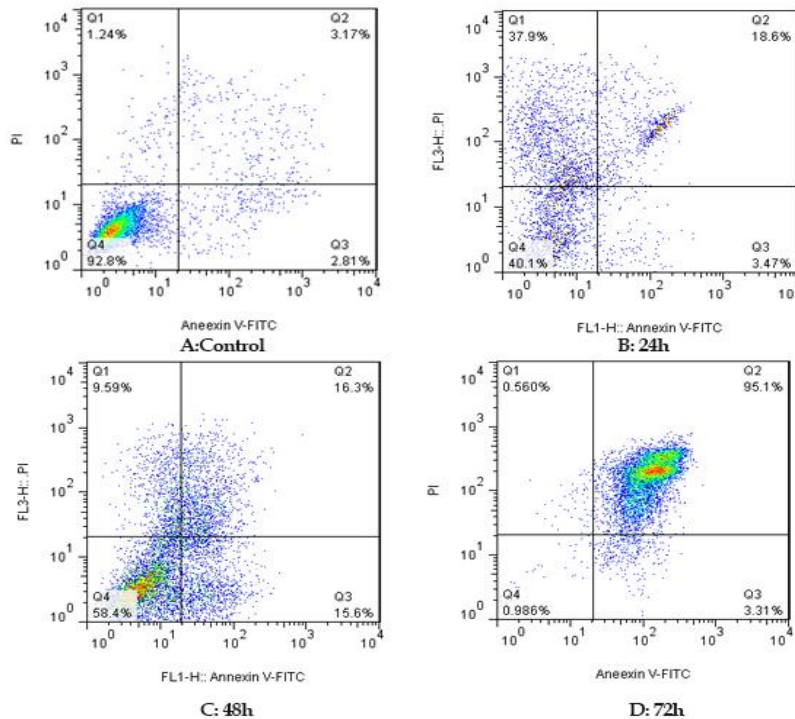
جدول شماره ۳- اثر داروی والپروئیک اسید (۵ میکرومول) بر روی بیان ژنهای مسیر داخلی آپوپتوز سلولی.

Cell line	Gene	Drug	Dose (μ M)	Duration (h)	Relative gene expression level	P-value
PLC/PRF5	BAX	VPA	5	24	1.7	0.001
PLC/PRF5	BAX	VPA	5	48	2	0.001
PLC/PRF5	BAX	VPA	5	72	2.2	0.001
PLC/PRF5	BAK	VPA	5	24	1.5	0.001
PLC/PRF5	BAK	VPA	5	48	1.8	0.001
PLC/PRF5	BAK	VPA	5	72	2	0.001
PLC/PRF5	APAF1	VPA	5	24	1.4	0.005
PLC/PRF5	APAF1	VPA	5	48	1.6	0.001
PLC/PRF5	APAF1	VPA	5	72	1.9	0.001
PLC/PRF5	Bcl-2	VPA	5	24	0.62	0.001
PLC/PRF5	Bcl-2	VPA	5	48	0.54	0.001
PLC/PRF5	Bcl-2	VPA	5	72	0.5	0.001
PLC/PRF5	Bcl-xL	VPA	5	24	0.55	0.001
PLC/PRF5	Bcl-xL	VPA	5	48	0.48	0.001
PLC/PRF5	Bcl-xL	VPA	5	72	0.38	0.001

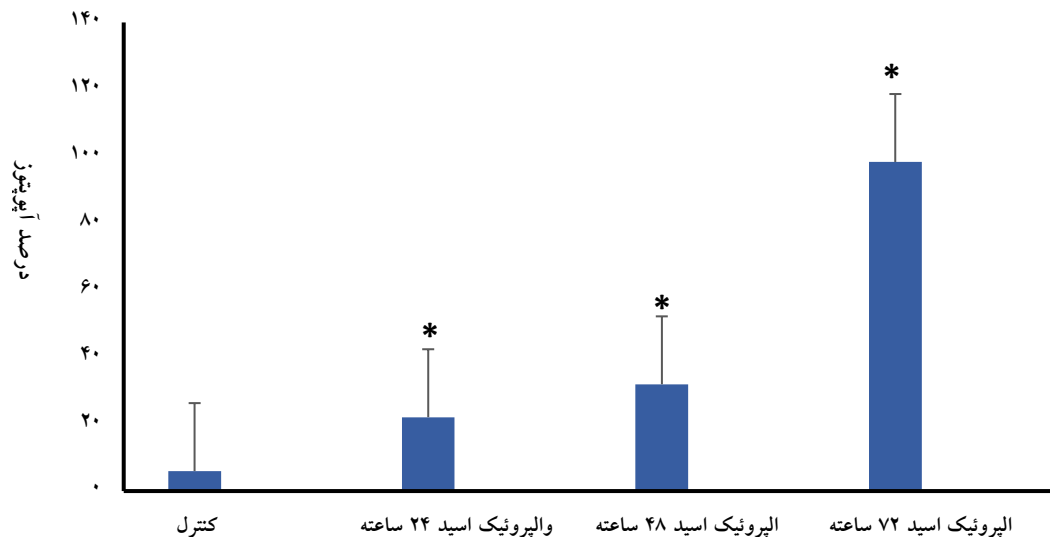


گروه‌های مورد آزمایش

نمودار شماره ۱- نتیجه تعیین سلول‌های زنده در سرطان کبد رده سلولی PLC/PRF5 که با داروی والپروتیک اسید با غلظت‌های مختلف (۱، ۵، ۱۰، ۲۰ میکرومول) تریت شده بودند. علامت ستاره، تفاوت معنی‌دار گروه‌های تریت‌شده با دارو را در مقایسه با گروه کنترل نشان می‌دهد ($P < 0.001$). در هر گروه به ترتیب از چپ به راست، اولکین ستون (میله) مربوط به گروه کنترل و دیگر میله‌ها به ترتیب مربوط به گروه‌های تریت‌شده با داروی والپروتیک اسید با غلظت‌های ۱، ۵، ۱۰ و ۲۰ میکرومول است.

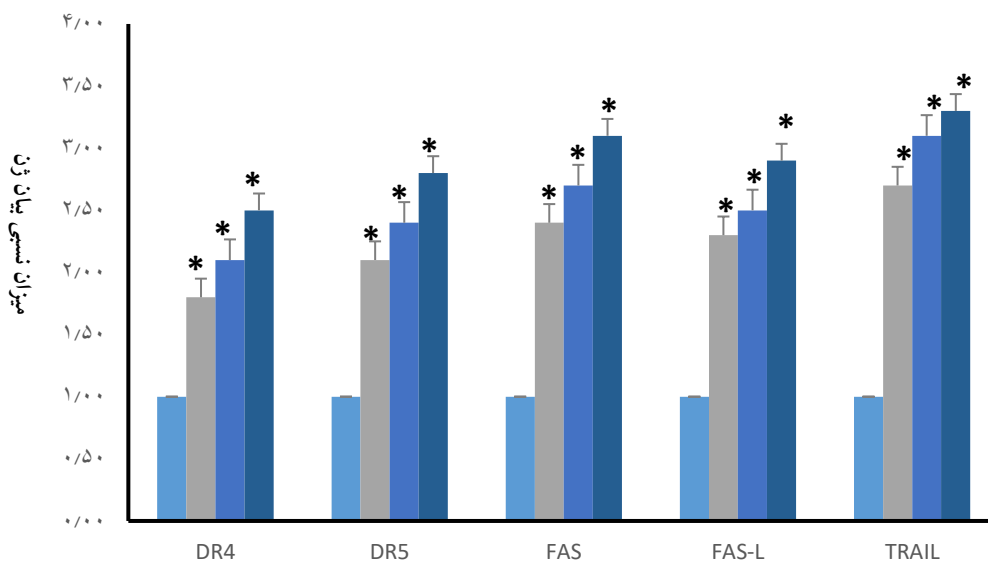


نمودار شماره ۲- نتیجه تعیین سلول‌های آپوپتوتیک در سرطان کبد رده سلولی PLC/PRF5 که با داروی والپروتیک اسید با غلظت ۵ میکرومول تریت شده بودند. علامت ستاره تفاوت معنی‌دار گروه‌های تریت‌شده با دارو در مقایسه با گروه کنترل را نشان می‌دهد ($P < 0.001$).



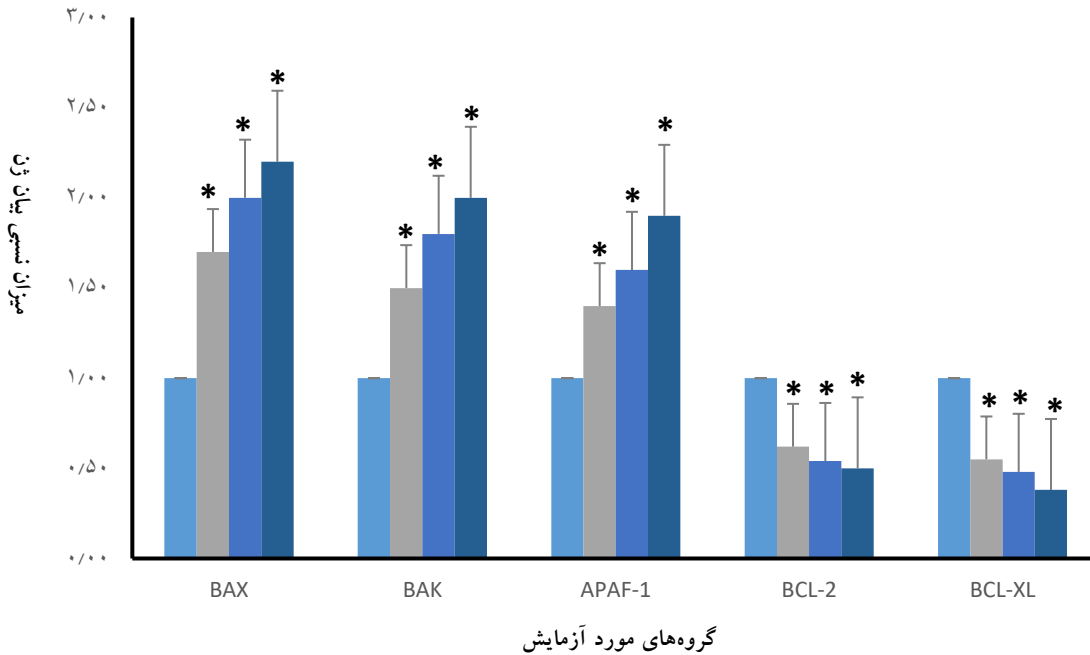
گروه‌های مورد آزمایش

نمودار شماره ۳- اثر آپوپتوتیک داروی والپروئیک اسید با غلظت ۵ میکرومول پس از گذشت مدت‌زمان ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت از تریتمنت. علامت ستاره بیانگر تفاوت معنی‌دار گروه‌های آزمایش با گروه کنترل است ($P < 0.001$).



گروه‌های مورد آزمایش

نمودار شماره ۴- نتیجه تعیین بیان ژن‌های مسیر خارجی (DR4, DR5, FAS, FAS-L, TRAIL) در سرطان کبد رده سلولی PLC/PRF5 که با داروی والپروئیک اسید با غلظت ۵ میکرومول تریتمنت شدند. علامت ستاره تفاوت معنی‌دار گروه‌های تریتمنت شده با دارو در مقایسه با گروه کنترل را نشان می‌دهد. در هر گروه به ترتیب از چپ به راست اولکین ستون (میل) مربوط به گروه کنترل و دیگر ستون‌ها به ترتیب مربوط به گروه‌های تریتمنت شده با داروی والپروئیک اسید با غلظت ۵ میکرومول به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت است.



نمودار شماره ۵- نتیجه تعیین بیان ژن‌های مسیر داخلی (BAX, BAK and APAF1, Bcl-2, and Bcl-xL) در سرطان کبد رده سلولی PLC/PRF5 که با داروی والپروئیک اسید با غلظت ۵ میکرومول تربیت شدند. علامت ستاره تفاوت معنی‌دار گروه‌های تربیت‌شده با دارو در مقایسه با گروه کنترل را نشان می‌دهد. در هر گروه به ترتیب از چپ به راست اولین ستون (میله) مربوط به گروه کنترل و دیگر ستون‌ها به ترتیب مربوط به گروه‌های تربیت‌شده با داروی والپروئیک اسید با غلظت ۵ میکرومول به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت است.

شوند. یک سری از تنظیم‌کننده‌های این دو مسیر، ژن‌های Bcl-2، BclXL، Mcl-1، BclXs، Apaf-1، NOXA، TRAIL-R1، TRAIL-R2، caspase 8 می‌باشند [۵]. نتیجه تحقیق حاضر، نشان داد که داروی والپروئیک اسید می‌تواند از دو مسیر خارجی و داخلی باعث القای آپوپتوز و مهار رشد سلولی در سلول‌های سرطانی کبد رده PLC/PRF5 شود. این دارو در مسیر خارجی باعث افزایش بیان ژن‌های DR4، DR5، FAS، FAS-L، TRAIL و در مسیر داخلی باعث افزایش بیان ژن‌های BAX، BAK and APAF1 و کاهش بیان ژن‌های Bcl-2، and Bcl-xL شد. نتیجه فعال‌شدن این دو مسیر مهار رشد سلولی و ایجاد آپوپتوز در سلول‌های سرطانی کبد بود. مشابه این نتیجه، دیگر محققان نیز گزارش کرده‌اند. مطالعات آزمایشگاهی نشان داده‌اند که داروی VPA از طریق مسیر داخلی باعث ایجاد آپوپتوز در سلول‌های سرطانی تیروئید (رده BHT101 و N-PA) می‌شود [۲۸]. گزارش شده است که این ترکیب از طریق فعال کردن هر دو مسیر، باعث القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی سرطان‌های سر و گردن (HNSCC) می‌شود [۲۹]. در سرطان کبد، گزارش شده است که این ترکیب از طریق افزایش بیان DR4 و DR5 و کاهش بیان Bcl-xL و Bcl-2 باعث القای آپوپتوز می‌شود. این بدین معنی است که این ترکیب، هر دو مسیر داخلی و خارجی را به کار می‌گیرد [۳۰]. مسیرهای مولکولی مشابهی برای داروی

بحث

سرطان، تکثیر بی‌رویه سلول‌هاست که به دلایل مختلف ژنتیک و اپی‌ژنتیک، تقسیم سلولی از کنترل خارج می‌شود و روند تقسیم، سرطانی می‌گردد. از جمله عوامل اپی‌ژنتیک که باعث ایجاد سرطان می‌گردد، خاموش شدن ژن‌های سرکوب‌کننده سرطان (tumor suppressor genes, TSGs) است. از جمله عواملی که باعث خاموش شدن این ژن‌ها می‌گردد، متیلاسیون ناحیه پروموتور و داستیلاسیون هیستون است [۲۶، ۲۵]. آنزیم‌های هیستون داستیلاز یک نقش محوری در بیان ژن از طریق تغییر شکل ساختار کروماتین بازی می‌کنند. فعالیت این آنزیم‌ها باعث برداشته شدن گروه استیل از لیزین هیستون و در نتیجه متراکم شدن DNA می‌شود که به نوبه خود دسترسی فاکتورهای نسخه‌برداری به DNA را کم می‌کند و موجب خاموش شدن ژن می‌شود. این پروسه، در ژن‌های خاموش‌کننده سرطان باعث القای سرطان می‌گردد. از این رو، مهارکننده‌های آنزیم‌های هیستون داستیلاز می‌توانند هدف پروسه درمان سرطان قرار گیرند. این ترکیبات با مهار فعالیت آنزیم‌های هیستون داستیلاز باعث بیان مجدد ژن‌های سرکوب‌کننده سرطان و ایجاد آپوپتوز می‌گردند [۲۷]. گزارش شده است که آنزیم‌های هیستون داستیلاز از طریق دو مسیر خارجی (سیتوپلاسمی) و داخلی (میتوکندریال) می‌توانند باعث ایجاد آپوپتوز سلول‌های سرطانی

در سرطان کولون رده سلولی HCT116 می‌گردد [۳۵]. در مجموع، با توجه به نتایج می‌توان نتیجه گرفت که داروی والپروئیک اسید کاندیدای مناسبی برای پروسه درمان سرطان می‌باشد. در این تحقیق تأثیر داروی والپروئیک اسید را بر میزان پروتئین‌های مسیر داخلی و خارجی آپوپتوز مورد بررسی قرار نگرفت، بنابراین بررسی پروتئینی این دو مسیر پیشنهاد می‌گردد.

نتیجه‌گیری

داروی والپروئیک اسید می‌تواند از طریق مسیرهای خارجی و داخلی آپوپتوز سلولی، باعث افزایش بیان ژن‌های DR4, DR5, FAS, FAS-L, TRAIL, BAX, BAK and APAF1 و کاهش بیان ژن‌های Bcl-2, and Bcl-xL و در نتیجه مهار رشد سلولی و القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی کبد رده سلولی PLC/PRF5 شود.

تشکر و قدردانی

از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی جهرم که حمایت مالی لازم را انجام داده‌اند، سپاسگزاریم.

References:

- [1] Xu W, Parmigiani R, Marks P. Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action. *Oncogene* 2007; 26(37): 5541-52.
- [2] Matthews GM, Newbold A, Johnstone RW. Intrinsic and extrinsic apoptotic pathway signaling as determinants of histone deacetylase inhibitor antitumor activity. *Advances in cancer research. Elsevier* 2012; 5: 165-97.
- [3] Eckschlager T, Plch J, Stiborova M, Hrabeta J. Histone deacetylase inhibitors as anticancer drugs. *Int J Mol Sci* 2017; 18(7): 1414.
- [4] Saharan R, Singh R, Nagar N, Verma S, Sharma V, Yadav S. HDAC inhibitors: a new armour in anti-cancer therapeutics. *Pharmacophore* 2011; 2: 104-13.
- [5] Facchetti F, Previdi S, Ballarini M, Minucci S, Perego P, La Porta C. Modulation of pro-and anti-apoptotic factors in human melanoma cells exposed to histone deacetylase inhibitors. *Apoptosis* 2004; 9(5): 573-82.
- [6] Meng J, Zhang HH, Zhou CX, Li C, Zhang F, Mei QB. The histone deacetylase inhibitor trichostatin A induces cell cycle arrest and apoptosis in colorectal cancer cells via p53-dependent and-independent pathways. *Oncol Rep* 2012; 28(1): 384-8.
- [7] Ryu JK, Lee WJ, Lee KH, Hwang JH, Kim YT, Yoon YB, et al. SK-7041, a new histone deacetylase inhibitor, induces G2-M cell cycle arrest and apoptosis in pancreatic cancer cell lines. *Cancer Lett* 2006; 237(1): 143-54.

تریکوآستاتین A (از دیگر داروهای خانواده مهارکننده هیستون داستیلاز) گزارش شده است. این دارو، از طریق فعال کردن هر دو مسیر داخلی و خارجی باعث ایجاد آپوپتوز در سلول‌های سرطانی مربوط به سرطان خون می‌گردد [۳۱]. دیگر همکاران گزارش کرده‌اند که داروی تریکوآستاتین A و بوتیرات سدیم با افزایش بیان Bad و کاهش بیان BCL-2, BCL-XL باعث ایجاد آپوپتوز در سلول‌های سرطان گلیوما می‌شود [۳۲]. داروی بوتیرات سدیم از طریق کاهش بیان Bcl-Xl و Bcl-2 باعث ایجاد آپوپتوز در سلول‌های سرطانی پانکراس می‌گردد [۳۳]. در سلول‌های سرطانی کولون رده سلولی HT-29، این ترکیب از طریق فعال کردن مسیر داخلی باعث ایجاد آپوپتوز می‌شود [۳۴]. تمام موارد گزارش شده به وسیله دیگر محققان که در بالا ذکر شد، مؤید گزارش این کار است. علاوه بر مسیرهای فوق، مسیرهای دیگری نیز برای داروی والپروئیک اسید ذکر شده است. پیش‌تر، گزارش شد که این ترکیب باعث بیان مجدد مهارکننده‌های سیکلین‌های وابسته به کیناز از قبیل P21, P27 و P21 در سرطان کولون می‌شود [۱۴]. همچنین گزارش شده است که تریکوآستاتین A با افزایش بیان P15 و P21 باعث ایجاد آپوپتوز

- [8] Lee SH, Shin MS, Lee HS, Bae JH, Lee HK, Kim HS, et al. Expression of Fas and Fas-related molecules in human hepatocellular carcinoma. *Hum Pathol* 2001; 32(3): 250-6.
- [9] Sanaei M, Kavooosi F, Salehi H. Genistein and trichostatin a induction of estrogen receptor alpha gene expression, apoptosis and cell growth inhibition in hepatocellular carcinoma HepG 2 cells. *Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP* 2017; 18(12): 3445.
- [10] Sanaei M, Kavooosi F, Roustazadeh A, Golestan F. Effect of genistein in comparison with trichostatin a on reactivation of DNMTs genes in hepatocellular carcinoma. *J Clin Transl Hepatol* 2018; 6(2): 141-6.
- [11] Kavooosi F, Sanaei M. Comparative analysis of the effects of valproic acid and tamoxifen on proliferation, and apoptosis of human hepatocellular carcinoma WCH 17 cell line. *Iran J Ped Hematol Oncol* 2018; 8(1): 12-20.
- [12] Sanaei M, Kavooosi F, Mansoori O. Effect of valproic acid in comparison with vorinostat on cell growth inhibition and apoptosis induction in the human colon cancer SW48 cells in vitro. *ExpOncol* 2018.
- [13] Sanaei M, Kavooosi F. Effects of 5-aza-2'-deoxycytidine and Valproic Acid on Epigenetic-modifying DNMT1 Gene Expression, Apoptosis Induction and Cell Viability in Hepatocellular Carcinoma WCH-17 cell line. *Iran J Ped Hematol Oncol* 2019; 2: 83-90.

- [14] Sanaei M, Kavooosi F. Effect of 5-aza-2'-deoxycytidine in comparison to valproic acid and trichostatin A on histone deacetylase 1, DNA methyltransferase 1, and CIP/KIP family (p21, p27, and p57) genes expression, cell growth inhibition, and apoptosis induction in colon cancer SW480 cell line. *Adv Biomed Res* 2019; 8: 52-58.
- [15] Liu J, Li G, Wang X, Wang L, Zhao R, Wang J, et al. Droxinostat, a histone deacetylase inhibitor, induces apoptosis in hepatocellular carcinoma cell lines via activation of the mitochondrial pathway and downregulation of FLIP. *Transl Oncol* 2016; 9(1): 70-8.
- [16] Yang W, Zhao X, Pei F, Ji M, Ma W, Wang Y, et al. Activation of the intrinsic apoptosis pathway contributes to the induction of apoptosis in hepatocellular carcinoma cells by valproic acid. *Oncol Lett* 2015; 9(2): 881-6.
- [17] Carlisi D, Lauricella M, D'Anneo A, Emanuele S, Angileri L, Di Fazio P, et al. The histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid sensitises human hepatocellular carcinoma cells to TRAIL-induced apoptosis by TRAIL-DISC activation. *Eur J Cancer* 2009; 45(13): 2425-38.
- [18] Zhou W, Feng X, Han H, Guo S, Wang G. Synergistic effects of combined treatment with histone deacetylase inhibitor suberoylanilidehydroxamic acid and TRAIL on human breast cancer cells. *Sci Rep* 2016; 6(1): 1-16.
- [19] Liu X, Yue P, Khuri FR, Sun S-Y. p53 upregulates death receptor 4 expression through an intronic p53 binding site. *Cancer Res* 2004; 64(15): 5078-83.
- [20] Soncini M, Santoro F, Gutierrez A, Frigè G, Romanenghi M, Botrugno OA, et al. The DNA demethylating agent decitabine activates the TRAIL pathway and induces apoptosis in acute myeloid leukemia. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 2013; 1832(1): 114-20.
- [21] Hasan Z, Ashraf M, Tayyebi A, Hussain R. M. leprae inhibits apoptosis in THP-1 cells by downregulation of Bad and Bak and upregulation of Mcl-1 gene expression. *BMC Microbiol* 2006; 6(1): 78.
- [22] Sharifi S, Barar J, Hejazi MS, Samadi N. Doxorubicin changes Bax/Bcl-xL ratio, caspase-8 and 9 in breast cancer cells. *Adv Pharm Bull* 2015; 5(3): 351.
- [23] Bolstad AI, Eiken HG, Rosenlund B, Alarcón-Riquelme ME, Jonsson R. Increased salivary gland tissue expression of Fas, Fas ligand, cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4, and programmed cell death 1 in primary Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum* 2003; 48(1): 174-85.
- [24] Fu WN, Bertoni F, Kelsey SM, McElwaine SM, Cotter FE, Newland AC, et al. Role of DNA methylation in the suppression of Apaf-1 protein in human leukaemia. *Oncogene* 2003; 22(3): 451-5.
- [25] Rubinek T, Shulman M, Israeli S, Bose S, Avraham A, Zundelevich A, et al. Epigenetic silencing of the tumor suppressor klotho in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2012; 133(2): 649-57.
- [26] Bachman KE, Park BH, Rhee I, Rajagopalan H, Herman JG, Baylin SB, et al. Histone modifications and silencing prior to DNA methylation of a tumor suppressor gene. *Cancer Cell* 2003; 3(1): 89-95.
- [27] Sekhavat A, Sun JM, Davie JR. Competitive inhibition of histone deacetylase activity by trichostatin A and butyrate. *BCB* 2007; 85(6): 751-8.
- [28] Catalano MG, Fortunati N, Pugliese M, Costantino L, Poli R, Bosco O, et al. Valproic acid induces apoptosis and cell cycle arrest in poorly differentiated thyroid cancer cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90(3): 1383-9.
- [29] Gillenwater AM, Zhong M, Lotan R. Histone deacetylase inhibitor suberoylanilidehydroxamic acid induces apoptosis through both mitochondrial and Fas (Cd95) signaling in head and neck squamous carcinoma cells. *Mol Cancer Ther* 2007; 6(11): 2967-75.
- [30] Chateauvieux S, Morceau F, Dicato M, Diederich M. Molecular and therapeutic potential and toxicity of valproic acid. *BioMed Res Int* 2010; 2010.
- [31] Sasaki K, Yamagata T, Mitani K. Histone deacetylase inhibitors trichostatin A and valproic acid circumvent apoptosis in human leukemic cells expressing the RUNX1 chimera. *Cancer Sci* 2008; 99(2): 414-22.
- [32] Sawa H, Murakami H, Ohshima Y, Sugino T, Nakajyo T, Kisanuki T, et al. Histone deacetylase inhibitors such as sodium butyrate and trichostatin A induce apoptosis through an increase of the bcl-2-related protein Bad. *Brain Tumor Pathol* 2001; 18(2): 109-14.
- [33] Natoni F, Diolordi L, Santoni C, Montani MSG. Sodium butyrate sensitises human pancreatic cancer cells to both the intrinsic and the extrinsic apoptotic pathways. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 2005; 1745(3): 318-29.
- [34] Wang L, Luo H, Xia H. Sodium butyrate induces human colon carcinoma HT-29 cell apoptosis through a mitochondrial pathway. *J Int Med Res* 2009; 37(3): 803-11.
- [35] Hitomi T, Matsuzaki Y, Yokota T, Takaoka Y, Sakai T. p15INK4b in HDAC inhibitor-induced growth arrest. *FEBS Lett* 2003; 554(3): 347-50.