

اثر ضد تکثیری سدیم بوتیرات بر رده سلولی Caco-2 سرطان کولورکتال انسانی با کاهش نسبت بیان رونوشت ژن Bcl-2 به Bax

فلورا فروزش^{1*}، پائته آ حاجی میرزا شفیع سلطانی²، مهسا قیاقی² و مهدی شعبانی³

۱- عضو هیات علمی-استادیار، گروه ژنتیک، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲- کارشناسی ارشد ژنتیک، گروه ژنتیک، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۳- عضو هیات علمی-استادیار، گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

*نویسنده مسئول: فلورا فروزش، دکتری تخصصی ژنتیک مولکولی، forouzes@iautmu.ac.ir و f8forouzes@gmail.com

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۹/۵/۱۲ تاریخ بازنگری: ۱۳۹۹/۸/۲۰ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۹/۱۱/۳۰

چکیده

پیشینه مطالعه و هدف: سرطان کولورکتال یکی از شایع‌ترین سرطان‌ها است و تغییرات اپی‌ژنتیکی به عنوان هدف درمانی مورد توجه قرار گرفته است. سدیم بوتیرات با هایپر-استیلاسیون اجزا کروماتین قادر به تغییر در بیان ژن‌ها است. هدف از این مطالعه بررسی تاثیر سدیم بوتیرات بر روی بیان ژن‌های Bcl-2 و Bax می‌باشد.

روش مطالعه: رده سلولی Caco-2 با غلظت‌های مختلف سدیم بوتیرات (۲۵ الی ۱۵۰ میلی‌مولار) براساس غلظت IC50 در دو بازه زمانی ۲۴ ساعت و ۴۸ ساعت تیمار شد. بیان ژن‌های Bcl-2 و Bax توسط تکنیک qReal-Time PCR به روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ اندازه‌گیری و نسبت Bcl-2/Bax مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج: نتایج نشان داد سدیم بوتیرات باعث افزایش بیان ژن Bax و کاهش بیان ژن Bcl2 در سلول‌های تحت تیمار در مقایسه با گروه کنترل شد که از نظر آماری معنی‌دار می‌باشد ($p < 0.05$). غلظت ۲۵ میلی‌مولار در بازه زمانی ۴۸ ساعت تیمار موثرترین دوز انتخاب گردید. همچنین نسبت Bcl-2/Bax در همین غلظت کاهش معنی‌داری را نشان داد.

نتیجه‌گیری: سدیم بوتیرات با کاهش نسبت بیان Bcl-2/Bax باعث القا آپوپتوز در سلول‌های سرطانی می‌شود. این ماده می‌تواند به عنوان هدف درمانی استفاده شود ولی نیاز به بررسی بیشتر می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: سرطان کولورکتال، سدیم بوتیرات، رده سلولی Caco-2، Bax، Bcl-2

مقدمه

شناخته می‌شود. از جمله تغییراتی که در این فرآیند حائز اهمیت هستند، می‌توان به جهش‌های فعال کننده انکوژن‌ها همراه با جهش‌های غیر فعال کننده ژن‌های مهارکننده تومور اشاره نمود (Arvelo et al., 2015). در سال‌های اخیر نرخ ابتلا به این سرطان در کشورهای آسیایی از جمله ایران افزایش یافته است که این امر می‌تواند ناشی از افزایش فاکتورهایی باشد که خطر ابتلا به این نوع سرطان را افزایش می‌دهد. از این فاکتورها می‌توان به بیماری‌های التهابی روده، تاریخچه خانوادگی کولورکتال، رژیم غذایی، چاقی مفرط، بی‌حرکی، استعمال دخانیات و دیابت اشاره نمود. این سرطان به عنوان چهارمین سرطان رایج در ایران

سرطان کولورکتال (CRC) حاصل از تجمع تغییرات ژنتیکی و اپی‌ژنتیکی است که نهایتاً منجر به تبدیل شدن سلول نرمال اپیتلیال کولون به سلول سرطانی می‌شود. CRC سومین سرطان شایع بعد از سرطان ریه و سینه می‌باشد و چهارمین عامل مرگ ناشی از سرطان است. این سرطان سومین سرطان شایع در مردان و رتبه دوم را در میان زنان جهان دارد (Jia and Guo, 2013). فرآیند تومورزایی کولورکتال ۸-۱۲ سال به طول می‌انجامد که با عنوان توالی پولیپ-کارسینوما

روش مطالعه

کشت و تیمار سلول‌ها: رده سلولی آدنوکارسینوما اپیتلیال روده بزرگ انسانی، Caco-2 از بانک سلولی مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران خریداری گردید. برای کشت رده سلولی Caco-2 از محیط زیستی (Gibco-UK) DMEM غنی شده با ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (FBS) (Gibco-UK) و ۱٪ مخلوط آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین و استرپتومایسین (Dacell-Iran) استفاده شد. سلول‌ها در انکوباتور با شرایط دمایی ۳۷ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۹۵ درصد و CO₂ ۵ درصد کشت داده شده‌اند (Hekmat and Saboury, 2019). سلول‌های چسبیده تک لایه با استفاده از محلول ۰/۲۵ درصد تریسین-EDTA (Gibco-UK) از کف فلاسک جدا گردید و به منظور انجام تست‌های مورد نظر شمارش و استفاده شد. به منظور شمارش سلولی، از رنگ آمیزی تریپان بلو استفاده گردید و با کمک لام نئوبار، شمارش انجام شد. محاسبه درصد سلول‌های زنده با استفاده از فرمول زیر انجام شد. $100 \times (\text{کل سلول شمارش شده} / \text{تعداد سلول زنده}) = \text{Viability } (\%)$

سپس شمارش و تعیین درصد سلول‌ها در هر میلی‌لیتر از رابطه زیر محاسبه شد.

$$\text{ضریب رقت} \times 10^4 \times \text{تعداد سلول شمارش شده در هر مربع لام نئوبار} = \text{تعداد سلول در هر میلی‌لیتر}$$

آماده سازی محلول سدیم بوتیرات: محلول استوک سدیم بوتیرات (Biobasic-کانادا) با غلظت ۱ مولار در آب مقطر تهیه گردید و در دمای اتاق نگهداری شد. سپس به منظور انجام تست رقت‌های مورد نیاز (۱۲.۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰ میلی‌مولار) در محیط کشت به صورت تازه قبل از هر تست آماده گردید.

تیمار رده سلولی Caco-2 با سدیم بوتیرات: با توجه به غلظت IC50 که توسط نویسنده مسؤل در پژوهش دیگری محاسبه شده بود (Forouzesht and Talebi, 2018)، رده سلولی Caco-2 در دو بازه زمانی ۲۴ ساعت، و ۴۸ ساعت تحت تیمار با طیفی از غلظت‌های مختلف سدیم بوتیرات قرار گرفتند (۲۵ میلی‌مولار، ۵۰ میلی‌مولار، ۱۰۰ میلی‌مولار و ۱۵۰ میلی‌مولار). از سلول‌های تیمار نشده به عنوان گروه کنترل استفاده شد.

استخراج RNA و سنتز cDNA: استخراج RNA از رده‌های سلولی تیمار شده با سدیم بوتیرات و تیمار نشده به عنوان گروه کنترل با استفاده از محلول RNX-plus (سیناکلون-ایران) طبق دستورالعمل آن انجام شد (Dejakam et al., 2020). برای استخراج از 2×10^6

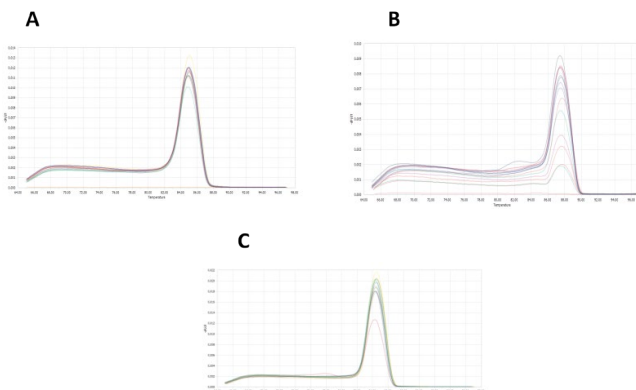
شناخته می‌شود که به ترتیب پنجمین و سومین سرطان رایجی است که مردان و زنان به آن مبتلا می‌گردند (Shadmani et al., 2017). مقاومت در برابر مهار رشد، نامیرایی، قابلیت بدست آوردن منبع خونی برای آنژیوژنز، متاستاز و فرار از آپوپتوز از جمله فنوتیپ‌های هستند که در ایجاد و توسعه سرطان دخالت دارند (Watson, 2004). سلول‌های توموری از مکانیسم‌های مولکولی متنوعی به منظور مهار آپوپتوز استفاده می‌کنند و قادرند مقاومت به آپوپتوز را از طریق بیان پروتئین‌های ضد آپوپتوزی مثل Bcl-2 یا از طریق کاهش بیان یا جهش پروتئین‌های پیش برنده آپوپتوز مثل Bax، کسب کنند. بیان Bcl-2 و Bax به وسیله ژن مهارکننده تومور p53 تنظیم می‌شود (Koff et al., 2015). تغییرات اپی‌ژنتیکی تغییراتی ارثی در بیان ژن هستند، اما این در حالی است که توالی DNA دست نخورده باقی می‌ماند که این از ویژگی‌های بارز سرطان‌ها، از جمله سرطان کولورکتال محسوب می‌گردد (Esteller, 2008). تغییر هیستون‌ها به فراوانی در سرطان کولورکتال یافت می‌شود که می‌تواند منجر به تغییر در بیان ژن‌ها به طور مستقیم یا از طریق متیلاسیون DNA گردد (Fraga et al., 2005). تغییرات اپی‌ژنتیکی به عنوان یکی از اهداف درمانی، مورد توجه محققین قرار گرفته است (Yan and Guo, 2015). دسترسی فاکتورهای رونویسی به DNA به واسطه ساختار فضایی کروماتین تعیین می‌گردد که به وسیله اپی‌ژنتیک قابل تغییر است. بدین صورت که فرم باز کروماتین تسهیل کننده اتصال فاکتورهای رونویسی و در نتیجه فعال سازی ژن‌ها است. در حالی که مهار آغاز رونویسی با فرم بسته و متراکم کروماتین همراه است که اتصال فاکتورهای رونویسی به پروموتور ژن را مختل می‌سازد (Sharma et al., 2010). به طور کلی، استیلایسیون و داستیلایسیون هیستون‌ها بیان ژن‌ها را کنترل می‌کنند (Xu et al., 2005). آنچه حائز اهمیت است این است که بیان هیستون داستیلازها در سرطان کولون افزایش یافته و از این رو مهار کننده‌های هیستون داستیلازها در القا توقف رشد و آپوپتوز در رده‌های سلولی مشتق از سرطان‌ها از جمله کولورکتال، ریه، تخمدان و رحم موثر واقع شده‌اند (Chueh et al., 2015). تغییر در بیان ژن توسط مهار کننده‌های هیستون داستیلاز بدون تغییر در توالی DNA صورت می‌پذیرد (West and Johnstone, 2014). یکی از این مهار کننده‌ها، سدیم بوتیرات است (Davie, 2003, Khan and Jena, 2014). از آنجایی که یکی از اهداف درمانی در سرطان القا آپوپتوز در سلول سرطانی است لذا مهار کننده‌های هیستون داستیلاز به عنوان یک ماده موثر در شیمی درمانی محسوب می‌گردند. از این رو، هدف از مطالعه حاضر مکانیسم اثر ضد تکثیر سدیم بوتیرات بر روی رده سلولی Caco-2 سرطان کولورکتال انسانی با تکیه بر اثر آن بر روی ژن‌های مسیر داخلی آپوپتوزی (Bcl-2 و Bax) مورد بررسی قرار گرفته است.

16 انجام پذیرفت و سطح معنی‌دار آماری $p < 0.05$ در نظر گرفته شد. همه آزمایش‌ها به صورت دوتایی و دوبار به صورت مستقل انجام گردید.

نتایج

بررسی کمی بیان رونوشت ژن‌ها توسط qRT-PCR: غلظت IC50 سدیم بوتیرات که برای دو بازه زمانی تیمار ۲۴ ساعت و ۴۸ ساعت در پژوهش دیگری از نویسنده مسئول، توسط روش XTT مورد ارزیابی قرار گرفته بود، به ترتیب غلظت‌های ۱۰۵ میلی مولار و ۱۰۰ میلی مولار گزارش گردید (Forouzeshand Talebi, 2018)، بر این اساس سلول‌های Caco-2 در دو بازه زمانی ۲۴ ساعت و ۴۸ ساعت تحت تیمار با دو غلظت کمتر از غلظت IC50 (۲۵ میلی مولار و ۵۰ میلی مولار) و یک غلظت بیشتر از IC50 (۱۵۰ میلی مولار) و همچنین تحت تیمار با غلظت IC50 (۱۰۰ میلی مولار) قرار گرفتند. از سلول‌های تیمار نشده (۰ میلی مولار) به عنوان گروه کنترل استفاده گردید.

پس از انجام تست qRT-PCR، به منظور اطمینان از تولید قطعات اختصاصی، فقدان پیک‌های غیراختصاصی و عدم وجود ساختارهای ثانویه پرایمر در محصولات Real-time PCR، منحنی ذوب بررسی گردید (نمودار ۱). نتایج حاصل از منحنی ذوب نشان می‌دهد که پرایمرها به صورت اختصاصی عمل کرده‌اند.



نمودار ۱- منحنی ذوب محصول Real-time PCR برای سلول‌های تیمار شده و سلول‌های تیمار نشده Caco-2. A: ژن Bax، B: ژن Bcl-2 و C: ژن خانه‌داری GAPDH

منحنی تکثیر رونوشت ژن‌های Bax، Bcl-2 و GAPDH در نمودار ۲ آورده شده است، که بیانگر تکثیر مناسب ژن‌های مورد نظر است. پس از استخراج داده‌ها و منحنی تکثیر مربوط به ژن‌های هدف و ژن خانه‌داری با استفاده از برنامه Corbett و آنالیز داده‌های حاصل از واکنش Real-time PCR با استفاده از نرم افزار REST انجام گردید.

سلول استفاده گردید. سپس کمی و کیفیت RNA استخراج شده به ترتیب توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر و الکتروفورز روی ژل ۱ درصد مورد بررسی قرار گرفت. غلظت ۲۰۰۰ نانو گرم از RNA به منظور سنتز cDNA، توسط کیت سنتز cDNA (یکتا تجهیز- ایران) استفاده شد. ترکیبات مورد نیاز جهت سنتز cDNA شامل ۴ μ l بافر ۵X، ۱ μ l از dNTPs با غلظت ۱۰ mM، ۰.۵ μ l از RNasin (40U/ μ L) و ۱ μ l آنزیم رونویسی معکوس (M-MLV) می‌باشد. ترکیبات مورد نظر با حجم نهایی ۲۰ μ l، به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و سپس ۵ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی گراد قرار داده شد.

بررسی کمی بیان رونوشت ژن‌های Bax و Bcl2 توسط

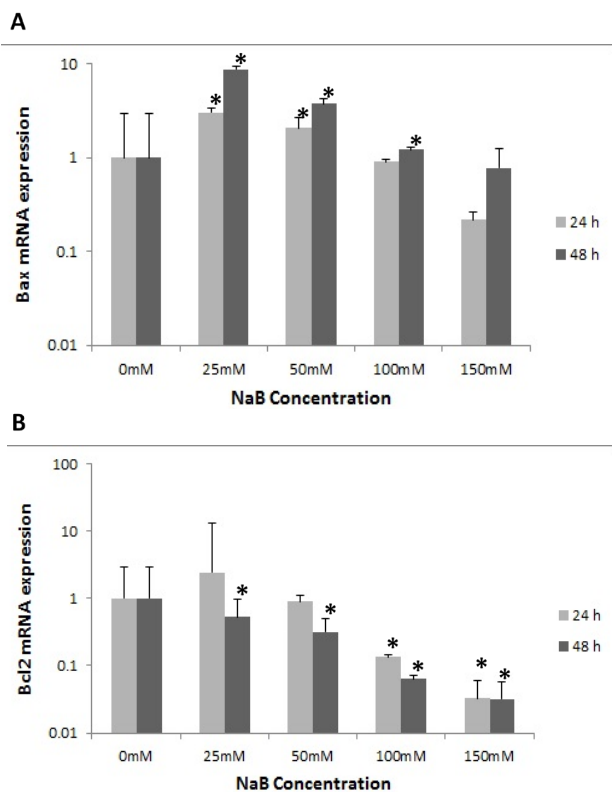
Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR): بررسی کمی بیان رونوشت ژن‌های Bax و Bcl2 توسط روش quantitative Real-time PCR، با سایبرگرین در دستگاه Corbett انجام گردید. از ژن (Housekeeping) GAPDH به عنوان کنترل داخلی استفاده گردید. اجزای واکنش شامل ۱۰ ماکرولیتر از مستر میکس (2X (1X) Real-time PCR master mix green, no ROX (Ampliqon-Denmark)، ۰/۵ ماکرولیتر از پرایمر فرادست (۱۰ pmol)، ۰/۵ ماکرولیتر از پرایمر فرودست (۱۰ pmol) (جدول ۱) و ۸ ماکرولیتر از آب دیونیزه بود، به طوریکه حجم نهایی ۲۰ ماکرولیتر تعیین گشت. برنامه زمانی و دمایی جهت تکثیر تمامی این ژن‌ها بدین ترتیب بود: نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد قرار گرفتند. سپس در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ ثانیه، سپس در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت ۶۰ ثانیه قرار داده شدند. مرحله دناتوراسیون، اتصال پرایمر و طولی سازی ۴۰ سیکل تکرار شد. لازم به ذکر است که همه واکنش‌ها به صورت دوتایی انجام گردید.

جدول ۱- ویژگی‌های پرایمرهای طراحی شده

کد	توالی پرایمر فرودست (۳-۵)	توالی پرایمر فرادست (۳-۵)	
NM_001289745.2	GAAGATGGTGATGGGATTTC	GAAGGTGAAGGTCGGAGTC	GAPDH
<u>NM_138764.5</u>	CAGTTGAAGTTGCCGTCAGA	AACATGGAGCTGCAGAGGAT	Bax
NM_000633.2	TCTTCAGAGACAGCCAGGAGA	ATGTGTGTGGAGAGCGTCAA	Bcl2

روش آماری: پردازش داده‌های Real-Time PCR توسط نرم افزار LinReg و REST انجام شد و به روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ محاسبه گردید. آنالیز آماری اطلاعات، با روش آنالیز واریانس یکطرفه توسط نرم افزار SPSS

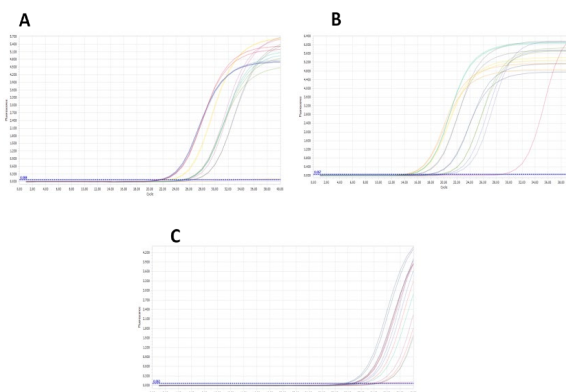
زمانی ۴۸ ساعت نیز کاهش معنی‌دار ($p < 0.05$) بیان این ژن را نشان داد. نتایج حاکی از آن است که تغییر بیان این ژن به صورت وابسته به دوز و زمان، کاهش معنی‌داری را نشان می‌دهد.



نمودار ۳- نتایج حاصل از بررسی کمی تغییرات بیان رونوشت ژن‌های Bax و Bcl-2 توسط qRT-PCR. رده سلولی Caco-2 با غلظت‌های ۲۵ میلی‌مولار، ۵۰ میلی‌مولار، ۱۰۰ میلی‌مولار و ۱۵۰ میلی‌مولار سدیم بوتیرات به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت تیمار شد و تغییرات بیان رونوشت ژن‌های Bax و Bcl2 بررسی گردید. A: تغییرات بیان رونوشت ژن Bax پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت تیمار با سدیم بوتیرات، B: تغییرات بیان رونوشت ژن Bcl-2 پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت تیمار با سدیم بوتیرات، غلظت (۰ میلی‌مولار) نشان دهنده گروه کنترل است و شامل سلول‌هایی است که تحت تیمار با دارو قرار نگرفته‌اند. (*) نشان‌دهنده تغییر معنی‌دار ($p < 0.05$) است.

مقایسه نتایج تغییرات بیان دو ژن Bax و Bcl-2 در دو بازه زمانی ۲۴ ساعت و ۴۸ ساعت تیمار با غلظت‌های متفاوت سدیم بوتیرات (نمودار ۳ A و B)، نشان می‌دهد که از مقایسه تمامی غلظت‌ها با یکدیگر، در پایین‌ترین غلظت (۲۵ میلی‌مولار)، در بازه زمانی ۴۸ ساعت افزایش بیان ژن Bax و کاهش بیان ژن Bcl-2 در مقایسه با گروه کنترل مشاهده می‌شود که از نظر آماری معنی‌دار می‌باشد. در غلظت IC50 (۱۰۰ میلی‌مولار)، سلول‌های تیمار شده در مقایسه با گروه کنترل، در هر دو بازه زمانی تیمار افزایش رونوشت ژن Bax و کاهش رونوشت ژن Bcl-2 را نشان می‌دهند.

میزان بیان رونوشت ژن‌های Bax و Bcl2 به دنبال تیمار سلول‌ها با غلظت‌های ۲۵ میلی‌مولار الی ۱۵۰ میلی‌مولار سدیم بوتیرات در دو بازه زمانی ۲۴ ساعت و ۴۸ ساعت در مقایسه با تغییرات بیان این ژن‌ها در سلول‌های تیمار نشده به عنوان گروه کنترل در شکل ۳ نشان داده شده است. همانطور که مشاهده می‌شود ژن Bax که یک ژن پروآپتوتیک هست در سلول‌های تحت تیمار با غلظت ۲۵ میلی‌مولار و ۵۰ میلی‌مولار سدیم بوتیرات در دو بازه زمانی تیمار ۲۴ ساعت و ۴۸ ساعت نسبت به گروه کنترل افزایش بیان دارد که از نظر آماری معنی‌دار می‌باشد ($p < 0.05$) (نمودار ۳A). همچنین سلول‌هایی که تحت تیمار با غلظت ۱۰۰ میلی‌مولار قرار داشتند، نسبت به گروه کنترل در بازه زمانی ۲۴ ساعت تیمار، افزایش بیان را نشان دادند ولی از نظر آماری معنی‌دار نبود ($p > 0.05$) ولی در بازه زمانی ۴۸ ساعت تیمار، افزایش بیان معنی‌دار ($p < 0.05$) را نشان دادند. نتایج حاکی از آن است که تغییر بیان این ژن به صورت وابسته به دوز و زمان، افزایش معنی‌داری را نشان می‌دهد.



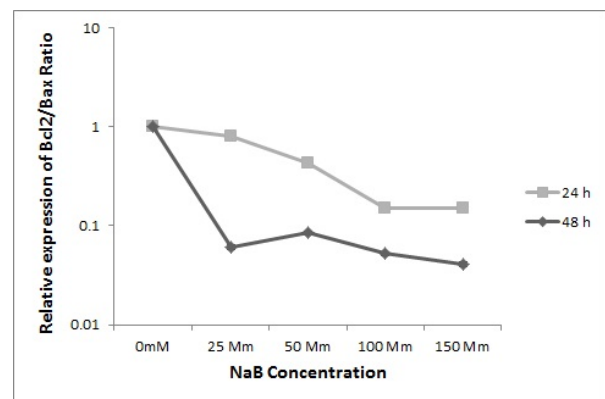
نمودار ۲- منحنی تکثیر حاصل از Real-time PCR برای سلول‌های تیمار شده و سلول‌های تیمار نشده Caco-2. A: رونوشت ژن Bax پس از تیمار با طیفی از غلظت‌های سدیم بوتیرات، B: رونوشت ژن Bcl2 پس از تیمار با طیفی از غلظت‌های سدیم بوتیرات، C: رونوشت ژن ژن خانه‌داری GAPDH پس از تیمار با طیفی از غلظت‌های سدیم بوتیرات.

در نمودار ۳B تغییرات بیان رونوشت ژن Bcl-2 نشان داده شده است. همانطور که مشاهده می‌شود ژن Bcl-2 که یک ژن آنتی آپتوتیک هست در سلول‌های تحت تیمار با غلظت‌های ۱۰۰ میلی‌مولار و ۱۵۰ میلی‌مولار سدیم بوتیرات در دو بازه زمانی تیمار ۲۴ ساعت و ۴۸ ساعت نسبت به گروه کنترل کاهش بیان دارد که از نظر آماری معنی‌دار می‌باشد ($p < 0.05$). همچنین در غلظت ۵۰ میلی‌مولار کاهش بیان مشاهده شد که به ترتیب در بازه زمانی ۲۴ ساعت، بی معنی ($p > 0.05$) ولی در بازه زمانی ۴۸ ساعت، معنی‌دار بود ($p < 0.05$). سلول‌های تیمار شده با غلظت ۲۵ میلی‌مولار سدیم بوتیرات در بازه

از آنجایی که نسبت بیان این دو ژن یعنی نسبت بیان رونوشت Bcl-2/Bax در سلول تعیین کننده سرنوشت سلول در پاسخ به دارو است، لذا در این تحقیق این نسبت مورد بررسی قرار گرفت که نتایج در نمودار ۴ آورده شده است. همانطور که نتایج نشان می‌دهد نسبت بیان رونوشت Bcl-2/Bax به صورت وابسته به دوز در هر دو بازه زمانی ۲۴ ساعت و ۴۸ ساعت تیمار در غلظت IC50 (۱۰۰ میلی‌مولار)، کاهش بیان را در مقایسه با گروه کنترل نشان می‌دهد. ولی در کمترین غلظت یعنی ۲۵ میلی‌مولار، بیشترین کاهش را در بازه زمانی ۴۸ ساعت تیمار نسبت به گروه کنترل نشان می‌دهد.

Mariadason,) (HDAC I) در تومورهای کولون گزارش شده است (2008) که در تحریک تکثیر و بقا سلول‌های کولون نقش مهمی ایفا می‌کند (Wilson et al., 2006). در مطالعاتی نشان داده شد که مهار HDAC های کلاس I شامل HDAC 1، ۲ و ۳ رشد سلولی را در سه رده سلولی سرطان کولورکتال، HCT116 (Wilson et al., 2006)، SW480 (Spurling et al., 2008) و HT29 (Zhu et al., 2004) کاهش می‌دهد. بوتیرات به عنوان یک اسید چرب زنجیره کوتاه قادر به مهار HDAC است (Stünkel et al., 2007). در سال ۲۰۲۰، W Wang و همکاران اثر سدیم بوتیرات را بر روی دو رده سلولی SW480 و HT-29 سرطان کولورکتال مورد ارزیابی قرار دادند و مشاهده کردند سدیم بوتیرات با کاهش بیان پروتئین تیوردوکسین ۱ (Trx-1) باعث مهار رشد سلولی، القا آپتوز، مهار تشکیل کلونی و مهاجرت سلولی و افزایش سطح ROS در سلول‌های سرطانی می‌شود (Wang et al., 2020). در سال ۲۰۱۷، V Salimi و همکاران، رده‌های سلولی MCF-7 و MDA-MB-467 سرطان سینه را تحت تیمار با سدیم بوتیرات با غلظت‌های ۰/۱ الی ۲۰ میلی‌مولار قرار دادند و نتایج آنها نشان داد که سدیم بوتیرات باعث توقف چرخه سلولی و القا آپتوز از طریق افزایش فعالیت کاسپاز، افزایش سطح ROS و کاهش پتانسیل غشا میتوکندری در سلول‌های سرطانی می‌شود (Salimi et al., 2017). در سال ۲۰۰۶، H Chirakkal و همکاران سه رده سلولی Caco-2، HT-29 و HCT-116 را با غلظت‌های ۵/۱۰-۱۰۰ میلی‌مولار بوتیرات تیمار کردند تا مکانیسم القا آپتوز توسط سدیم بوتیرات را مورد بررسی قرار دهند. آنها تغییرات بیان ژن‌های Bak، Bclx و Bax را مورد بررسی قرار دادند. نتایج آنها نشان داد بیان Bak در سطح رونویسی در سلول‌های تیمار شده افزایش یافت در حالیکه مشاهده شد بیان Bax بدون تغییر ماند. کاهش بیان Bclx نیز از دیگر تغییرات مشاهده شده پیرو تیمار با بوتیرات بود (Chirakkal et al., 2006). در سال ۲۰۰۳، Ruemmels و همکاران به بررسی تاثیر بوتیرات بروی رده سلولی Caco-2 با تکیه بر تاثیر آن بر روی پروتئین‌های خانواده Bcl-x(L)، مسیر میتوکندریایی و آبخار پیام رسان کاسپاز پرداختند. سلول‌ها با بوتیرات در غلظت‌های ۰/۱ الی ۱۰۰ میلی‌مولار به مدت ۴۸ ساعت تیمار شدند. افزایش بیان پروتئین پیش برنده آپتوز Bak به همراه کاهش بیان پروتئین ضد آپتوز Bcl-xL به دنبال تیمار با بوتیرات مشاهده شد، به دنبال آن انتقال سیتوکروم C از میتوکندری به سیتوزول و فعال‌سازی کاسپاز ۹ دیده شد که حاکی از فعال‌سازی مسیر داخلی آپتوز به دنبال تیمار این رده سلولی با بوتیرات بود (Ruemmele et al., 2003). در تحقیق حاضر نیز دو ژن دیگر درگیر در مسیر داخلی آپتوز، Bax و Bcl-2 در رده سلولی Caco-2 که تحت تیمار با دوزهای مختلف سدیم بوتیرات (۲۵ میلی‌مولار، ۵۰ میلی‌مولار، ۱۰۰ میلی‌مولار و ۱۵۰ میلی‌مولار) در دو بازه زمانی ۲۴ ساعت و ۴۸ ساعت بودند براساس

نمودار ۴- نسبت بیان رونوشت Bcl-2/Bax در رده سلولی Caco-2 تحت تیمار با غلظت‌های ۲۵ میلی‌مولار، ۵۰ میلی‌مولار، ۱۰۰ میلی‌مولار و ۱۵۰ میلی‌مولار سدیم بوتیرات به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت در مقایسه با گروه کنترل (غلظت ۰ میلی‌مولار). نسبت بیان رونوشت Bcl2/Bax به صورت وابسته به دوز در هر دو بازه زمانی ۲۴ ساعت و ۴۸ ساعت تیمار، در غلظت IC50 (۱۰۰ میلی‌مولار) به طور همزمان، کاهش بیان یافته است.

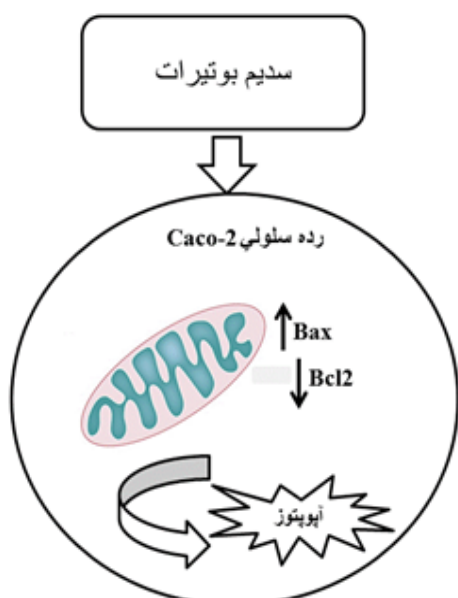


نمودار ۴- نسبت بیان رونوشت Bcl-2/Bax در رده سلولی Caco-2 تحت تیمار با غلظت‌های ۲۵ میلی‌مولار، ۵۰ میلی‌مولار، ۱۰۰ میلی‌مولار و ۱۵۰ میلی‌مولار سدیم بوتیرات به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت در مقایسه با گروه کنترل (غلظت ۰ میلی‌مولار). نسبت بیان رونوشت Bcl2/Bax به صورت وابسته به دوز در هر دو بازه زمانی ۲۴ ساعت و ۴۸ ساعت تیمار، در غلظت IC50 (۱۰۰ میلی‌مولار) به طور همزمان، کاهش بیان یافته است.

بحث

از آنجایی که فرار از مرگ برنامه ریزی شده در سرطان از طریق کاهش بیان در ژن‌های پیش برنده آپتوز و افزایش بیان در ژن‌های ضد آپتوز صورت می‌گیرد (Huerta et al., 2006, Qian et al., 2017)، این انتظار می‌رود که در داروهایی که برای درمان سرطان انتخاب می‌شوند این هدف مد نظر باشد که چه تاثیری بر روی تغییرات بیان ژن‌های درگیر در مسیر آپتوز می‌گذارند. در این تحقیق تغییرات بیان ژن‌های Bcl2 و Bax در رده سلولی Caco-2 که تحت تیمار با دوزهای مختلف سدیم بوتیرات به عنوان ماده مهار کننده هیستون داستیلاز (HDAC) است بررسی شد. همچنین نسبت بیان Bcl2/Bax در این سلول‌ها نسبت به سلول‌هایی که تحت تیمار نبودند محاسبه گردید. سال هاست که نقش مهار کننده‌های HDAC در القا آپتوز، تمایز و توقف رشد مورد توجه بوده است (Kim et al., 1980, Gum et al., 1987). در مطالعات متعددی افزایش بیان HDAC کلاس I

غلظت IC50 مورد بررسی قرار گرفت. غلظت IC50 یا غلظتی که سبب مهار رشد ۵۰ درصد سلول‌های Caco-2 در اثر تیمار با سدیم بوتیرات دو بازه زمانی ۲۴ ساعت و ۴۸ ساعت تیماری گردد، غلظت حدود ۱۰۰ میلی‌مولار تعیین گشته بود (Forouzeshand Talebi, 2018). بر اساس این غلظت، جهت بررسی اثر سدیم بوتیرات بر روی تغییرات بیان ژن‌های Bax و Bcl2، سلول‌ها علاوه بر این غلظت با دو غلظت کمتر و یک غلظت بیشتر از آن طی دو بازه زمانی ۲۴ و ۴۸ ساعت تیمار گشتند. نتایج نشان داد در غلظت IC50 افزایش بیان ژن Bax و کاهش ژن Bcl-2 در هر دو بازه زمانی ۲۴ ساعت و ۴۸ ساعت تیمار در مقایسه با گروه کنترل مشاهده شد که از نظر آماری معنی‌دار می‌باشد. در غلظت کمتر از غلظت IC50 یعنی در غلظت ۵۰ میلی‌مولار نیز افزایش بیان Bax و کاهش بیان رونوشت ژن Bcl-2 در دو بازه زمانی ۲۴ ساعت و ۴۸ ساعت تیمار مشاهده گردید ولی در غلظت ۲۵ میلی‌مولار تغییرات بیان این ژن‌ها به طور معنی‌دار در بازه زمانی ۴۸ ساعت بود. نتایج حاصل نشان می‌دهد که سدیم بوتیرات بر روی این ژن‌ها تاثیر گذاشته است و مانع تکثیر سلول‌های سرطانی Caco-2 گشته است. اگر چه در سلول‌های تحت تیمار با غلظت IC50 (۱۰۰ میلی‌مولار) در هر دو بازه زمانی ۲۴ ساعت و ۴۸ ساعت به ترتیب افزایش و کاهش در بیان ژن‌های Bax و Bcl-2 مشاهده گردید ولی هر چه دوز دارو پایین‌تر باشد و اثر مورد نظر را داشته باشد انتخاب آن دوز در الویت می‌باشد. نتایج ما نیز موافق با نتایج محققین دیگر نشان می‌دهد که سدیم بوتیرات باعث افزایش بیان ژن‌های پرو آپتوتیک و کاهش بیان ژن آنتی آپتوتیک می‌شود و این ماده می‌تواند مسیر داخلی آپتوز را تحت تاثیر قرار دهد. از آنجایی که آپتوز هم از طریق مسیر داخلی و مسیر خارجی در سلول باعث مرگ سلولی می‌گردد، در سال ۲۰۰۲، اثر سدیم بوتیرات و مکانیسم آن بر روی رشد رده سلولی MCF-7 سرطان سینه مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاکی از آن بود که در رده سلولی MCF-7 تیمار شده، آپتوز به واسطه Fas یعنی مسیر خارجی آپتوز القا گردیده است. نتایج آنها نشان داد مکانیسم اثر این دارو در سرطان‌های مختلف متفاوت است (Chopin *et al.*, 2002). همچنین در مطالعه دیگری نشان داده شد که سدیم بوتیرات در رده سلولی HCT-116 با اثر بر بیان ژن‌های درگیر در مسیر خارجی آپتوز، رشد سلولی را متوقف می‌کند (Mashayekhi *et al.*, 2021). این ماده در رده سلولی HT-29 سرطان کولورکتال باعث القا آپتوز با افزایش بیان ژن Bid می‌گردد (Amiri *et al.*, 2020)، و همچنین با کاهش بیان فاکتور رونویسی LHX1 که رونویسی HDAC8 را کنترل می‌کند سبب مرگ سلولی می‌شود (Forouzes *et al.*, 2020).



شکل ۱- شکل پیشنهادی اثر سدیم بوتیرات بر القای آپتوز در رده سلولی Caco-2 با تکیه بر تغییر بیان ژن‌های Bax و Bcl-2. در سلول‌های Caco-2 که تحت تیمار با سدیم بوتیرات قرار گرفته بودند، افزایش معنی‌دار بیان رونوشت ژن Bax و کاهش معنی‌دار بیان رونوشت ژن Bcl-2 در مقایسه با گروه کنترل (سلول‌های تیمار نشده) مشاهده شد.

تبادل بین بیان ژن‌های درگیر در مسیرهای آپتوزی بسیار حائز اهمیت می‌باشد. به طوریکه، نسبت بیان Bax و Bcl2 به عنوان یک مارکر تشخیصی برای موفقیت در شیمی درمانی، در سرطان‌ها به طور

نتیجه گیری

ایجاد آپتوز در سلول‌های سرطانی، منجر به توقف رشد و تکثیر این سلول‌ها می‌گردد و می‌تواند در مسیر درمان مورد توجه باشد ولی نیاز به مطالعات بیشتر در این زمینه می‌باشد.

تقدیر و تشکر

از کلیه افرادی که در این تحقیق ما را یاری نمودند کمال تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

مراجع

- Amiri, N., Forouzes, F., Nazemalhosseini-Mojarad, E., Shabani, M. 2020. The effect of sodium butyrate as a histone deacetylase inhibitor on the gene expression of Bid in HT-29 human colorectal cancer cell line. *Medical Science Journal of Islamic Azad University, Tehran Medical Branch*, 30(1): 40-50.
- Arvelo, F., Sojo, F. & Cotte, C. 2015. Biology of colorectal cancer. *Ecancermedicalscience*: 9.
- Chirakkal, H., Leech, S., Brooks, K., Prais, A., Waby, J. & Corfe, B. 2006. Upregulation of BAK by butyrate in the colon is associated with increased Sp3 binding. *Oncogene*, 25: 7192-7200.
- Chopin, V., Toillon, R. A., Jouy, N. & Bourhis, X. L. 2002. Sodium butyrate induces P53-independent, Fas-mediated apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells. *British journal of pharmacology*, 135: 79-86.
- Chueh, A. C., Tse, J. W., Togel, L. & Mariadason, J. M. 2015. Mechanisms of histone deacetylase inhibitor-regulated gene expression in cancer cells. *Antioxidants & redox signaling*, 23: 66-84.
- Davie, J. R. 2003. Inhibition of histone deacetylase activity by butyrate. *The Journal of nutrition*, 133: 2485S-2493S.
- Dejakam, A., Dejakam, A. and Hekmat, A. 2020. Evaluating of bdnf expression in blood cells of opium recovering patients with a new treatment method: A molecular marker. *Research in Karyotic Cell & Tissue*, 1(1): 16-25.
- Del Poeta, G. Venditti, A. Del Principe, M.I., et al. 2003. Amount of spontaneous apoptosis detected by Bax/Bcl-2 ratio predicts outcome in acute myeloid leukemia (AML). *Blood*, 101:2125-2131.
- Esteller, M. 2008. Epigenetics in cancer. *New England Journal of Medicine*, 358: 1148-1159.
- Farkas, R. Pozsgai, E., Bellyei, S.Z., Cseke, L., Szigeti, A., Vereczkei, A., Marton, S., Mange, L., Horvath, O.P., Papp, A. 2011. Correlation between tumor-associated proteins and response to neoadjuvant treatment in patients with advanced squamous-cell esophageal cancer. *Anticancer research*. 31(5):1769-75.
- Forouzes, F., Talebi, S., Shahbazi, N. 2018. Anticancer effects of sodium butyrate on human colon cancer Caco2 cell line. *Journal of Fasa University of Medical Sciences*, 8: 735-745.
- Forouzes, F., Ghiaghi, M., & Rahimi, H. 2020. Effect of sodium butyrate on HDAC8 mRNA expression in colorectal cancer cell lines and molecular docking study of LHX1 - sodium butyrate interaction. *EXCLI Journal*, 19: 1038-1051.
- Fraga, M. F., Ballestar, E., Villar-Garea, A., Boix-Chornet, M., Espada, J., Schotta, G., Bonaldi, T., Onaldi, T., Haydon, C., Roperio, S. & Petrie, K. 2005. Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer. *Nature genetics*, 37: 391-400.

- Gum, J., Kam W., Byrd, J., Hicks, J., Sleisenger, M. & Kim, Y. 1987. Effects of sodium butyrate on human colonic adenocarcinoma cells. Induction of placental-like alkaline phosphatase. *Journal of Biological Chemistry*, 262: 1092-1097.
- Hekmat, A. and Saboury, A.A. 2019. Structural effects of the synthetic cobalt-manganese-zinc ferrite nanoparticles ($\text{Co}_{0.3}\text{Mn}_{0.2}\text{Zn}_{0.5}\text{Fe}_2\text{O}_4\text{NPs}$) on DNA and its antiproliferative effect on t47d cells. *BioNanoScience*, 9(4): 821-832.
- Huerta, S., Goulet, E. J. & Livingston, E. H. 2006. Colon cancer and apoptosis. *The American Journal of Surgery*, 191: 517-526.
- Jia, Y. & Guo, M. 2013. Epigenetic changes in colorectal cancer. *Chinese journal of cancer*, 32: 21.
- Khan, S. & Jena, G. 2014. Protective role of sodium butyrate, a HDAC inhibitor on beta-cell proliferation, function and glucose homeostasis through modulation of p38/ERK MAPK and apoptotic pathways: study in juvenile diabetic rat. *Chemico-biological interactions*, 213: 1-12.
- Khaw, S.L., Mérimo, D., Anderson, M.A., Glaser, S.P., Bouillet, P., Roberts, A.W. & Huang, D.C.S. 2014. Both leukaemic and normal peripheral B lymphoid cells are highly sensitive to the selective Pharmacological inhibition of pro-survival Bcl-2 with ABT-199. *Leukemia*, 28: 1207-1215.
- Kilm, Y. S., Tsao, D., Siddiqui, B., Whitehead, J. S., Arnstein, P., Bennett, J. & Hicks, J. 1980. Effects of sodium butyrate and dimethylsulfoxide on biochemical properties of human colon cancer cells. *Cancer*, 45: 1185-1192.
- Koff, J. L., Ramachandiran, S. & Bernal-Mizrachi, L. 2015. A time to kill: targeting apoptosis in cancer. *International journal of molecular sciences*, 16: 2942-2955.
- Kulsoom, B., Shamsi, T.S., Afsar, N.A., Memon, Z., Ahmed, N., Hasnain, S.N. 2018. Bax, Bcl-2, and Bax/Bcl-2 as prognostic markers in acute myeloid leukemia: are we ready for Bcl-2-directed therapy? *Cancer Management and Research*, 10: 403-416.
- Mariadason, J. M. 2008. HDACs and HDAC inhibitors in colon cancer. *Epigenetics*, 3: 28-37.
- Qian, H.-R., Shi, Z.Q., Zhu, H.P., Gu, L.H., Wang, X.F. & Yang, Y. 2017. Interplay between apoptosis and autophagy in colorectal cancer. *Oncotarget*, 8: 62759.
- Mashayekhi, A., Forouzes, F., and Mashayekhi, M. 2021. Promotion of Extrinsic Apoptosis Pathway in HCT-116 Human Colorectal Cancer Cell Line by Sodium Butyrate as Histone Deacetylase Inhibitor. *Iran Red Crescent Medical Journal*. 23(1):e190.
- Ruemmele, F., Schwartz, S., Seidman, E., Dionne, S., Levy, E. & Lentze, M. 2003. Butyrate induced Caco-2 cell apoptosis is mediated via the mitochondrial pathway. *Gut*, 52: 94-100.
- Salimi, V., Shahsavari, Z., Safizadeh, B., Hosseini, A., Khademian, N., and Tavakoli-Yaraki, M. 2017. Sodium butyrate promotes apoptosis in breast cancer cells through reactive oxygen species (ROS) formation and mitochondrial impairment. *Lipids Health Dis*, 16: 208.
- Shadmani, F. K., Ayubi, E., Khazaei, S., Sani, M., Hanis, S. M., Khazaei, S., Soheylizad, M., & Mansori, K. 2017. Geographic distribution of the incidence of colorectal cancer in Iran: a population-based study. *Epidemiology and health*, 39: e2017020.
- Sharma, S., Kelly, T. K., & Jones, P. A. 2010. Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis*, 31: 27-36.
- Spurling, C. C., Godman, C. A., Noonan, E. J., Rasmussen, T. P., Rosenberg, D. W., & Giardina, C. 2008. HDAC3 overexpression and colon cancer cell proliferation and differentiation. *Molecular Carcinogenesis: Published in cooperation with the University of Texas MD Anderson Cancer Center*, 47: 137-147.
- Stunkel, W., Peh, B. K., Tan, Y. C., Nayagam, V. M., Wang, X., Salto-Tellez, M., Ni, B., Entzeroth, M., & Wood, J. 2007. Function of the SIRT1 protein deacetylase in cancer. *Biotechnology Journal: Healthcare Nutrition Technology*, 2: 1360-1368.
- Wang, W., Fang, D., Zhang, H., Xue, J., Wangchuk, D., Du, J., Jiang, L. 2020. Sodium Butyrate Selectively Kills Cancer Cells and Inhibits Migration in Colorectal Cancer by Targeting Thioredoxin-1. *OncoTargets and Therapy* 13: 4691-4704.
- Watson, A. 2004. Apoptosis and colorectal cancer. *Gut*, 53: 1701-1709.
- West, A. C. & Johnstone, R. W. 2014. New and emerging HDAC inhibitors for cancer

- treatment. The Journal of clinical investigation, 124:30-39.
- Wilson, A. J., Byun, D.S., Popova, N., Murray, L. B., Litalien, K., Sowa, Y., Aramgo, D., Velcich, A., Augenlicht, L. H., & Mariadason, J. M. 2006. Histone deacetylase 3 (HDAC3) and other class I HDACs regulate colon cell maturation and p21 expression and are deregulated in human colon cancer. Journal of Biological Chemistry, 281: 13548-1355. ^
- Xu, F., Zhang, K., & Grunstein, M. 2005. Acetylation in histone H3 globular domain regulates gene expression in yeast. Cell, 121: 375-385.
- Yan, W., & Guo, M. 2015. Epigenetics of colorectal cancer. Methods in Molecular Biology, 1238:405-24
- Zhu, P., Martin, E., Mengwasser, J., Schlag, P., Janssen, K.P. & Gottlicher, M. 2004. Induction of HDAC2 expression upon loss of APC in colorectal tumorigenesis. Cancer cell, 5: 455-463.

Anti-proliferative effect of sodium butyrate against Caco-2 cell line of human colorectal cancer by reducing the expression ratio of Bcl-2 to Bax mRNA

Flora Forouzesh^{1,*}, Pantea Hajimirza Shafiesoltani², Mahsa Ghiaghi², and Mahdi Shabani³

¹ PhD. Department of Genetics, Faculty of Advanced Science and Technology, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

² MSC. Department of Genetics, Faculty of Advanced Science and Technology, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

³ PhD. Department of Immunology, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

*Correspondence to Flora Forouzesh, Ph.D., forouzesh@iautmu.ac.ir, f8forouzesh@gmail.com

Received 2nd August 2020 Revised 10th November 2020 Accepted 18th February 2021

Abstract

Introduction and Aim: Colorectal cancer is one of the most common cancers. Epigenetic change has been considered by many scientists as a therapeutic target. Hyper acetylation of chromatin components by sodium butyrate can alter gene regulation. This study aims to investigate the effects of sodium butyrate on Bax and Bcl-2 gene expression.

Methods: Caco-2 cell line was treated with different concentrations of sodium butyrate (25 mM to 150 mM) based on IC₅₀ concentration in two time periods of 24 hours and 48 hours. Bax and Bcl-2 gene expression were measured by qReal-Time PCR technique and Bcl2/Bax ratio was evaluated.

Results: The results showed that sodium butyrate increased the expression of Bax gene and decreased the expression of Bcl-2 gene in treated cells compared to the control group, which was statistically significant ($p < 0.05$), and 25 mM was selected as the most effective dose after 48 hours of treatment. Also, the Bcl-2/Bax ratio at the same concentration showed a significant decrease

Conclusion: Sodium butyrate induces apoptosis in cancer cells by reducing the expression ratio of Bcl-2/Bax. It can be used as a therapeutic target but needs further investigation.

Keywords: Colorectal cancer, Sodium butyrate, Caco-2 cell line, Bax, Bcl2