Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 9:53 +0330 on Sunday October 21st 2018

مقاله پژوهشی

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

محمدرضا سام*[۱]، رضا عبدی ینکجه[۲]

تاریخ دریافت ۱۳۹٤/۱۱/۲۸ تاریخ پذیرش ۱۳۹۵/۰۱/۲۹

چکیده

پیش‌زمینه و هدف: هپاتوسلولار 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 سراشیا مارسسنس 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 موردبررسی 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 موردبررسی قرار گرفت. همچنین پس از ۴۸ ساعت تیمار با غلظت‌های ذکرشده پرودیجیوسین، شمارش سلولی و میزان آپوپتوز به ترتیب با استفاده از هموسایتومتر و آزمون فلوسایتومتری تعیین گردید.

یافته‌ها: بر مبنای نتایج حاصل از آزمون MTT، در غلظت‌های افزایش‌یابنده 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، ۴۰۰،۲۰۰ و ۶۰۰ نانو مول پرودیجیوسین، میزان رشد سلول‌ها در مقایسه با سلول‌های کنترل تیمار نشده به ترتیب ۲ ± ۴۴درصد، ۴ ± ۳۳درصد، ۳± ۲۷درصد و ۵ ± ۲۷درصد اندازه‌گیری شد. همچنین به‌طور وابسته به غلظت، تعداد سلول‌ها با افزایش غلظت پرودیجیوسین کاهش می‌یابد. به‌ویژه پس از ۴۸ ساعت تیمار با ۶۰۰ نانو مول پرودبجیوسین، تعداد سلول‌ها در مقایسه با سلول‌های کنترل تیمار نشده به میزان ۷۷درصد کاهش می‌یابد. همچنین، میزان آپوپتوز تأخیری در رنج غلظتی استفاده‌شده از پرودیجیوسین به میزان ۹۷.۴-۳۷درصد 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: هپاتوسلولار کارسینوما، پرودیجیوسین، سراشیا مارسسنس، 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

کارسینومای 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 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،

[۱] گروه بیوتکنولوژی سلولی و مولکولی دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران (نویسنده مسئول)

[۲] گروه بیوتکنولوژی سلولی و مولکولی دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 9:53 +0330 on Sunday October 21st 2018

متیل-۳- پنتیل-۶- متوکسی پرودیجیوسین (پرودیجیوسین) دیواره سلولی باکتری سراشیا مارسسنس است که خواص ضد تکثیری آن در انواع مختلفی از سلول‌های بدخیم نشان داده شده است (۶-۳). خانواده پرودیجیوسین که در ساختار مولکولی همه آن‌ها اسکلت پیرولیل پیرومتن[1] دیده می‌شود، رنگ‌دانه‌هایی هستند که ازلحاظ 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 (۴، ۳). به خاطر این سیتوتوکسیتی انتخابی، خانواده پرودیجیوسین ها به‌عنوان عوامل ضد سرطانی، امیدهای فراوانی را به‌وجود 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 (۱۰، ۵)؛ بنابراین با توجه به مزایای ذکرشده از پرودیجیوسین و نیز عوارض جانبی بالای داروهای شیمی‌درمانی، در این پژوهش، اثر پرودیجیوسین دیواره سلولی باکتری سراشیا مارسسنس بر تکثیر سلول‌های سرطانی کبدی و القا آپوپتوز در این سلول‌ها موردبررسی 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 درصد۱۰ سرم جنین گاوی (PAA, Austria)، ۱۰۰ u / ml پنی‌سیلین و ۱۰۰ µg / ml استرپتومایسین، ۲ میکرومول L گلوتامین (Roche, Germany) و ۲۰ میکرمول بافر HEPES در دمای ۳۷ 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 ۰.۲۵درصد تریپسین و ۰.۰۲درصد EDTA) و کیت Annexin V Fluos برای سنجش آپوپتوز از شرکت Roche آلمان خریداری شدند. پودر MTT از شرکت آتوسل اتریش و سایر مواد شیمیایی از شرکت مرک آلمان خریداری گردیدند.

آماده‌سازی پرودیجیوسین و تیمار سلولی:

پرودیجیوسین در اتانول حل گردید تا استوک ۲۰µg/ml از آن تهیه گردد. سپس در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. برای تمامی آزمایشات، از محلول استوک پرودیجیوسین، غلظت‌های ۱۰۰ الی ۶۰۰ 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 ۳۷ 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 ۱۰۰، ۴۰۰ و ۶۰۰ نانو مول پرودیجیوسین تعویض شد و پلیت به مدت ۴۸ ساعت دیگر در انکوباتور مرطوب دارای ۵درصد CO_2 قرار گرفت. سپس سلول‌های چسبیده به کف چاهک‌ها با استفاده از محلول تریپسین جداشده 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 ۱۰۰ الی ۶۰۰ نانومولار پرودیجیوسین به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تیمار گردیدند و میزان تکثیر سلولی با استفاده از آزمون MTT موردبررسی قرار گرفت. برای هر چاهک ۱۰ میکرولیتر محلول MTT (۵mg/ml در بافر فسفات) به محیط کشت سلول‌ها اضافه شد و سلول‌ها به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. سپس محیط کشت هر چاهک با ۲۰۰ میکرولیتر دی متیل سولفوکساید جهت انحلال کریستال‌های فورمازان تشکیل‌شده جایگزین گردید. میزان جذب نوری هر چاهک با دستگاه اسپکتوفتومتر (State fox, USA) در طول‌موج ۴۹۲ نانومتر اندازه‌گیری شد و نتایج با استفاده از فرمول $(A_{sample} - A_{blank})/(A_{control} - A_{blank}) \times 100\%$ محاسبه شدند و به‌صورت درصدی از رشد سلول‌های کنترل تیمار نشده نشان داده شدند.

سنجش آپوپتوز:

سلول‌های HepG2 در حضور و عدم حضور غلظت‌های ۱۰۰،۴۰۰ و ۶۰۰ 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.

[1] Pyrrolylpyrromethene

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 9:53 +0330 on Sunday October 21st 2018

در مرحله بعدی سلول‌ها در تعداد ۵×۱۰^{۵} 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 ارائه‌شده حاصل میانگین دوبار آزمایش ± 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:

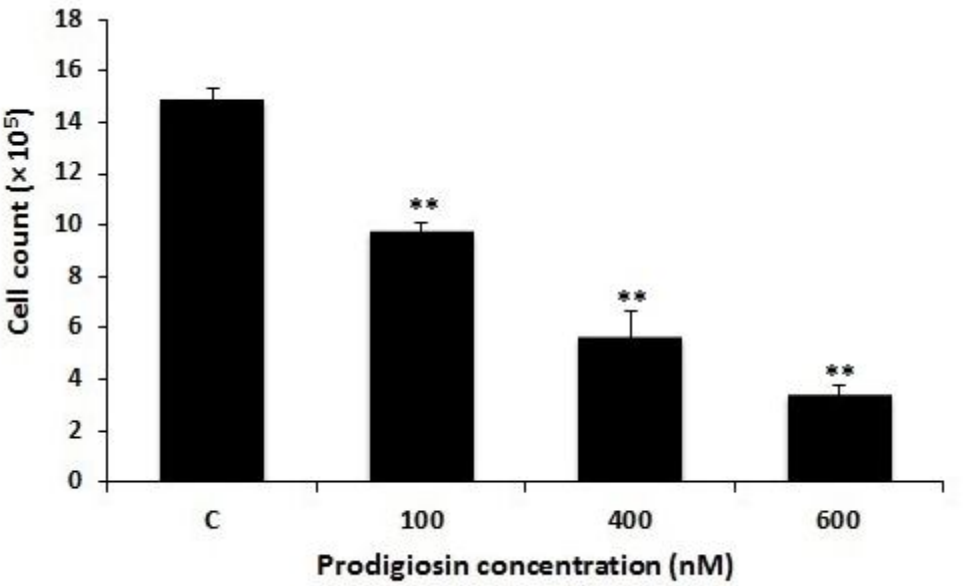
پس از ۴۸ ساعت تیمار سلولی توسط پرودیجیوسین، تعداد سلول‌ها به‌طور معناداری و به‌طور وابسته به دوز کاهش یافت و در غلظت‌های صفر (کنترل بدون تیمار)، ۱۰۰، ۴۰۰ و ۶۰۰ نانو مول پرودیجیوسین به ترتیب تعداد سلول‌ها به ۱۴.۹×۱۰^{۵}، ۹.۷×۱۰^{۵}، ۵.۶×۱۰^{۵} و ۳.۴×۱۰۵ رسید (نمودار ۱).

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 ذکرشده از پرودیجیوسین به ترتیب ۴۴درصد، درصد۳۳، درصد۲۷ و درصد۲۷ رشد سلولی نسبت به سلول‌های کنترل نشده مشاهده گردید (نمودار ۲).

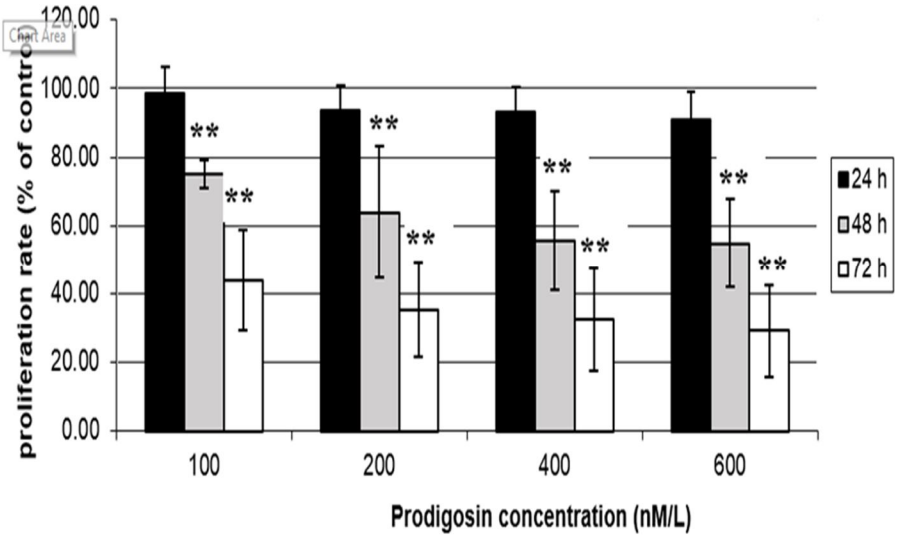
اثر پرودیجیوسین بر القا آپوپتوز در سلول‌های سرطانی کبد:

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 استفاده‌شده، آپوپتوز را در سلول‌های سرطانی HepG2 به‌طور وابسته به دوز القاء می‌کند و میزان نکروز مشاهده‌شده 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.



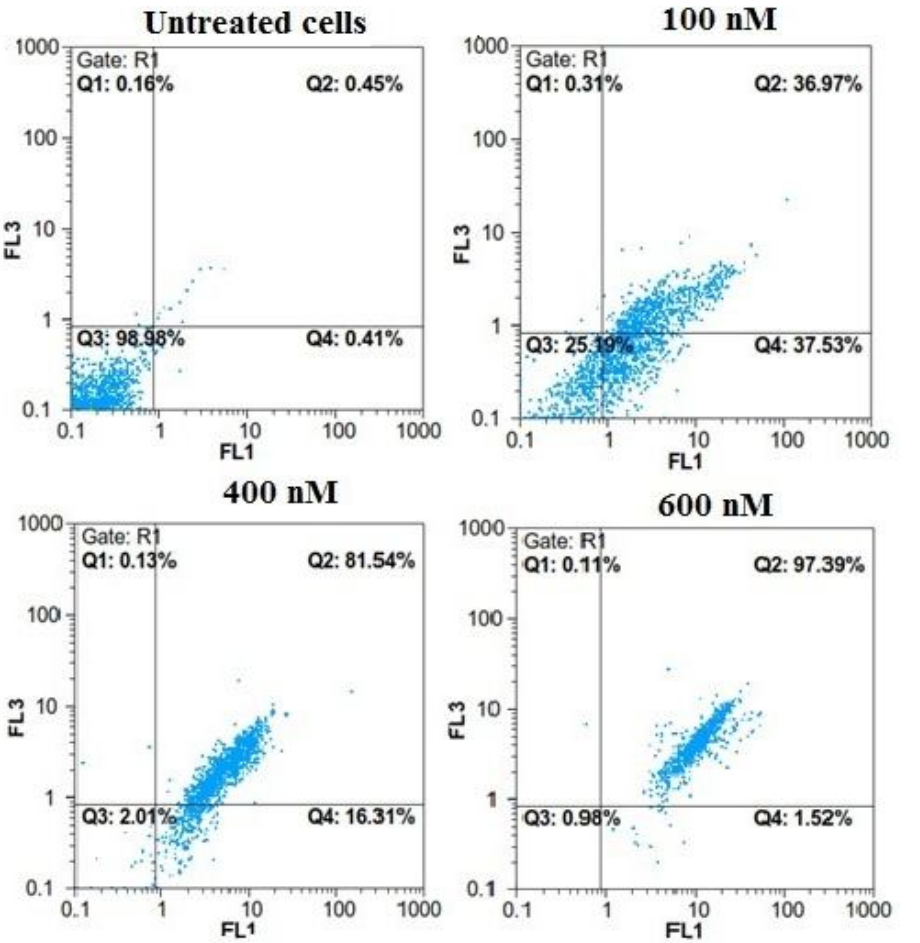
نمودار (۱): تعداد سلول‌های شمارش‌شده HepG2 در غلظت‌های مختلف پرودیجیوسین در بازه زمانی ۴۸ ساعت پس از تیمار. نتایج میانگین حداقل دو بار آزمایش ± انحراف معیار است. میزان معناداری نسبت به نتایج سلول‌های کنترل تیمار نشده محاسبه و نشان داده شده است.
**P<0.01, ** P<0.01 vs. untreated control cells

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 9:53 +0330 on Sunday October 21st 2018



نمودار (۲): میزان رشد و تکثیر سلول‌های تیمار شده HepG2 در غلظت‌های ذکرشده از پرودیجیوسین در بازه‌های زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از تیمار. نتایج میانگین حداقل دو بار آزمایش ± 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 پرودیجیوسین.
Q1: سلول‌های پری نکروتیک:Q2 سلول‌های آپوپتوزی ثانویه و نکروزی:Q3 سلول‌های زنده وQ4: سلول‌های آپوپتوز اولیه

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 9:53 +0330 on Sunday October 21st 2018

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

پرودیجیوسین(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 پرودیجیوسین‌ها اولین بار از طریق اثر سیکلوپرودیجیوسین بر روی سلول‌های هپاتوکارسینومای Huh-7 نشان داده شد (۱۲). بررسی اثر پرودیجیوسین بر روی فعال‌سازی مسیر مرگ سلولی ناشی از استرس شبکه آندوپلاسمی در رده‌های سلولی سرطانی پستان، نشان می‌دهد که پرودیجیوسین 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، پرودیجیوسین 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 (۱۶،۱۵)؛ بنابراین کاهش تعداد سلول‌ها پس از تیمار با پرودیجیوسین 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 پرودیجیوسین، رشد و تکثیر سلول‌های بدخیم در غلظت ۶۰۰ نانو مولار از پرودیجیوسین، بیشترین کاهش را نشان داد که می‌توان این کاهش را به فعال شدن بهتر مکانیسم آپوپتوز در سلول‌های بدخیم در تیمار با غلظت بالاتر پرودیجیوسین در بازه زمانی طولانی‌تر نسبت داد. در این زمینه در مطالعات سایر محققان نیز نشان داده شده است که پرودیجیوسین 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، پرودیجیوسین 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 پرودیجیوسین 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 پرودیجیوسین 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 پرودیجیوسین از مسیر غیروابسته به p53 موجب القا آپوپتوز می‌گردد (۱۸). با توجه به اینکه در ۵۰درصد موارد ژن p53 در سلول‌های سرطانی دچار جهش شده است، القا آپوپتوز توسط پرودیجیوسین 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، پرودیجیوسین 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. بااین‌وجود مطالعات بیشتری ازجمله استفاده از مدل‌های حیوانی (in vivo) که می‌تواند بخشی از سؤالات در این زمینه را پاسخ دهد توصیه می‌گردد.

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 9:53 +0330 on Sunday October 21st 2018

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 می‌نماید.

References:

1. 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.
2. Wörns MA, Galle PR. Future perspectives in hepatocellular carcinoma. Dig Liver Dis 2010;42 Suppl 3:S302-309.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. Pandey R, Chander R, Sainis KB. Prodigiosins as anti cancer agents: living up to their name. Curr Pharm 2009; 15: 732–41.
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. 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.
14. Zhang J, Shen Y, Liu J, Wei D. Antimetastatic effect of prodigiosin through inhibition of tumor invasion. Biochem. Pharmacol 2005; 69: 407-14.
15. Sam S, Sam MR, Esmaeillou 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, Esmaeillou 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;
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.

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 9:53 +0330 on Sunday October 21st 2018

Original Article

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

Mohammad Reza Sam[1], Reza Abdi Yenkejeh[2]*

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

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 9:53 +0330 on Sunday October 21st 2018

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 ± %2, %33 ± %4, %27 ± %3 and 27% ± %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*