مقاله پژوهشی

ارمغان دانش، مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی یاسوج
دوره ۲۵، شماره۳، مرداد و شهریور ۱۳۹۹(شماره پی در پی۱٤۰)

ارزیابی اثرات سایتوتوکسیک و آپوپتوتیک سیمواستاتین در رده سلولی سرطان استخوان MG63

محمد امین سلطانی[۱]، طاهره ناجی[۱*]، رحیم احمدی[۲]

[۱]گروه علوم پایه، واحد علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران،[۲]گروه فیزیولوژی، واحد همدان، دانشگاه آزاد اسلامی، همدان، ایران

تاریخ وصول: ۱۳۹۸/۰۸/۰۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۱/۲۹

چکیده

زمینه و هدف: سرطان عبارت است از ناهماهنگی میان رشد و مرگ سلول‌ها که نتیجه آن انباشته شدن تعداد بیش از حد سلول‌ها است. سرطان استخوان یک نوع بسیار جدی از سرطان است و زمانی اتفاق می‌افتد که سلول‌های استخوان‌ساز دچار مشکل شوند، لذا هدف از این مطالعه تعیین و بررسی اثرات سایتوتوکسیک و آپوپتوتیک سیمواستاتین در رده سلولی سرطان استخوان MG63 بود.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی که در اردیبهشت ۱۳۹۸ در واحد علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی انجام شد، سلول‌های MG63 کشت داده شدند و سپس سلول‌ها با غلظت‌های مختلف سیمواستاتین به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند و دوز IC50 با استفاده از آزمون ام‌تی‌تی اندازه‌گیری شد. اثرات سیمواستاتین بر روی مکانیزم‌های مرگ سلولی مانند آپوپتوز و نکروز به وسیله فلوسایتومتری مورد ارزیابی قرار گرفت. از تست ریل تام پی سی آر برای بررسی بیان ژن آنزیم‌های کاسپاز ۳، ۸ و۹ استفاده شد و در آخر سلول‌های تیمار شده با دوز IC50 سیمواستاتین با تکنیک رنگ‌آمیزی فلوسایتومتری هوخست مورد بررسی قرار گرفتند. داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از آزمون آماری تی دانشجویی تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: نتایج آزمون MTT نشان داد که سیمواستاتین در دوز ۱۵۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر ۵۰ درصد سلول‌های سرطانی(IC50) را از بین برد. از طرفی ارزیابی فلوسایتومتری نشان داد که سلول‌های MG63 تیمار شده با سیمواستاتین(دوز ۳۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) بیش از ۹۰ درصد نسبت به گروه کنترل دچار مرگ سلولی از نوع آپاپتوز شدند. بررسی آنزیم‌های کاسپاز ۳ ، ۸ و ۹ با استفاده از تکنیک Real-time PCR نشان داد که بیان ژن‌های کاسپاز ۳ و ۹ اختلاف معنی‌داری داشت($p<۰/۰۰۱$)، اما در مورد بیان ژن کاسپاز ۸ اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد($p<۰/۰۵$). در تکنیک رنگ‌آمیزی هوخست تغییر رنگ سلول‌های گروه تیمار نسبت به گروه کنترل، حاکی از متراکم و متلاشی شدن هسته سلول بود که این موضوع بیانگر مرگ سلولی از نوع آپاپتوز بود.

نتیجه‌گیری: در نهایت نتایج به دست آمده از این پژوهش نشان داد که داروی سیمواستاتین در محیط کشت سلولی می‌تواند موجب اثرات سایتوتوکسیک و آپوپتوتیک در سلول‌های سرطان استخوان MG63 شود که بر این اساس، بررسی احتمال کاربرد داروی سیمواستاتین در درمان سرطان استخوان حایز اهمیت است.

واژه‌های کلیدی: سیمواستاتین،MG63، سرطان استخوان، کاسپاز

***نویسنده مسئول: طاهره ناجی**، تهران، دانشگاه علوم پزشکی تهران، گروه علوم پایه

Email: tnaji2002@gmail.com

مقدمه

سرطان عبارت است از ناهماهنگی میان رشد و مرگ سلول‌ها که نتیجه آن انباشته شدن تعداد بیش از حد سلول‌ها است. به سلول‌های انباشته‌شده غده یا تومور می‌گویند که ممکن است از نوع خوش‌خیم یا بدخیم باشد که سرطان باعث ۱۳ درصد مرگ‌ها می‌باشد. بر اساس بر آوردهای صورت گرفته، مرگ و میر ناشی از سرطان در سال ۲۰۱۵ تا ۲۰۳۰ به ترتیب ۹ و ۱۱/٤ میلیون نفر تخمین زده شده است(۱). سرطان استخوان یک نوع بسیار سخت و جدی از سرطان است و زمانی اتفاق می‌افتد که سلول‌های استخوان‌ساز دچار مشکل شوند. این سرطان در کودکان و نوجوانان بیشتر و سرطان استخوان متاستاتیک در بزرگسالان شایع‌تر است. این نوع سرطان از یک ناحیه سرطانی دیگر به استخوان‌ها شیوع می‌یابد(۲). سرطان استخوان نادر است و کمتر از ۱ درصد تمام سرطان‌ها را تشکیل می‌دهد، اما این هفتمین نوع شایع سرطان در نوجوانان است که ۵ درصد از کل سرطان‌ها در سنین زیر ۱۱ سال را شامل می‌شود(۳). هم‌چنین سرطان استخوان ثانویه از شایع‌ترین تومورهای استخوان است(٤). از سویی تومورهای استخوانی اولیه شامل تومورهای خوش خیم و بدخیم است و برخی از تومورهای خوش خیم ممکن است باعث شکنندگی استخوان شوند و به تومورهای بدخیم تبدیل شوند و شرایطی که امکان شبیه‌سازی تومورهای اولیه استخوانی وجود دارد مانند متاستاز و شرایط غیر نئوپلاستیک مثل؛ فرآیندهای التهابی، کیست‌های استخوانی، فیبروزدیسپلازی، فیبروما استخوانی، بیماری پاژه استخوان و غیره است. در مقایسه با دیگر بدخیمی‌ها، تومورهای بدخیم اولیه استخوان نادر است. سه نوع اصلی از شایع‌ترین بدخیمی‌های اصلی اولیه استخوان(استئوسارکوم، کندروسارکوم، و یوینگ سارکوم) است که تنها ۲/۹ درصد از تمام بدخیمی‌ها در انگلستان و ایالات متحده آمریکا را تشکیل می‌دهد. اگرچه در کودکان(< ۱۵ سال) تومورهای بدخیم استخوان حدود ۵ درصد از همه بدخیمی‌ها را تشکیل می‌دهد(۵). از طرفی استئوسارکوم یک تومور بدخیم است که عمدتاً بر استخوان‌های دراز تأثیر می‌گذارد، هم‌چنین می‌تواند استخوان‌های دیگر در بدن را به ویژه دیستال فمور و پروگزیمال تیبیا را درگیر کند، استئوسارکوم دومین علت اصلی مرگ مرتبط با سرطان برای کودکان و نوجوانان است. شیوع و گسترش متاستاتیک استخوان تا بالای ۳۹ درصد است. از طرفی سلول‌های MG-63 یک دودمان استئوسارکوم مشخص است که به وسیله تشکیل فرم‌های استخوان غیرطبیعی از زمان بیان ژن و قابلیت سنتز درست ماتریکس خارج سلولی استخوان ECM مختل شده است(٦). از سویی سلول‌های MG-63 نسبتاً شبیه به فیبروبلاست هستند، هم‌چنین با توجه به این که سرطان‌ها به وسیله یک سری جهش‌های متوالی در ژن‌های انسان اتفاق می‌افتد و هر موتاسیون هم تا حدی تغییرات جدیدی را در سلول به وجود می‌آورد. مواد شیمیایی باعث ایجاد سلول‌های سرطانی به نام کارسینوژن می‌شوند(۷). با توجه به معضل سرطان محققان هر روزه دنبال روش‌های نوین برای درمان بوده‌اند، از جمله درمان‌های معمول سرطان شیمی‌درمانی است که با هدف نابودسازی

سلول‌های سرطانی انجام می‌پذیرد. پژوهش‌ها نشان می‌دهد شیمی درمانی توأم با عوارض متعددی مانند؛ خستگی، تهوع، استفراغ، آنمی و آلوپسی است که می‌تواند بر کیفیت زندگی اثر منفی داشته باشد. با توجه به عوارض داروهای شیمی درمانی امروزه به دنبال راه‌های نوینی برای از میان برداشتن سرطان می‌باشند؛ سیمواستاتین برای درمان هیپرکلسترولمی و کاهش چربی خون استفاده می‌شود، سیمواستاتین به عنوان داروی کمکی همراه با رژیم غذایی در درمان زیادی کلسترول خون ناشی از افزایش کلسترولLDL در بیمارانی که در معرض خطر بیماری شریان کرونر بوده و به درمان با رژیم غذایی پاسخ نمی‌دهند مصرف می‌شود(۸). مکانیسم اثر سیمواستاتین به گونه‌ای است که با مهار آنزیمHM G-CoA reductaseباعث کاهش سرعت سنتز کلسترول LDLدر کبد می‌شود و در نهایت میزان کلسترول خون را کاهش می‌دهد(۹). علی‌رغم برخی گزارش‌ها در مورد اثرات ضدسرطانی سیمواستاتین، فعالیت سیمواستاتین روی سلول‌های سرطان استخوان گزارش نشده است. هدف از این مطالعه تعیین و بررسی اثرات سایتوتوکسیک و آپوپتوتیک سیمواستاتین در رده سلولی سرطان استخوان MG-63 می‌باشد.

روش بررسی

در این مطالعه تجربی که در اردیبهشت ۱۳۹۸ در واحد علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی انجام شد، ، تست‌های MTT ، ریل‌تایم، فلوسایتومتری و رنگ‌آمیزی فلورسانس هوخست استفاده شد. در تست MTT سلول سرطان استخوان MG-63 درون میکروپلیت ۹۶ خانه ریخته شد و تحت تیمار با دوزهای مختلف سیمواستاتین قرار گرفت. جهت تیمار سلول‌ها رقت‌های مختلفی از سیمواستاتین در میکروتیوپ‌های استریل از غلظت ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تا غلظت۸ ۷/۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر از طریق روش رقت‌سازی سریالی تهیه شد. گروه کنترل :در این گروه هیچ‌گونه تیماری روی سلول‌ها صورت نگرفت. چاهک‌های حاوی سلول‌های کنترل تنها با محیط DMEM کامل پر شدند. در هر پلیت 96 چاهک، یک گروه ۸ تایی کنترل در نظر گرفته شد.

در تست ریل تایم سلول‌ها پس از ۲۴ ساعت تیمار با دوز ۱۵۵ میکروگرم بر میلی لیتر(IC50) داروی سیمواستاتین جدا شدند، به وسیله بسته آزمایشگاهی مخصوص سنجش RNA ، RNA آن‌ها استخراج شد و برای ساخت cDNA به وسیله پلیمر الیگو دی‌تی در دستگاه PCR قرار گرفت. پس از اتمام این مرحله cDNAها به همراه پرایمر اختصاصی به دستگاه Real-time PCR منتقل شدند، تعداد سیکل‌ها و دما مشخص گردید و پس از پایان روند تکثیر به وسیله نرم‌افزار داده‌ها مورد ارزیابی قرار گرفتند. برای نرمالایز کردن (مفهوم نرمالایز کردن: برای رسیدن به میزان نسبی بیان ژن، Ct هر ژن با Ct یک ژن رفرانس، ژن رفرانس مثل ژنی که همیشه در آن سلول‌ها بیان می‌شود و تحت تأثیر دارو قرار نمی‌گیرد مقایسه کرده، یک نسبت به دست می‌آید) از ژن GAPDH استفاده شد.

در این روش سلول‌های به دست آمده با معرف رنگی تعیین آپوپتوز با روش رنگ‌آمیزی

فلوسیتومتری مخصوصی به نام هوخست مجاورت داده می‌شوند. تکنیک رنگ‌آمیزی آنکسین V برای تعیین نوع مرگ(آپوپتوز یا نکروز) مورد استفاده قرار می‌گیرد. این نوع سنجش تأیید کننده مرگ سلولی از نوع آپوپتوز به دلیل تجمع جمعیت آنکسین V مثبت و PI منفی(آپاتوز اولیه) و هم‌چنین تأیید کننده مرگ سلولی از نوع نکروز به دلیل تجمع جمعیت PI مثبت وآنکسین V منفی می‌باشد. دوز ۳۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر محلول سیمواستاتین به یک چاهک پلیت ۶ خانه اضافه شد و پلیت به مدت ۲٤ ساعت در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت.

رنگ آمیزی با استفاده از رنگ آمیزی فلوسیتومتری مخصوصی به نام هوخست انجام شد و آنکسین V به غلظت نهایی ۵ میکرومولار اضافه شد و سلول‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در تاریکی انکوبه شدند. سلول‌ها سپس با PBS دوباره شسته و سانتریفیوژ و در بافر اتصال معلق شدند. قبل از تجزیه و تحلیل فلوسایتومتری، ۱۰ میکرومول آپاپتوز اولیه (PI) در بافر اتصال به هر نمونه اضافه شد. سیگنال‌های فلورسانس از آنکسین V و آپاپتوز اولیه(PI) با استفاده از فلوسایتومتری در کانال‌های اف ال ۱ و اف ال ۳ در آزمایشگاه اندازه‌گیری شد. جهت بررسی مورفولوژی هسته سلول با رنگ‌آمیزی فلورسانس هوخست دوز۱۵۵ میکرو بر میلی‌لیتر (IC50) از محلول سیمواستاتین به یک چاهک اضافه شد و پلیت به مدت ۲٤ ساعت در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از جداسازی سلول‌ها، آنها را روی لام ریخته و تثبیت شدند، رنگ هوخست را به آن ها اضافه کرده و به مدت ۲۰ دقیقه در تاریکی مطلق قرار داده شدند و با استفاده از دستگاه میکروسکوپ فلورسانس تصویر برداری انجام شد.

داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزاراس پی اس اس و اکسل و آزمون‌های آماری کولموگروف ــ اسمیرنوف و روش آماری وان وی آنووا تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها

زنده مانی سلول با استفاده از روش MTT با غلظت‌های مختلف سیمواستاتین مورد ارزیابی قرار گرفت. نمودار زیر نشان‌دهنده تأثیر غلظت‌های مختلف دارو بر رده سلولی MG63 می‌باشد. با افزایش غلظت سیمواستاتین زنده مانی سلول نسبت به گروه کنترل کاهش یافته است(آی سی ۵۰ برابر با ۱۵۵ میکرو گرم بر میلی لیتر شود)(نمودار ۲و۱).

بر اساس نتایج به دست آمده از بررسی ژن‌های انتخابی، ژن‌های آنزیم‌های کاسپاز ۳ و۹ نسبت به گروه کنترل افزایش بیان قابل ملاحضه‌ای را داشته‌اند.

نتایج حاصل از آنالیز آزمون تی نشان داد که بیان ژن آنزیم کاسپاز ۳ در گروه دریافت کننده غلظت IC50 سیمواستاتین نسبت به گروه کنترل دچار تغییر معنی‌دار شد($p<0/001$)(نمودار ۳).

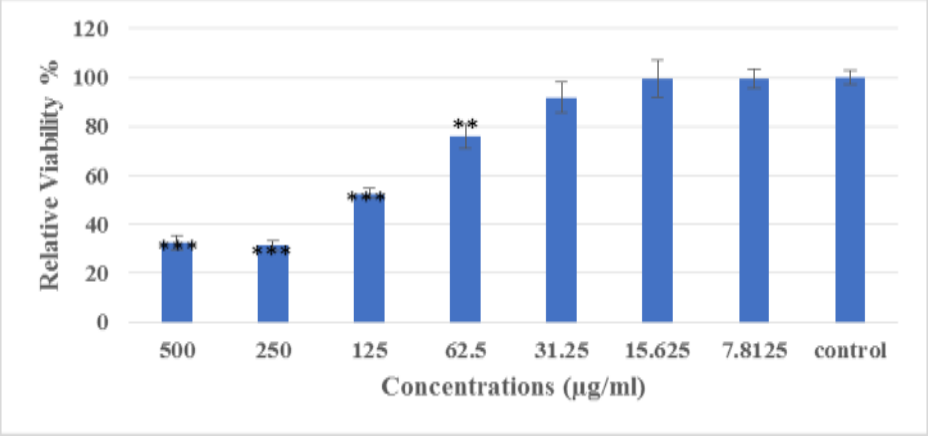
نتایج حاصل از آنالیز آزمون تی نشان داد که بیان ژن آنزیم کاسپاز ۸ در گروه دریافت کننده غلظت IC50 سیمواستاتین نسبت به گروه کنترل دچار تغییر معنی‌داری نشد($p<0/05$)(نمودار۴).

نتایج حاصل از آنالیز آزمون تی نشان داد که بیان ژن آنزیم کاسپاز ۹ در گروه دریافت کننده غلظت

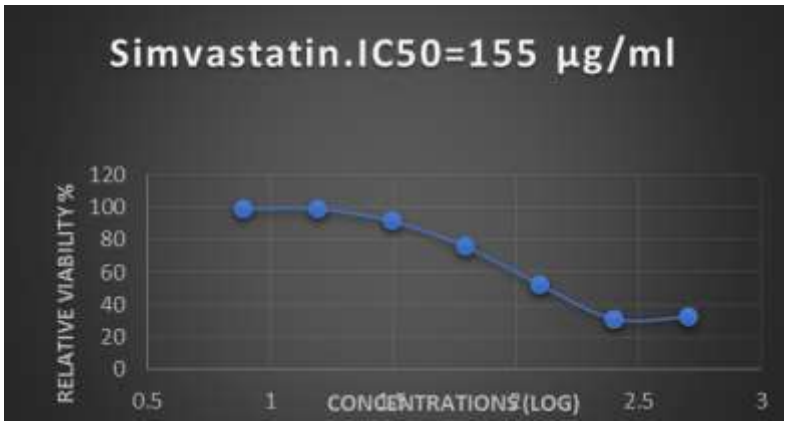
IC50 سیمواستاتین نسبت به گروه کنترل دچار تغییر معنی‌دار شد(p<۰/۰۰۱)(نمودار ۵).

آپوپتوز به وسیله خارج شدن فسفاتیدیل سرین اندازه‌گیری شد. پروپیدیوم یدید هسته را رنگ‌آمیزی می‌کند و بنابراین به عنوان یک شاخص یکنواختی غشایی مورد استفاده قرار می‌گیرد. نتایج این تحقیق نشان داد، پس از آن که رده سلولی MG63 در معرض داروی سیمواستاتین با غلظت ۳۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفتند که ۶۳/۱ درصد سلول‌ها دچار آپاپتوز اولیه، ۲۹ درصد سلول‌ها دچار آپاپتوز ثانویه و۰/۹۵ درصد دچار نکروز شدند و ۶/۹۱ درصد سلول‌ها زنده ماندند(نمودار ۶).

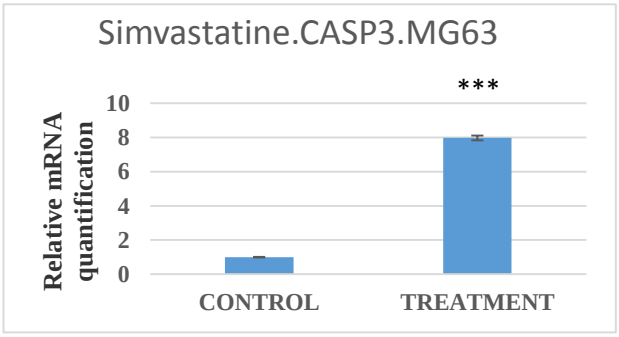
نتایج حاصل از تصویربرداری فلورسانس سلول‌های MG63 تیمار شده با سیمواستاتین نشان داد که هسته سلول‌ها در مقایسه با گروه کنترل متراکم و متلاشی شده است که این موضوع بیانگر مرگ سلولی از نوع آپاپتوز می‌باشد(تصویر ۱).



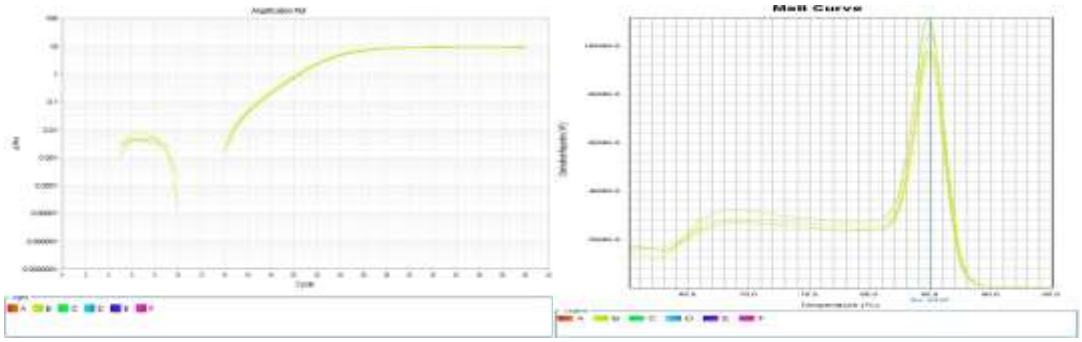
نمودار ۱: تعیین زنده مانی سلول‌های MG63 با استفاده از تست MTT در مواجه با غلظت‌های مختلف سیمواستاتین
***** نشان دهنده اختلاف معنی‌داری با گروه کنترل(p<۰/۰۰۱)**



نمودار ۲: درصد زنده مانی سلول‌های MG63 تیمار شده با دوزهای مختلف سیمواستاتین

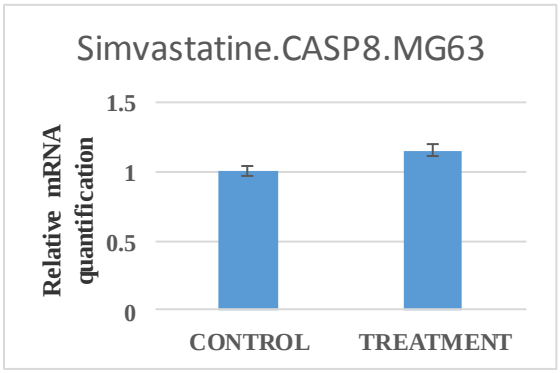


(الف)

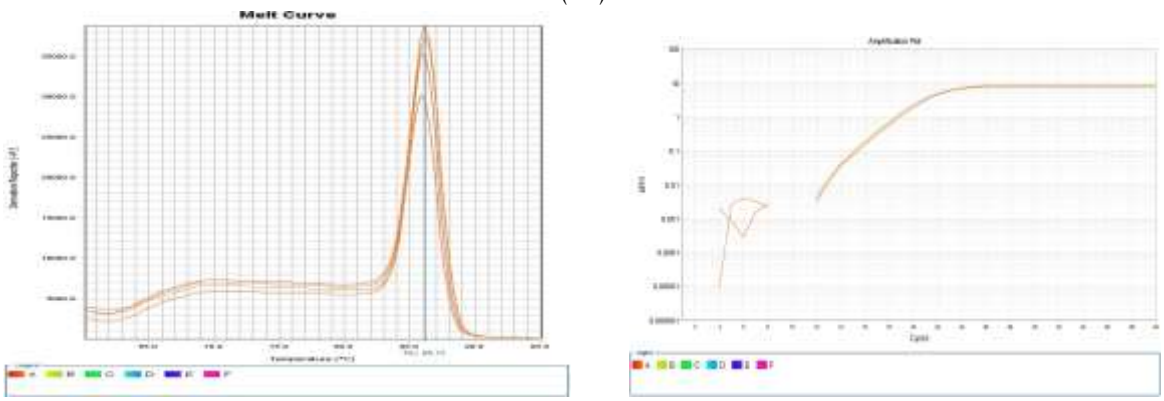


(ج) (ب)

نمودار ۳: نمودار ریل تایم کاسپاز ۳ (الف)میزان اثر سیمواستاتین بر بیان ژن آنزیم کاسپاز ۳ در سلول های MG63 در مقایسه با گروه کنترل *** نشان دهنده اختلاف معنی‌داری با گروه کنترل(**p<۰/۰۰۱**) است (ب)نمودار تکثیر (ج)نمودار چند منحنی که تک پیک در این نمودار نشانه داشتن یک محصول می‌باشد.

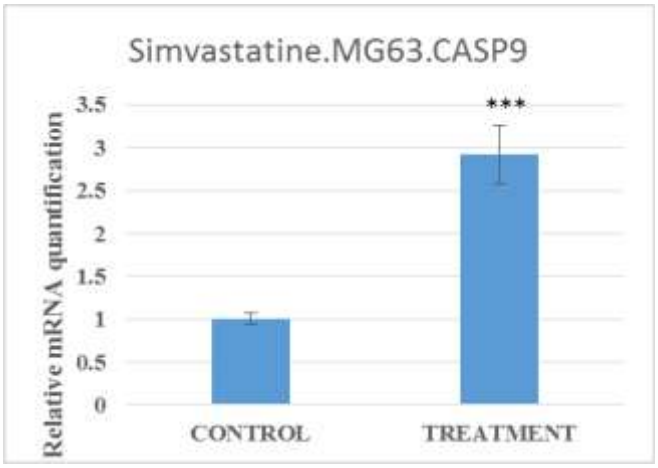


(الف)

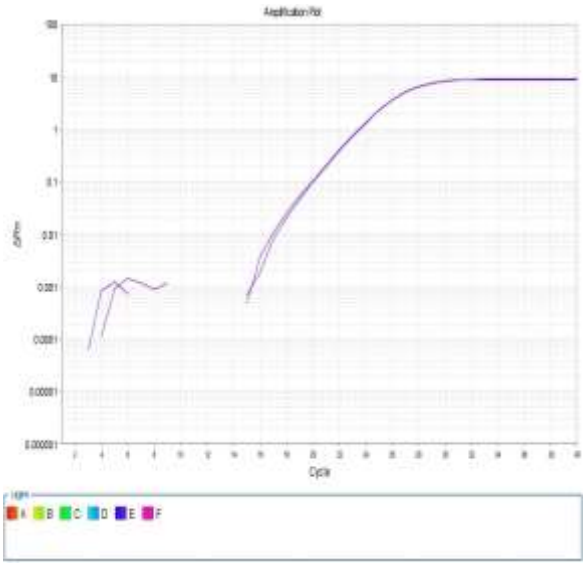


(ج) (ب)

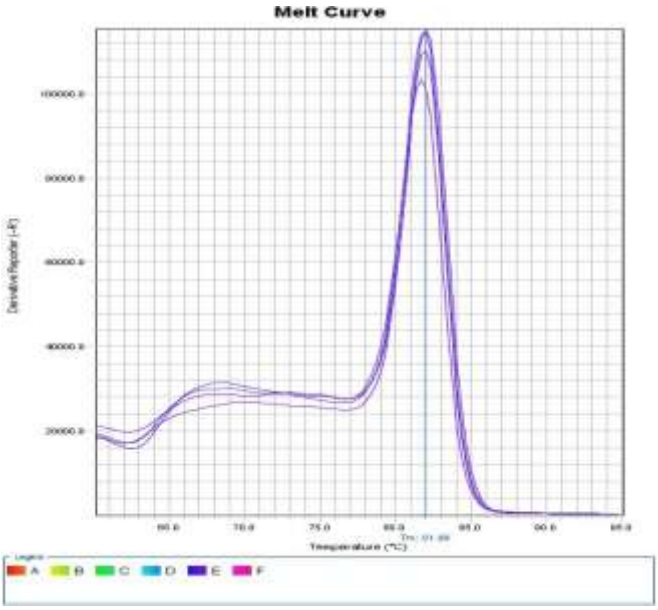
نمودار ۴: نمودار ریل تایم کاسپاز ۸ (الف) میزان اثر سیمواستاتین بر بیان ژن آنزیم کاسپاز ۸ در سلول های MG63 در مقایسه با گروه کنترل(ب)نمودار تکثیر(ج)نمودار چند منحنی که تک پیک در این نمودار نشانه داشتن یک محصول می‌باشد.



(الف)



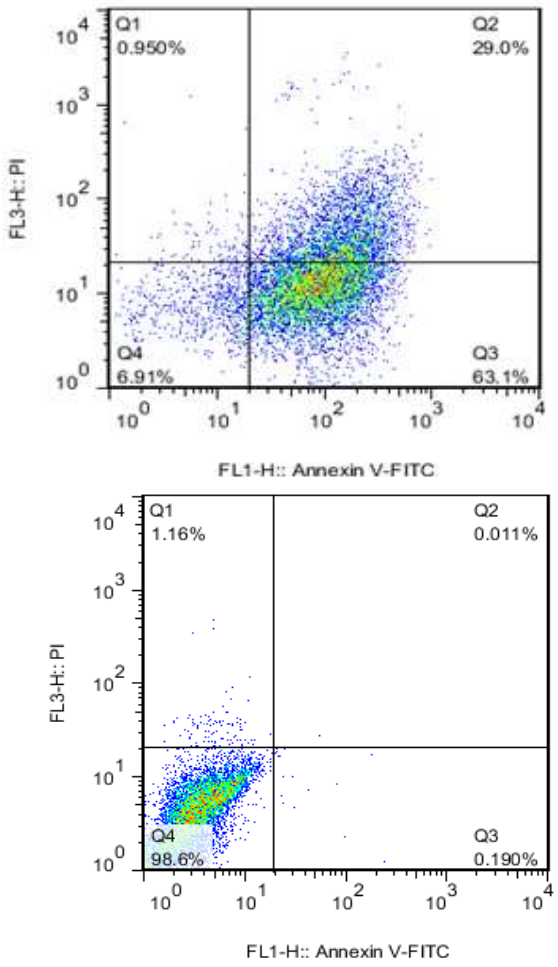
(ب)



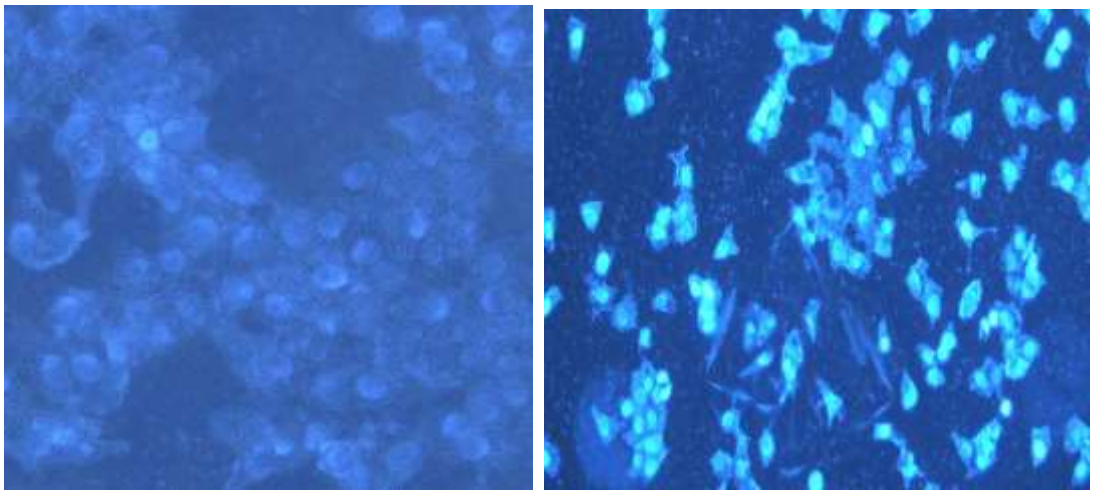
(ج)

نمودار۵: نمودار ریل تایم کاسپاز۹ (الف)میزان اثر سیمواستاتین بر بیان ژن آنزیم کاسپاز ۹ در سلول های MG63 در مقایسه با گروه کنترل

*** نشان دهنده اختلاف معنی‌داری با گروه کنترل(**p<۰/۰۰۱**) است(ب)نمودار تکثیر (ج)نمودار چند منحنی که تک پیک در این نمودار نشانه داشتن یک محصول می‌باشد.



نمودار۶: نمودارهای فلوسایتومتری سلول های سرطانی MG63 تیمار شده با سیمواستاتین(سمت چپ: گروه کنترل، سمت راست: گروه تیمار)



تصویر ۱: رنگ آمیزی فلورسانس هوخست سلول های MG63 تیمار شده با سیمواستاتین(سمت چپ: گروه کنترل، سمت راست: گروه تیمار)

بحث

سرطان عبارت است از ناهماهنگی میان رشد و مرگ سلول‌ها که نتیجه آن انباشته شدن تعداد بیش از حد سلول‌ها است. به سلول‌های انباشته شده غده یا تومور می‌گویند مه ممکن است از نوع خوش خیم یا بد خیم باشد(۱۰)، هدف از این مطالعه تعیین و بررسی اثرات سایتوتوکسیک و آپوپتوتیک سیمواستاتین در رده سلولی سرطان استخوان MG63 بود.

نتایج این مطالعه نشان داد که در سلول‌های سرطان استخوان MG63 تیمار شده با سیمواستاتین بیان ژن کاسپاز ۳ و۹ افزایش معنی‌داری داشت که این موضوع نشان دهنده اثر آپوپتوتیکی سیمواستاتین بود. هم‌چنین نتایج حاصل از فلوسایتومتری نشان داد که میزان آپوپتوز در غلظت ۳۰۰ میکروگرم سیمواستاتین نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری دارد. که نتیجه این آزمایش با آزمایش میازاوا(۲۲) و یوآن(۱۸) مطابقت داشت و نشانگر اثر آپوپتوتیکی سیمواستاتین بر رده سلولی MG63 بود.

در ایران سرطان سومین عامل اصلی مرگ و میر در ایران پس از بیماری‌های قلبی ـ عروقی و حوادث جاده‌ای است(۱۰). بنابراین یکی از چالش‌های عمده در علوم پزشکی، درمان مؤثر و به هنگام سرطان است. از جمله درمان‌های معمول سرطان شیمی درمانی است که با هدف نابودسازی سلول‌های سرطانی انجام می‌پذیرد.پژوهش‌ها نشان می‌دهد شیمی درمانی توأم با عوارض متعددی مانند؛ خستگی، تهوع، استفراغ، آنمی و آلوپسی است که می‌تواند بر کیفیت زندگی اثر منفی گذارد(۱۱). استاتین به طور قوی باعث کاهش سنتز کلسترول درون‌زا شده و منجر به کاهش در گردش لیپوپروتئین با چگالی کم(LDL) کلسترول می‌شود. مستقل از ویژگی‌های کاهش دهنده چربی، به نظر می‌رسد که استاتین‌ها دارای انواع مختلفی از اثرات پلیوتروپیک از جمله؛ مهار تکثیر سلولی، افزایش آپوپتوز، تعدیل التهاب، عملکرد اندوتلیال و آنژیوژنز هستند. در حقیقت، تصور می‌شود که برخی از این اقدامات به نقش حفاظت قلبی آن‌ها مرتبط است. با وجود این مکانیسم‌های متنوع، فرض شده است که استاتین ها بر طیف گسترده‌ای از فرآیندهای دیگر بیماری‌ها، از جمله سرطان تأثیر بگذارند(۱۲).

دو راه برای مرگ سلولی شناخته شده است: نکروز و آپوپتوز. تفاوت‌های بیوشیمیایی و موفولوژیکی بسیاری بین نکروز و آپوپتوز وجود دارد. نکروز پاسخ طبیعی سلول به صدمه‌های فیزیولوژیکی است که با برهم خوردگی توانایی سلول برای نگه‌داری هموئوستازی شروع می‌شود، با نفوذ آب و یون‌های خارج سلولی تمام اندامک‌های درون سلولی به خصوص میتوکندری متورم می‌شود و سپس با از هم پاشیدگی غشای سلولی و لیز سلولی تخریب صورت می‌گیرد و اجزای سیتوپلاسمی نظیر آنزیم‌های لیزوزومی در مایع خارج سلولی رها می‌شوند. بنابراین به علت پاسخ‌های التهابی، مرگ سلولی از طریق نکروز با تخریب گستردهٔ بافتی همراه است(۱۳). برخلاف آن در آپوپتوز که اکثراً به علت تحریک‌های داخل سلولی اتفاق می‌افتد، سلول خودکشی می‌کند. سلول آپوپتوزی مشخصات موفولوژیکی خاصی دارد که مشخص‌ترین آن‌ها اجسام آپوپتوزی است. این اجسام شامل قسمتی از

سیتوپلاسم و هسته در وزیکول‌های پلاسمایی و همچنین حاوی ریبوزوم است. این وزیکول‌ها خیلی سریع به وسیله فاگوسیت‌ها یا سلول‌های اپیتلیال مجاور شناسایی و هضم می‌شوند، بدون این که پاسخ التهابی ایجاد کنند(۱٤). این اصلی‌ترین تفاوت میان نکروز و آپوپتوز است. فرآیند پروتئولیز کاتالیز شده به وسیله کاسپازها، به نابودی اجزای سلولی، برای حذف و انهدام منظمی که ۷ مشخصه آپوپتوز است، کمک می‌کند پیام‌های خارج سلولی به نام عوامل مرگ یا آسیب‌های فیزیکی بر شیمیایی درونی همچون آسیب DNA یا تنش‌های اکسیداتیو ممکن است سلول‌ها را دچار آپوپتوز کنند. به دنبال آن، دو مسیر مولکولی غیراختصاصی به ترتیب بیرونی و درونی ممکن است فعال شوند. کاسپازها، پروتئازهای ویژه‌ای هستند که در نقش قیچی مولکولی، پروتئین‌های درون سلولی را در محل واحدهای اسپارتات(یکی از ۲۰ اسید آمینه) برش می‌زنند. کاسپازها نقش محوری در آپوپتوز ایفا می‌کنند. از کاسپازهای آغازگر کاسپاز ۸ و از کاسپازهای اجرایی، کاسپاز ۳ به عنوان کاسپاز مؤثر هستند(۱۵). کاسپاز ۸ القاء آپوپتوز را از طریق مسیر خارجی به واسطه پروتئین‌های سیگنالینگ پیش می‌برد(۱٦). در مسیر میتوکندریایی(داخلی) با رها شدن سیتوکروم C، سبب فعال‌سازی کاسپاز آغازی به نام کاسپاز ۹ می‌شود که با فعالسازی پروکاسپاز ۳، در نهایت کاسپاز ۳ فعال می‌شود در سرطان‌ها کاسپاز ۸ و ۹ دارای تنظیم پایین و فعالیت کاسپاز ۳ کاهش می‌یابد(۱۷). در تحقیق انجام شده به وسیله یوآن شن و همکاران با بررسی اثر ضدسرطانی سیمواستاتین بر مبنای مکانیسم ملکولی بر سرطان سینه رده سلولی MDA-MB-231 دیده شده که با تحت تأثیر قرار دادن این سلول‌ها با سیمواستاتین بیان ژن Bax و کاسپاز ۳، ۸ و ۹ افزایش و ژن Bcl2 کاهش یافت. از طریق تست فلوسایتومتری و وسترن بلات مشاهده شد که سیمواستاتین سبب توقف فاز G0/G1 و کاهش بیان پروتئین cyclin D و (CDK)2 و پروتئین (MMP)-2 و نیز توقف فعالیت (NF)-Kb شده بود که مشاهدات دال بر اثر آپوپتوتیکی سیمواستاتین بوده است(۱۸). نتایج این مطالعه نشان داد که در سلول‌های سرطان استخوان MG63 تیمار شده با سیمواستاتین بیان ژن کاسپاز ۳ و ۹ افزایش معنی‌داری داشت که این موضوع نشان دهنده اثر آپوپتوتیکی سیمواستاتین بود. نتایج حاصل از این مطالعه با مطالعات یوآن و همکاران که بر روی سلول‌های سرطان سینه رده سلولی MB-MDA-۲۳۱، پائولو کافوریو و همکاران روی سلول‌های توموری T، B و میلومای انسانی(۱۹) و آپریگلیانو و همکاران روی سلول‌های ستاره‌ای کبد رت(HSC)(۲۰) مطابقت داشت. در مطالعه‌ای که به وسیله آپریگلیانو وهمکاران انجام شد، نشان دادند سیمواستاتین، القای آپوپتوز را با فعال سازی کاسپاز ۳ و قطعه قطعه شدن DNA در سلول‌های مختلف ملانومای انسانی و موشی(ام جی ٦۳ انجام می‌دهد(۲۰).

قطعه قطعه شدن DNA از شاخص‌های مورفولوژیک در آپوپتوز می‌باشد که این ویژگی با روش رنگ‌آمیزی فلوسایتومتری هوخست ثابت شد. نتایج به دست آمده از این تست نشان داد که سیمواستاتین باعث قطعه قطعه شدن DNA در رده سلولی MG63 شده است و نتایج به دست آمده از این

مطالعه با نتایج مطالعه سایتو و همکاران بر روی سلول‌های مختلف ملانومای انسانی و موشی همخوانی داشت(۲۱).

نتایج حاصل از فلوسایتومتری نشان داد که میزان آپوپتوز در غلظت ۳۰۰ میکروگرم سیمواستاتین نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری دارد که نتیجه این آزمایش با آزمایش میازاوا(۲۲) و یوآن (۱۸) مطابقت داشت و نشان‌گر اثر آپوپتوتیکی سیمواستاتین بر رده سلولیMG63 بود.

با توجه به افزایش هزینه ها وامکانات مالی اندک، عدم بررسی بیان ژن های دیگر دخیل در سرطان استخوان از محدودیتهای این تحقیق می باشد،بنابر این پیشنهاد می‌شود که سیموستاتین و یا سایر استاتین ها بر بیان ژن های دیگر نیز بررسی گردد

نتیجه‌گیری

تیمار سلول‌های MG63 با سیمواستاتین نشان داد که بیان ژن‌های کاسپاز ۳ و ۹ اختلاف معنی‌داری دارد، در صورتی که در بیان ژن کاسپاز ۸ اختلاف معنی‌داری دیده نشد. از آنجا که کاسپاز ۹ از عوامل تأثیرگذار در شروع آپاپتوز از مسیر داخلی(میتوکندریایی) و کاسپاز ۸ یکی از عوامل مؤثر در شروع آپاپتوز از مسیر خارجی(پروتئین‌های سیگنالینگ) می‌باشند، می‌توان گفت مکانیسم احتمالی مرگ در سلول‌های MG63 تیمار شده با سیمواستاتین از نوع آپوپتوز داخلی می‌اشد. این موضوع نشان دهنده اثر سیمواستاتین بر سلول‌های سرطانی می‌باشد که توانسته است میزان بیان ژن آنزیم‌های تأثیرگذار در روند آپاپتوزی شدن سلول را افزایش دهد و درصد قابل توجهی از سلول‌های سرطانی را از بین ببرد. در نهایت نتایج به دست آمده از این پژوهش نشان داد که داروی سیمواستاتین در محیط کشت سلولی می‌تواند موجب اثرات سایتوتوکسیک و آپوپتوتیک در سلول‌های سرطان استخوان MG63 شود که بر این اساس، بررسی احتمال کاربرد داروی سیمواستاتین در درمان سرطان استخوان حایز اهمیت است.

تقدیر و تشکر

این مقاله برگرفته از پایان‌نامه دوره دکتری عمومی رشته داروسازی با کد اخلاق IR.IAU.PS.REC.1398.203 واحد علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی می‌باشد، نویسندگان بر خود لازم می‌دانند از مسئولین محترم آزمایشگاه که در مراحل انجام این تحقیق کمک زیادی نمودند تشکر و قدردانی نمایند.

REFERENCES

1.Sardari S, Shokrgozar MA, Ghavami G. Cheminformatics based selection and cytotoxic effects of herbal extracts. Toxicology in Vitro 2009; 23(7): 1412-21.
2.Martin JW, Squire JA, Zielenska M. The genetics of osteosarcoma.Hindawi Publishing Corporation Sarcoma, 2012.
3.Jun Li , Trevor D Thompson, Jacqueline W Miller, Lori A Pollack, Sherri L Stewart. Cancer incidence among children and adolescents in the United States, 2001–2003. Pediatrics 2008; 121(6): e1470-7.
4.Virk MS, Lieberman JR. Tumor metastasis to bone. Arthritis Research & Therapy 2007; 9(1): S5.
5.Dorfman HD, Czerniak B. Bone cancers. Cancer 1995; 75(S1): 203-210.
6.Scarpa A. Molecular features of primary mediastinal B-cell lymphoma: involvement of p16INK4A, p53 and c-myc. British Journal of Haematology 1999; 7(1): 106-13.
7.Parkin DM. The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. International Journal of Cancer 2006; 118(12): 3030-44.
8.McAuley DF. Simvastatin to reduce pulmonary dysfunction in patients with acute respiratory distress syndrome: the HARP-2 RCT. Efficacy and Mechanism Evaluation Journal 2018; 5: 1.
9.Gopalan A, Weiping Yu, Bob G Sanders, Kimberly Kline. Simvastatin inhibition of mevalonate pathway induces apoptosis in human breast cancer cells via activation of JNK/CHOP/DR5 signaling pathway. Cancer Letters 2013; 329: 9-16.
10.Mousavi SM, Gouya M, Ramazani R, Davanlou M, Hajsadeghi N, Seddighi Z. Cancer incidence and mortality in Iran. Annals of Oncology 2008; 20(3): 556-63.
11.Peters III WA. Concurrent chemotherapy and pelvic radiation therapy compared with pelvic radiation therapy alone as adjuvant therapy after radical surgery in high-risk early-stage cancer of the cervix. Obstetrical & Gynecological Survey 2000; 55(8): 491-2.
12.Lochhead P, Chan AT. Statins and colorectal cancer. Clinical Gastroenterology and Hepatology 2013; 11(2): 109-18.
13.Zimmermann KC, Bonzon C, Green DR. The machinery of programmed cell death. Pharmacology & Therapeutics 2001; 92(1): 57-70.
14.Dlamini Z, Mbita Z, Zungu M. Genealogy, expression, and molecular mechanisms in apoptosis. Pharmacology & Therapeutics 2004; 101(1): 1-15.
15.Mousavi SK, Janbabai G, Bizhan Kouchaki B, Hanieh Borhani H, Rashidi M Salehifar E. Demographic and clinical characteristics of gastric cancer patients in north of Iran, Mazandaran province, 2008-2014. Pharm Biomed Res 2015; 1(1): 32-6.
16.De Vita Vincent T, Steven R. Cancer principles & practice of oncology. Lippincott Williams & Wilkins 1989; 6: 1092-161.
17.Dickson JL, Cunningham D. Systemic treatment of gastric cancer. European Journal of Gastroenterology & Hepatology 2004; 16(3): 255-63.
18.Shen YY, Youhan Y, Ying D. Molecular mechanism underlying the anticancer effect of simvastatin on MDA‐MB‐231 human breast cancer cells. Molecular Medicine Reports 2015; 12(1): 623-30.
19.Cafforio P, Dammacco F, Angela Gernone A, Franco Silvestris F Statins activate the mitochondrial pathway of apoptosis in human lymphoblasts and myeloma cells. Carcinogenesis 2005; 26(5): 883-91.
20.Aprigliano I. Atorvastatin induces apoptosis by a caspase-9-dependent pathway: an in vitro study on activated rat hepatic stellate cells. Liver International 2008; 28(4): 546-57.
21.Saito A. Simvastatin inhibits growth via apoptosis and the induction of cell cycle arrest in human melanoma cells. Melanoma Research 2008; 18(2): 85-94.
22.Miyazawa Y, Sekine Y,Kato H,Furuya Y,Koike H,Suzuki K. Simvastatin Up-regulates annexin a10 that can inhibit the proliferation, migration, and invasion in androgenindependent-human prostate cancer cells. The Prostate 2017; 77(4): 337-49.

Armaghane-danesh, Yasuj University of Medical Sciences Journal (YUMSJ)

Original Article

Evaluation of Cytotoxic and Apoptotic Effects of Simvastatin in Bone Cancer Cell line(MG-63)

Soltani MA1, Naji T1* , Ahmadi R2

[1]Department of Basic Sciences, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran, [2]Department of Physiology, Hamedan Branch, Islamic Azad University, Hamedan, Iran.

Received: 30 Oct 2019 Accepted: 18 Feb 2020

Abstract

Background & aim: Cancer is a mismatch between cell growth and death that results in excessive accumulation of cells. Bone cancer is a very serious type of cancer and occurs when osteoporotic cells have problems. The aim of this study was to evaluate the cytotoxic and apoptotic effects of simvastatin on bone cancer MG63 cell line.

Methods: In the present experimental study conducted in May 2017 in the Medical Sciences Branch of Islamic Azad University, MG63 cells were cultured and subsequently incubated with different concentration of simvastatin for 24 hours. Afterwards, the IC50 dose was measured using MTT assay. The effects of simvastatin on cell death mechanisms such as apoptosis and necrosis were evaluated by flow cytometry. PCR test was used to evaluate the gene expression of caspase 3, 8 and 9 enzymes. Finally, the cells were treated with IC50 dose of simvastatin and then examined by Hoochst flow cytometry staining technique. The collected data were analyzed using t-test.

Results: The results of MTT test indicated that simvastatin at a dose of 155 µg / ml killed 50% of cancer cells (IC50). On the other hand, flow cytometric evaluation revealed that MV63 cells treated with simvastatin (300 µg / ml) had more than 90% apoptotic cell death compared to the control group. Evaluation of caspase 3, 8 and 9 enzymes using real-time PCR technique displayed a significant difference in the expression of caspase 3 and 9 genes ($p < 0.001$, but no significant difference was observed in the expression of caspase 8 gene (0.05). In Hochst staining technique, the discoloration of the cells in the treatment group compared to the control group indicated that the cell nucleus was dense and fragmented, which indicated apoptotic cell death.

Conclusion: Finally, the results of the present study revealed that simvastatin in cell culture medium can induce cytotoxic and apoptotic effects in bone cancer cells (MG63 cell line), therefore, it is important to consider the possibility of using simvastatin in the treatment of bone cancer.

Key words: Simvastatin, MG63 Cell Line, Bone Cancer, Caspase

*Corresponding author: **Naji T,** Department of Basic sciences, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran
Email: tnaji2002@gmail.com

Please cite this article as follows:
Soltani MA, Naji T, Ahmadi R. Evaluation of Cytotoxic and Apoptotic Effects of Simvastatin in Bone Cancer Cell line(MG-63). Armaghane-danesh 2020; 25(3): 293-305.