ارمغان دانش، مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی یاسوج
دوره ۲۵، شماره۵، آذر و دی ۱۳۹۹(شماره پی در پی ۱۴۲)

اثر داروی ۵ – آزا سیتیدین بر روی مهار رشد سلولی و القاء آپوپتوز در رده سلولی A549 سرطان ریه

معصومه سنائی جهرمی، فریدون کاوسی*

مرکز تحقیقات بیماری‌های غیر واگیر، دانشگاه علوم پزشکی جهرم، جهرم، ایران

تاریخ وصول: ۱۳۹۹/۰۱/۱۲ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۷/۱۰

چکیده

زمینه و هدف: سرطان ریه، یکی از مهم‌ترین علت‌های مرگ ناشی از سرطان است. تغییرات اپی‌ژنتیک شامل؛ متیلاسیون دی ان آ ، داستیلاسیون هیستون و میکرو آر ان آ می‌تواند منجر به خاموش شدن ژن‌های سرکوب کننده سرطان و در نتیجه ایجاد سرطان شود. هدف از این مطالعه تعیین و اثر داروی ۵ ـ آزا سیتیدین بر روی سرطان ریه بود.

روش بررسی: این پژوهش یک مطالعه آزمایشگاهی است که در سال ۱۳۹۸انجام شد. تعداد ۳۰۰۰۰۰ سلول برای هر گروه آزمایشی انتخاب شد. سلول‌های سرطانی ریه رده A549 با داروی ۵ ـ آزا سیتیدین درمان و میزان زنده بودن سلول، سلول‌های آپوپتوتیک و بیان ژن به ترتیب با تکنیک‌های MTT، فلوسیتومتری و PCR مورد بررسی قرار گرفت. داده‌ها با استفاده از آزمون‌های آماری آنالیز واریانس یک طرفه و تی تست تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: نتایج نشان داد داروی ۵ ـ آزا سیتیدین به طور معنی‌داری باعث مهار رشد سلولی، القاء آپوپتوز، کاهش بیان ژن‌های DNA متیل ترانس فراز(DNMT1، DNMT3A و DNMT3B) و افزایش بیان ژن‌های مهارکننده کینازهای وابسته به سیکلین(p14ARF، p16INK4a, and p15INK4b) گردید.

نتیجه‌گیری: داروی ۵ ـ آزا سیتیدین می‌تواند با مهار بیان ژن‌های متیل ترانس فراز باعث افزایش بیان ژن‌های مهار کننده تومـوری و القاء آپوپتوز در سلول‌های سرطانی ریه گـردد. درصـد سـلول‌هـای آپوپتوتیـک پـس از ۲۴ و ۴۸ سـاعت بـه ترتیـب ۸/۸۹ و ۵۴/۷ بود($p<۰/۰۰۱$). حداکثر میزان آپوپتوز پس از ۴۸ ساعت مشاهده شد.

واژه‌های کلیدی: ۵ ـ آزا سیتیدین، DNA متیل ترانس فراز، ژن‌های سرکوب کننده تومور، سرطان ریه

***نویسنده مسئول: فریدون کاوسی**، جهرم، دانشگاه علوم پزشکی جهرم، مرکز تحقیقات بیماری‌های غیر واگیر

Email: kavoosifraidoon@gmail.com

مقدمه

سرطان ریه، یکی از مهم‌ترین علت‌های مرگ ناشی از سرطان در مردان و زنان و دومین علت مرگ ناشی از سرطان در جهان است(۱). این بیماری می‌تواند در سطح مولکولی همراه با مجموعه‌ای از فاکتورهای ژنتیک، اپی‌ژنتیک و محیطی شرح داده شود. تغییرات اپی‌ژنتیک شامل متیلاسیون DNA، دِاستیلاسیون هیستون و میکروRNA (miRNA) است که منجر به خاموش شدن ژن‌های سرکوب کننده سرطان و در نتیجه ایجاد سرطان می شود. خاموشی حاصل از تغییرات اپی ژنتیک که از هیپرمتیلاسیون ناحیه پروموتر ناشی می‌شود به عنوان معمول‌ترین تغییرات اپی‌ژنتیک در سرطان‌های انسانی شناخته شده است(۲). این تغییر در سرطان‌های مختلف از قبیل؛ سرطان پروستات، مثانه، کولون، معده، کبد، سرطان خون، گردن رحم، پانکراس، اندومتر رحم، ریه، مری و سرطان سر و گردن گزارش شده است(۳). ژن‌های سرکوب کننده توموری مختلفی در سرطان ریه متیله می شوند که این ژن‌ها به وسیله محققان مختلف گزارش شده است(۵ و۴). چندین آنزیم DNA متیل ترانس فراز(DNMT) در متیله کردن DNA دخیل هستند که عبارتند از؛ دی ان آ متیل ترانس فراز نوع یک، نوع دو، نوع آ، نوع ب، و نوع ل (DNMT1, DNMT2, DNMT3A, DNMT3B and DNMT3L). فعالیت این آنزیم ها منجر به هیپرمتیلاسیون ژن‌های سرکوب کننده سرطان و در نتیجه خاموش شدن ژن و به وجود آمدن تومور می‌شود(۶). از این رو استفاده از داروهای مهار کننده آنزیم‌های DNA متیل ترانس فراز می‌تواند باعث بیان مجدد ژن‌های سرکوب کننده سرطان شود. داروهای 5- azacytidine (5-aza-CR, Vidaza) and 5-Aza-2'-deoxycytidine (5-AZA-CdR, Decitabine) به عنوان داروهای دمتیله کننده، قادر به دمتیلاسیون ژن‌های متیله شده خاموش هستند(۷). داروی ۵ ـ آزا سیتیدین (5-aza-CR) می‌تواند باعث بیان مجدد ژن‌های سرکوب کننده توموری در سرطان‌های مختلف از قبیل سرطان دهان و حنجره، ریه، کولون، پستان و فیبروکارسینوما شود(۸). در پژوهش‌های قبلی اثر این ترکیب بر روی سرطان کبد و کولون گزارش شد(۱۱ـ۹).

زبولارین از دیگر اعضای خانواده داروهای مهار کننده آنزیم دی ان آ متیل ترانس فراز است، دیگر پژوهش‌ها نشان داده است که این دارو باعث مهار رشد سلولی و ایجاد آپوپتوز در سرطان پانکراس رده سلولی YAP C و Panc-89 می شود(۱۲). اثر مشابهی از این دارو بر روی سرطان تخمدان گزارش شده است(۱۳).

کورکومین(curcumin)، از دیگر اعضای خانواده مزبور است. پژوهش‌های آزمایشگاهی نشان داده‌اند که این دارو باعث ایجاد آپوپتوز در سلول‌های سرطانی میلوئیدی(Myeloid leukemia) می‌شود(۱۴).

اثر آپوپتوتیک مشابهی از کورکومین بر روی سرطان معده و پروستات گزارش شده است(۱۵).

با توجه به این که پژوهشی بر روی اثر داروی ۵ ــ آزا سیتیدین بر روی سرطان ریه رده سلولی

A549 گزارش نشده است این تحقیق با هدف مطالعه تعیین و اثر داروی ۵ ـآزا سیتیدین بر روی مهار رشد سلولی و القاء آپوپتوز در رده سلولی A549 سرطان ریه انجام شد.

روش بررسی

این پژوهش یک مطالعه آزمایشگاهی است و در سال ۱۳۹۸ انجام شد، تعداد ۳۰۰۰۰۰ سلول برای هر گروه آزمایشی انتخاب گردید. با توجه به عدم گزارش مبنی بر بررسی اثر ۵ ـ آزا سیتیدین بر روی بیان ژن‌های مهار کننده دی‌ان‌آ متیل ترنس فراز (DNMT1, DNMT3A, DNMT3B) و ژن‌های مهار کننده کینازهای وابسته به سیکلین (p14ARF, p16INK4a, and p15INK4b)، مهار رشد سلولی و ایجاد آپوپتوز در سرطان ریه رده سلولی A549، این رده سلولی انتخاب و از بانک سلولی انستیتو پاستور کشور جمهوری اسلامی ایران[1] خریداری گردید و در محیط کشت سلولی DMEM ((Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) [2] که با سرم جنین گاوی(FBS)[3] غنی شده و حاوی آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین و استرپتومایسین [4] بود و در دمای ۳۷ درج سانتی‌گراد نگهداری شد. داروی ۵ـآزاسیتیدین و دیگر مواد لازم از قبیل؛ نمک زرد رنگ تترازولیوم (MTT)[5]، تریپسین(trypsin-EDTA)[6]، محیط کشت(DMEM)، انکسین V (Annexin V)[7] و پروپیدیوم آیودید(PI)[8] و کیت بیان ژن(کیت استخراج آر ان آ) از شرکت سیگما(Sigma) خریداری شد.

ابتدا سلول‌ها کشت داده شدند و پس از این که همپوشانی سلول‌ها به حدود ۸۰ درصد رسید، سلول‌ها را با تریپسین جمع‌آوری و پس از شستشو، در پلیت‌های ۹۶ خانه کشت داده شدند. پس از ۲۴ ساعت، محیط کشت با محیط حاوی داروی ۵ ــ آزا سیتیدین با غلظت‌های مختلف(۱، ۲/۵، ۵، ۷/۵، ۱۰ و ۲۰ میکرومول) تعویض شد و سلول‌ها با این دارو درمان شدند(به جز گروه کنترل که DMSO دریافت کردند). ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از درمان، سلول‌ها با PBS شستشو و سپس محلول MTT برای مدت ۴ ساعت اضافه شد، پس از ۴ ساعت، کریستال‌های رنگی ایجاد شده با DMSO حل کرده و میزان رنگ ایجاد شده با طول موج ۵۷۰ مورد بررسی قرار گرفت و برای اطمینان بیشتر هر آزمایش ۳ بار تکرار شد.

برای تعیین آپوپتوز سلولی، سلول‌ها در پلیت‌های ۲۴ خانه با داروی ۵ ـ آزا سیتیدین با غلظت ۵ میکرومول کشت داده شدند(به جز گروه کنترل که DMSO دریافت کردند) و پس از گذشت ۲۴ و ۴۸ ساعت با محلول حاوی ۵ ـ آزا سیتیدین درمان شدند. در ادامه پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت تمام سلول ها با استفاده از تریپسین جمع‌آوری و با محلول PBS شستشو داده شدند و سپس با آنکسین و پروپیدیوم

1- Cell Bank of Iran-Pasteur Institute
2- Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)
3-Fetal Bovine Serum(FBS)
4-Penicillin G Sodium, Streptomycin Sulfate and Amphotericin B
5-3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)
6-Trypsin-EDTA Solution (trypsin-EDTA)
7- Annexin-V-(FITC)
8-Propidium Iodide(PI)

آیودید رنگ‌آمیزی انجام گردید و سلول‌های آپوپتوتک با دستگاه FACScanTM flow cytometer شمارش شد.

سلول های سرطانی ریه رده A549 در پلیت‌های ۲۴ خانه کشت داده شده و با داروی ۵ ــ آزاسیتیدین(۵ میکرومول) برای مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت درمان شدند و پس از درمان سلول‌ها، تمام RNA سلول‌ها به وسیله کیت RNeasy mini kit طبق پروتکل مربوطه استخراج و به منظور حذف DNA ژنومی، RNA به دست آمده با کیت RNase-free DNase درمان شد. غلظت RNA با استفاده از دستگاه بیوفتومتر(BioPhotometer) تعیین گردید و 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 داخلی استفاده شد.

مراحل واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز(PCR) با تکرارپذیری ۴۰ سیکل به صورت ذیل انجام شد؛ مرحله واسرشته سازی(Denaturation): شامل گرم کردن به میزان ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه، مرحله اتصال(Annealing): این واکنش در دمای ۵۸ درجه سانتی‌گراد برای مدت ۱۵ ثانیه انجام شد، و مرحله گسترش(Extension) این مرحله در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه انجام شد.

نتایج بیان ژن از طریق فرمول دلتا سی‌تی (ΔΔCt) محاسبه گردید و توالی پرایمر های استفاده شده(۱۴-۱۲) در جدول ۱ مشخص شده است.

داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزار گراف پد پریسم ۸ (GraphPad Software) و آزمون‌های آماری آنالیز واریانس یک طرفه و تی تست تجزیه و تحلیل شدند.

جدول۱: توالی پرایمرهای استفاده شده و رفرنس های مربوطه

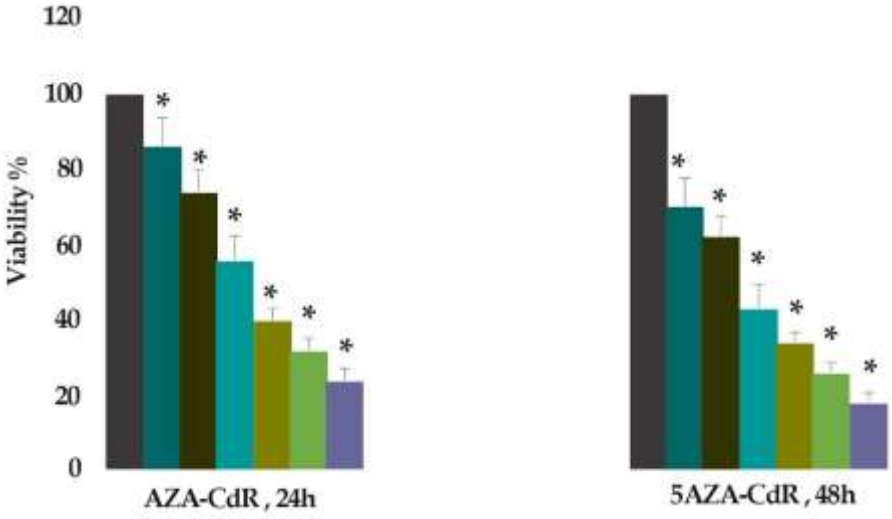
Primer	Primer sequences (5' to 3')	Reference
DNMT1		۱۶
Forward	GAG GAA GCT GCT AAG GAC TAG TTC	
Reverse	ACT CCA CAA TTT GAT CAC TAA ATC	
DNMT3a		۱۶
Forward	GGA GGC TGA GAA GAA AGC CAA GGT	
Reverse	TTT GCC GTC TCC GAA CCA CAT GAC	
DNMT3b		۱۶
Forward	TAC ACA GAC GTG TCC AAC ATG GGC	
Reverse	GGA TGC CTT CAG GAA TCA CAC CTC	
$p14^{ARF}$		۱۷
Forward	GTGGGTTTTAGTTTGTAGTT	
Reverse	AAACCTTTCCTACCTAATCT	
p15INK4b		۱۷
Forward	AAGCTGAGCCCAGGT CTCCTA	
Reverse	CCACCGTTGGCCGTAAACT	
p16INK4a		۱۷
Forward	CCCGCTTTCGTAGTTTTCAT	
Reverse	TTATTTGAGCTTTGGTTCTG	
GAPDH		۱۸
Forward:	AAC GTG TCA GTO GTG GAC CTG	
Reverse:	GGG TGT CGC TGT FGA AGT	

یافته‌ها

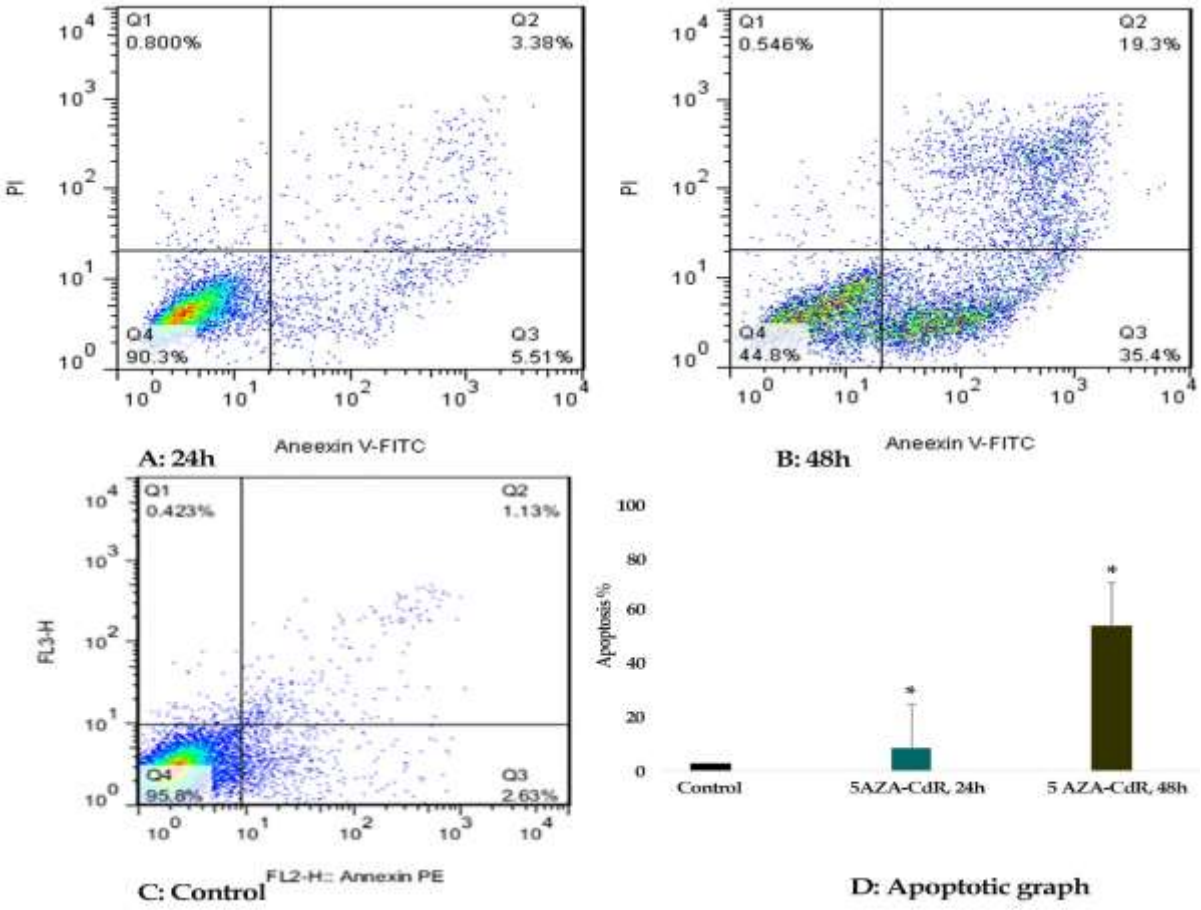
نتایج نشان داد اثر داروی ۵ ـ آزا سیتیدین بر میزان زنده بودن سلول به وسیله تکنیک MTT مورد بررسی قرار گرفت. همچنان که در شکل ۱ مشخص شده است این ترکیب با تمام غلظت‌های استفاده شده به صورت وابسته به دوز و زمان توانست رشد سلولی را به صورت معنی‌داری مهار کند(p<۰/۰۰۱). دوز مؤثر این دارو که توانست رشد ۵۰ درصد سلول‌ها را مهار کند ۵ میکرومول بود.

برای تعیین سلول‌های آپوپتوتیک، سلول‌ها با داروی ۵ ـ آزا سیتیدین درمان شدند. پس از درمان با استفاده از رنگ‌آمیزی آنکسین و پروپیدیوم آیدید میزان سلول‌های آپوپتوتیک مشخص شد. همچنان که در شکل ۲ نشان داده شده است این ترکیب به طور معنی‌داری باعث ایجاد اپوپتوز شد(p<۰/۰۰۱). اثر این ترکیب بر روی آپوپتوز به صورت وابسته به زمان بود. درصد سلول‌های آپوپتوتیک پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت به ترتیب ۸/۸۹ و ۵۴/۷ بود(p<۰/۰۰۱). حداکثر میزان آپوپتوز پس از ۴۸ ساعت مشاهده شد.

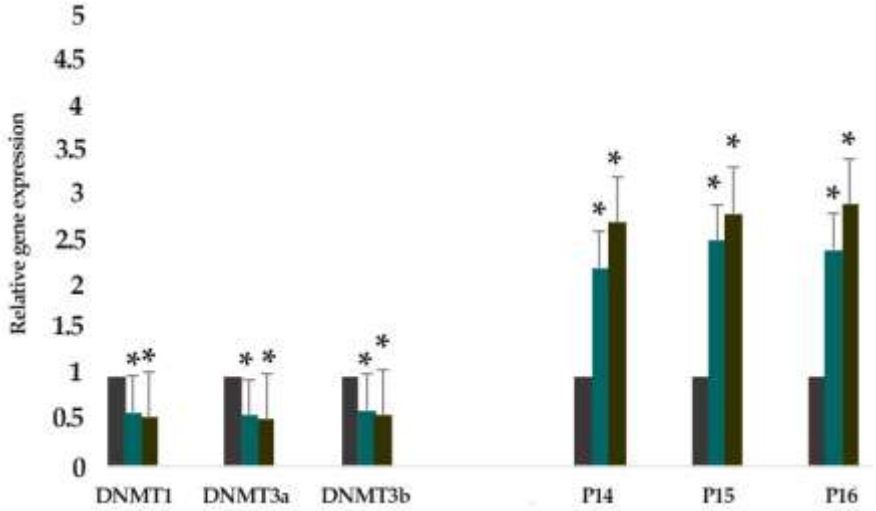
نتیجه تعیین بیان ژن نشان داد که داروی ۵ ـ آزا سیتیدین(۵ میکرومول) می‌تواند به صورت معنی‌داری باعث کاهش بیان ژن‌های دی‌ان‌آ متیل‌ترانس فراز(DNMT1, DNMT3A, and DNMT3B) و افزایش ژن‌های مهار کننده‌های کینازهای وابسته به سیکلین(p14ARF, p16INK4a, and p15INK4b) شود(شکل ۳)(جدول۲).



شکل ۱: نتیجه تعیین سلول‌های زنده در سرطان ریه رده سلولی A549 با داروی ۵ ـ آزا سیتیدین با غلظت‌های مختلف (۱، ۲/۵، ۵، ۷/۵، ۱۰ و ۲۰ میکرومول) درمان شده بودند، علامت ستاره‌دار تفاوت معنی دار گروه‌های درمان شده با دارو در مقایسه با گروه کنترل را نشان می‌دهد(p<۰/۰۰۱)



شکل۲: نتیجه تعیین سلول های آپوپتوتیک در سرطان ریه رده سلولی A549 که با داروی ۵ ـ آزا سیتیدین(۵ میکرومول) درمان شدند.
علامت ستاره تفاوت معنی‌دار گروه‌های درمان شده با دارو در مقایسه با گروه کنترل نشان می‌دهد(p<۰/۰۰۱)



شکل ۳: نتیجه تعیین بیان ژن های DNMT1, DNMT3A, DNMT3B, p14ARF, p16INK4a, and p15INK4b در سرطان ریه رده سلولی A549 که با داروی ۵ ـ آزا سیتیدین(۵ میکرومول) درمان شدند. نتیجه تعیین بیان ژن نشان داد که داروی ۵ ـ آزا سیتیدین(۵ میکرومول) می‌تواند به صورت معنی‌داری باعث کاهش بیان ژن‌های دی‌ان‌آ متیل ترانس‌فراز (DNMT1, DNMT3A, and DNMT3B) و افزایش ژن‌های مهار کننده های کیناز های وابسته به سیکلین(p14ARF, p16INK4a, and p15INK4b) شود. علامت ستاره تفاوت معنی‌دار گروه‌های درمان شده با دارو در مقایسه با گروه کنترل را نشان می دهد(p<۰/۰۰۱)

جدول۲: اثر داروی ۵ ـ آزا سیتیدین(۵ میکرومول بر روی بیان ژن های DNMT1, DNMT3A, DNMT3B, p14ARF, p16INK4a, and p15INK4b) در رده سلولی A549.

Cell line	Gene	Drug	Dose (μM)	Duration (h)	Expression	P-value
A549	DNMT1	5-AZA-CdR	5	24	0.6	0.001
A549	DNMT1	5-AZA-CdR	5	48	0.54	0.001
A549	DNMT3a	5-AZA-CdR	5	24	0.56	0.001
A549	DNMT3a	5-AZA-CdR	5	48	0.52	0.001
A549	DNMT3b	5-AZA-CdR	5	24	0.62	0.001
A549	DNMT3b	5-AZA-CdR	5	48	0.57	0.001
A549	p14ARF	5-AZA-CdR	5	24	2.2	0.001
A549	p14ARF	5-AZA-CdR	5	48	2.7	0.001
A549	p15INK4b	5-AZA-CdR	5	24	2.5	0.001
A549	p15INK4b	5-AZA-CdR	5	48	2.8	0.001
A549	p16INK4a	5-AZA-CdR	5	24	2.4	0.001
A549	p16INK4a	5-AZA-CdR	5	48	2.9	0.001

بحث

اپی‌ژنتیک همراه با مکانیسم‌های ژنتیک، برای تکامل طبیعی و حفظ و بیان ژن‌ها در پستانداران ضروری است. تغییرات اپی‌ژنتیک، بر خلاف تغییرات ژنتیک غیر ارثی و قابل برگشت هستند. پژوهش‌های اخیر نقش تغییرات اپی‌ژنتیک در ایجاد سرطان در بافت‌های مختلف را اثبات کرده است(۱۹). اختلالات اپی‌ژنتیک باعث اختلال در بیان ژن و باعث خاموش شدن ژن می‌گردد. چنانچه این اختلالات در ژن‌های سرکوب کننده سرطان رخ دهد باعث القاء سرطان و تومورزایی می‌گردد(۲۰). لذا سرطان می‌تواند به وسیله تغییرات ژنتیک و اپی‌ژنتیک ایجاد شود. تغییرات اپی‌ژنتیک از قبیل متیلاسیون و دِاستیلاسیون می‌توانند باعث خاموش شدن ژن‌های سرکوب کننده سرطان و در نتیجه ایجاد سرطان شوند(۲۲ و ۲۱).

مهارکننده‌های آنزیم‌های DNA متیل ترانس فراز از قبیل ۵ ــ آزا سیتیدین می‌توانند باعث بیان مجدد ژن‌های سرکوب کننده توموری خاموش شده شوند(۲۳). در این مطالعه حاضر نشان دادیم که داروی ۵ ــ آزا سیتیدین می تواند باعث کاهش بیان ژن‌های DNA متیل ترانس فراز (DNMT1, DNMT3A, DNMT3B)، افزایش بیان ژن‌های سرکوب کننده سرطان (p14ARF, p16INK4a, and p15INK4b)، مهار رشد سلولی و ایجاد آپوپتوز گردد.

پژوهش‌های قبلی ما نشان داد که داروی ۵ ـ آزا سیتیدین باعث کاهش بیان آنزیم DNA متیل ترانس فراز و افزایش بیان ژن مهار کننده توموری P16 در سرطان کولون می‌شود و از این طریق باعث مهار رشد سلولی و القاء آپوپتوز می‌شود(۱۶).

مشابه نتایج حاضر، دیگر پژوهش‌ها نشان داده‌اند که این ترکیب می‌تواند با مهار فعالیت آنزیم‌های DNA متیل ترانس فراز باعث ایجاد آپوپتوز در سلول‌های سرطانی ریه شود(۲۴). اثر مشابهی به

وسیله دیگر محققان از این دارو بر دیگر سرطان ها گزارش شده است. گزارش شده است که این دارو با مهار آنزیم های DNA متیل ترانس فراز باعث ایجاد آپوپتوز در سرطان کولون رده سلولی HT-116 می‌شود (۲۵). در سرطان معده نیز گزارش شده است که این دارو با مهار آنزیم های مزبور باعث ایجاد آپوپتوز و مهار رشد سلولی در رده‌های سلولی KATO-III ,OCUM-12 ,OCUM-2M و MKN-74 می‌شود(۲۶). مشابه یافته‌های ما، دیگر محققان گزارش کرده‌اند که داروی ۵ ـ آزا سیتیدین باعث بیان مجدد ژن‌های P16 در سرطان ریه رده سلولی H 719 و H23 می‌شود(۲۷). پژوهش‌های آزمایشگاهی دیگر نشان داده است که داروی ۵ ـ آزا سیتیدین باعث بیان مجدد ژن P16 و ایجاد آپوپتوز در سرطان ریه رده‌های سلولی Ma-10, H20, Ma-1, H841 می‌شود(۲۸). در سرطان کبد نیز گزارش شده است که این دارو باعث بیان مجدد ژن P16 در رده سلولی HePG2 می‌شود(۲۹). اثر مشابهی از این دارو بر روی رده‌های سلولی HeP3B2 گزارش شده است(۳۰). هم‌چنین گزارش شده است که داروی ۵ ــ آزا سیتیدین باعث بیان مجدد ژن P15 در آدنوکارسینومای ریه می‌شود (۳۱).

باید توجه داشت که ژن‌های INK4 که شامل p14ARF, p15INK4b, p16INK4a, p18INK4c, and p19INK4d می باشد مهارکننده های کینازهای وابسته به سیکلین (cyclin-dependent kinase inhibitors, CKIs) هستند این مهار کننده شامل دو خانواده بزرگ هستند که عبارتند از INK4 و CIP/KIP . اعضای خانواده CIP/KIP (CIP/KIP Family) شامل ژن‌های p21Cip1/Waf1/Sdi1, p27Kip1, and p57Kip2 می‌باشد(۳۲). پژوهش‌های قبلی ما نشان داد که خانواده INK4 تنها مسیر و وسیله اثر بخشی داروهای مهار کننده آنزیم‌های مهارکننده DNA متیل ترانس فراز نیستند. این پژوهش‌ها نشان داد که این داروها می‌توانند باعث بیان مجدد ژن‌های خانواده CIP/KIP و القاء آپوپتوز در سرطان کولون رده سلولی LS 174T شوند(۳۳). هم‌چنین ما گزارش کردیم که داروی مهار کننده آنزیم DNA متیل ترانس فراز (زبولارین) می‌تواند باعث بیان مجدد ژن‌های خانواده CIP/KIP و القاء آپوپتوز در سلول‌های سرطانی کولون رده LS 180 گردد(۳۴). دیگر محققان نیز گزارش کرده‌اند که داروی ۵ ــ آزا سیتیدین از طریق بیان مجدد ژن‌های خانواده CIP/KIP باعث القاء آپوپتوز در سلول‌های سرطانی پانکراس رده سلولی CFPAC1 می‌شود(۳۵). در این تحقیق به علت محدودیت بودجه ما نتوانستیم بررسی پروتئینی مربوط به ژن‌های p14ARF, p16INK4a و p15INK4b انجام دهیم، بنابراین بررسی سطح پروتئنی این ژن‌ها پیشنهاد می‌گردد.

در مجموع پژوهش‌های حاضر نشان داد که داروهای مهار کننده آنزیم های DNA متیل ترانس فراز قادرند با مهار آنزیم‌های DNA متیل ترانس فراز (DNMT1, DNMT3A, and DNMT3B)، باعث بیان مجدد ژن‌های سرکوب کننده توموری خاموش شده از قبیل p14ARF, p16INK4a, and p15INK4b گردند و از این

طریق باعث مهار رشد سلول‌های سرطانی و ایجاد آپوپتوز شوند.

در تحقیق حاضر به علت محدودیت بودجه مالی قادر به بررسی سطح پروتئینی ژن‌های مربوطه نبودیم. پیشنهاد می‌گردد اثر این ترکیب بر روی دیگر رده‌های سلولی سرطان ریه مورد بررسی قرار گیرد.

نتیجه‌گیری

داروی ۵ ـ آزا سیتیدین می تواند به عنوان یک داروی دمتیله کننده عمل کند و با مهار کاهش بیان ژن‌های DNMT1, DNMT3A, and DNMT3B، باعث دمتیلاسیون ژن‌های p14ARF, p16INK4a, and p15INK4b و بیان مجدد این ژن‌ها گردد و از این طریق باعث مهار رشد سلولی و ایجاد آپوپتوز در سلول‌های سرطانی ریه شود، بنابراین نتیجه این تحقیق می‌تواند زمینه لازم برای انجام یک سلسله پژوهش‌ها در خصوص بررسی اثر دیگر اعضاء مهارکننده‌های DNA متیل ترانس فراز برروی بیان ژن‌های مزبور و دیگر ژن‌های سرکوب کننده سرطان در سرطان‌های مختلف فراهم کند.

تقدیر و تشکر

این مقاله برگرفته از پایان‌نامه دوره دکتری رشته پزشکی با کد اخلاق IR.JUMS.REC.1398.109 دانشگاه علوم پزشکی جهرم می‌باشد، که با حمایت مالی این دانشگاه انجام شد.

REFERENCES

1.Han F, Liu W, Jiang X, Shi X, Yin L, Ao L, et al. SOX30, a novel epigenetic silenced tumor suppressor, promotes tumor cell apoptosis by transcriptional activating p53 in lung cancer. Oncogene 2015; 34(33): 4391-402.
2.Ushijima T. Epigenetic field for cancerization. Journal of Biochemistry and Molecular Biology 2007; 40(2): 142-50.
3.Suzuki H, Maruyama R, Yamamoto E, Kai M. DNA methylation and microRNA dysregulation in cancer. Mol Oncol 2012; 6(6): 567-78.
4.Castro M, Grau L, Puerta P, Gimenez L, Venditti J, Quadrelli S, et al. Multiplexed methylation profiles of tumor suppressor genes and clinical outcome in lung cancer. J Transl Med 2010; 8(1): 86.
5.Paz MF, Fraga MF, Avila S, Guo M, Pollan M, Herman JG, Esteller M. A systematic profile of DNA methylation in human cancer cell lines. Cancer Res 2003; 63(5): 1114-21.
6. Fehrenbach U, Kayser G. Epigenetics in lung cancer: What do DNA-methyltransferases do? Diagn Pathol 2017;3(1): 33-38.
7.Venturelli S, Berger A, Weiland T, Essmann F, Waibel M, Nuebling T, et al. Differential induction of apoptosis and senescence by the DNA methyltransferase inhibitors 5-azacytidine and 5-aza-2′-deoxycytidine in solid tumor cells. Mol Cancer Ther 2013; 12(10): 2226-36.
8.Karahoca M, Momparler RL. Pharmacokinetic and pharmacodynamic analysis of 5-aza-2'-deoxycytidine (decitabine) in the design of its dose-schedule for cancer therapy. Clin Epigenetics 2013; 5(1): 3.
9.Sanaei M, Kavoosi F, Esmi Z. The effect of 5-aza-2′-deoxycytidine in combination to and in comparison with vorinostat on dna methyltransferases, histone deacetylase 1, glutathione s-transferase 1 and suppressor of cytokine signaling 1 genes expression, cell growth inhibition and apoptotic induction in hepatocellular lcl-pi 11 cell line. International Journal of Hematology-Oncology and Stem Cell Research 2020; 14(1) :45-52
10.Sanaei M, Kavoosi 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; 9: 83-90.
11.Sanaei M, Kavoosi 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: 52-59
12.Neureiter D, Zopf S, Leu T, Dietze O, Hauser-Kronberger C, Hahn EG, et al. Apoptosis, proliferation and differentiation patterns are influenced by Zebularine and SAHA in pancreatic cancer models. Scandinavian Journal of Gastroenterology 2007; 42(1): 103-16.
13.Balch C, Yan P, Craft T, Young S, Skalnik DG, Huang TH, et al. Antimitogenic and chemosensitizing effects of the methylation inhibitor zebularine in ovarian cancer. Molecular cancer therapeutics. 2005;4(10):1505-1514.
14.Yu J, Peng Y, Wu L-C, Xie Z, Deng Y, Hughes T, et al. Curcumin down-regulates DNA methyltransferase 1 and plays an anti-leukemic role in acute myeloid leukemia. PloS One 2013; 8(2): 55934-9.
15.Akram M, Shahab-Uddin AA, Usmanghani K, Hannan A, Mohiuddin E, Asif M. Curcuma longa and curcumin: a review article. Rom J Biol Plant Biol 2010; 55(2): 65-70.
16.Sanaei M, Kavoosi F, Roustazadeh A, Golestan F. Effect of genistein in comparison with trichostatin a on reactivation of DNMTs genes in hepatocellular carcinoma. Journal of Clinical and Translational Hepatology 2018; 6(2): 141-7.
17.Sanaei M, Kavoosi F, Mohammadi M, Khanezad M. Effect of 5-aza-2′-deoxycytidine on p16INK4a, p14ARF, p15INK4b Genes Expression, Cell Viability, and Apoptosis in PLC/PRF5 and MIA Paca-2 Cell Lines. Iranian Journal of Pediatric Hematology and Oncology 2019; 9(4): 219-28.
18.Sanaei M, Kavoosi F. Effect of curcumin and trichostatin a on the expression of DNA methyltransfrase 1 in hepatocellular carcinoma cell line hepa 1-6. Iranian Journal of Pediatric Hematology and Oncology 2018; 8(4): 193-201.
19.Fardi M, Solali S, Hagh MF. Epigenetic mechanisms as a new approach in cancer treatment: An updated review. Genes & Diseases 2018; 5(4): 304-11.

20.Raynal NJ-M, Lee JT, Wang Y, Beaudry A, Madireddi P, Garriga J, et al. Targeting calcium signaling induces epigenetic reactivation of tumor suppressor genes in cancer. Cancer Research 2016; 76(6): 1494-1505.
21.Leu YW, Rahmatpanah F, Shi H, Wei SH, Liu JC, Yan PS, et al. Double RNA interference of DNMT3b and DNMT1 enhances DNA demethylation and gene reactivation. Cancer Res 2003; 63(19): 6110-5.
22.Lin CH, Hsieh SY, Sheen IS, Lee WC, Chen TC, Shyu WC, et al. Genome-wide hypomethylation in hepatocellular carcinogenesis. Cancer Res 2001; 61(10): 4238-43.
23. Subramaniam D, Thombre R, Dhar A, Anant S. DNA methyltransferases: a novel target for prevention and therapy. Front Oncol 2014; 4: 80.
24. Belinsky SA, Klinge DM, Stidley CA, Issa JP, Herman JG, March TH, et al. Inhibition of DNA methylation and histone deacetylation prevents murine lung cancer. Cancer Res 2003; 63(21): 7089-93.
25. Schneider-Stock R, Diab-Assef M, Rohrbeck A, Foltzer-Jourdainne C, Boltze C, Hartig R, et al. RETRACTION: 5-aza-Cytidine is a potent inhibitor of DNA methyltransferase 3a and induces apoptosis in HCT-116 colon cancer cells via Gadd45-and p53-dependent mechanisms. J Pharmacol Exp Ther 2005; 312(2): 525-36.
26.Qiu H, Yashiro M, Shinto O, Matsuzaki T, Hirakawa K. DNA methyltransferase inhibitor 5-aza-CdR enhances the radiosensitivity of gastric cancer cells. Cancer Sci 2009; 100(1): 181-8.
27.Zhu W-G, Dai Z, Ding H, Srinivasan K, Hall J, Duan W, et al. Increased expression of unmethylated CDKN2D by 5-aza-2′-deoxycytidine in human lung cancer cells. Oncogene 2001;20(53):7787-7796.
28.Miki K, Shimizu E, Yano S, Tani K, Sone S. Demethylation by 5-aza-2′-deoxycytidine (5-azadC) of p16 INK4A gene results in downregulation of vascular endothelial growth factor expression in human lung cancer cell lines. Oncology Research Featuring Preclinical and Clinical Cancer Therapeutics 2001; 12(8): 335-42.
29.Liu LH, Xiao WH, Liu WW. Effect of 5-2Aza-2'-deoxycytidine on the P16 tumor suppressor gene in hepatocellular carcinoma cell line HepG2. World J Gastroenterol 2001; 7(1): 131.
30.Yu Y, Zhang Y, Hu J, Zhang H, Wang S, Han F, et al. MARVELD1 inhibited cell proliferation and enhance chemosensitivity via increasing expression of p53 and p16 in hepatocellular carcinoma. Cancer Sci 2012; 103(4): 716-22.
31.Liu K, Huang W, Gao W, He W. Effect of combined 5-aza-2'deoxycytidine and cisplatin treatment on the P15 lung adenocarcinoma cell line. Oncol Lett 2015; 9(5): 2007-12.
32.Chim C, Fung T, Wong K, Lau J, Law M, Liang R. Methylation of INK4 and CIP/KIP families of cyclin-dependent kinase inhibitor in chronic lymphocytic leukaemia in Chinese patients. J Clin Pathol 2006; 59(9): 921-6.
33.Sanaei M, Kavoosi F. Effect of Zebularine in comparison to and in combination with trichostatin a on CIP/KIP Family (p21Cip1/Waf1/Sdi1, p27Kip1, and p57Kip2), DNMTs (DNMT1, DNMT3a, and DNMT3b), Class I HDACs (HDACs 1, 2, 3) and Class II HDACs (HDACs 4, 5, 6) Gene Expression, Cell Growth Inhibition and Apoptosis Induction in Colon Cancer LS 174T Cell Line. APJCP 2020; 21(7): 2131-9.
34.Sanaei M, Kavoosi F. Investigation of the effect of zebularine in comparison to and in combination with trichostatin a on p21cip1/waf1/sdi1, p27kip1, p57kip2, dna methyltransferases and histone deacetylases in colon cancer ls 180 cell line. APJCP 2020; 21(6): 1819-28.
35.Wang X, Wang H, Jiang N, Lu W, Zhang X, Fang J. Effect of inhibition of MEK pathway on 5-aza-deoxycytidine-suppressed pancreatic cancer cell proliferation. Genet Mol Res 2013; 12(4): 5560-73.

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

Original Article

Effect of 5- Azacytidine on the Cell Growth Inhibition and Apoptosis Induction Lung Cancer A549 Cell Line

Sanaei Jahromi M, Kavousi F*

Non-Communicable Diseases Research Center, Jahrom University of Medical Sciences, Jahrom, Iran

Received: 01 Apr 2020 Accepted: 01 Oct 2020

Abstract

Background & aim: Lung cancer is one of the most important causes of cancer death. Epigenetic changes include; DNA methylation, histone distillation, and microRNA can lead to the silencing of cancer-suppressing genes, resulting in cancer. The aim of this study was to determine the effect of 5-azacitidine on lung cancer.

Methods: The present laboratory study was conducted in 2019. 300,000 cells were selected for each experimental group. Lung cancer cells of class A549 were treated with 5-azacitidine and the cell viability; apoptotic cells and gene expression were evaluated by MTT, flow cytometry and PCR, respectively. Data were analyzed using one-way ANOVA and t-test.

Results: The results indicated that 5-aza cytidine significantly inhibited cell growth, induced apoptosis, decreased expression of methyltransferase DNA genes (DNMT1, DNMT3A and DNMT3B) and increased expression of pKA kinase inhibitors of pK4, pK4-dependent kin of pIN-14.

Conclusion: 5-Azacitidine could increase the expression of tumor-inhibiting genes and induce apoptosis in lung cancer cells by inhibiting the expression of methyltransferase genes. The percentage of apoptotic cells after 24 and 48 hours was 8.89 and 54.7, respectively ($p < 0.001$). The maximum rate of apoptosis was observed after 48 hours.

Keywords: 5-AZA-CdR, DNA methyltransferases, Tumor suppressor genes, Lung cancer

***Corresponding author: Kavousi F**, Non-Communicable Diseases Research Center, Jahrom University of Medical Sciences, Jahrom, Iran
Email: kavoosifraidoon@gmail.com

Please cite this article as follows:
Sanaei Jahromi M, Kavousi F. Effect of 5- Azacytidine on the Cell Growth Inhibition and Apoptosis Induction Lung Cancer A549 Cell Line. Armaghane-danesh 2020; 25(5): 630-641.