

ارزیابی تغییرات بیان ژن‌های مسیر میتوکندریایی آپوپتوز و چرخه سلولی در سلول‌های AsPC-1 تیمار شده با فلوراوراسیل

نگار خراسانی^۱، جواد بهارآرا^۲ و خدیجه نژاد شاهرخ آبادی^۱

^۱گروه زیست شناسی، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران؛ ^۲گروه زیست شناسی و مرکز تحقیقات بیولوژی کاربردی تکوین جانوری، واحد مشهد،

دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران

مسئول مکاتبات: جواد بهارآرا، baharara@mshdiau.ac.ir

چکیده. سرطان پانکراس یکی از کشنده‌ترین و تهاجمی‌ترین سرطان‌ها است؛ فلوراوراسیل باعث توقف در چرخه سلولی و القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی می‌شود. در مطالعه حاضر اثر فلوراوراسیل بر مراحل مختلف چرخه سلولی و بیان ژن‌های درگیر در مسیر درونی آپوپتوز در رده سلولی AsPC-1 (سرطان پانکراس انسانی)، بررسی شده است. در این پژوهش تجربی-آزمایشگاهی برای بررسی اثر سمیت فلوراوراسیل بر روی تکثیر سلول‌های AsPC-1 از آزمون MTT استفاده شد؛ نوع مرگ سلولی القا شده و تغییرات در چرخه سلولی به روش فلوسایتومتری بررسی شد؛ تغییرات در سطح بیان ژن‌های (BAX, Bcl-2, APAF-1, Caspase-3, Caspase-9, p53, p21) با تکنیک Real-time PCR ارزیابی شد. داده‌های کمی حاصل در سطح معنی‌داری ($p < 0.05$) تحلیل گردید. یافته‌های حاصل از آزمون MTT نشان داد که فلوراوراسیل به صورت وابسته به غلظت باعث کاهش تکثیر سلول‌های AsPC-1 می‌شود، نتایج آنالیز فلوسایتومتری نشان دهنده افزایش درصد سلول‌های آپوپتوتیک در سلول‌های تحت تیمار بود؛ فلوراوراسیل در سلول‌های AsPC-1 سبب توقف چرخه سلولی در مرحله S و کاهش جمعیت سلولی در فاز G1 شد. بررسی نتایج Real-time PCR در سلول‌های تیمار شده، نشان دهنده افزایش بیان ژن‌های مسیر میتوکندریایی آپوپتوز و همچنین ژن‌های موثر در تنظیم چرخه سلولی بود. فلوراوراسیل باعث کاهش تکثیر سلولی و القای آپوپتوز از طریق افزایش بیان ژن‌های دخیل در مسیر درونی آپوپتوز در سلول‌های AsPC-1 می‌شود، همچنین فلوراوراسیل با تنظیم ژن‌های (p53 و p21) سبب توقف چرخه سلولی در این سلول‌ها می‌شود.

واژه‌های کلیدی. تکثیر سلولی، تکنیک Real-time PCR، سرطان پانکراس، فلوسایتومتری

Evaluation of genes expression changes in the mitochondrial pathway of apoptosis and cell cycle in AsPC-1 cells treated with Fluorouracil

Negar Khorasani¹, Javad Baharara² & Khadijeh Nejad Shahrokhbabadi¹

¹Department of Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran; ²Department of Biology & Research Center for Animal Development Applied Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran
Correspondent author: Javad Baharara, baharara@mshdiau.ac.ir

Abstract. Pancreatic cancer is one of the most deadly and aggressive cancers; Fluorouracil induces apoptosis and cell cycle arrest in cancer cells. In the present study; the effect of Fluorouracil on different stages of the cell cycle and the expression of genes involved in the internal pathway of apoptosis in the AsPC-1 cell line (human pancreatic cancer) were investigated. In order to do so, MTT assay was used to evaluate the cytotoxic effect of Fluorouracil on AsPC-1 cell proliferation; The type of induced cell death and cell cycle changes were investigated by flow cytometry; changes in the expression level of genes (BAX, Bcl-2, APAF-1, Caspase-3, Caspase-9, p53, p21) were examined by Real-time PCR. Quantitative data were analyzed at the significant level of ($p < 0.05$). The MTT assay results showed that Fluorouracil decreased AsPC-1 cell proliferation in a concentration-dependent manner. The results of flow cytometry analysis showed that increased percentage of apoptotic cells in the treated cells; Fluorouracil induces S phase cell cycle arrest in AsPC-1 cells and reduced distribution in the G1 phase. The Real-time PCR results in treated cells showed an increase in the expression of genes in the mitochondrial apoptotic pathway as well as genes effective in regulating the cell cycle. Fluorouracil reduces cell proliferation and induces apoptosis by increasing the expression of genes involved in the Intrinsic apoptotic pathway in AsPC-1 cells; Fluorouracil also caused cell cycle arrest in these cells by regulating the (p53, p21) genes.

Key words. cell proliferation, flow cytometry, pancreatic cancer, real-time PCR

مقدمه

پیریمیدین‌ها عمل می‌کند و به‌عنوان یک آنتی‌متابولیت طبقه‌بندی می‌شود؛ فلوروآوراسیل از طریق ممانعت از سنتز DNA باعث توقف چرخه سلولی و القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی می‌شود؛ فلوروآوراسیل در فاز S چرخه سلولی نیز اختلال ایجاد کرده و تقسیم سلولی را متوقف می‌کند (Vodenkova et al., 2020).

آپوپتوز مهم‌ترین مسیری است که در انواع مختلف سرطان دستخوش تغییر شده است، این مسیر که اهمیت ویژه‌ای در جلوگیری از ایجاد و مهار سرطان دارد توسط سیگنال‌های داخل و خارج سلولی کنترل می‌شود، مسیرهای مرگ سلولی بسته به این که پیام مرگ از چه طریقی به سلول ابلاغ شود، مسیر فعال‌سازی متفاوتی را پیش می‌گیرند؛ اگر پیام‌ها داخلی باشند، اولین اندامک فعال شده میتوکندری خواهد بود و اگر پیام از طریق رسپتورهای سطحی سلولی بیان شود، انتقال پیام از طریق مولکول‌های سازگار کننده به آبشار کاسپازی خواهد رسید (Honardoost et al., 2013)؛ کاسپازها، پروتئازهای ویژه‌ای هستند که در هر دو مسیر آپوپتوزی نقش مرکزی دارند (Cavalcante et al., 2019). کاسپازها بر اساس عملکردشان به دو نوع آغازگر شامل کاسپازهای ۸، ۹ و ۱۰ و اجرایی شامل کاسپازهای ۳، ۶ و ۷ دسته‌بندی می‌شوند؛ مسیر بیرونی آپوپتوز شامل کاسپازهای ۸ و ۱۰ و مسیر داخلی آپوپتوز شامل کاسپاز-۹ می‌باشد که هر دو مسیر همگرا بوده و از کاسپازهای اجرایی استفاده می‌نمایند (Abediankenari et al., 2017; Julien & Wells, 2013). کاسپاز-۹ یک کاسپاز آغازگر در مسیر میتوکندریایی آپوپتوز است که از طریق تجمع یافتن فعال می‌شود و آبشار کاسپازی دیگری را با ایجاد برش و فعال کردن کاسپاز ۳، ۶ و ۷ پایین‌دست خود شروع می‌کند؛ بنابراین کاسپاز-۹، یک مولکول کلیدی در مسیر درونی آپوپتوز است (Li et al., 2017). روند آپوپتوز در اثر فعال شدن آنزیم‌های گروه کاسپاز رخ می‌دهد (Motaharinia & Nabini, 2022)؛ نسبت درون سلولی پروتئین‌های القا کننده آپوپتوز مانند BAX و BAK به پروتئین‌های ضد آپوپتوز مانند Bcl-2 تعیین کننده حساسیت سلول نسبت به آپوپتوز است (Goldar et al., 2015). محرک‌های داخل سلولی مثل آسیب DNA و تنش اکسیداتیو از طریق پروتئین‌های خانواده Bcl-2 که در غشای خارجی میتوکندری قرار دارند، آپوپتوز را القا می‌کنند؛ به نظر می‌رسد که پروتئین‌های خانواده Bcl-2 از طریق ایجاد کانال و نیز مسدود کردن کانال‌های موجود در غشای خارجی میتوکندری، آزاد شدن حد واسط‌های مولکولی آپوپتوزی مهم از میتوکندری را تنظیم می‌کنند (Cavalcante et al., 2019). سلول‌های سرطانی اغلب با بیان بیش از حد یا تثبیت پروتئین‌های خانواده ضد آپوپتوتیک Bcl-2، از

سرطان یکی از جدی‌ترین بیماری‌های قرن است؛ در سال ۲۰۲۰، ۱۹/۳ میلیون مورد جدید ابتلا به سرطان و ۱۰ میلیون مرگ ناشی از سرطان در سراسر جهان گزارش شده است؛ برآورد شده است که گزارش موارد جدید ابتلا به سرطان تا سال ۲۰۴۰ به حدود ۲۸/۴۰ میلیون نفر می‌رسد (Sung et al., 2021). آمار ابتلا به سرطان در ایران رو به افزایش است؛ پیش‌بینی می‌شود تعداد موارد جدید ابتلا به سرطان (به استثنای سرطان پوست) در ایران در سال ۲۰۲۵ نسبت به سال ۲۰۱۶ در حدود ۴۲/۶ درصد افزایش یابد (Farhood et al., 2018; Roshandel et al., 2021).

سرطان پانکراس یکی از تهاجمی‌ترین و بدخیم‌ترین سرطان‌های سیستم گوارشی است؛ در سال ۲۰۲۰ حدود ۴۹۵/۷۷۳ مورد جدید ابتلا به سرطان پانکراس در سراسر جهان گزارش شده است که سرطان پانکراس را در رتبه دوازدهم در بین تمام تومورهای بدخیم قرار می‌دهد؛ همچنین در سال ۲۰۲۰ حدود ۴۶۶/۰۰۳ مورد مرگ ناشی از سرطان پانکراس گزارش شده است، در نتیجه سرطان پانکراس در رتبه هفتم مرگ ناشی از سرطان قرار می‌گیرد (Cai et al., 2021). ایران در میان کشورهای آسیایی از نظر بروز سرطان پانکراس در جایگاه یازدهم قرار دارد و این نوع از سرطان دوازدهمین علت مرگ با عامل سرطان در کشور را به خود اختصاص داده است (Pourshams et al., 2018). روش‌های درمان سرطان پانکراس رزکسیون جراحی (برداشتن قسمتی از پانکراس) همراه با شیمی‌درمانی است (Qiu et al., 2018). تقریباً ۱۰ درصد از بیماران مبتلا به سرطان پانکراس دارای نرخ بقای ۵ سال هستند، اما در کل متوسط میزان بقا در میان مبتلایان به این سرطان در حدود ۶ ماه است؛ عدم موفقیت در درمان سرطان پانکراس عمدتاً به تشخیص ضعیف در مراحل اولیه بیماری، پیشرفت سریع و نتایج ناامیدکننده درمان جراحی مربوط می‌شود (Qiu et al., 2018; Tonini & Zanni, 2021). آدنوکارسینومای مجرای پانکراس شکل غالب سرطان پانکراس است و بیش از ۹۰ درصد موارد بالینی را به خود اختصاص می‌دهد (Hu et al., 2021). پیش‌بینی می‌شود که در سال ۲۰۳۰ آدنوکارسینومای مجرای پانکراس از سرطان سینه و روده بزرگ (سرطان کولون) پیشی بگیرد و به‌عنوان دومین علت مرگ ناشی از سرطان شناخته شود (Park et al., 2021).

فلوروپیریمیدین‌ها مانند ۵-فلوروآوراسیل پایه بسیاری از رژیم‌های شیمی‌درمانی را تشکیل می‌دهند؛ این دارو از طریق ممانعت از عملکرد آنزیم تیمیدیلای سنتتاز عمل می‌کند، ممانعت از فعالیت این آنزیم از ساخته شدن تیمیدین که در فرایند همانندسازی DNA مورد نیاز است، جلوگیری می‌کند؛ این دارو به‌طور اختصاصی به‌صورت آنتاگونیست متابولیسم

Gao et al.,) EBEWE Pharma; Austria) تیمار شدند (۲۰۱۴)؛ بعد گذشت زمان ۲۴ ساعت از تیمار سلول‌ها، مقدار ۱۰ میکرولیتر از محلول (Sigma-Aldrich; USA) MTT به محیط سلول‌ها اضافه شد و پلیت برای مدت ۳ ساعت درون انکوباتور قرار داده شد؛ بعد گذشت این مدت، مایع رویی سلول‌ها خارج و مقدار ۸۰ میکرولیتر دی‌متیل‌سولفوکسید (DMSO) به هر چاهک اضافه شد؛ در نهایت پلیت مربوطه به دستگاه اسپکتروفتومتر منتقل شد و میزان جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۵۷۰ نانومتر قرائت شد (Baharara et al., 2016). درصد سلول‌های زنده توسط فرمول زیر محاسبه شد:

$$100 \times \text{میانگین جذب نمونه کنترل} / \text{میانگین جذب نمونه تیمار} = \text{درصد سلول‌های زنده}$$

آزمون انکسین ۵-پروپیديوم يودايد جهت سنجش آپوپتوز
از این آزمون به منظور تعیین نوع مرگ سلولی استفاده شد؛ جهت انجام این آزمون از کیت (Annexin V-FITC) (Apoptosis Staining; Abcam; UK) استفاده شد؛ برای انجام این آزمون، تعداد 3×10^5 عدد از سلول‌های AsPC-1 در یک پلیت ۶ خانه کشت داده شدند، سپس سلول‌ها با غلظت ۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از فلوروآراسیل تیمار شدند، بعد از گذشت ۲۴ ساعت از تیمار سلول‌ها، محیط رویی هر چاهک به یک میکروتیوپ منتقل شد، سپس سلول‌های باقی‌مانده به کمک آنزیم تریپسین (Bio-IDEA; Iran) جدا و به همان میکروتیوپ انتقال داده شدند و سانتریفوژ انجام گردید، بعد از خارج کردن محیط رویی میکروتیوپ‌ها، طبق پروتکل کیت به هر نمونه ۵۰۰ میکرولیتر Binding Buffer 1X اضافه شد، در ادامه ۵ میکرولیتر انکسین ۵ و ۵ میکرولیتر پروپیديوم يودايد به هر نمونه اضافه شد، نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه شدند؛ در نهایت نمونه‌ها جهت بررسی نوع مرگ سلولی با دستگاه فلوسایتومتری و توسط نرم‌افزار (FlowJo) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

بررسی چرخه سلولی با استفاده از تکنیک فلوسایتومتری
برای بررسی اثر فلوروآراسیل بر مراحل مختلف چرخه سلولی در سلول‌های رده AsPC-1 از کیت (DNA Cell Cycle) (Analysis With PI; Mahboub bioresarch; Iran) استفاده شد؛ مراحل انجام کار به‌طور خلاصه شامل مراحل زیر بود: بعد از کشت و تیمار سلول‌ها (با غلظت ۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از فلوروآراسیل برای مدت ۲۴ ساعت) در پلیت ۶ خانه؛ محیط رویی هر چاهک به یک میکروتیوپ منتقل شد، سپس سلول‌های باقی‌مانده به کمک آنزیم تریپسین (Bio-IDEA; Iran) جدا و به همان میکروتیوپ انتقال داده شدند،

آپوپتوز فرار می‌کنند؛ علاوه‌براین، مکانیسم مشترک دیگری که به بقای سلول سرطانی کمک می‌کند غیرفعال کردن عوامل رونویسی محرک آپوپتوز مانند غیرفعال کردن ژن‌های سرکوبگر تومور (مانند p53) است (Matsuura et al., 2016). ژن p53 اولین ژن شناخته شده به‌عنوان سرکوب کننده تومور، محسوب می‌شود، p53 در بیش از ۵۰ درصد سرطان‌های انسانی دچار جهش می‌شود؛ p53 دارای توانی خاص متصل شونده به DNA است، این پروتئین به‌طور مستقیم با پروتئین‌های سلولی میانکنش می‌دهد و در پاسخ به آسیب DNA باعث توقف چرخه سلولی می‌شود؛ مسیرهای وابسته به p53 توسط حذف سلول آسیب دیده و یا از طریق آپوپتوز و یا توسط متوقف کردن چرخه سلولی، به حفظ پایداری ژنوم کمک می‌کنند (Thomas et al., 2022). تکثیر و سرعت رشد سلولی نرمال به تنظیم دقیق چرخه سلولی وابسته است؛ تنظیم ناقص چرخه سلولی می‌تواند منجر به سرطان‌زایی شود، با توقف آپوپتوز و تسریع چرخه سلولی و تکثیر سلولی، رشد سلول‌ها به‌طور غیرطبیعی افزایش می‌یابد و منجر به ایجاد تومور می‌شود؛ فعالیت ژن‌های سرکوبگر تومور، مانند p53 در تنظیم پیشرفت چرخه سلولی تاثیر می‌گذارد (Engeland, 2022).

با توجه به این که اثر فلوروآراسیل بر بیان ژن‌های موثر در مسیر میتوکندریایی آپوپتوز و چرخه سلولی در رده سلولی AsPC-1 بررسی نشده است؛ در پژوهش حاضر اثر فلوروآراسیل بر چرخه سلولی و میزان بیان ژن‌های مسیر داخلی آپوپتوز در رده سلولی AsPC-1 (دودمان سرطان پانکراس انسانی) مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

تهیه و کشت سلول‌های رده AsPC-1

رده سلولی AsPC-1 متعلق به سرطان پانکراس انسانی از انستیتو پاستور ایران (NCBI Code: C558) تهیه شد و در محیط کشت (Bio-IDEA; Iran) RPMI حاوی ۱۰ درصد FBS (Gibco; USA) و یک درصد آنتی‌بیوتیک (Bio-IDEA; Iran)؛ کشت داده شد.

آزمون MTT جهت بررسی میزان تکثیر سلولی

برای بررسی تاثیر فلوروآراسیل بر روی تکثیر سلول‌های AsPC-1 از آزمون MTT استفاده شد؛ برای این کار ابتدا تعداد 3×10^3 عدد از سلول‌ها؛ بعد از شمارش توسط رنگ‌تریپان بلو (Bio-IDEA; Iran)؛ در یک پلیت ۹۶ خانه کشت داده شد، سپس سلول‌های AsPC-1 با غلظت‌های ۳/۱۲۵، ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از فلوروآراسیل

فلوروووراسیل با غلظت ۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در ۲۴ ساعت منجر به مرگ حدود ۵۰ درصد از سلول‌های سرطانی رده AsPC-1 شده است (شکل ۱).

نتایج تست انکسین ۵-پروپیدیوم یوداید

نتایج آزمون انکسین ۵-پروپیدیوم یوداید نشان داد درحالی‌که درصد زنده بودن سلول‌های گروه کنترل در حدود ۹۳ درصد می‌باشد، این درصد در سلول‌های تیمار شده با فلوروووراسیل با غلظت ۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بعد از گذشت ۲۴ ساعت به حدود ۵۱ درصد کاهش یافته است. در سلول‌های تحت تیمار ۴۴/۹ درصد سلول‌ها دچار آپوپتوز ثانویه شده بودند، ۱/۷۰ درصد سلول‌ها در وضعیت آپوپتوز اولیه بودند و ۱/۹۱ درصد سلول‌ها دچار مرگ نکروتیک شده بودند (شکل ۲).

بررسی تاثیر فلوروووراسیل بر چرخه سلولی

برای ارزیابی اثر فلوروووراسیل بر روی روند چرخه سلولی از روش فلوسایتومتری با رنگ پروپیدیوم یوداید استفاده شد. بررسی نتایج به‌دست‌آمده نشان داد که درصد سلول‌ها در مرحله G1 در گروه کنترل ۷۵/۱ درصد و در گروه تیماری با غلظت ۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از فلوروووراسیل بعد از گذشت ۲۴ ساعت ۵۸/۵ درصد است؛ به‌صورت کلی نتایج آنالیز چرخه سلولی نشان داد که فلوروووراسیل باعث کاهش جمعیت سلولی در مرحله G1 می‌شود، همچنین فلوروووراسیل باعث توقف چرخه سلولی در مرحله S از طریق مسدود سازی و تجمع سلول‌های AsPC-1 در این مرحله می‌شود که این امر نشان دهنده اعمال اثر مهاري فلوروووراسیل در الگوی چرخه سلولی است (شکل ۳).

نتایج بررسی بیان ژن‌ها توسط تکنیک Real-time PCR

همان‌طور که در شکل ۴ مشاهده می‌شود، میزان بیان ژن‌های BAX، APAF-1 و Caspase-9 در سلول‌های AsPC-1 تیمار شده، با غلظت ۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از فلوروووراسیل برای زمان ۲۴ ساعت؛ نسبت به گروه کنترل افزایش و میزان بیان ژن Bcl-2 کاهش داشته است که این امر می‌تواند نشان دهنده القای آپوپتوز از طریق مسیر داخلی در سلول‌های سرطانی رده AsPC-1 باشد؛ سایر نتایج حاصل از تکنیک Real-time PCR نشان دهنده افزایش بیان ژن‌های p53 و p21 در سلول‌های تحت تیمار با فلوروووراسیل بود، این ژن‌ها در تنظیم چرخه سلولی موثر هستند (شکل ۴).

بحث

سرطان پانکراس یکی از عوامل اصلی مرگ ناشی از ابتلا به سرطان در سراسر جهان است و بار جهانی آن در ۲۵ سال گذشته بیش از دو برابر شده است (Klein, 2021).

پس از سانتریفیوژ کردن سلول‌ها و خارج کردن محیط رویی نمونه‌ها، رسوب سلولی ۲ بار با محلول PBS سرد شست‌وشو داده شد؛ در مرحله بعد نمونه‌ها با اتانول ۷۰ درصد تثبیت شدند (Gao et al., 2014) و به مدت یک ساعت در یخچال ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند، بعد از این مدت برای حذف اتانول، نمونه‌ها سانتریفیوژ شدند و بعد از سانتریفیوژ محیط رویی نمونه‌ها خارج شد (Rajabnia et al., 2017)؛ سپس مطابق با پروتکل کیت به هر کدام از نمونه‌ها ۴۰۰ میکرولیتر از محلول پروپیدیوم یوداید و ۴ میکرولیتر از محلول RNase اضافه شد؛ در نهایت نمونه‌ها با دستگاه فلوسایتومتری مورد ارزیابی قرار گرفتند و نتایج حاصل با کمک نرم‌افزار (FlowJo) آنالیز شد.

تکنیک Real-time PCR

جهت انجام تست Real-time PCR ابتدا استخراج RNA طبق پروتکل کیت (Pars tous; Iran) صورت گرفت؛ برای اطمینان از غلظت مناسب RNA استخراج شده، میزان غلظت RNA به‌صورت کمی توسط دستگاه نانودراپ سنجیده شد؛ در ادامه سنتز cDNA طبق پروتکل کیت (Pars tous; Iran) صورت گرفت و در نهایت تغییرات در سطح بیان ژن‌های BAX، APAF-1، Bcl-2، Caspase-3، Caspase-9، p53 و p21 در سلول‌های AsPC-1 تیمار شده با غلظت ۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از فلوروووراسیل برای زمان ۲۴ ساعت؛ بر اساس پرایمرهای طراحی و سنتز شده توسط شرکت فناوری بن یاخته (جدول ۱)، توسط دستگاه (Bio-Rad CFX96 RT-PCRs) و نرم‌افزار (Bio-Rad CFX Manager)؛ برحسب $\Delta\Delta Cq$ بررسی شد.

تجزیه و تحلیل آماری

داده‌های آماری حاصل از این پژوهش تجربی، در نرم‌افزار GraphPad Prism و به کمک آزمون‌های آماری (One-way ANOVA) برای داده‌های حاصل از آزمون MTT و (t-test) برای داده‌های حاصل از تکنیک Real-time PCR؛ در سطح معنی‌داری ($p < 0.05$) تجزیه و تحلیل شدند. نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Excel رسم شده‌اند. برای حصول اطمینان از نتایج این پژوهش تجربی؛ تمام آزمایش‌ها به‌صورت سه بار تکرار انجام شدند.

نتایج

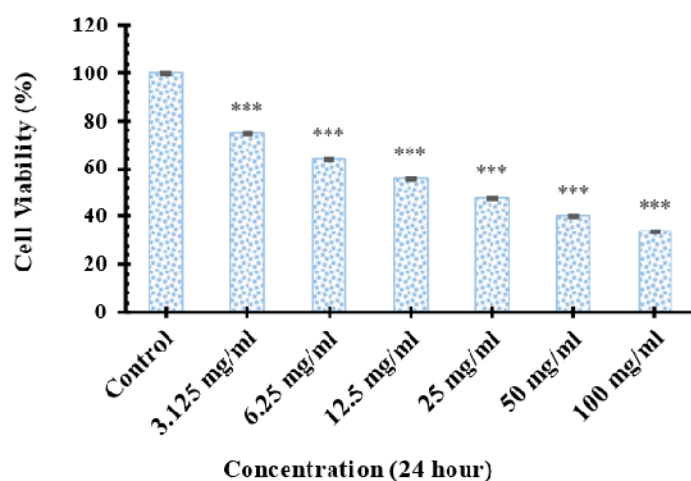
بررسی میزان سمیت سلولی با آزمون MTT

بررسی نتایج حاصل از آزمون MTT نشان داد که فلوروووراسیل به‌صورت وابسته به غلظت منجر به مهار تکثیر سلول‌ها می‌شود؛ با تعیین غلظت مهاري (IC_{50}) مشخص شد که

جدول ۱- توالی پرایمرهای مورد استفاده در تکنیک Real-time PCR.

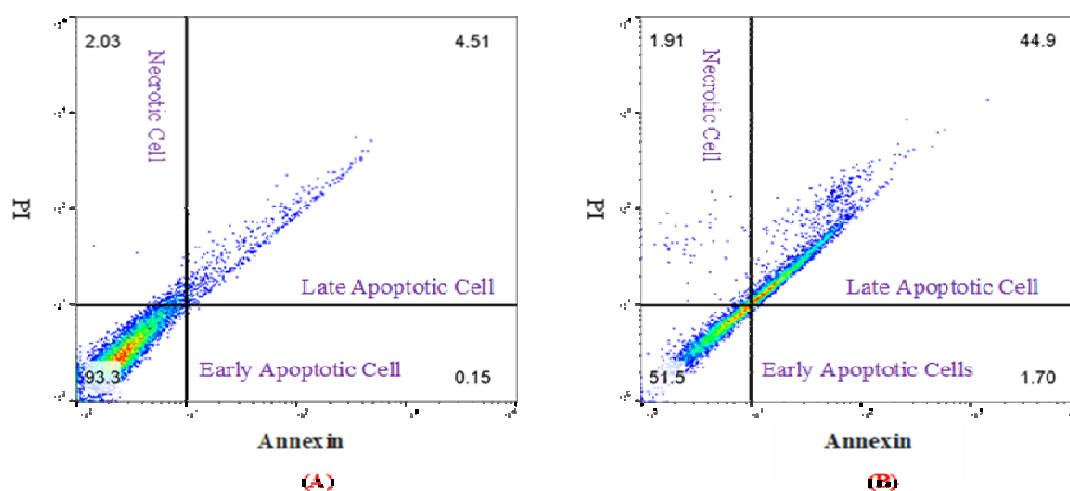
Table 1. Primer sequences for Real-time PCR.

Gene	Reverse	Forward
GAPDH	CTC TCT GCT CCT CCT GTT	ACG ACC AAA TCC GTT GAC
BAX	CAA ACT GGT GCT CAA G	CAC AAA GAT GGT CAC G
Bcl-2	GAT AAC GGA GGC TGG G	CAG GAG AAA TCA AAC AGA
APAF-1	TCA AGA CAT CCT ACA TCA T	AAG TAT CAT TTT AAT CAG CAT A
Caspase-3	TGA TGC GTG ATG TTT CTA A	CAG TTA GAC TTC TAC AAC GAT
Caspase-9	GCC TCC ACTT CCC CT	GGT CCC TCC AGG AAA C
p53	GGA GTA TTT GGA TGA CAG AA	GAT TAC CAC TGG AGT CT
p21	CCA GCA TGA CAG ATT TCT	AGA CAC ACA AAC TGA GAC TAA



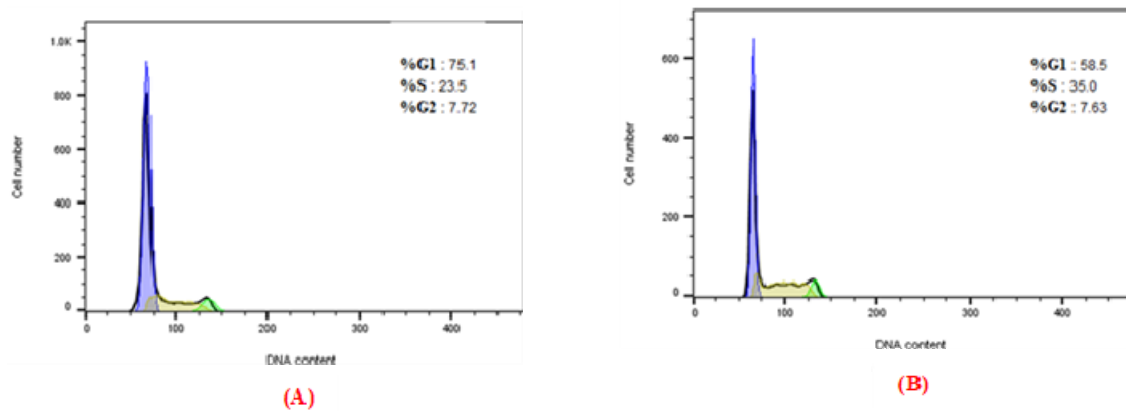
شکل ۱- مقایسه میانگین درصد زنده ماندن سلول‌های گروه کنترل با سلول‌های تحت تیمار با فلورواوراسیل در غلظت‌های مختلف برای زمان ۲۴ ساعت. (***) $p<0.001$.

Figure 1. Comparison of the mean survival percentage of control group cells with cells treated with Fluorouracil at different concentrations in 24 hours. (***) $p<0.001$.

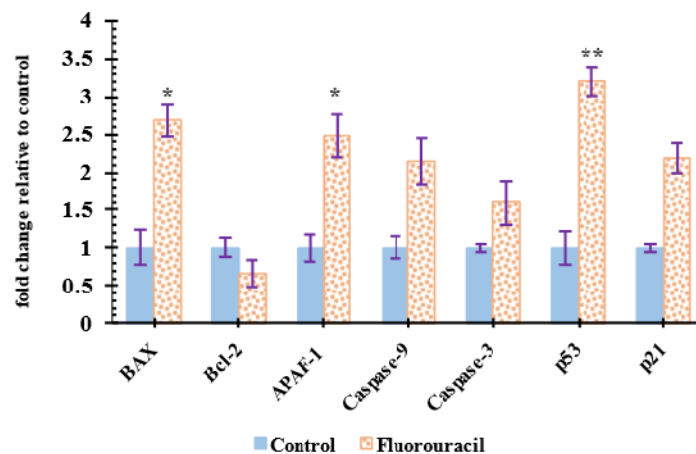


شکل ۲- آنالیز فلوسایتومتری. (A) گروه کنترل، (B) تیمار با غلظت ۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر از فلورواوراسیل.

Figure 2. Flow cytometry analysis. (A) Control group, (B) Treated with a concentration of 25 mg/ml of Fluorouracil.



شکل ۳- آنالیز چرخه سلولی. (A) گروه کنترل، (B) تیمار با غلظت ۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر از فلورواوراسیل.
Figure 3. Cell cycle analysis. (A) Control group, (B) Treated with a concentration of 25 mg/ml of Fluorouracil.



شکل ۴- مقایسه میزان تغییرات در بیان ژن‌ها در گروه کنترل با سلول‌های تیمار شده با غلظت ۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر از فلورواوراسیل توسط Real-time PCR. (* $p < 0.05$) (** $p < 0.01$).

Figure 4. Comparison of changes in genes expression of control group with cells treated with 25 mg/ml Fluorouracil by Real-time PCR. (* $p < 0.05$) (** $p < 0.01$).

نتایج بررسی‌های حاصل از آزمون MTT این پژوهش نشان داد که فلورواوراسیل می‌تواند به صورت وابسته به غلظت میزان بقای سلول‌های سرطانی AsPC-1 را کاهش دهد. در سال ۲۰۱۷، در پژوهشی اثر سه داروی فلورواوراسیل، دوکسوروبیسین و ایرینوتکان بر روی رده سلولی سرطانی HSC-39 (سرطان معده انسانی) بررسی شد؛ نتایج نشان داد که استفاده از فلورواوراسیل به صورت وابسته به غلظت باعث کاهش تکثیر سلولی و القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی رده HSC-39 می‌شود و دو داروی دیگر باعث مرگ سلولی به شیوه نکروز در این سلول‌ها می‌شوند (Tamaki et al., 2017)؛ که با نتایج

فلورواوراسیل در گروه داروهای آنتی‌متابولیت قرار می‌گیرد؛ ساختار فلوروپیریمیدین‌ها مانند ۵-فلورواوراسیل به باز پیریمیدین شباهت دارد و همین امر باعث می‌شود که سلول‌های سرطانی آن را در روند تکثیر خود راه دهند و این امر موجب از بین رفتن ادامه تکثیر سلولی و القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی خواهد شد (Tang et al., 2016). در این پژوهش تجربی-آزمایشگاهی اثر فلورواوراسیل بر تکثیر، تغییرات چرخه سلولی و سطح بیان ژن‌های دخیل در مسیر آپوپتوز درونی یا میتوکندریایی در سلول‌های سرطانی پانکراس انسانی رده AsPC-1 بررسی شده است.

عامل ایجاد ۵۰ تا ۵۵ درصد از سرطان‌های انسانی است؛ p53 با فعال‌سازی میتوکندری و همچنین مسیرهای آپوپتوز ناشی از گیرنده‌های غشایی مرگ که در نهایت هر دو مسیر منجر به القای سیگنالینگ کاسپاز می‌شوند؛ باعث شروع فرایند آپوپتوز می‌شود (Wang et al., 2015)؛ همچنین ژن p53 یک ژن اصلی در چرخه سلولی است، یکی از فعالیت‌های مهم p53 متوقف کردن چرخه سلولی در پاسخ به آسیب DNA است، به‌طوری که تا قبل از دوره بعدی همانندسازی فرصت کافی برای ترمیم آسیب وجود داشته باشد، بنابراین با این مکانیسم، از همانندسازی و انتقال DNA آسیب دیده به سلول‌های دختری جلوگیری و حفاظت از ژنوم تامین خواهد شد (Thomas et al., 2022)؛ مکانیسم مولکولی این پاسخ سلولی، القای رونویسی ژن p21 است، محصول این ژن یعنی پروتئین p21 چندین کمپلکس cyclin-cdk را مهار می‌کند و باعث توقف چرخه سلولی در گذر از فاز G0/G1 به S و G2/M می‌شود، p53 همچنین می‌تواند بیان عوامل ضد آپوپتوز مانند Bcl-2، Bcl-x و IAPها را سرکوب کند (Engeland, 2022; Thomas et al., 2022).

در سال ۲۰۱۶، اثر سیس پلاتین بر روی رده‌های سلولی A549 و H460 (سرطان ریه انسانی) بررسی شد، نتایج نشان داد که سیس پلاتین به‌صورت وابسته به غلظت باعث کاهش تکثیر هر دو رده سلولی سرطانی می‌شود، همچنین بیان شد که تیمار سلول‌های A549 و H460 با سیس پلاتین باعث القای آپوپتوز و افزایش فعالیت کاسپاز-۳ در این سلول‌ها می‌شود (Shi et al., 2016). در سال ۱۳۹۶، اثرات سمیت سلولی و آپوپتوزی داروی اگزالی پلاتین بر روی رده سلولی سرطان کولون (HT-29) و آنالیز بیان ژن‌های کاسپاز-۳ و کاسپاز-۹ مورد بررسی قرار گرفت؛ نتایج نشان داد که اگزالی پلاتین به‌صورت وابسته به غلظت باعث کاهش تکثیر سلول‌های سرطانی می‌شود و همچنین باعث بیان بیشتر ژن‌های آپوپتوزی کاسپاز ۳ و ۹ در گروه‌های تیماری می‌شود (Yonesi, et al., 2017)؛ که با نتایج پژوهش حاضر که نشان دهنده اثر فلوروآوراسیل در تغییر بیان ژن‌های (Caspase-9 و Caspase-3) در سلول‌های AsPC-1 تحت تیمار بود، هم‌خوانی دارد.

نتایج حاصل از تست انکسین ۵-پروپیدوم یوداید پژوهش حاضر نشان دهنده توانایی فلوروآوراسیل در القای آپوپتوز در سلول‌های AsPC-1 تیمار شده با غلظت ۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از فلوروآوراسیل به مدت ۲۴ ساعت بود، آنالیز نمودار حاصل از تکنیک فلوسایتومتری نشان داد درحالی که ۹۳/۳ درصد سلول‌های گروه کنترل زنده هستند، این درصد در گروه تیمار شده با فلوروآوراسیل به ۵۱/۵ درصد کاهش می‌یابد و ۴۶/۶

پژوهش حاضر که نشان دهنده تاثیر وابسته به غلظت فلوروآوراسیل در مهار تکثیر سلول‌های سرطانی پانکراس رده AsPC-1 بود، هم‌راستا است.

نتایج تکنیک Real-time PCR برای بررسی میزان تغییرات در سطح بیان ژن‌های (BAX, APAF-1 و Caspase-9) و همچنین ژن‌های (p53 و p21) نشان دهنده افزایش سطح بیان این ژن‌ها در گروه تیماری با فلوروآوراسیل نسبت به گروه کنترل بود؛ ژن‌های (BAX, Bcl-2, APAF-1 و Caspase-9) از جمله مهم‌ترین ژن‌های القا کننده آپوپتوز از طریق مسیر آپوپتوز داخلی یا میتوکندریایی هستند و ژن‌های (p53 و p21) در کنترل چرخه سلولی موثر هستند. در شرایط پاتولوژیک به‌ویژه سرطان، سلول‌ها توانایی خود را برای مرگ ناشی از آپوپتوز از دست می‌دهند که این امر منجر به تکثیر بی‌رویه سلول‌های سرطانی می‌شود، سلول‌های سرطانی غالباً دارای بیان بیش از حد بسیاری از پروتئین‌هایی هستند که نقش مهمی در مقاومت در برابر فعال شدن آبشار آپوپتوتیک دارند؛ فرار از فرایند طبیعی آپوپتوز ممکن است به توسعه، پیشرفت و همچنین مقاومت به درمان تومور در سلول‌های سرطانی کمک کند، به همین دلیل امروزه بیشتر درمان‌هایی که جهت مقابله با سرطان در دسترس هستند (از قبیل شیمی‌درمانی، رادیوتراپی و ایمونوتراپی)؛ در درجه اول با فعال‌سازی مجدد آپوپتوز در سلول‌های سرطانی در ارتباط هستند (Mohammad et al., 2015). BAX و BAK عوامل اصلی در آپوپتوز میتوکندریایی هستند، BAX و BAK در هسته اصلی مسیر درونی آپوپتوز قرار دارند، این پروتئین‌ها پس از فعال شدن، غشای خارجی میتوکندری را الیگومریزه می‌کنند که این امر باعث آزاد شدن فاکتورهای آپوپتوز در سیتوزول و در نهایت منجر به مرگ سلولی می‌شود (Cosentino & García-Sáez, 2017). کاسپاز-۹ شروع کننده مسیر درونی یا میتوکندریایی آپوپتوز است، این مسیر با آزاد شدن سیتوکروم-سی از میتوکندری آغاز می‌شود و نهایتاً منجر به تشکیل آپوپتوزوم یا کمپلکس فعال کننده کاسپاز می‌شود، کمپلکس آپوپتوزوم از سیتوکروم-سی و پروکاسپاز-۹ تشکیل شده است و در حضور دثوکسی آدنوزین تری فسفات می‌تواند کاسپاز-۹ را فعال کند، پروتئین APAF-1 نیز یک فاکتور کمکی دیگر است که برای فعال‌سازی پروکاسپاز-۹ لازم است (Li et al., 2017)؛ کاسپاز-۹ موجب فعال شدن کاسپاز اجرایی پایین‌دست خود یعنی کاسپاز-۳ می‌گردد که این موارد در نهایت منجر به ایجاد تظاهرات مورفولوژیک مرتبط با آپوپتوز در سلول‌ها می‌شود (Li et al., 2017). ژن سرکوبگر توموری p53 توسط پروتئین TP53 رمزگذاری می‌شود، از دست دادن فعالیت p53

REFERENCES

- Abediankenari, S., Shokrzadeh, M., Aminjan, H.H., Nasri, N. & Alizadeh, A.** 2013. Evaluation of caspase3 and 9 gene polymorphisms in gastric cancer patients in Mazandaran province: a brief report. *Tehran University Medical Journal* 71: 536-540. (In Persian).
- Baharara, J., Amini, E., Afzali, M., Nikdel, N., Mostafapour, A. & Kerachian, M.A.** 2016. Apoptosis inducing capacity of holothuria arenicola in CT26 colon carcinoma cells in vitro and in vivo. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences* 19: 358-365.
- Cai, J., Chen, H., Lu, M., Zhang, Y., Lu, B., You, L., Zhang, T., Dai, M. & Zhao, Y.** 2021. Advances in the epidemiology of pancreatic cancer: Trends, risk factors, screening, and prognosis. *Cancer Letters* 520: 1-11.
- Cavalcante, G.C., Schaan, A.P., Cabral, G.F., Santana-Da-Silva, M.N., Pinto, P., Vidal, A.F. & Ribeiro-Dos-Santos, Â.** 2019. A cell's fate: An overview of the molecular biology and genetics of apoptosis. *International Journal of Molecular Sciences* 20: 1-20.
- Cosentino, K. & García-Sáez, A.J.** 2017. Bax and Bak Pores: Are We Closing the Circle? *Trends in Cell Biology* 27: 266-275.
- Engeland, K.** 2022. Cell cycle regulation: p53-p21-RB signaling. *Cell Death & Differentiation* 29: 946-960.
- Farhood, B., Geraily, G. & Alizadeh, A.** 2018. Incidence and mortality of various cancers in Iran and compare to other countries: A review article. *Iranian Journal of Public Health* 47: 309-316.
- Gao, L., Shen, L., Yu, M., Ni, J., Dong, X., Zhou, Y. & Wu, S.** 2014. Colon cancer cells treated with 5-fluorouracil exhibit changes in polylactosamine-type N-glycans. *Molecular Medicine Reports* 9: 1697-1702.
- Goldar, S., Khaniani, M.S., Derakhshan, S.M. & Baradaran, B.** 2015. Molecular mechanisms of apoptosis and roles in cancer development and treatment. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 16: 2129-2144.
- Honardoost, M., Soleimanjahi, H. & Rajaei, F.** 2013. Apoptosis: programmed cell death. *Journal of Qazvin University of Medical Sciences* 17: 48-57. (In Persian).
- Hu, J.X., Lin, Y.Y., Zhao, C.F., Chen, W.B., Liu, Q.C., Li, Q.W. & Gao, F.** 2021. Pancreatic cancer: A review of epidemiology, trend, and risk factors. *World Journal of Gastroenterology* 27: 4298-4321.
- Julien, O. & Wells, J.A.** 2017. Caspases and their substrates. *Cell Death and Differentiation* 24: 1380-1389.
- Klein, A.P.** 2021. Pancreatic cancer epidemiology: understanding the role of lifestyle and inherited risk factors. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology* 18: 493-502.
- Li, P., Zhou, L., Zhao, T., Liu, X., Zhang, P., Liu, Y., Zheng, X. & Li, Q.** 2017. Caspase-9: Structure, mechanisms and clinical application. *Oncotarget* 8: 23996-24008.
- Matsuura, K., Canfield, K., Feng, W. & Kurokawa, M.** 2016. Metabolic Regulation of Apoptosis in Cancer. *International Review of Cell and Molecular Biology* 327: 43-87.

درصد سلول‌ها دچار آپوپتوز شده‌اند. ارزیابی اثر فلوروووراسیل با روش فلوسایتومتری بر روی چرخه سلولی در سلول‌های AsPC-1 نشان دهنده تغییر در الگوی چرخه سلولی در سلول‌های تحت تیمار با فلوروووراسیل نسبت به گروه کنترل بود؛ به طوری که در گروه تیماری شاهد کاهش جمعیت سلولی در فاز G1 و توقف چرخه سلولی در فاز S بودیم. فلوروووراسیل آنالوگ پیریمیدین‌ها است و از این طریق با متابولیسم نوکلئوتیدی تداخل می‌کند و در RNA و DNA گنجانده می‌شود و در نهایت منجر به توقف چرخه سلولی و آپوپتوز می‌شود، همچنین فلوروووراسیل به عنوان یک آنتی‌متابولیت به طور خاص سلول‌ها را در فاز S چرخه سلولی مسدود می‌کند (Gao et al., 2014).

در سال ۲۰۱۴؛ اثر فلوروووراسیل بر آپوپتوز و چرخه سلولی در سلول‌های سرطانی کولون رده SW620 بررسی شد، نتایج تست‌های آزمایشگاهی نشان داد که تیمار سلول‌ها با فلوروووراسیل منجر به القای آپوپتوز در سلول‌های SW620 می‌شود، همچنین ارزیابی چرخه سلولی نشان دهنده توقف چرخه سلولی و افزایش درصد سلول‌ها در فاز S در سلول‌های تحت تیمار با فلوروووراسیل بود (Gao et al., 2014)؛ که با نتایج مطالعه حاضر که نشان دهنده توانایی فلوروووراسیل در القای آپوپتوز و توقف چرخه سلولی در فاز S در سلول‌های AsPC-1 بود، همسو است.

نتیجه‌گیری

یافته‌های حاصل از این پژوهش تجربی نشان داد که فلوروووراسیل می‌تواند باعث کاهش تکثیر و القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی رده AsPC-1، از طریق توقف در چرخه سلولی و همچنین بالابردن سطح بیان ژن‌های موثر در مسیر داخلی آپوپتوز؛ شود. در نتیجه ممکن است فلوروووراسیل در ترکیب با سایر روش‌های درمانی سرطان پانکراس مفید واقع شود که این امر نیاز به مطالعات و تحقیقات بیشتری دارد.

سپاسگزاری

نتایج این پژوهش بخشی از رساله دکترای تخصصی با مصوب کد اخلاق (IR.IAU.MSHD.REC.1399.151) است که در مرکز تحقیقات بیولوژی کاربردی تکوین جانوری دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد انجام گردیده است. نویسندگان بر خود لازم می‌دانند از کلیه همکاران مرکز تحقیقات بیولوژی کاربردی تکوین جانوری سپاسگزاری نمایند.

- Mohammad, R.M., Muqbil, I., Lowe, L., Yedjou, C., Hsu, H.Y., Lin, L.T., Siegelin, M.D., Fimognari, C., Kumar, N.B., Dou, Q.P., Yang, H., Samadi, A.K., Russo, G.L., Spagnuolo, C., Ray, S.K., Chakrabarti, M., Morre, J.D., Coley, H.M., Honoki, K., Fujii, H., ... Azmi, A.S. 2015. Broad targeting of resistance to apoptosis in cancer. *Seminars in Cancer Biology* 35: 78-103.
- Motaharinia, M. & Nabiuni, M. 2022. Study of synergic effects of Curcumin and Cisplatin on Cdc42 gene expression in human Calu-6 lung carcinoma cell line. *Nova Biologica Reperta* 8: 253-264. (In Persian).
- Park, W., Chawla, A. & O'Reilly, E.M. 2021. Pancreatic Cancer: A Review. *JAMA - Journal of the American Medical Association* 26: 851-862.
- Pourshams, A., Kazemi, B. & Kalantari, S. 2018. A review of the etiology and biomarkers of pancreatic cancer, with emphasis on the role of diabetes: review article. *Tehran University Medical Journal* 75: 773-778. (In Persian).
- Qiu, J., Yang, G., Feng, M., Zheng, S., Cao, Z., You, L., Zheng, L., Zhang, T. & Zhao, Y. 2018. Extracellular vesicles as mediators of the progression and chemoresistance of pancreatic cancer and their potential clinical applications. *Molecular Cancer* 17: 1-11.
- Rajabnia, T. & Meshkini, A. 2017. Reduction of cell growth and induction of apoptosis in osteosarcoma cells by silver nanoparticles. *Journal of Birjand University of Medical Sciences* 24: 50-61. (In Persian).
- Roshandel, G., Ferlay, J., Ghanbari-Motlagh, A., Partovipour, E., Salavati, F., Aryan, K., Mohammadi, G., Khoshaabi, M., Sadjadi, A., Davanlou, M., Asgari, F., Abadi, H., Aghaei, A., Ahmadi-Tabatabaei, S.V., Alizadeh-Barzian, K., Asgari, A., Asgari, N., Azami, S., Cheraghi, M., Enferadi, F., ... Bray, F. 2021. Cancer in Iran 2008 to 2025: Recent incidence trends and short-term predictions of the future burden. *International Journal of Cancer* 149: 594-605.
- Shi, S., Tan, P., Yan, B., Gao, R., Zhao, J., Wang, J., Guo, J., Li, N. & Ma, Z. 2016. ER stress and autophagy are involved in the apoptosis induced by cisplatin in human lung cancer cells. *Oncology Reports* 35: 2606-2614.
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R.L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A. & Bray, F. 2021. *Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries*. CA: A Cancer Journal for Clinicians 71: 209-249.
- Tamaki, R., Kanai-Mori, A., Morishige, Y., Koike, A., Yanagihara, K. & Amano, F. 2017. Effects of 5-fluorouracil, adriamycin and irinotecan on HSC-39, a human scirrhous gastric cancer cell line. *Oncology Reports* 37: 2366-2374.
- Tang, J.C., Feng, Y.L., Liang, X. & Cai, X.J. 2016. Autophagy in 5-fluorouracil therapy in gastrointestinal cancer: Trends and Challenges. *Chinese Medical Journal* 129: 456-463.
- Thomas, A.F., Kelly, G.L. & Strasser, A. 2022. Of the many cellular responses activated by TP53, which ones are critical for tumour suppression? *Cell Death & Differentiation* 29: 961-971.
- Tonini, V. & Zanni, M. 2021. Pancreatic cancer in 2021: What you need to know to win. *World Journal of Gastroenterology* 27: 5851-5889.
- Vodenkova, S., Buchler, T., Cervena, K., Veskrnova, V., Vodicka, P. & Vymetalkova, V. 2020. 5-fluorouracil and other fluoropyrimidines in colorectal cancer: Past, present and future. *Pharmacology and Therapeutics* 206: 1-19.
- Wang, X., Simpson, E.R. & Brown, K.A. 2015. p53: Protection against tumor growth beyond effects on cell cycle and apoptosis. *Cancer Research* 75: 5001-5007.
- Yonesi, B., Mirzaie, A. & Aliasgari, E. 2017. Cytotoxicity and apoptotic effect of oxaliplatin on colon cancer cell line (HT29) and analysis of caspase 3 and caspase 9 gene expression using Real Time PCR method. *Journal of Cell and Tissue* 8: 364-373. (In Persian).

How to cite this article:

Khorasani, N., Baharara, J. & Nejad Shahrokhbadi, Kh. 2023. Evaluation of genes expression changes in the mitochondrial pathway of apoptosis and cell cycle in AsPC-1 cells treated with Fluorouracil. *Nova Biologica Reperta* 10: 99-107. (In Persian).

خراسانی، ن.، بهارآرا، ج. و نژاد شاهرخ آبادی، خ. ۱۴۰۲. ارزیابی تغییرات بیان ژن‌های مسیر میتوکندریایی آپوپتوز و چرخه سلولی در سلول‌های AsPC-1 تیمار شده با فلوروراسیل. یافته‌های نوین در علوم زیستی ۱۰: ۹۹-۱۰۷.