تحقیقی

اثر والپروئیک اسید بر بیان ژن Bim و زیست‌پذیری سلول‌های سرطان تخمدان رده A2780

زینب امینی فارسانی[١]، دکتر محمدحسین سنگتراش*[٢]، دکتر حسین تیموری[٣]، دکتر مهدی شمس آرا[٤]

١- دانشجوی دکتری تخصصی زیست شناسی - ژنتیک، گروه زیست شناسی، دانشگاه سیستان و بلوچستان، زاهدان، ایران. ٢- دانشیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه سیستان و بلوچستان، زاهدان، ایران. ٣- دانشیار، مرکزتحقیقات سلولی و مولکولی، پژوهشکده علوم پایه سلامت، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران.
٤- استادیار، مرکز ملی تحقیقات موش تراریخت، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران.

چکیده

زمینه و هدف : *سرطان تخمدان پنجمین سرطان شایع در زنان بوده و تعداد مبتلایان به این بیماری رو به افزایش است. والپروئیک اسید یک مهار کننده هیستون داستیلاز است که به‌طور موثر برای درمان صرع و بیماری‌های دوقطبی به‌کار می رود. اخیراً این ترکیب به عنوان دارویی با عملکردهای ضدسرطانی مورد توجه قرار گرفته است. ژن Bim یکی از مهم‌ترین ژن‌های مسیر داخلی (میتوکندریایی) آپوپتوز است که نقش مهمی در بیولوژی سرطان دارد. بیان این ژن در سرطان تخمدان به شدت کاهش می‌یابد. این مطالعه به منظور تعیین اثر والپروئیک اسید بر زیست‌پذیری سلول‌های سرطان تخمدان، آپوپتوز و نیز بیان ژن Bim در رده A2780 انجام شد.*

روش بررسی : *در این مطالعه توصیفی - تحلیلی سلول‌های سرطان تخمدان (A2780) در محیط کشت RPMI-1640 در شرایط بهینه تکثیر شدند. سپس سلول‌ها با غلظت‌های مختلف والپروئیک اسید (٣٠-١میلی مولار) تیمار و به مدت ٢٤، ٤٨ و ٧٢ ساعت انکوبه شدند. پس از پایان زمان انکوباسیون، زیست‌پذیری سلول‌ها با استفاده از روش MTT ارزیابی شد. آنالیز آپوپتوز در جمعیت سلولی تیمار شده با والپروئیک اسید با استفاده از روش فلوسایتومتری انجام گردید. از آزمون Real time PCR برای تعیین اثر این دارو بر تغییر بیان ژن Bim استفاده شد.*

یافته ها : *نتایج حاصل از تست MTT نشان داد که داروی والپروئیک اسید باعث کاهش زیست‌پذیری سلول‌های A2780 می‌شود و این اثر وابسته به غلظت و زمان بود. به‌طوری که در غلظت ٣٠ میلی‌مولار و ٧٢ ساعت پس از تیمار، کاهش زیست‌پذیری به بالاترین میزان رسید ($P<0/05$). درصد قابل توجهی از سلول‌ها در اثر تیمار با والپروئیک اسید دچار آپوپتوز شدند. همچنین والپروئیک اسید میزان بیان ژن Bim را افزایش داد ($P<0/05$).*

نتیجه‌گیری : *داروی والپروئیک اسید سبب کاهش زیست‌پذیری سلول‌های A2780 می‌شود. همچنین والپروئیک اسید از طریق تغییر بیان ژن‌های دخیل در مسیر داخلی آپوپتوز، سبب افزایش مرگ سلولی در سلول‌های سرطان تخمدان می‌شود.*

کلید واژه‌ها : *سلول‌های سرطان تخمدان رده A2780 ، والپروئیک اسید ، زیست پذیری ، ژن Bim ، روش MTT ، فلوسایتومتری*

* نویسنده مسؤول : دکتر محمد حسین سنگتراش ، پست الکترونیکی sangtarash@science.usb.ac.ir
نشانی : زاهدان، دانشگاه سیستان و بلوچستان، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی، تلفن و نمابر ٠٣٨-٣٣٤٦٥٦٥
وصول مقاله : ١٣٩٥/٥/١٦ ، اصلاح نهایی : ١٣٩٥/١٠/١٢ ، پذیرش مقاله : ١٣٩٥/١٠/٢٩

مقدمه

سرطان تخمدان پنجمین سرطان شایع و مهم‌ترین عامل مرگ ناشی از بدخیمی‌های سیستم تولید مثلی در میان زنان است (١). به دنبال تشخیص، بیماران تحت عمل جراحی قرار گرفته و سپس با داروهای حاوی پلاتین (سیس پلاتین و کربوپلاتین) شیمی‌درمانی می‌شوند. از آنجا که اغلب داروهای رایج شیمی‌درمانی سایتوتوکسیک هستند؛ اثرات جانبی نامطلوبی مانند اختلالات گوارشی و آسیب‌های کلیوی ایجاد کرده و به سلول‌های طبیعی بدن آسیب می‌رسانند (٢). یک استراتژی برای غلبه بر این مشکل استفاده از داروهای ساخته شده‌ای است که قبلاً برای درمان بیماری‌های غیر سرطانی مورد پذیرش قرار گرفته‌اند و ویژگی‌های فارماکودینامیکی، فارماکوکینتیکی وتوکسیسیتی آنها به خوبی شناخته شده است (٣). از جمله این داروها می‌توان به داروهای ضدتشنج مانند والپروئیک اسید (2-propyl pentanoic acid) اشاره نمود. والپروئیک اسید نوعی اسید چرب با زنجیره کوتاه است که در سال ١٨٨٢ به شکل آنالولوگ پنتانوئیک اسید استخراج شده از گیاه *Valeriana officinalis.* ساخته شد (۴). این ترکیب یک مهار کننده هیستون داستیلاز است که به‌طور موثر برای درمان صرع،

بیماری‌های دوقطبی، میگرن و اسکیزوفرنی به‌کار می‌رود. در مغز انسان، والپروئیک اسید فعالیت مهارکنندگی نروترانسمیتر GABA را تقویت نموده و تحریک به‌واسطه NMDA را کاهش داده و کانال‌های وابسته به ولتاژ سدیم را مسدود می‌کند (۵). اخیراً والپروئیک اسید به عنوان دارویی با عملکردهای ضدسرطانی مورد توجه قرار گرفته است. مطالعات مختلف نشان داده‌اند که این دارو به صورت موثری سبب القاء تمایز، مهار تکثیر سلولی و افزایش آپوپتوز در سلول‌های سرطانی مختلف از جمله سرطان پستان، کلون، پروستات، پوست، رحم، کبد و شش می‌شود (۸-۶). همچنین این دارو با مهار رگزایی و توقف سیکل سلولی در جلوگیری از پیشرفت سرطان موثر است (۹). پیشرفت تومور در نتیجه عدم تعادل بین تکثیر و مرگ سلولی رخ می‌دهد که از طریق سیگنال‌های مختلف و مسیرهای آپوپتوزی تنظیم می‌شود. ژن‌های مختلفی در مسیر آپوپتوز شرکت دارند. ژن Bim یکی از مهم‌ترین ژن‌های مسیر داخلی (میتوکندریایی) آپوپتوز است. Bim عضوی از پروتئین‌های پروآپوپتوزی خانواده Bcl2 است که در بسیاری از بافت‌های بدن بیان می‌شود. این پروتئین با مهار اعضای آنتی‌آپوپتوزی این خانواده، آپوپتوز را القاء می‌کند و نقش مهمی در بیولوژی سلولی تومور دارد. کاهش بیان Bim در افزایش تکثیر سلولی و متاستاز سلول‌های سرطانی موثر است (۱۰و۱۱).

با توجه به شیوع گسترده سرطان تخمدان و اهمیت مقابله با آن، لزوم مطالعات بیشتر در زمینه کشف داروها و ترکیبات جدید ضدسرطانی که بتوانند کارایی درمان را افزایش داده و تا حد امکان از عوارض جانبی آن بکاهند؛ مشخص می‌شود. این مطالعه به منظور تعیین اثر والپروئیک اسید بر زیست‌پذیری و میزان آپوپتوز سلول‌های سرطان تخمدان در رده سلولی A2780 انجام شد.

روش بررسی

کشت سلول: در این مطالعه توصیفی – تحلیلی سلول‌های سرطان تخمدان رده سلولی A2780 از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران در سال ۱۳۹۴ خریداری شد. این سلول‌ها در محیط کشت RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute1640) حاوی ۱۰ درصد FBS و یک درصد آنتی‌بیوتیک (پنی‌سیلین – استرپتومایسین) کشت داده شدند و در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد حاوی ۵ درصد CO2 و ۹۵ درصد هوای مرطوب قرار گرفتند. هر ۴۸ ساعت یک‌بار تعویض محیط صورت گرفت. بعد از ۳ تا ۴ روز از کشت اولیه تراکم سلولی در زیر میکروسکوپ معکوس بررسی شد و هنگامی که تراکم سلولی به ۸۰-۷۰ درصد رسید؛ سلول‌ها به فلاسک‌های جدید منتقل شدند.

تست MTT: به منظور بررسی اثر سایتوتوکسیک والپروئیک اسید از روش MTT استفاده شد. این روش بر اساس تبدیل نمک زرد رنگ تترازولیوم به کریستال‌های ارغوانی رنگ و نامحلول فورمازان توسط آنزیم‌های دهیدروژناز موجود در میتوکندری سلول‌های زنده بنا نهاده شده است. جذب این ترکیب پس از حل شدن در طول موج ۵۷۰-۵۴۰ قابل اندازه‌گیری است. در این روش تعداد ۴۰۰۰ سلول در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه‌ای کاشته شده و به مدت یک شب در شرایط بهینه انکوبه می‌شود. بعد از گذشت ۲۴ ساعت، سلول‌ها در معرض غلظت‌های مختلف والپروئیک اسید (۳۰-۱ میلی‌مولار) قرار می‌گیرند. برای هر غلظت سه چاهک در نظر گرفته شده و سه چاهک نیز به عنوان کنترل بدون دارو مورد ارزیابی قرار می‌گیرند. پلیت‌ها به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت انکوبه می‌شوند (۱۲). پس از پایان بازه‌های زمانی، پلیت را از داخل انکوباتور خارج کرده و محیط کشت رویی سلول‌ها خارج می‌شود. سپس به هر چاهک میزان ۱۰۰ میکرولیتر RPMI-1640 بدون رنگ به همراه ۱۰ میکرولیتر از محلول MTT (۵ mg/ml) اضافه شده و پلیت به مدت ۴ ساعت در شرایط تاریکی انکوبه می‌شود. سپس محیط کشت هر چاهک به آرامی خارج شده و ۱۵۰ میکرولیتر DMSO به هر چاهک اضافه می‌شود و به مدت ۵ دقیقه روی روتاتور با سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه قرار داده می‌شود. میزان جذب نوری (OD) در طول موج ۵۴۰ نانومتر توسط دستگاه Eliza reader اندازه‌گیری شده و درصد سلول‌های زنده (میزان جذب نوری تست تقسیم بر میزان جذب کنترل ضرب در عدد ۱۰۰) محاسبه می‌شود.

استخراج RNA و سنتز cDNA: به منظور سنجش بیان ژن، سلول‌ها در پلیت ۶ خانه کاشته شدند و با غلظت ۱۷ میلی‌مولار داروی والپروئیک اسید در محیط کشت انکوبه شدند. پس از گذشت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت RNA سلول‌ها با استفاده از TRIzol استخراج و کمیت و کیفیت آن با استفاده از دستگاه نانودراپ بررسی شد. تقریبا ۱۰۰ نانوگرم از RNA با استفاده از کیت PrimeScript™ RT Reagent Kit (Takara، ژاپن) به cDNA تبدیل شد. حجم مورد نظر برای انجام این واکنش ۱۰ میکرولیتر شامل ۲ میکرولیتر بافر 5X PCR، یک میکرولیتر dNTP، یک میکرولیتر Random hexamer، ۲ میکرولیتر آب عاری از نوکلئاز، ۰/۵ میکرولیتر ترانس کریپتاز معکوس و ۱۰۰ نانوگرم از RNA مورد آزمایش به ازاء هر واکنش بود. محتوی مذکور به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، ۱۵ دقیقه در دمای ۴۲ درجه سانتی گراد و ۵ ثانیه در دمای ۸۵ درجه سانتی گراد انکوبه شد و در نهایت cDNA سنتز شده در دمای منهای ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری و ذخیره شد.

Real time PCR: آزمون RT PCR در دستگاه RotorGene Q (Qiagen) و در حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر انجام شد. به ازاء هر واکنش ۵ میکرولیتر از Master MixesSYBR Green، یک میکرولیتر cDNA، ۰/۵ میکرولیتر از هر کدام از پرایمرها (۱۰ پیکومولار) و ۳ میکرولیتر آب عاری از نوکلئاز استفاده شد. شرایط

دمایی واکنش شامل ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه و ۳۰ سیکل ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ ثانیه، ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه تنظیم گردید. برای بررسی اختصاصیت محصول نیز منحنی ذوب بررسی شد. ژن GAPDH به عنوان کنترل داخلی در نظر گرفته شد. از روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ برای تجزیه و تحلیل نتایج استفاده شد. توالی پرایمرهای استفاده شده برای آزمون Real time PCR در جدول یک آمده است.

جدول ۱ : توالی پرایمرهای مورد استفاده برای انجام آزمون Real time PCR

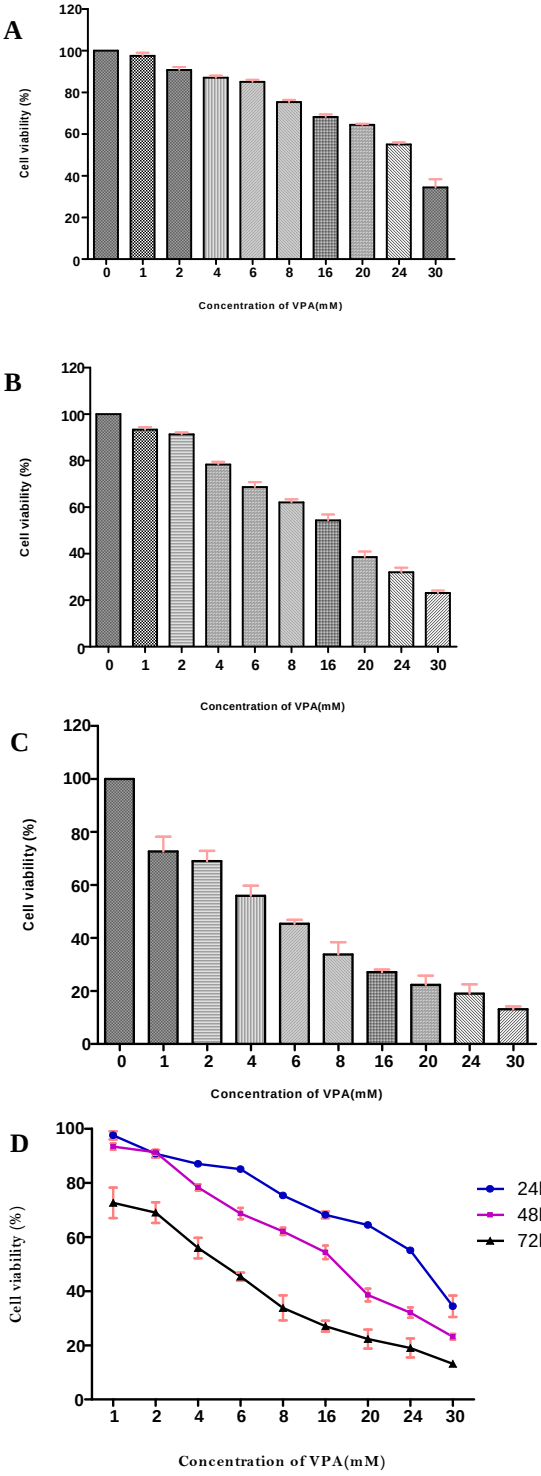
توالی آغازگرها (bp)	اندازه قطعه تکثیر شده (bp)
BIM-F: 5'-TAAGTTCTGAGTGTGACCGAGA-3' BIM-R: 5'-GCTCTGTCTGTAGGGAGGTAGG-3'	۹۶
GAPDH-F: 5'-ACGGATTTGGTCGTATTGGG-3' GAPDH-R: 5'-TGATTTTGGAGGGATCTCGC-3'	۲۳۱

فلوسایتومتری: به منظور بررسی درصد سلول‌های آپوپتوز شده در جمعیت سلولی تیمار شده با والپروئیک اسید از روش فلوسایتومتری استفاده شد. در این روش، تعداد 10^5 سلول A2780 در هر چاهک پلیت ۶ خانه‌ای کاشته شد و به مدت یک شب در شرایط بهینه انکوبه شد. بعد از گذشت ۲۴ ساعت، سلول‌ها در معرض غلظت ۱۷ میلی‌مولار والپروئیک اسید (غلظت میانی و IC50 در ۴۸ ساعت) قرار گرفتند. پلیت‌ها به مدت ۴۸ و ۷۲ ساعت انکوبه شدند. پس از پایان بازه‌های زمانی، سلول‌ها تریپسینه شده و به‌وسیله بافر PBS سرد شست و شو داده شدند. سپس به رسوب حاصل از سانتریفوژ سلول‌ها، ۱۰۰ میکرولیتر بافر بایندینگ در میکروتیوب‌های ۱/۵ اضافه شد. سپس ۱۰ میکرولیتر از رنگ پروپیدیوم (PI) و ۵ میکرولیتر از رنگ آنکسین V – (Annexin-V) به محتویات موجود در میکروتیوب اضافه شده و به مدت ۱۵ دقیقه در تاریکی انکوبه شد و در نهایت آنالیز سلولی توسط فلوسایتومتری انجام گردید.

آنالیز آماری: داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS-19 و استفاده از آزمون‌های ANOVA و دانکن در سطح معنی داری کمتر از ۰/۰۵ تجزیه و تحلیل شدند.

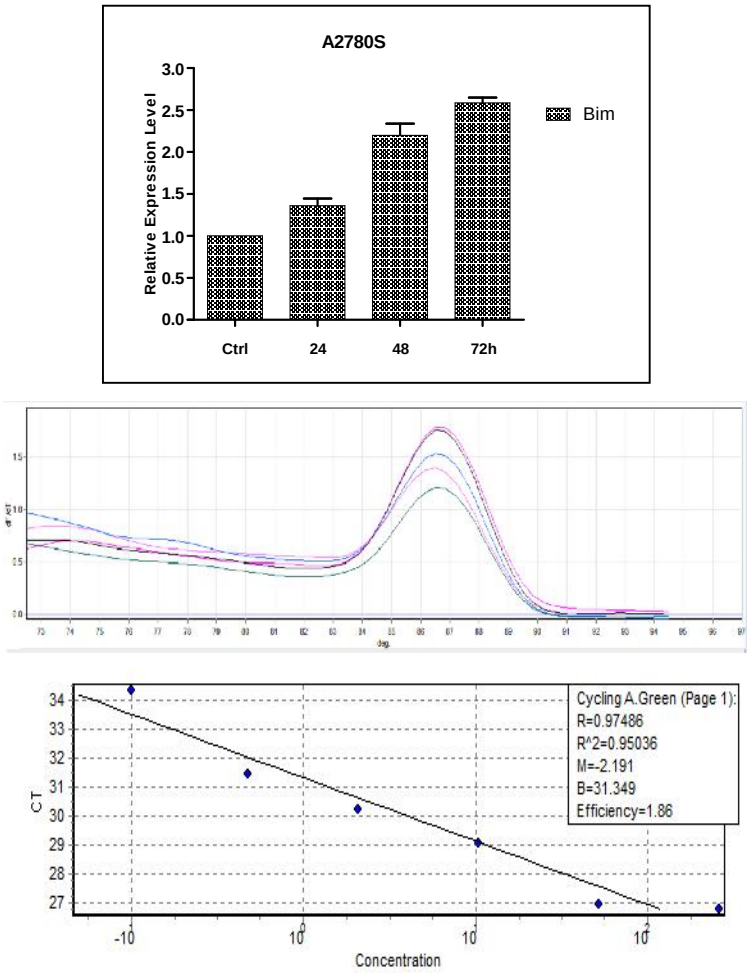
یافته‌ها

نمودارهای A-۱، B-۱ و C-۱ به ترتیب اثر غلظت‌های مختلف والپروئیک اسید را بر زیست‌پذیری سلول‌های سرطان تخمدان (A2780) پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت نشان می‌دهند. به‌دنبال انکوباسیون ۲۴ ساعته، درصد زیستایی با افزایش غلظت والپروئیک اسید در رده سلولی A2780 کاهش یافت (نمودار A-۱). به‌طوری که درصد زیستایی از ۹۷/۵ درصد (در غلظت یک میلی‌مولار) به ۳۴/۳۹ درصد (در غلظت ۳۰ میلی‌مولار) به طور معنی داری کاهش یافت (P<۰/۰۰۰۱).

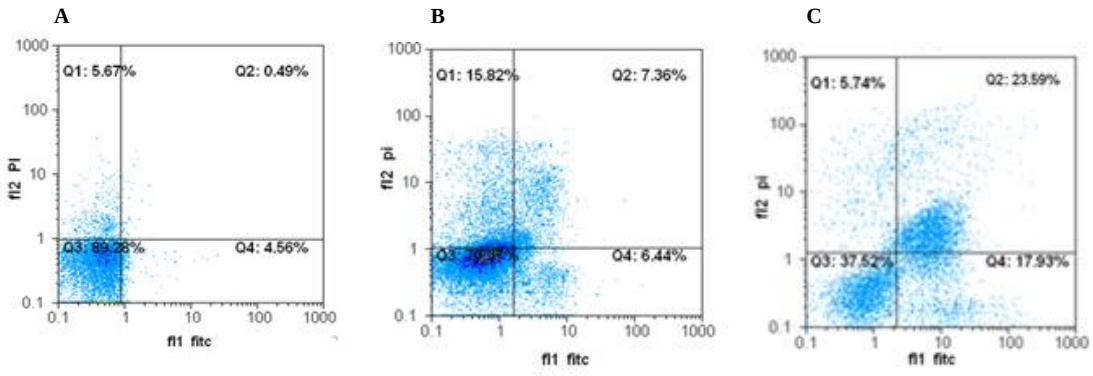


نمودار ۱ : کاهش درصد زیستایی سلول‌های A2780 پس از ۲۴ ساعت (A)، ۴۸ ساعت (B) و ۷۲ ساعت (C) مجاورت با مقادیر مختلف والپروئیک اسید؛ (D) مقایسه کاهش درصد زیستایی سلول‌های A2780 پس از مجاورت با مقادیر مختلف والپروئیک اسید در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت

نتایج به‌دست آمده پس از انکوباسیون ۴۸ ساعته نیز حاکی از کاهش درصد زیستایی در حالت وابسته به دوز است. به طوری که



نمودار ۲ : اثر والپروئیک اسید بر بیان ژن Bim در لاین سلولی A2780 در زمان‌های ۲۴ ، ۴۸ و ۷۲ ساعت
(A) سلول‌های تیمار شده با والپروئیک اسید؛ (B) منحنی ذوب بیان ژن Bim ؛ (C) منحنی استاندارد بیان ژن Bim



نمودار ۳ : اثر والپروئیک اسید بر آپوپتوز در سلول‌های A2780
(A) گروه کنترل (بدون تیمار با والپروئیک اسید)؛ B و C به‌ترتیب تیمار سلول‌ها با غلظت ۱۷ میلی‌مولار والپروئیک اسید به مدت ۴۸ و ۷۲ ساعت

درصد زیستایی از ۹۳/۳۶ درصد (در غلظت یک میلی‌مولار) به ۲۳/۱۴ درصد (در غلظت ۳۰ میلی‌مولار) کاهش یافت (P<۰/۰۰۰۱). انکوباسیون ۷۲ ساعته این سلول‌ها با غلظت‌های مختلف والپروئیک اسید نیز موجب کاهش درصد زیستایی از ۷۲/۶۲ درصد (در غلظت یک میلی‌مولار) به ۱۳/۱۴ درصد (در غلظت ۳۰ میلی‌مولار) شد (P<۰/۰۰۰۱).

میزان IC50 پس از گذشت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به ترتیب ۲۵/۲۴، ۱۷ و ۴/۳ میلی‌مولار به‌دست آمد. در نمودار D–۱ اثر غلظت‌های مختلف والپروئیک اسید بر روی سلول‌های A2780 در بازه‌های زمانی مختلف با هم مقایسه شده و اختلاف آماری

معنی‌داری بین زمان‌های مختلف به‌دست آمد (P<۰/۰۵).

والپروئیک اسید میزان بیان mRNA ژن Bim را به‌طور معنی‌داری افزایش داد (P<۰/۰۰۰۱) (نمودار ۲).

در نمودار ۳ درصد سلول‌های آپوپتوز شده پس از تیمار با غلظت ۱۷ میلی‌مولار والپروئیک اسید به همراه گروه کنترل نشان داده شده است. درصد سلول‌های زنده در گروه کنترل ۸۹ درصد بودکه بیش از سایر گروه‌هاست. درصد سلول‌هایی که در مراحل اولیه آپوپتوز (Q4) بودند از ۶ درصد پس از ۴۸ ساعت به ۱۷ درصد پس از ۷۲ ساعت تیمار با والپروئیک اسید افزایش یافت. همچنین درصد سلول‌هایی که در مراحل انتهایی آپوپتوز (Q2) بودند؛ نیز پس از گذشت ۴۸ و ۷۲ ساعت تیمار با والپروئیک اسید به ترتیب ۷ درصد و ۲۳ درصد افزایش یافت.

بحث

در این مطالعه اثر داروی والپروئیک اسید بر زیست‌پذیری سلول‌های سرطان تخمدان (A2780) ارزیابی شد. یافته‌های حاصل از روش MTT نشان داد که استفاده از غلظت یک میلی‌مولار داروی والپروئیک اسید در یک کشت ۲۴ ساعته می‌تواند منجر به کاهش ۲/۵ درصدی زیست‌پذیری سلول‌های توموری فوق شود و با افزایش غلظت، قدرت کشندگی دارو افزایش می‌یابد. به‌طوری که در غلظت ۳۰ میلی‌مولار این دارو، زیست‌پذیری سلول‌ها تا حدود ۳۵ کاهش یافت. انکوباسیون ۴۸ ساعته سلول‌ها در مجاورت غلظت ۳۰ میلی‌مولار والپروئیک اسید، زیست‌پذیری را تا ۲۳ درصد کاهش داد. همچنین پس از ۷۲ ساعت انکوباسیون در مجاورت با غلظت‌های یک و ۳۰ میلی‌مولار این دارو، میزان زیست‌پذیری به ترتیب ۱۳ درصد و ۷۲ درصد تعیین شد.

کاهش توانایی زیست‌پذیری سلول‌ها پس از تیمار با داروی والپروئیک اسید در غلظت‌ها و زمان‌های مختلف، در مطالعات دیگر نیز نشان داده شده است. از جمله نتایج مطالعه Grabarska و همکاران نشان داد که تیمار با والپروئیک اسید، منجر به کاهش معنی‌داری در تعداد سلول‌های سرطان حنجره می‌شود و با افزایش غلظت این ترکیب، تعداد سلول‌ها به تدریج کاهش بیشتری نشان می‌دهند (۱۳). همچنین این نتایج همسو با نتایج مطالعه Kwiecinska و همکاران است که نشان داد داروی والپروئیک اسید می‌تواند به صورت وابسته به دوز و زمان منجر به کاهش زیست‌پذیری سلول‌های سرطان تخمدان (OVCAR-3) شود (۷). در مطالعه Eun Lee و Kim توانایی زیستی سلول‌های سرطان پروستات تحت تاثیر داروی والپروئیک اسید ارزیابی شد. والپروئیک اسید منجر به کاهش توانایی زیستی این سلول‌ها به صورت وابسته به دوز و زمان گردید (۱۴).

نتایج حاصل از این مطالعه به وضوح اثر ضدسرطانی و سایتوتوکسیسیتی والپروئیک اسید را در سرطان تخمدان نشان می‌دهد. در ادامه برای مطالعه بیشتر شیوه مرگ سلولی (آپوپتوز یا نکروز) آنالیز فلوسایتومتری انجام شد. همچنین از آنجا که اغلب داروهای شیمی‌درمانی و عوامل محرک مرگ سلولی موجب القاء آپوپتوز از طریق مسیر داخلی یا میتوکندریایی می‌شوند؛ بیان ژن Bim که یکی از مهم‌ترین اجزای مسیر داخلی آپوپتوز است؛ مورد بررسی قرار گرفت. نتایج مطالعه ما مشخص کرد درصد قابل توجهی از سلول‌ها در اثر تیمار با والپروئیک اسید دچار آپوپتوز شده‌اند. همچنین با افزایش مدت زمان انکوباسیون درصد سلول‌های آپوپتوز شده افزایش یافت. بیشترین درصد آپوپتوز القاء شده پس از ۷۲ ساعت تیمار با غلظت ۱۷ میلی‌مولار ۴۱ درصد بود. همچنین والپروئیک اسید میزان بیان mRNA ژن Bim را به‌صورت معنی‌داری افزایش داد. مطالعات مختلفی نتایج مطالعات ما را تایید می‌کنند. Arakawa و همکاران نشان دادند که والپروئیک اسید از طریق هایپر استیله کردن هیستون‌های مرکزی و اثر بر روی بیان ژن‌های تنظیم کننده سیکل سلولی، منجر به توقف در فاز G1 شده و تکثیر سلولی در سرطان پستان را سرکوب کرده و میزان آپوپتوز را افزایش می‌دهد (۱۵). از طرف دیگر در مطالعه Phillips و همکاران این دارو با افزایش بیان کاسپاز ۱۱ و به دنبال آن افزایش فعالیت کاسپاز ۳، منجر به افزایش بیان ژن‌های دخیل در آپوپتوز و به دنبال آن افزایش میزان آپوپتوز در سرطان کبد گردید (۱۶). والپروئیک اسید با افزایش بیان ژن‌های پروآپوپتوزی و مهار بیان ژن‌های آنتی‌آپوپتوزی منجر به القاء آپوپتوز در کارسینومای سلول‌های کبدی می‌شود (۱۷). مطالعه وفاییان و همکاران نشان داد که والپروئیک اسید سبب افزایش بیان Bax و کاهش میزان بیان Bcl2 در سرطان پستان می‌شود (۱۲). القاء آپوپتوز از طریق مکانیسم‌های فوق، در لاین‌های سلولی مختلف سرطان‌های میلوما، لوکمیا و پروستات نیز به اثبات رسیده است (۲۰-۱۸). احتمالاً در تحقیق حاضر نیز والپروئیک اسید با افزایش هایپراستیلاسیون و به دنبال آن تغییر بیان ژن‌های تنظیم‌کننده سیکل سلولی و ژن‌های آپوپتوزی از جمله ژن Bim منجر به توقف تکثیر و القاء آپوپتوز در سلول‌های سرطان تخمدان شده است.

با توجه به این که والپروئیک اسید دارای اثر مهار رشد روی رده سرطانی A2780 بوده؛ عوارض جانبی کمی داشته و کم‌هزینه است؛ ممکن است بتوان در آینده از این دارو برای افزایش اثر داروهای شیمی‌درمانی و یا توسعه روش‌های نوین درمان سرطان استفاده کرد. این پیشنهادات به بررسی‌های بیشتری نیاز دارد.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که داروی والپروئیک اسید دارای پتانسیل درمانی بوده و در غلظت‌های بالاتر و در بازه‌های زمانی طولانی‌تر دارای اثر سایتوتوکسیتی بیشتری بر روی سلول‌های سرطان تخمدان است.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامه خانم زینب امینی فارسانی برای اخذ درجه دکتری در رشته زیست شناسی - ژنتیک از دانشکده علوم‌پایه دانشگاه سیستان و بلوچستان بود و با حمایت مالی معاونت تحقیقات و فن‌آوری دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد و دانشگاه سیستان و بلوچستان انجام شد. بدین‌وسیله از زحمات خانم زهرا سجادپور و آقایان پیام قاسمی و امین سلطانی که در انجام مراحل آزمایشگاهی ما را یاری نمودند؛ تشکر می‌نماییم.

References

1. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013. CA Cancer J Clin. 2013 Jan; 63(1): 11-30. doi: 10.3322/caac.21166

2. Forouzandeh F, Salimi S, Naghsh N, Zamani N, Jahani S. [Evaluation of anti-cancer effect of Peganum harmala L hydroalcholic extract on human cervical carcinoma epithelial cell line]. J Shahrekord Univ Med Sci. 2014; 16(4): 1-8. [Article in Persian]

3. Bastani S, Mohamadzade M, Pazhang Y. [The anti-proliferative and apoptotic effects of propranolol on K562 cell line]. Armaghane-danesh. 2016; 20(12): 1119-29. [Article in Persian]

4. Machado Ximenes JC, Lima Verde EC, Naffah-Mazzacoratti MG, Barros Viana GS. Valproic acid, a drug with multiple molecular targets related to its potential neuroprotective action. Neuroscience and Medicine. 2012 Mar; 3(1): 107-23. doi: 10.4236/nm.2012.31016

5. Kostrouchová M, Kostrouch Z, Kostrouchová M. Valproic acid, a molecular lead to multiple regulatory pathways. Folia Biol (Praha). 2007; 53(2): 37-49.

6. Blaheta RA, Michaelis M, Driever PH, Cinatl J Jr. Evolving anticancer drug valproic acid: insights into the mechanism and clinical studies. Med Res Rev. 2005 Jul; 25(4): 383-97. doi: 10.1002/med.20027

7. Kwiecinska P, Taubøll E, Gregoraszczuk EL. Effects of valproic acid and levetiracetam on viability and cell cycle regulatory genes expression in the OVCAR-3 cell line. Pharmacol Rep. 2012; 64(1): 157-65.

8. Zhang L, Wang G, Wang L, Song C, Leng Y, Wang X, Kang J. VPA inhibits breast cancer cell migration by specifically targeting HDAC2 and down-regulating Survivin. Mol Cell Biochem. 2012 Feb; 361(1-2): 39-45. doi: 10.1007/s11010-011-1085-x

9. Shan Z, Feng-Nian R, Jie G, Ting Z. Effects of valproic acid on proliferation, apoptosis, angiogenesis and metastasis of ovarian cancer in vitro and in vivo. Asian Pac J Cancer Prev. 2012; 13(8): 3977-82.

10. Youle RJ, Strasser A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. Nat Rev Mol Cell Biol. 2008 Jan; 9(1): 47-59. doi: 10.1038/nrm2308

11. Shuang T, Shi C, Chang S, Wang M, Bai CH. Downregulation of miR-17~92 expression increase paclitaxel sensitivity in human ovarian carcinoma SKOV3-TR30 cells via BIM instead of PTEN. Int J Mol Sci. 2013 Feb; 14(2): 3802-16. doi: 10.3390/ijms14023802

12. Vafaiyan Z, Gharaei R, Asadi J. The correlation between telomerase activity and Bax/Bcl-2 ratio in valproic acid-treated MCF-7 breast cancer cell line. Iran J Basic Med Sci. 2015 Jul; 18(7): 700-4.

13. Grabarska A, Dmoszynska-Graniczka M, Jeleniewicz W, Kiebus M, Nowosadzka E, Rivero-Muller A, et al. Valproic acid suppresses growth and enhances cisplatin cytotoxicity to larynx cancer cells. Head Neck Oncol. 2014 May; 6(1): 7.

14. Eun Lee J, Kim HJ. Valproic acid inhibits the invasion of PC3 prostate cancer cells by upregulating the metastasis suppressor protein NDRG1. Genet Mol Biol. 2015 Oct-Dec; 38(4): 527-33. doi: 10.1590/S1415-475738420150028

15. Arakawa Y, Saito S, Yamada H, Aiba K. Simultaneous treatment with camptothecin and valproic acid suppresses induction of Bcl-X(L) and promotes apoptosis of MCF-7 breast cancer cells. Apoptosis. 2009 Sep; 14(9): 1076-85. doi: 10.1007/s10495-009-0384-0.

16. Phillips A, Bullock T, Plant N. Sodium valproate induces apoptosis in the rat hepatoma cell line, FaO. Toxicology. 2003 Nov; 192(2-3): 219-27.

17. Armeanu S, Pathil A, Venturelli S, Mascagni P, Weiss TS, Göttlicher M, et al. Apoptosis on hepatoma cells but not on primary hepatocytes by histone deacetylase inhibitors valproate and ITF2357. J Hepatol. 2005 Feb; 42(2): 210-17.

18. Kaiser M, Zavrski I, Sterz J, Jakob C, Fleissner C, Kloetzel PM, et al. The effects of the histone deacetylase inhibitor valproic acid on cell cycle, growth suppression and apoptosis in multiple myeloma. Haematologica. 2006 Feb; 91(2): 248-51.

19. Tang R, Faussat AM, Majdak P, Perrot JY, Chaoui D, Legrand O, et al. Valproic acid inhibits proliferation and induces apoptosis in acute myeloid leukemia cells expressing P-gp and MRP1. Leukemia. 2004 Jul; 18(7): 1246-51.

20. Angelucci A, Valentini A, Millimaggi D, Gravina GL, Miano R, Dolo V, et al. Valproic acid induces apoptosis in prostate carcinoma cell lines by activation of multiple death pathways. Anticancer Drugs. 2006 Nov; 17(10): 1141-50.

Original Paper

Effect of valproic acid on Expression of Bim gene and viability of ovarian cancer cell line A2780

Amini-Farsani Z (M.Sc)[1], Sangtarash MH (Ph.D)*[2]
Teimori H (Ph.D)[3], Shamsara M (Ph.D)[4]

[1]Ph.D Candidate in Biology-Genetics, Department of Biology, University of Sistan and Baluchestan, Zahedan, Iran. [2]Associate Professor, Department of Biology, Faculty of Science, University of Sistan and Baluchestan, Zahedan, Iran. [3]Associate Professor, Cellular and Molecular Research Center, Basic Health Sciences Institute, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran. [4]Assistant Professor, National Research Center for Transgenic Mouse, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran.

Abstract

Background and Objective: Ovarian cancer is the fifth common cancer among women and the number of new cases is increasing. Valproic acid is a histone deacetylase inhibitor effectively used to treat epilepsy and bipolar disease. Recently, this compound has attracted attention as an anti-cancer agent. Bim is one of the most important genes of mitochondrial pathway of apoptosis, and it plays an important role in the biology of cancer. Expression of this gene is greatly reduced in ovarian cancer. This study was done to evaluate the effect of valproic acid on the viability of ovarian cancer cells, apoptosis and Bim gene expression in A2780 line.

Methods: In this experimental study, the human ovarian cancer cells (A2780) were grown in RPMI-1640 medium in appropriate culture conditions. The cells were treated by various concentrations valproic acid (1-30 mM) and were incubated for 24, 48 and 72 hours. After the incubation of period, cell viability was investigated using MTT. Apoptosis was analyzed by flow-cytometry method in the cells were treated by valproic acid. The Real time PCR test was used to assess the effect of this drug on the expression of Bim gene.

Results: The results of MTT assay showed that valproic acid reduced the viability of A2780 cells, and this effect was time and dose-dependent. The reduction of cell viability at 30 mM concentration and 72 hours after treatment, was maximum and statistically significant ($P<0.05$). Exposure to valproic acid significantly increased the percentage of apoptotic cells ($P<0.05$). Also, Valproic acid significantly increased the expression of Bim ($P<0.05$).

Conclusion: Valproic acid reduced viability in ovarian cancer cell line A2780. Valproic acid increased cell death by altering the expression of genes involved in apoptosis in ovarian cancer cell line A2780.

Keywords: Ovarian cancer cell line A2780, Valproic acid, Viability, Bim gene, MTT method, flow-cytometry

*** Corresponding Author: Sangtarash MH (Ph.D), E-mail: sangtarash@science.usb.ac.ir**

Received 6 Aug 2016 **Revised** 1 Jan 2017 **Accepted** 18 Jan 2017

Cite this article as: Amini-Farsani Z, Sangtarash MH, Teimori H, Shamsara M. [Effect of valproic acid on Expression of Bim gene and viability of ovarian cancer cell line A2780]. J Gorgan Univ Med Sci. Autumn 2017; 19(3): 60-66. [Article in Persian]