

Effect of Dexamethasone on *Fas/FasL* and *Bax/Bcl2* mRNA Expression in Human Colorectal Cancer HT-29 Cell Line

Pantea Hajimirza Shafiesoltani¹, Flora Forouzes^{*1}, Mahdi Shabani²

1. Department of Genetics, Faculty of Advanced Science and Technology, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran

2. Department of Immunology, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

(Received: 2019/04/12

Accept:2019/07/14)

Abstract

Background: Colorectal cancer is one of the most common cancers and among the most common causes of cancer death worldwide. Dexamethasone is a glucocorticoid medication which has anti-proliferative and anti-inflammatory properties that induce apoptosis and growth inhibition in human myeloma cell lines in vitro. The aim of the current study was to determine the effects of dexamethasone against human colorectal cancer HT29- cell lines, relying on the expression of genes which are involved in extrinsic (*Fas* and *FasL*) and intrinsic pathway of apoptosis (*Bax* and *Bcl2*).

Materials and methods: An experimental study was conducted. HT-29 cell line was cultured and then treated with various concentrations of dexamethasone (from 0.1 to 1000 μ M) for 24h, 48h, and 72h incubation. The cytotoxicity was measured using MTT assay and IC50 was determined. Then, RNA was extracted from treated and untreated cells and cDNA was synthesized. Gene expression was investigated using qReal-Time PCR method. Data analysis was performed using the livak method.

Results: Dexamethasone at 1000 μ M significantly inhibited the growth of treated HT-29 cells after 24h, 48h, and 72h incubation and IC50 was 1000 μ M after 48h. After treating cells at IC50 concentration, the mRNA expression of *Fas* and *FasL* did not change significantly in comparison with untreated cells ($p < 0.05$), while *Bax* and *Bcl2*- mRNA expression increased and decreased respectively in comparison with untreated cells ($p < 0.05$). Dexamethasone was effective against human colorectal cancer HT-29 cell line in a dose dependent manner and induced the intrinsic genes of apoptosis.

Conclusion: Dexamethasone can inhibit the growth of human colon cancer HT-29 cell lines and induces apoptosis through the intrinsic pathway of apoptosis, while it has no effect on the extrinsic pathway of apoptosis.

Keywords: Colorectal cancer; Apoptosis; Dexamethasone; HT-29 cell line

*Corresponding author: Flora Forouzes

Email: f8forouzes@gmail.com

بررسی اثر دگزامتازون روی تغییرات بیان رونوشت ژن های *Fas/FasL* و *Bax/Bcl2* در رده سلولی HT-29 سرطان کولورکتال انسانی

پانته‌آ حاجی میرزا شفیع سلطانی^۱، فلورا فروزش^{۱*}، مهدی شعبانی^۲

۱- گروه ژنتیک، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۲- گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۸/۰۱/۲۳ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۸/۰۴/۲۳

چکیده:

سابقه و هدف: سرطان کولورکتال یکی از شایع‌ترین سرطان‌ها و عامل مرگ بر اثر سرطان در جهان است. دگزامتازون، یک داروی گلوکوکورتیکوئیدی و دارای خواص ضد تکثیری و ضد التهابی است که قادر به مهار رشد و القا آپوپتوز در رده‌های سلولی سرطان میلوما انسانی است. هدف از این تحقیق تعیین اثر این دارو روی رده سلولی HT-29 سرطان کولورکتال انسانی با تکیه بر روی بیان ژن‌های مسیر خارجی آپوپتوزی (*Fas* و *FasL*) و بیان ژن‌های مسیر داخلی آپوپتوزی *Bax* و *Bcl-2* است.

مواد و روش‌ها: تحقیق به روش تجربی انجام شد. پس از کشت رده سلولی HT-29، سلول‌ها تحت تیمار با غلظت‌های مختلف دگزامتازون (۰/۱ میکرومول الی ۱۰۰۰ میکرومول) و زمان‌های مختلف (۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت) قرار گرفتند. بررسی سمیت با تست *MTT* ارزیابی و *IC50* تعیین شد. برای بررسی کمی تغییر بیان رونوشت ژن‌های *Fas/FasL* و *Bax/Bcl-2*، *RNA*، از سلول‌های تیمار شده و تیمار نشده استخراج شد و پس از سنتز *cDNA*، بیان رونوشت ژن‌ها توسط *quantitative Real time-PCR* ارزیابی و آنالیز داده‌ها با استفاده از روش لیواک سنجیده شد.

یافته‌ها: دگزامتازون در غلظت ۱۰۰۰ میکرومول به کاهش سلول‌های زنده در هر سه بازه زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت منجر شده است، اما این غلظت بعد از ۴۸ ساعت آنکوباسیون به عنوان *IC50* تعیین شد. پس از تیمار سلول‌ها در غلظت *IC50*، سطح بیان رونوشت ژن‌های *Fas* و *FasL* در مقایسه با سلول‌های تیمار نشده تغییر معنادار مشاهده نشد ($p < 0.05$). در حالی که سطح بیان رونوشت ژن‌های *Bax* و *Bcl-2* به طور معنادار در مقایسه با سلول‌های تیمار نشده به ترتیب افزایش و کاهش یافت ($p < 0.05$). دگزامتازون به روش وابسته به دوز و زمان روی رده سلولی HT-29 سرطان کولورکتال انسانی اعمال اثر کرده است. **نتیجه‌گیری:** دگزامتازون می‌تواند سبب مهار رشد در رده سلولی HT-29 سرطان کولورکتال انسانی و همچنین به القا آپوپتوز از طریق مسیر داخلی منجر شود، در حالی که تأثیری روی القا آپوپتوز از طریق مسیر خارجی ندارد. بنابراین تیمار رده سلولی HT-29 سرطان کولورکتال انسانی با غلظت معینی از دگزامتازون می‌تواند بیان ژن‌های دخیل در مسیر داخلی آپوپتوز را در راستای مرگ برنامه‌ریزی سلول تغییر دهد.

واژگان کلیدی: سرطان کولورکتال، آپوپتوز، دگزامتازون، رده سلولی HT-29

مقدمه:

سرطان است که سالانه ۱/۲۳ میلیون نفر را تحت تأثیر قرار می‌دهد و چهارمین دلیل رایج مرگ ناشی از سرطان در جهان است (۲). آپوپتوز مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده است (۳) و یکی از اعمال مهم آن حذف سلول‌های آسیب دیده مانند سلول‌هایی که در معرض عوامل کارسینوژن قرار گرفته‌اند و دچار آسیب ژنتیکی شده‌اند، است. در مسیر خارجی آپوپتوز، یعنی

سرطان کولورکتال (CRC)، سرطان اپی‌تلیالی است که بخش کولون و رکتوم را درگیر می‌کند. سرطان کولورکتال یک بیماری ناهمگن (heterogeneous) است و حاصل تجمع چندین جهش ژنتیکی و تغییرهای اپی‌ژنتیکی در ژن‌های دخیل در آپوپتوز، تمایز و رشد سلول است (۱). این سرطان یکی از رایج‌ترین انواع

نویسنده مسئول: فلورا فروزش

پست الکترونیک: F8forouzesht@gmail.com

(Fas) در سطح سلول های توموری، بیان گیرنده مرگ خاموش، ترشح میزان بالایی از فرم محلول گیرنده مرگ که لیگاند Fas را در بر می گیرد یا بیان لیگاند Fas در سطح سلول های توموری (۳۲).

برخی هورمون ها نظیر کورتیکواستروئیدها به مرگ آپوپتوتیک در برخی از سلول ها مثل تیموسیت ها منجر می شوند و این در حالی است که سلول های دیگر تحت تاثیر قرار نمی گیرند (۳۳). همانند سایر گلوکوکورتیکوئیدها، دگزامتازون گیرنده های استروئیدی را هدف قرار داده و فرآیندهای زیستی نظیر متابولیسم پروتئین، گلوکز و التهاب را تحت تاثیر قرار می دهد.

دگزامتازون یک داروی ضد التهابی قوی است و در حوزه های درمانی مختلفی نظیر درماتولوژی، هماتولوژی و اندوکریولوژی استفاده شده است. دگزامتازون از طریق مکانیسم های مختلفی نظیر مهار فسفولیپاز A2، ترشح اسید آراشیدونیک از لیپیدهای سلولی و مهار سنتز پروستاگلاندین H2 یا بیان سیکلواکسیژناز-۲، اثر ضد التهابی خود را اعمال می کند (۳۴). همچنین اثر ضد رشد و تکثیر دگزامتازون از طریق افزایش بیان پروتئین p21، مهار فعالیت CDK2 و فسفریلاسیون رتینوبلاستوما، اعمال می شود (۳۵).

از آنجا که تا کنون اثر داروی دگزامتازون روی مسیر خارجی و داخلی آپوپتوز در هیچ یک از رده های سلولی سرطان کولورکتال بررسی نشده است، بنابراین در تحقیق حاضر اثر ضد رشد و ضد تکثیر این دارو روی رده سلولی HT-29 سرطان کولورکتال انسانی با تکیه بر اثر آن روی بیان ژن های مسیر خارجی آپوپتوزی (Fas و FasL) و بیان ژن های مسیر داخلی آپوپتوزی (Bcl2 و Bax) بررسی شده است. از نقاط قوت این مطالعه، بررسی اثر دگزامتازون روی بیان ژن های مسیر داخلی و خارجی آپوپتوز به طور همزمان در سطح mRNA بوده است. برای مطالعه تکمیلی پیشنهاد می شود این مطالعه در سطح پروتئین نیز انجام شود.

مواد و روش ها: کشت سلول:

در این مطالعه که از نوع تجربی است، از رده سلولی HT-29 سرطان کولون انسانی استفاده شد که از انستیتو پاستور ایران خریداری شد. برای کشت رده سلولی HT-29 از محیط RPMI7-1640 (Gibco-UK) غنی شده با ۱۰ درصد سرم جنینی گاو (FBS) (Gibco-UK) و ۱ درصد مخلوط آنتی بیوتیک های پنی سیلین و استرپتومایسین (Dacell-Iran) استفاده شد. سلول ها در انکوباتور با شرایط دمایی ۳۷ درجه سانتی گراد، رطوبت ۹۵ درصد و CO2 ۵ درصد قرار گرفتند. سلول های چسبیده با استفاده از محلول ۰/۲۵ درصد تریپسین (Gibco-UK) EDTA از کف فلاسک جدا و برای انجام تست های مورد نظر استفاده شد.

برای شمارش سلولی و بررسی سلول های زنده از آزمون دفع رنگ (Dye exclusion test) و لام هموسیتر استفاده و توسط رنگ تریپان بلو (Sigma-US) سنجش شد. محاسبه درصد سلول های زنده با استفاده از فرمول زیر انجام شد (۳۶).

$100 \times (\text{کل سلول شمارش شده} / \text{تعداد سلول زنده}) = \text{درصد Viability}$ ، سپس شمارش و تعیین درصد سلول ها در هر میلی لیتر از رابطه زیر محاسبه شد.

(ضرب رقت) $10^4 \times$ تعداد سلول شمارش شده در هر مربع لام هموسیتر
نوبار = تعداد سلول در هر میلی لیتر

آماده سازی محلول دگزامتازون:

برای تهیه غلظت های مختلف دگزامتازون، هشت میلی گرم پودر خالص دگزامتازون (SIGMA-USA) در ۱۳ میکرولیتر حلال آن، DMSO حل شد و محلول با محیط خالص RPMI-1640 به حجم دو میلی لیتر رسانده شد و محلول 8mg/2ml به عنوان استوک در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شد. غلظت های مورد نیاز از دگزامتازون به صورت تازه و قبل از انجام هر تست آماده شد. برای رقیق سازی از محیط خالص RPMI-1640 استفاده شد. غلظت حلال در بیشترین غلظت ۵ درصد بود و برای سلول اثر کشندگی به همراه نداشت.

غلظت های مختلف دگزامتازون (۱/۱۰، ۱/۱۰، ۱۰، ۱۰۰ و ۱۰۰۰ میکرومول) آماده و در

رسپتورهای مرگ اعضا خانواده لیگاند TNF1 به رسپتورهای ویژه از خانواده رسپتور TNF متصل می شوند و به راه اندازی مسیرهای پیام رسان گوناگون در درون سلول منجر می شوند که این مسیرهای پیام رسان می توانند به آپوپتوز، تمایز و تکثیر سلول منجر شوند (۴). در این مسیر، سه مولکول TNF- α ، لیگاند Fas (FasL، CD95L) و TRAIL با اتصال به گیرنده اختصاصی خود به القا آپوپتوز منجر می شوند (۵). در مسیر داخلی (میتو کندریایی) پروتئین های پیش برنده آپوپتوز ۲ نفوذپذیری غشای خارجی میتوکندری را نسبت به سیتوکروم c داخلی افزایش می دهند و این امر به ترشح یا آزادسازی سیتوکروم c به درون فضای سیتوسولی منجر می شود (۶،۷). سیتوکروم c با Apaf-13، آدنوزین تری فسفات و پروکاسپاز ۹ واکنش می دهد و آپوپتوزوم ۴ شکل می گیرد. درون آپوپتوزوم، پروکاسپاز ۹ به کاسپاز ۹ شکسته و فعال می شود و در ادامه به فعال سازی کاسپازهای ۳، ۶ و ۷ منجر و تحریک آپوپتوز می شود (۸،۷).

آشاری از کاسپازهای آغازگر و اجراکننده در القای آپوپتوز دخالت داشته که به ترتیب فعال می شوند (۹،۱۰). کاسپازها خانواده ای از سیستمین پروتازها هستند که به صورت زیموژن های غیر فعال در سلول حاضر هستند (۹). کاسپازهای اجراکننده، مثل کاسپاز ۳ توسط کاسپازهای آغازگر نظیر کاسپاز ۹ فعال می شوند. کاسپازهای اجراکننده منجر به القای شکست پروتئولیتیکی اهداف سلولی مختلفی نظیر poly(ADP-ribose) polymerase (۱۱،۱۲)، پروتئین کیناز وابسته به DNA، پروتئین کیناز δ -C، و دیگر سوبستراها (۱۳) می شوند که در نهایت به مرگ سلولی منجر می شود. مطالعه های اخیر نشان داده، مهارکننده آپوپتوز 5 (IAP)، خانواده ای از پروتئین هاست که آپوپتوز را از طریق اتصال مستقیم و مهارکننده به کاسپازها، مهار می کند (۱۴،۱۵).

به عنوان مثال c-IAP-1، XIAP، و c-IAP-2 به پروکاسپاز ۹ متصل و مانع از فعال شدنش می شوند (۱۶) همچنین مانع از شکست پروتئولیتیکی کاسپاز ۳، ۶ و ۷ می شود (۱۷). با ترشح سیتوکروم c از میتوکندری یکی از آشارهای اصلی کاسپاز به راه می افتد (۱۸،۱۹) سیتوکروم c سیتوسولی به Apaf-1 متصل می شود و فعال سازی کاسپاز ۳ که وابسته به کاسپاز ۹ است را القا می کند (۲۱،۲۲). یک تنظیم کننده مهم آپوپتوز شناسایی شده است تحت عنوان Smac6 که در طول آپوپتوز از میتوکندری به درون سیتوزول آزاد می شود (۲۳،۲۵) و آثار مهاري IAP ها روی کاسپازها را مهار می کند (۲۵،۲۶). مطالعه های پیشین به اثبات رسانده است که آپوپتوز القا شده توسط دگزامتازون وابسته به ترشح سیتوکروم c و فعال سازی کاسپاز ۳ است (۲۷،۲۸).

فرار از مرگ برنامه ریزی شده سلول یکی از ویژگی های سلول های سرطانی است و نقص در مسیر پیام رسان مرگ سلولی یک پدیده اساسی در سرطان کولورکتال است. بنابراین تمامی درمان های غیرتهاجمی سرطان، در نهایت به القای مرگ سلولی منجر خواهند شد (۲۹). سلول های توموری از مکانیسم های مولکولی متنوعی برای مهار آپوپتوز استفاده می کنند. سلول های توموری قادرند مقاومت به آپوپتوز را از طریق بیان پروتئین های ضد آپوپتوزی مثل Bcl-2 یا از طریق کاهش بیان یا جهش پروتئین های پیش برنده آپوپتوز مانند Bax، کسب کنند. بیان Bcl-2 و Bax به وسیله ژن مهارکننده تومور P53 تنظیم می شود (۳۰). روش دیگر مهار آپوپتوز در سلول های سرطانی، فرار از سیستم ایمنی است. طریق مسیر گرانزیم B/پرفورین یا مسیر گیرنده مرگ (Fas) تخریب می کنند. برخی سلول های توموری برای فرار از انهدام و تخریب توسط سیستم ایمنی، حساسیت گیرنده مرگ (Fas) را به لیگاندش (FasL) که توسط سلول های T تولید شده اند، کاهش می دهند که این امر به روش های مختلفی انجام می گیرند، از جمله کاهش بیان گیرنده مرگ

Tumor necrosis factor	1
Proapoptotic	2
Apoptosis-activating factor-1	3
Apoptosome	4
Inhibitor of apoptosis	5
Second mitochondria-derived activator of caspase	

دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شد.

بررسی سمیت سلولی با روش MTT

سمیت سلولی دگزامتازون با استفاده از تست MTT بررسی شد. تست MTT روشی برای تعیین تعداد سلول‌های زنده در مطالعه‌ها سمیت سلولی است. در این روش سلول‌های زنده با متابولیسم فعال نمک تترازولیم زرد (MTT) با فرمول شیمیایی 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide را به محصول فورمازان بنفش رنگ تبدیل می‌کند و این عمل را به وسیله آنزیم‌های میتوکندریایی انجام می‌دهند (۳۷). تعداد سلول بهینه شده ۵۰ هزار سلول (۳۸). در سه بازه زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در هر حفره از پلیت ۹۶ حفره انتقال و در محیط RPMI-1640 غنی شده با ۲ درصد سرم جنین گاوی کشت داده شدند. سپس غلظت‌های مختلفی از دگزامتازون (۰/۱ تا ۱۰۰۰ میکرومول) به سلول‌ها اضافه و در سه زمان ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در انکوباتور با شرایط ۵ درصد CO_2 ، رطوبت ۹۵ درصد و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، قرار گرفت. هر غلظت از دارو در سه چاهک تکرار شد و همچنین آزمایش در حداقل سه تکرار مجزا برای هر زمان انکوباسیون انجام شد.

پس از پایان مدت انکوباسیون، به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر از محلول MTT (SIGMA-USA) با غلظت ۰.۵ mg/ml افزوده و پس از چهار ساعت انکوباسیون، ۵۰ میکرولیتر از DMSO به هر چاهک اضافه و میزان محصول فورازان تولید شده توسط دستگاه الایزا ریدر (Garni Medical Eng. Co., Tehran, Iran) در طول موج ۵۴۶ نانومتر و رفرنس ۶۳۰ نانومتر خوانده شد. سپس IC_{50} و درصد بقای سلول‌های تیمار شده جدول توالی‌های پرایمرهای استفاده شده برای quantitative Real-time PCR

cDNA (yekatajiz; Cat. No. YT4500) انجام شد. مواد مورد نیاز برای سنتز cDNA در جدول زیر آورده شده است. تیوپ مورد نظر با حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر، به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و سپس پنج دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد.

جدول مواد مورد نیاز برای سنتز cDNA طبق کیت یکتا تجهیز (Cat. No. YT4500)

نام ترکیب‌ها	حجم مواد
5x first-strand buffer	4μl
dNTPs(10 mM each)	1μl
RNasin (40U/μL)	0.5 μl
M-MLV	1μL

بررسی کمی بیان رونوشت ژن‌ها توسط (qRT-PCR) Quantitative real-time RT-PCR: برای بررسی کمی بیان رونوشت ژن‌های Fas، FasL، Bax، Bcl-2 از quantitative Real-time PCR، و روش سایبرگرین استفاده و در دستگاه Corbett انجام شد. از ژن GAPDH (Housekeeping) به عنوان کنترل داخلی استفاده شد. هر تیوب شامل ۱۰ میکرولیتر از مستر میکس (2x Real-time PCR master mix green, no ROX) (۱X) (Ampliqon- Denmark)، ۰/۵ میکرولیتر از پرایمر فرادست (10 pmol)، ۰/۵ میکرولیتر از پرایمر فرودست (10 pmol) (جدول زیر) و هشت میکرولیتر از آب دیونیزه بود، به طوری که حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر تعیین شد. برنامه زمانی و دمایی برای تکثیر تمامی این ژن‌ها به این ترتیب بود: برای دناوراسیون و فعال‌سازی آنزیم، نمونه‌ها

نام ژن‌ها	توالی پرایمر فرادست (5'→3')	توالی پرایمر فرودست (5'→3')	کد ژن
GAPDH	GAAGGTGAAGGTCGGAGTC	GAAGATGGTGATGGGATTTTC	NM_001289745.2
Fas	TGCCAAGAAGGGAAGGAGTA	CGGGTGTCAGTTTATTTCCAC	XM_011539767.3
FasL	AGCAAATAGGCCACCCAGTCC	TGGCTCAGGGGCAGGTTGTTG	NM_000639.2
Bax	AACATGGAGCTGCAGAGGAT	CAGTTGAAGTTGCCGTCAGA	XM_017027077.1
Bcl-2	ATGTGTGTGGAGAGCGTCAA	TCTTCAGAGACAGCCAGGAGA	NM_000633.2

به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. سپس دناوراسیون در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه انجام شد و برای اتصال پرایمر، طولی سازی و دریافت فلورسنت نمونه‌ها به مدت ۶۰ ثانیه در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. مرحله دناوراسیون، اتصال پرایمر و طولی سازی ۴۰ سیکل تکرار شد.

آنالیز آماری:

پردازش داده‌های Real-Time PCR توسط نرم‌افزار LinReg و REST انجام شد و به روش $\Delta\Delta CT$ محاسبه شد و سطح معنادار آماری $p < 0.05$ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها:

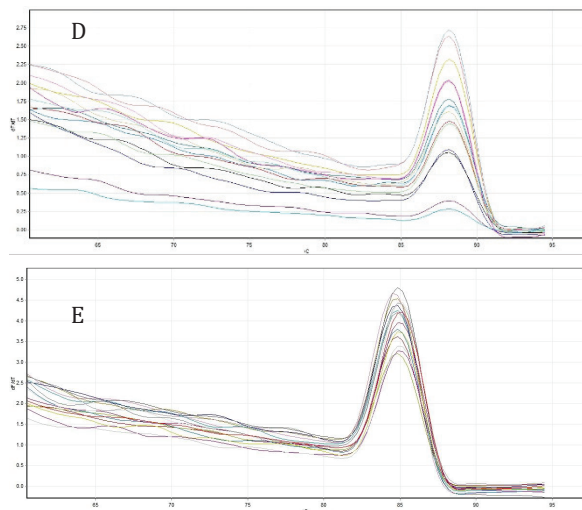
نتایج حاصل از بررسی سمیت سلولی:

برای بررسی اثر داروی دگزامتازون روی بقای سلول‌های HT-29 سرطان کولورکتال انسانی، سمیت سلولی بعد از گذشت سه بازه زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از

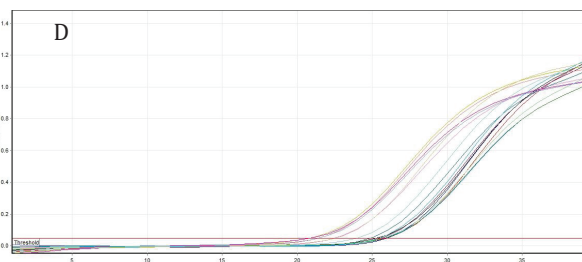
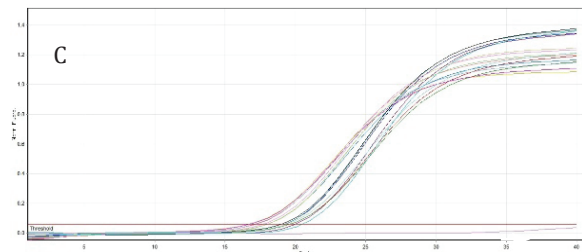
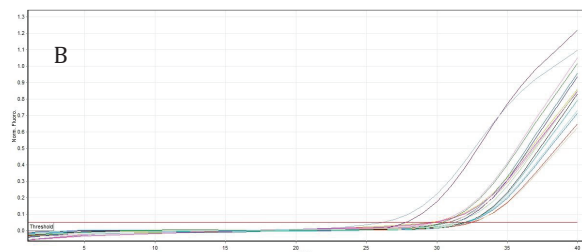
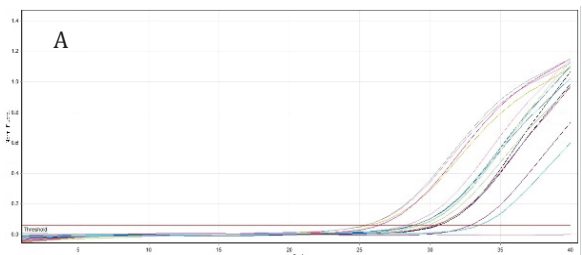
با غلظت‌های مختلف دگزامتازون از فرمول زیر محاسبه شد (۳۸). درصد بقا (درصد): (جذب نوری رنگ تولیدی در سلول‌های تیمار شده / جذب نوری رنگ تولیدی در سلول‌های تیمار نشده) $\times 100$

استخراج RNA و سنتز cDNA:

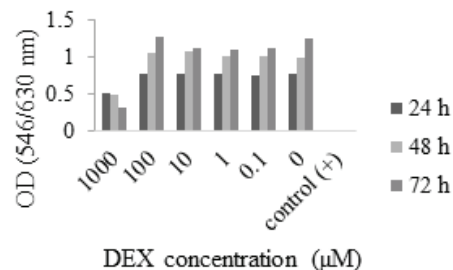
برای استخراج RNA و سنتز cDNA، رده سلولی HT-29 با غلظت ۱۰۰ و ۱۰۰۰ میکرومول دگزامتازون به مدت ۴۸ ساعت تیمار شد. هر غلظت در دو چاهک تکرار و استخراج total RNA با استفاده از محلول RNX-plus (sinaclon, Cat. No. RN7713C، Iran) طبق پروتکل ارائه شده توسط کمپانی، انجام شد. RNA استخراج شده در فریزر -۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. برای بررسی‌های کمی RNA استخراج شده از دستگاه اسپکتروفتومتر استفاده شد. OD ۲۸۰/۲۶۰ میزان جذب DNA/protein است که عدد به‌دست آمده باید بین ۱/۸-۲ باشد. غلظت ۲۰۰۰ نانو گرم از total RNA برای سنتز cDNA استفاده و واکنش RT-PCR با استفاده از کیت سنتز



شکل ۱: منحنی ذوب محصول Real-time PCR برای سلول‌های تیمار شده و سلول‌های تیمار نشده. A: ژن Bcl-2، B: ژن Fas، C: ژن FasL، D: ژن Bax، E: ژن Bcl-2 و GAPDH ژن خانه‌داری. منحنی تکثیر رونوشت ژن‌های Bcl-2، Fas، FasL، Bax و GAPDH در شکل ۲ آورده شده است، که نشان می‌دهد تکثیر به خوبی انجام شده است.



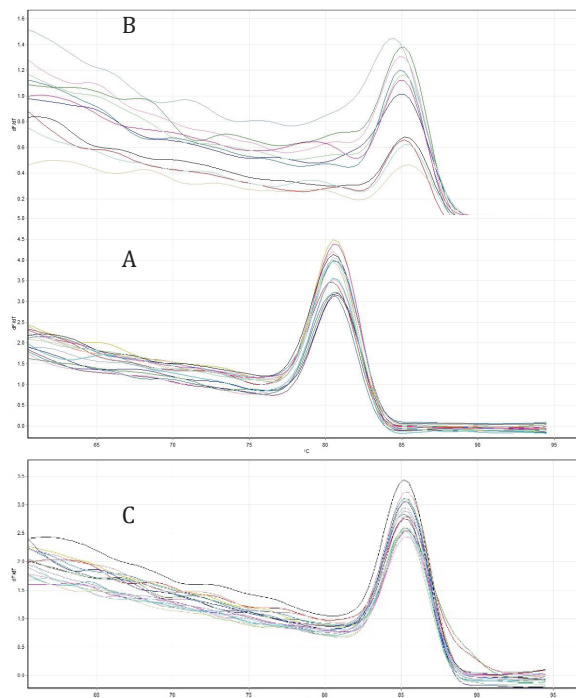
تیمار سلول‌ها در محدوده غلظتی ۰/۱ تا ۱۰۰۰ میکرومول، با روش MTT ارزیابی و با سلول‌های تیمار نشده به عنوان گروه کنترل مقایسه شد. در نمودار ۱ ارتباط بین بقای سلولی با غلظت‌های مختلف دارو نشان داده شده است. نتایج بررسی سمیت سلولی حاکی از آن است که در مقایسه با سلول‌های تیمار نشده، غلظت ۱۰۰۰ میکرومول از دگزامتازون به کاهش سلول‌های زنده در هر سه بازه زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت منجر شده است. همچنین غلظتی از دارو که منجر به

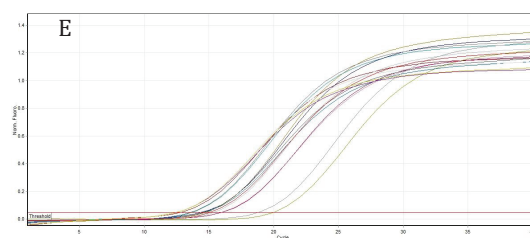
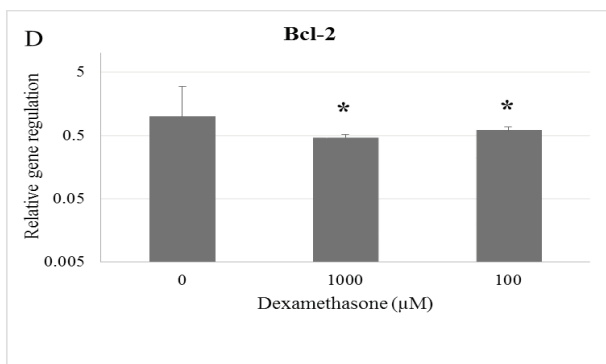


۵۰ درصد مهار رشد شود (IC₅₀) نیز محاسبه شد که غلظت ۱۰۰۰ میکرومول از دگزامتازون بعد از ۴۸ ساعت انکوباسیون است.

نمودار ۱ میزان سمیت سلول‌ها بر غلظت‌ها و به تفکیک زمان پیگیری: سلول‌ها با تعداد بهینه شده برای هر مدت انکوباسیون در حفره‌های پلیت ۹۶ حفره کاشته و با غلظت‌هایی از دگزامتازون که در محور افقی نشان داده شده است، به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت انکوباسیون، تحت تیمار قرار گرفتند. کنترل (+) حاوی ۲۰ درصد DMSO است و سلول‌ها را وارد فاز مرگ می‌کند. غلظت صفر (۰ μM) نشان‌دهنده گروه کنترل است و شامل سلول‌هایی است که تحت تیمار قرار نگرفته‌اند. نتایج نشان داد که درصد سلول‌های زنده در تیمار با ۱۰۰۰ میکرومول دگزامتازون، در مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت انکوباسیون کاهش یافته است. در سایر غلظت‌ها، کاهش معناداری در درصد سلول‌های زنده مشاهده نشد.

نتایج حاصل از بررسی کمی بیان رونوشت ژن‌ها توسط qRT-PCR: برای اطمینان از عدم حضور پیک‌های غیراختصاصی، نبود ساختارهای ثانویه پرایمر در محصول‌های Real-time PCR و تولید قطعه‌های اختصاصی، منحنی ذوب رسم شد (شکل ۱). نتایج منحنی ذوب نشان داد که پرایمرها به صورت اختصاصی عمل می‌کنند.

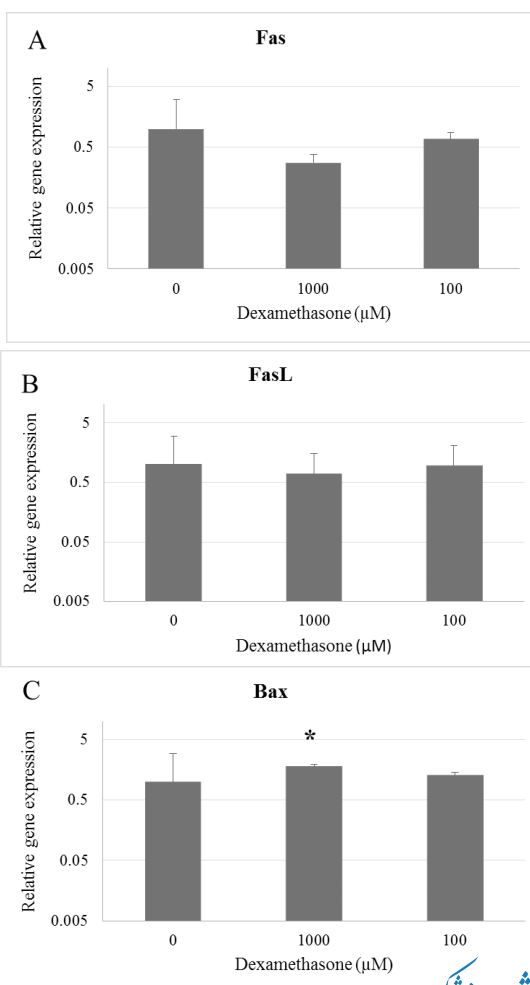




شکل ۲: منحنی تکثیر (Amplification Plot) حاصل از Real-time PCR برای سلول‌های تیمار شده و سلول‌های تیمار نشده. A: رونوشت ژن Fas، B: رونوشت ژن FasL، C: رونوشت ژن Bax، D: رونوشت ژن Bcl-2، E: رونوشت ژن GAPDH. خط قرمز افقی مربوط به خط حد آستانه است. خط حد آستانه که برای نمونه‌ها توسط دستگاه محاسبه شده است ۶ درصد است.

برای آنالیز داده‌های حاصل از واکنش Real-time PCR، داده‌های take off و منحنی تکثیر مربوط به ژن‌های هدف و ژن خانه داری از برنامه Rotor-Gene 6000 Series software 1.7 استخراج و از نرم افزار REST استفاده شد.

نتایج نشان داد، در سلول‌های تیمار شده با غلظت‌های ۱۰۰ و ۱۰۰۰ میکرومول دگزامتازون، سطح بیان رونوشت ژن‌های Fas و FasL در مقایسه با سلول‌های تیمار نشده تغییر معنادار ($p > 0.05$) وجود ندارد. در حالی که سطح بیان رونوشت ژن Bcl-2 در سلول‌های تیمار شده به طور معنادار ($p < 0.05$) در مقایسه با سلول‌های تیمار نشده کاهش یافت. زمانی که دگزامتازون با غلظت ۱۰۰۰ میکرومول استفاده شد، سطح بیان رونوشت ژن Bax در سلول‌های تیمار شده در مقایسه با سلول‌های تیمار نشده به طور معنادار ($p < 0.05$) افزایش یافت (نمودار ۲).



نمودار ۲. نتایج حاصل از بررسی کمی تغییرهای بیان رونوشت ژن‌ها توسط qRT-PCR: رده سلولی HT-29 با غلظت‌های ۱۰۰ و ۱۰۰۰ میکرومول دگزامتازون به مدت ۴۸ ساعت تیمار شد و تغییرهای بیان رونوشت ژن‌های Fas، FasL، Bax و Bcl-2 بررسی شد. A: رونوشت ژن Fas، B: رونوشت ژن FasL، C: رونوشت ژن Bax، D: رونوشت ژن Bcl-2، E: رونوشت ژن GAPDH. غلظت صفر (μM) نشان دهنده گروه کنترل است و شامل سلول‌هایی است که تحت تیمار قرار نگرفته‌اند. (*) نشان‌دهنده تغییر معنادار ($p < 0.05$) است.

بحث:

در این تحقیق اثر سمیت سلولی دگزامتازون، در رده سلولی HT-29 سرطان کولورکتال انسانی بررسی شد. سپس به بررسی مکانیسم سمیت سلولی با تکیه بر برخی ژن‌های مهم مسیر داخلی و خارجی آپوپتوز و اثر آن بر القای این سیستم پرداخته شد. به طور قطع قطع ژن‌های بی‌شماری در این مسیر ایفای نقش می‌کند که در تحقیق حاضر تمرکز روی بیان رونوشت ژن‌های Fas/FasL و Bax/Bcl-2 بوده است.

ابتدا رده سلولی HT-29 با یک طیف غلظتی از دگزامتازون (0.1، 1، 10، 100، 1000 μM) در مدت زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت انکوباسیون، تیمار شد. بررسی نتایج حاصل از تست MTT نشان داد، درصد بقای سلول‌های تیمار شده در غلظت ۱۰۰۰ میکرومول و در مدت انکوباسیون ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در مقایسه با سلول‌های تیمار نشده، کاهش یافته است اما در غلظت‌های ۱۰۰، ۱۰، ۱ و ۰/۱ میکرومول، در مدت انکوباسیون ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، مرگ سلولی مشاهده نشد. غلظت IC_{50} برای این دارو در مدت ۴۸ ساعت انکوباسیون، غلظت ۱۰۰۰ میکرومول و نشان می‌دهد مرگ سلولی وابسته به دوز و زمان است. موافق با تحقیق ما، Chauhan و همکاران در سال ۲۰۰۱ سیگنالینگ بالادست فعالسازی کاسپاز ۳ توسط دگزامتازون را در مالتیپل میلوما بررسی کردند. سلول S.MM با ۱۰ میکرومول دگزامتازون به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت تیمار شد و نتایج نشان داد که آپوپتوز القا شده توسط دگزامتازون در مالتیپل میلوما به واسطه Smac بوده است که با اتصال به XIAP آن را مهار کرده و به فعالسازی کاسپاز ۹ منجر می‌شود (۳۹). در سال ۲۰۱۱، Zhengzi و همکاران اثر مهار داروی دگزامتازون را روی رشد سلول‌های Mino (لنفوبلاست‌هایی با اختلال‌های سیتوژنتیکی) و سلول‌های به تازگی جدا شده MCL^{A} بررسی کرده و نشان دادند که دگزامتازون در تیمار ۷۲ ساعته به صورت وابسته به دوز رشد هر دو سلول را مهار می‌کند. IC_{50} در سلول‌های Mino، بین ۱ و ۱۰ میکرومول و در سلول‌های MCL بین یک درصد و ۰/۱ تعیین شد (۴۰). در سال ۲۰۱۰، Gandhi و همکاران اثر مهار دگزامتازون روی رشد رده‌های سلولی plasma cell leukemia و مولتیپل میلوما را بررسی کردند. این سلول‌ها به مدت ۷۲ ساعت با دامنه غلظتی ۰/۴ تا ۰/۰۰۰۹۸ میکرومول دگزامتازون تیمار شدند. نتایج نشان داد که دگزامتازون به مهار رشد در سلول‌ها منجر می‌شود. همچنین

سلول‌های Mino با غلظت ۰/۱ میکرومول دگزامتازون تیمار شدند، کاسپاز ۳، ۸، ۹ و پروتئین‌های پروآپتوتیک و آنتی‌آپتوتیک وابسته به میتوکندری فعال شد (۴۰). در سال ۲۰۱۰، Gandhi و همکاران برای بررسی مسیر پیام‌رسان آپوپتوز القا شده به واسطه دگزامتازون در سلول‌های مالتیپل میلوما، فعال‌سازی مسیرهای کاسپاز را بررسی کردند. به این منظور سلول‌ها به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت با غلظت یک میکرومول دگزامتازون تیمار شدند و نتایج نشان داد که دگزامتازون منجر به فعال‌سازی کاسپاز ۳ و ۸ در رده‌های سلولی Karpas-620، KMS-12-BM، JJN-3 و NCI-H929 و منجر به فعال‌سازی کاسپاز ۹ در دو رده سلولی JJN-3 و RPMI-8226 شد. همچنین تیمار رده‌های سلولی با غلظت یک میکرومول دگزامتازون به مدت ۷۲ ساعت به القای آپوپتوز منجر شد (۴۱).

نتیجه‌گیری:

به نظر می‌رسد مرگومیر و توقف در رشد رده سلولی HT-29 که تحت تیمار با ۱۰۰۰ میکرومول دگزامتازون به مدت ۴۸ ساعت بوده است، ناشی از القای مسیر داخلی آپوپتوز در این رده سلولی است زیرا سطح بیان رونوشت ژن‌های پروآپتوتیک Bax و آنتی‌آپتوتیک Bcl-2 به ترتیب افزایش و کاهش بیان را نشان داد که این تغییرهای بیان، در راستای القای آپوپتوز اعمال شده است. بنابراین تیمار رده سلولی HT-29 سرطان کولورکتال انسانی با ۱۰۰۰ میکرومول از دگزامتازون به مدت ۴۸ ساعت می‌تواند بیان ژن‌های دخیل در مسیر داخلی آپوپتوز را در راستای القای آپوپتوز تغییر دهد. یکی از اهداف درمانی، تحریک مسیرها و مکانیسم‌های طبیعی در سلول است که تنظیم‌های تکثیر سلولی را کنترل می‌کند. از آنجا که آپوپتوز از دو مسیر داخلی و خارجی انجام می‌شود، حایز اهمیت است که وقتی دارویی برای درمان انتخاب می‌شود، ژن‌های کدام مسیر را تحت تأثیر قرار می‌دهد. از این‌رو، در تحقیق حاضر برخی ژن‌های هر دو مسیر مطالعه شد و نتایج نشان داد که دگزامتازون به صورت وابسته به دوز و زمان می‌تواند روی بیان ژن‌های مسیر داخلی آپوپتوز تأثیر داشته باشد.

رده‌های سلولی میلوما با غلظت ۸۰۰ نانومولار دگزامتازون به مدت شش ساعت و ۲۴ ساعت تیمار و به افزایش بیان مهارکننده تومور p21 منجر شد. برای شناخت مکانیسم مهار رشد توسط دگزامتازون، چرخه سلولی بررسی شد و نتایج نشان داد که تیمار رده‌های سلولی میلوما با غلظت ۰/۸ یا یک میکرومول دگزامتازون به مدت ۷۲ ساعت به توقف سلول‌ها در G₁/G₀ منجر شد (۴۱).

در تحقیق حاضر، پس از تیمار سلول‌ها در غلظت IC₅₀ دگزامتازون، سطح بیان رونوشت ژن‌های Fas و FasL در مقایسه با سلول‌های تیمار نشده تغییر معنادار ($p < 0.05$) مشاهده نشد. در سلول‌های سرطانی کاهش بیان ژن‌های Fas و برعکس افزایش بیان ژن FasL گزارش شده است، بنابراین در این تحقیق انتظار می‌رفت که پس از تیمار، بیان رونوشت ژن Fas افزایش و برعکس بیان رونوشت ژن FasL کاهش یابد، ولی با نتایج حاصل از این تحقیق، دگزامتازون بر روی تغییر بیان رونوشت ژن‌های Fas/FasL مسیر خارجی آپوپتوز بی تأثیر بود.

ژن‌های Fas/FasL مسیرهای خارجی همچنین پس از تیمار سلول‌ها در غلظت IC₅₀ دگزامتازون، انتظار می‌رفت که دگزامتازون بیان رونوشت ژن‌های Bax/ Bcl-2 مسیر داخلی آپوپتوز را در راستا القا آپوپتوز تغییر دهد. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که به طور معنادار ($p < 0.05$) در غلظت ۱۰۰۰ میکرومول سطح بیان رونوشت ژن‌های Bax و Bcl-2 در مقایسه با سلول‌های تیمار نشده، به ترتیب افزایش و کاهش یافت. همسو با نتایج ما، در سال ۲۰۱۱، Zhengzi و همکارانش اثر دگزامتازون با غلظت ۰/۱، ۰/۱ و ۱ میکرومول را روی القای آپوپتوز در سلول‌های Mino بررسی کردند. به این منظور سلول‌ها به مدت ۲ تا ۷ روز تیمار شدند. نتایج نشان داد که دگزامتازون به صورت وابسته به زمان و دوز، آپوپتوز را در کشت‌های بیش از چهار روز القا می‌کند. برای بررسی مکانیسم القای آپوپتوز، سلول‌های MCL (سلول‌های مشتق شده از Mino) با دگزامتازون تیمار و مسیر پیام‌رسانی آپوپتوز با استفاده از آنالیز وسترن بلات بررسی شد. زمانی که سلول‌های Mino به مدت چهار روز با دگزامتازون (۰/۱، ۰/۱ و ۱ میکرومول) تیمار شدند، شکسته شدن PARP به صورت وابسته به دوز مشاهده شد. زمانی که

منابع:

- Mundade R, Imperiale TF, Prabhu L, Loehrer PJ, Lu T. Genetic pathways, prevention, and treatment of sporadic colorectal cancer. *Oncoscience*. 2014;1(6):400-406.
- Dolatkhah R, Somi MH, Bonyadi MJ, Asvadi Kermani I, Farassati F, Dastgiri S. Colorectal cancer in Iran: molecular epidemiology and screening strategies. *J Cancer Epidemiol* [Internet]. 2015 [cited 2016 Aug 3];2015. Available from: <http://www.hindawi.com/journals/jce/2015/643020/abs/>
- Zahran MA, Gamal-Eldeen AM, El-Hussieny EA, Agwa HS. Thalidomide dithiocarbamate and dithioate derivatives induce apoptosis through inhibition of histone deacetylases and induction of caspases. *J Genet Eng Biotechnol*. 2014;12(1):65-70.
- Tschopp J, Martinon F, Hofmann K. Apoptosis: silencing the death receptors. *Curr Biol*. 1999;9(10):R381-R384.
- Koornstra JJ, De Jong S, Hollema H, de Vries EGE, Kleibeuker JH. Changes in apoptosis during the development of colorectal cancer: a systematic review of the literature. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2003;45(1):37-53.
- Ghobrial IM, Witzig TE, Adjei AA. Targeting apoptosis path-

ways in cancer therapy. *CA Cancer J Clin*. 2005;55(3):178-194.

- Czabotar PE, Lessene G, Strasser A, Adams JM. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014;15(1):49-63.
- Adrain C, Martin SJ. The mitochondrial apoptosome: a killer unleashed by the cytochrome seas. *Trends Biochem Sci*. 2001;26(6):390-397.
- Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science*. 1998;281(5381):1312-1316.
- Chinnaiyan AM, Dixit VM. The cell-death machine. *Curr Biol*. 1996;6(5):555-562.
- Oberhammer FA, Hochegger K, Fröschl G, Tiefenbacher R, Pavelka M. Chromatin condensation during apoptosis is accompanied by degradation of lamin A+ B, without enhanced activation of cdc2 kinase. *J Cell Biol*. 1994;126(4):827-837.
- Lazebnik YA, Kaufmann SH, Desnoyers S, Poirier GG, Earnshaw WC. Cleavage of poly (ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature*. 1994;371(6495):346-347.
- Emoto Y, Manome Y, Meinhardt G, Kisaki H, Kharbanda S, Robertson M, et al. Proteolytic activation of protein kinase C delta

- by an ICE-like protease in apoptotic cells. *EMBO J.* 1995;14(24):6148–6156.
14. Deveraux QL, Reed JC. IAP family proteins—suppressors of apoptosis. *Genes Dev.* 1999;13(3):239–252.
15. Miller LK. An exegesis of IAPs: salvation and surprises from BIR motifs. *Trends Cell Biol.* 1999;9(8):323–328.
16. Deveraux QL, Roy N, Stennicke HR, Van Arsdalet T, Zhou Q, Srinivasula SM, et al. IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases. *EMBO J.* 1998;17(8):2215–2223.
17. Roy N, Deveraux QL, Takahashi R, Salvesen GS, Reed JC. The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases. *EMBO J.* 1997;16(23):6914–6925.
18. Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell.* 1996;86(1):147–157.
19. Yang J, Liu X, Bhalla K, Kim CN, Ibrado AM, Cai J, et al. Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science.* 1997;275(5303):1129–1132.
20. Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Green DR, Newmeyer DD. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science.* 1997;275(5303):1132–1136.
21. Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, et al. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell.* 1997;91(4):479–489.
22. Zou H, Li Y, Liu X, Wang X. An APAF-1· cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J Biol Chem.* 1999;274(17):11549–11556.
23. Chai J, Du C, Wu J-W, Kyin S, Wang X, Shi Y. Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO. *Nature.* 2000;406(6798):855–862.
24. Srinivasula SM, Datta P, Fan X-J, Fernandes-Alnemri T, Huang Z, Alnemri ES. Molecular determinants of the caspase-promoting activity of Smac/DIABLO and its role in the death receptor pathway. *J Biol Chem.* 2000;275(46):36152–36157.
25. Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell.* 2000;102(1):33–42.
26. Verhagen AM, Ekert PG, Pakusch M, Silke J, Connolly LM, Reid GE, et al. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *cell.* 2000;102(1):43–53.
27. Chauhan D, Pandey P, Ogata A, Teoh G, Krett N, Halgren R, et al. Cytochrome c-dependent and-independent induction of apoptosis in multiple myeloma cells. *J Biol Chem.* 1997;272(48):29995–29997.
28. Chauhan D, Pandey P, Ogata A, Teoh G, Treon S, Urashima M, et al. Dexamethasone induces apoptosis of multiple myeloma cells in a JNK/SAP kinase independent mechanism. *Oncogene.* 1997;15(7):837–843.
29. Koehler BC, Jäger D, Schulze-Bergkamen H. Targeting cell death signaling in colorectal cancer: current strategies and future perspectives. *World J Gastroenterol WJG.* 2014;20(8):1923–1934.
30. Miyashita T, Krajewski S, Krajewska M, Wang HG, Lin H-K, Liebermann DA, et al. Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene.* 1994;9(6):1799–1805.
31. Smyth MJ, Godfrey DI, Trapani JA. A fresh look at tumor immunosurveillance and immunotherapy. *Nat Immunol.* 2001;2(4):293–299.
32. Cheng J, Zhou T, Liu C, Shapiro JP, Brauer MJ, Kiefer MC, et al. Protection from Fas-mediated apoptosis by a soluble form of the Fas molecule. *Science.* 1994;263(5154):1759–1762.
33. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* 2007;35(4):495–516.
34. Yao X-L, Cowan MJ, Gladwin MT, Lawrence MM, Angus CW, Shelhamer JH. Dexamethasone alters arachidonate release from human epithelial cells by induction of p11 protein synthesis and inhibition of phospholipase A2 activity. *J Biol Chem.* 1999;274(24):17202–17208.
35. Cha HH, Cram EJ, Wang EC, Huang AJ, Kasler HG, Firestone GL. Glucocorticoids stimulate p21 gene expression by targeting multiple transcriptional elements within a steroid responsive region of the p21 waf1/cip1 promoter in rat hepatoma cells. *J Biol Chem.* 1998;273(4):1998–2007.
36. Louis KS, Siegel AC, Levy GA. Comparison of manual versus automated trypan blue dye exclusion method for cell counting. Stoddart MJ (Ed.), *Mammalian Cell Viability: Methods and Protocols, Series Methods in Molecular Biology.* Springer Protocols, New York; 2011.
37. Abe K, Matsuki N. Measurement of cellular 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction activity and lactate dehydrogenase release using MTT. *Neurosci Res.* 2000;38(4):325–329.
38. Ghiaghi M, Forouzes F, Rahimi H. Effect of Sodium Butyrate on LHX1 mRNA Expression as a Transcription Factor of HDAC8 in Human Colorectal Cancer Cell Lines. *Avicenna J Med Biotechnol.* 2019;11(3).
39. Chauhan D, Hideshima T, Rosen S, Reed JC, Kharbanda S, Anderson KC. Apaf-1/cytochrome c-independent and Smac-dependent induction of apoptosis in multiple myeloma (MM) cells. *J Biol Chem.* 2001;276(27):24453–24456.
40. Qian Z, Zhang L, Cai Z, Sun L, Wang H, Yi Q, et al. Lenalidomide synergizes with dexamethasone to induce growth arrest and apoptosis of mantle cell lymphoma cells in vitro and in vivo. *Leuk Res.* 2011;35(3):380–386.
41. K Gandhi A, Kang J, Capone L, Parton A, Wu L, H Zhang L, et al. Dexamethasone synergizes with lenalidomide to inhibit multiple myeloma tumor growth, but reduces lenalidomide-induced immunomodulation of T and NK cell function. *Curr Cancer Drug Targets.* 2010;10(2):155–167.