

تأثیر ویتامین C بر مقاومت دارویی 5-FU در سلول‌های سرطانی کولون HT29

آرزو زارعی^۱، سعید قربیان^{۱*}

(۱) گروه ژنتیک مولکولی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اهر، اهر، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱/۲۵ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱/۲۰

چکیده

مقدمه: امروزه، تحقیقات گسترده‌ای در استفاده از آنتی‌اکسیدانت‌ها در کاهش آثار جانبی شیمی داروها و شکستن مقاومت سرطان نسبت به شیمی دارو در حال انجام است. هدف این مطالعه نیز، استفاده از ویتامین C به‌عنوان آنتی‌اکسیدانت و تعیین تأثیر آن در مقاومت دارویی سلول‌های HT29 است.

مواد و روش‌ها: در طول این مطالعه مورد-شاهدی، ابتدا سلول‌های HT29 کشت داده شدند و با استفاده از روش MTT assay، تکثیر سلولی و یا مرگ سلول‌ها در تیمار با ویتامین C و داروی 5-FU بررسی گردید؛ همچنین آزمون DAPI برای نشان دادن آپوپتوز سلولی صورت گرفت. پس از استخراج RNA و تهیه cDNA، برای تعیین سازوکار مولکولی آپوپتوز توسط دارو و اثر مهارکنندگی و یا تشدید ویتامین C بر سیگنالینگ سلولی آپوپتوز، بیان ژن‌های مرتبط با رشد و آپوپتوز مارکرهای Bax, casp3 به روش Real-time PCR سنجیده شد.

یافته‌های پژوهش: نتایج به‌دست‌آمده از آزمایش MTT نشان داد که ویتامین C هیچ تأثیر معناداری ($P < 0.05$) در کاهش اثر 5-FU در آپوپتوز سلول‌ها ندارد. نتایج دیپی و DNA ladder assay به‌دست‌آمده از تیمار سلول‌های HT29 تغییرات کیفی آپوپتوز سلولی را نشان داد. علاوه بر این، نتایج Real-time PCR نشان داد افزایش معناداری در بیان ژن Bax و Casp3 بر سلول‌های سرطانی کولون HT29 در تیمار با شیمی دارو وجود دارد.

بحث و نتیجه‌گیری: یافته‌ها نشان داد ویتامین C مانع تأثیر شیمی دارو نشد، اگرچه هیچ تأثیر مثبتی هم بر روی رشد سلول‌های سرطانی نداشت؛ بنابراین، مصرف ویتامین C از سوی بیمارانی که در حال شیمی‌درمانی هستند، هیچ ممانعتی بر تأثیر دارو نخواهد داشت و می‌تواند بیمار را از آثار جانبی دارو محافظت کند.

واژه‌های کلیدی: سرطان کلورکتال، ویتامین C، آپوپتوز، شیمی دارو 5-FU، HT29

* نویسنده مسئول: گروه ژنتیک مولکولی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اهر، اهر، ایران

Email: ghorbian20@yahoo.com

مقدمه

سرطان کولورکتال یکی از عوامل شایع مرگ‌ومیر در جهان است (۱، ۲). سرطان روده بزرگ، سومین سرطان شایع در دنیا است (۳) و در حال حاضر، سالانه حدود ۱/۲ میلیون مورد جدید سرطان در ایالات متحده آمریکا تشخیص داده می‌شود و هر سال، این بیماری جان حدود ۶۰۰ هزار نفر را می‌گیرد (۴). عوامل مؤثر بر تغییرات در میزان بروز و بقای بیماران را می‌توان به دو صورت قابل اصلاح و غیرقابل اصلاح تقسیم کرد (۵، ۶).

عوامل قابل اصلاح شامل چاقی، رژیم غذایی دربرگیرنده گوشت قرمز، مصرف سبزی‌ها (۸، ۷)، مصرف الکل، دخانیات و فعالیت فیزیکی اندک (۹) و عوامل خطر غیرقابل اصلاح شامل سن بالای ۶۵ سال، سابقه فامیلی، بیماری‌های التهابی روده و پولیپ‌های آدنوماتوی فامیلی است (۱۰). با قاطعیت نمی‌توان دربارهٔ اپیدمیولوژی سرطان قضاوت کرد؛ اما بر اساس آمار سازمان بهداشت جهانی، سرطان کولون سومین سرطان شایع در مردان و دومین سرطان رایج در زنان، در سال ۲۰۱۶ بوده است (۳). میزان زنده ماندن افراد دارای متاستاز سرطان کولون به مدت ۵ سال است، به‌طوری‌که این بیماران به داروهای ضدسرطان نیز مقاومت پیدا می‌کنند (۱۱). آنتی‌متابولیت 5-FU فعال‌ترین دارو در برابر این بدخیمی است. 5-FU یک آنالوگ یوراسیل با یک اتم فلورین است که در جایگاه C-5 به‌جای هیدروژن قرار دارد (۱۲). در سرطان پیشرفته کولون، درمان با 5-FU مدولاسیون شده با اسیدفولیک، میزان پاسخ ۲۰-۲۵ درصد و میانگین زنده ماندن ۱۱ ماه است. اخیراً اثبات شده است که داروهای بیولوژیکی جدید مانند آنتی‌بادی‌های مونوکلونال (آنزیم مهارکننده فاکتور رشد اپیدرمی) و بواسیزوماب (یک مهارکننده فاکتور رشد اندوتلیال عروقی)، مزایای بالینی بالاتری برای بیماران مبتلا به سرطان متاستاتیک کولورکتال دارند (۱۳)؛ اما مسیرهای سیگنالینگ مولکولی که پاسخ به این عوامل را تنظیم می‌کنند، به‌وضوح مشخص نیستند؛ همچنین نقش ویتامین‌های آنتی‌اکسیدان در درمان سرطان با استفاده از سلول‌های تومور در کشت و بیماران مبتلا به تومورهای خاص مطالعه شده‌اند؛ اما این نتایج پراکنده‌اند و هیچ فرضیه‌ای برای توضیح سازوکارهای این ویتامین‌ها در

شرایط *in vivo* یا *in vitro* در درمان سرطان ارائه نشده است.

ژن *Bax* یکی از ژن‌هایی است که در مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلول نقش دارد. رخدادهای مشترک جهش‌های حرکتی در ژن *Bax* در سرطان کولون و سرطان معده نشان می‌دهد که غیرفعال کردن *Bax* در برخی تومورها ممکن است با پیشرفت فرایند آپوپتوز، به پیشرفت تومور کمک کند. این فرضیه توسط اثر کاهش بیان *Bax* در بعضی از دستگاه‌ها پشتیبانی می‌شود. بااین‌حال، اهمیت عملکرد این جهش در پیشرفت تومور مشخص نشده است (۱۴). کاسپازها نیز واسطه‌های حیاتی مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلول‌ها هستند؛ ازجمله آن‌ها می‌توان به کاسپاز ۳ اشاره کرد که به‌طور ویژه‌ای باعث تجزیه پروتئین‌های کلیدی سلولی می‌شود. بااین‌حال، اطلاعات خاصی از این کاسپازها در آپوپتوز تا حد فراوانی ناشناخته باقی‌مانده است. کاسپاز ۳ برای رشد طبیعی مغز ضروری است و در سایر سناریوهای آپوپتوز در یک شیوه خاص بافت، نوع سلولی و یا نوع خاصی از تحریکات مرگ‌ومیر، مهم و ضروری است (۱۵).

مواد و روش‌ها

در این مطالعه مورد-شاهدی، سلول‌های سرطانی HT29 تهیه‌شده از مرکز کلکسیون سلولی پاستور ایران، در داخل فلاسک‌های سلولی و در محیط کشت کامل RPMI 1640 کشت گردیدند. پس از رشد با ازدحام بالای ۹۰ درصد تریپسین شدند و به تعداد ده هزار سلول در هر چاهک پلیت ۹۶ تایی، به مدت ۲۴ ساعت کشت گردیدند. تیمار با شیمی دارویی 5-FU با غلظت‌های مختلف صورت گرفت و IC₅₀ شیمی دارو و میزان مقاومت سلول‌ها با استفاده از روش MTT در ساعت‌های مختلف اندازه‌گیری شد؛ سپس سلول‌ها در پلیت‌های ۶ تایی کشت داده شدند و تیمار شیمی دارو و اسید آسکوربیک انجام گردید و با استفاده از DAPI سلول‌ها رنگ‌آمیزی شد و میزان آپوپتوز و نقش ویتامین سی در جلوگیری و یا تشدید آن مطالعه گردید. پس از آن، برای مطالعه سازوکار مولکولی و نیز ژن‌های درگیر در آن، استخراج RNA از سلول‌های سرطانی HT29 صورت گرفت و سنتز cDNA تک‌ رشته‌ای با استفاده از آنزیم MMLV طبق پروتکل‌های موجود انجام شد. به‌منظور انجام Real time PCR

طراحی پرایمرهای بر روی ژنهای مرتبط صورت گرفت. واکنش Real time PCR به صورت تکرارهای ۳ تایی (triplet) انجام گردید.

روش کار با رده سلولی HT29: در این پروژه، رده سلولی آدنوکارسینوم کولون انسانی HT-29 (human colon adenocarcinoma grade II) از انستیتوی پاستور تهیه شد. سلولها در داخل فلاسک حاوی ۹۰ سی سی محیط کشت RPMI1640 غنی شده با ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (Fetal Bovine Serum-FBS)، ۱۰۰ ماکرولیت آنتی بیوتیک (penicillin 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ and streptomycin 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)، در انکوباتور در شرایط دمایی ۳۷ درجه سانتی گراد و دی اکسید کربن ۵ درصد کشت گردید. پس از یک شبانه روز، محیط کشت سلولها دور ریخته و با PBS شستشو داده و محیط کشت تازه به آن افزوده شد و دوباره در انکوباتور قرار گرفت و پس از ۴۸ ساعت، سلولها پاساژ داده شدند.

بررسی توکسیستیتی شیمی داروی 5-FU بر روی سلولهای سرطانی: برای بررسی تأثیر شیمی دارو بر روی سلولهای HT29 ابتدا زمانی که سلولها به تراکم حدود ۸۰ درصد در T فلاسک کشت سلولی رسیدند، توسط تریپسین/ EDTA نیم درصد از سطح T فلاسک جدا گردیدند و به هر چاهک پلیت ۹۶ خانه، حدود ۱۰ هزار سلول HT29 اضافه شد و برای رشد بهینه سلولها، داخل انکوباتور نگهداری گردید تا اینکه سلولها به سطح فلاسک متصل شوند و رشد کنند. پس اینکه سلولها ۴۰ تا ۵۰ درصد چاهک را پر کردند، به تخلیه محیط کشت هر چاهک اقدام می شود و غلظت های مختلف دارو داخل محیط کشت تازه به چاهکها افزوده می گردد. باید توجه داشت برای هر غلظت، دست کم ۳ تکرار انجام گیرد؛ سپس پلیت های ۹۶ خانه به مدت زمان مختلف انکوبه شد و میزان زنده ماندن سلول های HT29 پس هر زمان انکوباسیون، به شیوه MTT assay مورد سنجش قرار گرفت. برای تهیه محلول MTT، به ازای هر ۱ میلی لیتر حجم، ۰/۵ میلی گرم پودر MTT در بافر PBS حل و با محیط کشت به حجم رسانده شد.

بررسی الگوی شکست نردبانی DNA (DNA Ladder assay): قطعه قطعه شدن DNA کروماتینی یکی از نشانه های وقوع مرگ سلولی است. در مرگ ناگهانی

سلول (نکروز)، DNA بدون نظم مشخص و به صورت اتفاقی از نقاط مختلف شکسته می شود، درحالی که در مراحل انتهایی فرایند آپاپتوز، بر اثر فعال شدن آنزیم های آندونوکلیاز درونی مانند (CAD/CPAN/DFF40) به وسیله کاسپازها، DNA کروموزومی از نواحی میان نوکلئوزومی بریده و قطعات یک و یا چند نوکلئوزومی ایجاد می گردد. قطعات به دست آمده پس از تفکیک به وسیله الکتروفورز بر روی ژل آگارز، الگوی مشخص نردبانی ایجاد می کنند که به راحتی از الگوی پیوسته DNA در سلول های نکروزی قابل تفکیک است؛ بنابراین، سلول های تیمار شده با دارو و ویتامین، به منظور تشخیص آپاپتوز سلولی و قطعه قطعه شدن DNA الکتروفورز گردیدند.

کشت سلولها و تیمار آنها: سلول های HT29 به تعداد ۵۰ هزار تا در محیط کشت RPMI1640 کامل داخل هر چاهک پلیت های ۶ خانه ویژه محیط کشت، کشت و تکثیر داده شد. پس از یک روز که تعداد سلولها ۲ برابر گردید، سلولها با شیمی دارو و ویتامین سی تیمار شدند. پس از فواصل زمانی مختلف، استخراج RNA از سلول های سرطانی HT29 تیمار شده انجام گرفت؛ سپس سلولها به روشی که ذیل توضیح داده می شود، برای استخراج RNA و سنتز cDNA استفاده گردیدند.

سنتز cDNA تک رشته ای با استفاده از آنزیم MMLV طبق پروتکل، شامل ۱ میکروگرم از total RNA که با 0.2 ماکرومولار هگزامر پرایمرهای universal رونویسی معکوس می شود و یک ماکرولیت (10mM) dNTP و آب DEPC مخلوط و با حرارت ۶۵ درجه به مدت ۵ دقیقه انکوبه می کنیم؛ سپس روی یخ قرار می دهیم و پس از آن، ۵ یونیت آنزیم RT (MMLV)، بافر (1x) (buffer for MMLV RT)، یک یونیت بر ماکرولیت مهارگر RNase را می افزاییم و درواقع، در انتها حجم کلی هر تیوب باید ۲۰ ماکرولیت شود. پس از آن، تیوبها را در دستگاه PCR می گذاریم و به دستگاه این برنامه ۱۰ دقیقه ۲۵ درجه، ۶۰ دقیقه ۴۲ درجه و ۱۰ دقیقه ۷۲ درجه را می دهیم تا cDNA سنتز شوند. پرایمرهای استفاده شده توسط وبسایت NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) استخراج گردیدند که اطلاعات آنها در جدول ذیل موجود است (جدول شماره ۱). همه پرایمرها توسط شرکت تکاپو زیست سنتز شدند.

جدول شماره ۱. پرایمرهای استفاده شده در مطالعه

نام ژن	Tm(°C)	توالی پرایمر
Casp3	134	5'-TGCCTGTAAGTCTGAGAGTAGATGG-3' 5'-CTTCACTTTCTTACTTGGCGA TGG-3'
BAX	176	5'-ATCCAGGATCGAGCAGGGCG-3' 5'-GGTTCTGATCAGTTCCGGCA-3'
GAPDH	68	F: 5'-AAGCTCATTTCTGGTATGACAACG-3' R: 5'-TCTTCTCTTGTGCTCTTGCTGG-5'

۱ ماکرولیتر پرایمر ریورز (0.2 ماکرومولار)، ۷ ماکرولیتر DEPC و ۱۰ ماکرولیتر Mastermix 1x Real time می‌ریزیم، حجم نهایی باید ۲۰ ماکرولیتر شود؛ سپس تیوب‌ها را در دستگاه Real time PCR قرار می‌دهیم و دستگاه run می‌شود.

Real time quantitative-PCR: واکنش Real time

PCR به صورت تکرارهای ۳ تایی (triplet) صورت گرفت، بدین صورت که در تیوب‌های مخصوص Real time PCR، ۱ ماکرولیتر cDNA و ۱۹ ماکرولیتر مستر میکس حاوی ۱ ماکرولیتر پرایمرهای فوروارد (0.2 ماکرومولار)،

جدول شماره ۲. ترکیبات مورد نیاز برای انجام qPCR

مقدار	ترکیبات واکنش (۲۰ میکرولیتر)
7µl	آب تیمار شده با DEPC
10µl	Mastermix 2x Real time
1µl	cDNA (1µg/µl)
0.05µM	پرایمرهای Forward
0.05µM	پرایمرهای Reverse

جدول شماره ۳. برنامه ترموسایکلر

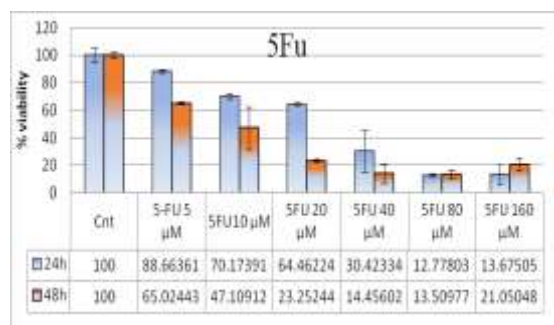
مرحله	دما (درجه سانتی‌گراد)	زمان	تعداد سیکل
فعال‌سازی اولیه	۹۴	۱۰ دقیقه	۱
جداسازی	۹۴	۱۵ ثانیه	۴۰
اتصال	۵۹-۶۰-۶۳	۳۰ ثانیه	
طول‌سازی	۷۲	۲۵ ثانیه	
طول‌سازی نهایی	۷۲	۵ دقیقه	۱

توسعه روش‌های درمانی ترکیبی مانند استفاده از آنتی‌اکسیدانت‌ها و ویتامین‌ها راهبرد مؤثری برای مهار سلول‌های سرطانی و جلوگیری از بروز مقاومت در برابر دارو است. نتایج نشان داد شیمی داروی 5-FU می‌تواند سبب آپوپتوز سلول‌های سرطانی شود؛ اما ویتامین C تأثیری در افزایش و یا کاهش تأثیر شیمی دارو نداشت و بنابراین، مصرف ویتامین C به منظور جلوگیری از آثار جانبی شیمی دارو بر بیماران سرطانی، تأثیر منفی در روند درمان سرطان نخواهد داشت.

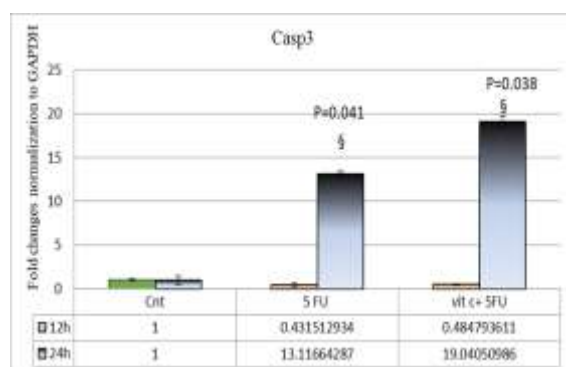
تحلیل آماری: تعیین سیکل آستانه CT برای هر کدام از نمونه‌ها صورت پذیرفت. میزان بیان در هر نمونه برای ژن‌های CASP3/bax و استفاده از مقادیر CT محاسبه گردید. در نمونه‌های تیمار شده نسبت به نمونه کنترل که به وسیله میزان بیان ژن GAPDH نرمالایزه شده، با استفاده از فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$ محاسبات انجام گردید.

یافته‌های پژوهش

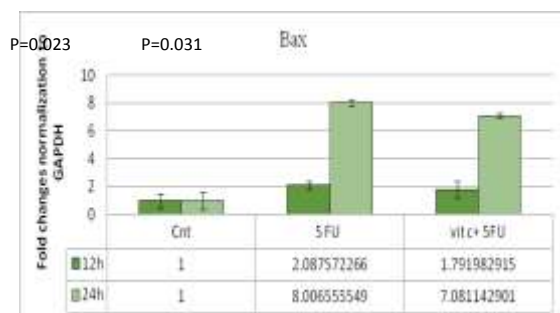
با وجود پتانسیل بالای شیمی داروی 5-fluorouracil (5-FU) در درمان سرطان کولورکتال، در برخی مواقع همراه با مقاومت به دارو است. مقاومت به شیمی درمانی 5-FU علت اصلی ناکارآمدی در درمان سرطان کولون است.



شکل شماره 1. نمودار اثر شیمی دارو بر روی حیات سلولی پس از ساعت‌های مختلف انکوباسیون. سلول‌های HT29 تحت تأثیر غلظت‌های مختلف شیمی دارو قرار گرفتند. گفتنی است طی مدت ۴۸ ساعت انکوبه شدن سلول‌های HT29 با شیمی دارو میزان IC_{50} با غلظت ۱۰ میکرومولار (حدود ۴۷ درصد) و در مدت ۲۴ ساعت حدود ۳۰ میکرومولار انتخاب شد.



شکل شماره 2. نمودار میزان بیان ژن CASP3 در سلول‌های HT29 تحت تأثیر شیمی دارو به صورت تکی به مدت ۱۲ و ۲۴ ساعت تیمار و میزان تغییرات بیان ژن در HT29 به روش Real time PCR سنجیده شد. همه آزمایش‌ها سه بار تکرار گردید و $P < 0.05$ معنادار در نظر گرفته شد.



شکل شماره 3. نمودار میزان بیان ژن Bax در سلول‌های HT29 تحت تأثیر شیمی داروی سلول‌های HT29. همان‌طور که در شکل دیده می‌شود، ویتامین C هیچ تأثیری در میزان بیان ژن توسط دارو نداشته است. $P < 0.05$ معنادار در نظر گرفته شد.

بحث و نتیجه‌گیری

بسیاری از سرطان‌ها طی درمان با داروهای شیمی‌درمانی، نسبت به آثار درمانی داروی مصرفی مقاوم می‌شوند. سازوکارهای مختلفی در ارتباط با مقاومت دارویی پیشنهاد شده است. یکی از مهم‌ترین علل مقاومت به دارو، بیان بالای پروتئین‌های غشایی وابسته به ATP از دسته خانواده بزرگ ناقلین غشایی (ATP Binding Cassette) ABC است. از این خانواده، ناقل غشایی با وزن مولکولی 170 kDa با نام گلیکوپروتئین P، نقش مهمی را در

مقاومت دارویی بر عهده دارد (16). دیگر پروتئین‌های غشایی از خانواده MRP (Multidrug Resistance associated Protein) نیز، در مقاومت دارویی دخیل هستند. پروتئین‌های ABC در سلول‌های طبیعی نیز بیان می‌شوند (17). پروتئین‌های یادشده وظیفه نقل و انتقال سوبستراهای آندوژن را بر عهده دارند. بیان بالای این پروتئین‌ها در سلول‌های سرطانی، مهم‌ترین مانع بر سر راه درمان سرطان به‌شمار می‌رود. بنا به نتایج در طول ۲۰ سال گذشته، افزایش درک سازوکار عمل 5-FU به توسعه

استراتژی‌هایی منجر شده است که فعالیت ضد سرطانی را افزایش می‌دهد. علی‌رغم این پیشرفت‌ها، مقاومت دارویی محدودیت چشمگیری برای استفاده بالینی از 5-FU است. شیوع این سرطان در گروه‌های نژادی مختلف، متفاوت است و نیز سن، رژیم غذایی، سابقه خانوادگی افراد، سیگار کشیدن، مصرف الکل، کم‌تحرکی و چاقی از عوامل مستعدکننده آن هستند؛ همچنین ژنتیک در ایجاد و پیشگیری سرطان نقش بسیار مهمی دارد. ژن‌های Bax و Casp3 از جمله ژن‌های مهمی هستند که در این مطالعه بررسی شده‌اند که یک آنزیم کلیدی در اجرای آپوپتوز به‌شمار می‌روند. این آنزیم متعلق به خانواده کاسپاز (از پروتئاز آسپارتات سیستئین) است که یکی از شش خانواده پروتئاز است که توابع مهمی در توسعه عصبی طبیعی و نوروپاتولوژی دارند. کاسپازها آندوپروتئازهایی هستند که واسطه برخی از اشکال مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلول عصبی (PCD) مانند آپوپتوز و پیروپتوزند که به ترتیب وابسته به کاسپاز ۳ و کاسپاز ۱ هستند. در طول توسعه عصبی، فرایند PCD اتفاق می‌افتد (18) که توسط آن، نورون‌هایی که بیش‌ازحد تولید می‌شوند، از بافت خارج می‌گردند تا مغز و نخاع بالغ را جدا کنند. PCD ممکن است وابسته به فعال شدن کاسپازها باشد؛ کاسپاز ۳ که بر روی آن همگرایی مسیرهای آپوپتوز درونی و بیرونی، وجود عامل اصلی آپوپتوز است. در میان انواع مختلف نورون‌ها و گلیا در مخچه، شواهد کافی برای مداخله کاسپاز ۳ در تنظیم سلول‌های گرانول مخچه پس از میتوز (CGCs) و نورون‌های Purkinje وجود دارد؛ همچنین CGCها در مرحله تمایز پیش‌ساز/پیش از مهاجرت، بدون دخالت کاسپاز ۳، در معرض مرگ سلول اولیه قرار می‌گیرند (19). Bax یکی از اعضای اصلی خانواده پروتئین Bcl-2 است. این پروتئین‌های کوچک (۲۰-۳۰ کیلو دالتون) عملکردهای ضد پروآپوپتوتیک دارند. پروآپوپتوتیک، Bid و Bak، Bax، با محرک‌های آپوپتوز به میتوکندری منتقل می‌شوند (20). خانواده ژن Bcl-2 در مسیر آپوپتوز، با واسطه میتوکندری عملکردهای مهمی را انجام می‌دهند. در این خانواده، برخی از اعضا آثار مهارى در آپوپتوز را نشان می‌دهند، درحالی‌که سایرین مانند Bax سبب افزایش آپوپتوز می‌شوند. Bax معمولاً در سیتوپلاسم قرار دارد. به‌محض دریافت سیگنال آپوپتوز، Bax تحت

عمل الیگومریک شدن قرار می‌گیرد و به غشای میتوکندری منتقل می‌شود که متعاقباً به انتشار سیتوکروم C و سایر فاکتورهای آپوپتوز در داخل سیتوپلاسم منجر می‌گردد (21). سیتوکروم C ترکیبی از پروتئاز آپوپتوز فعال‌کننده فاکتور-۱ و طرفدار کاسپاز ۹ که به‌صورت آپوپتوزوم تشکیل می‌شوند، به فعال شدن کاسپاز ۹ و کاسپاز ۳ منجر می‌گردد. مطالعات پیشین گزارش داده‌اند که کمبود Bax ممکن است با جلوگیری از جابجایی باکس به میتوکندری باعث شود که سلول‌های سرطانی نسبت به داروهای ضد توموری غیرحساس گردند.

طبق مطالعات چپی و همکاران در سال ۲۰۱۹، مقاومت به شیمی‌درمانی 5-FU علت اصلی نارسایی در درمان سرطان کولون است. توسعه روش‌های درمانی ترکیبی راهبرد مؤثری برای مهار سلول‌های سرطانی و جلوگیری از ظهور مقاومت در برابر دارو است (22)؛ بنابراین، تحقیقات فراوانی برای مهار مقاومت دارویی کولون کسر به شیمی داروی 5-FU انجام می‌شود. استفاده از آنتی‌اکسیدانت‌ها ازجمله این استراتژی‌ها است که در این مقاله نیز، از آنتی‌اکسیدانت‌ها به‌منظور غلبه بر مقاومت دارویی و افزایش کارایی دارو استفاده شد. با وجود اینکه بسیاری از دانشمندان معتقدند آنتی‌اکسیدانت‌ها اثر شیمی دارو را از میان می‌برند؛ اما برخی دیگر اعتقاد دارند استفاده از آنتی‌اکسیدانت‌ها همراه با شیمی‌درمانی، از دو طریق باعث موفقیت شیمی‌درمانی خواهد شد: یکی از راه خنثی کردن آثار جانبی شیمی دارو و دیگری از راه کاهش مقاومت به شیمی دارو. با وجود این، 5-FU یک داروی بسیار خوب است و به‌منظور شکستن مقاومت علیه آن بهتر است کامبینیشن‌تراپی به همراه سایر مکمل‌ها و آنتی‌اکسیدانت‌ها انجام پذیرد. توسعه روش‌های درمانی ترکیبی راهبرد مؤثری برای مهار سلول‌های سرطانی و جلوگیری از ظهور مقاومت در برابر دارو است (22).

دانیل و همکاران در سال ۲۰۰۳، به‌طور گسترده‌ای درباره درمان سرطان با 5-FU، حدود بیست سال مطالعه کردند. آنان بیان نمودند با وجود اینکه ۵ فلورواراسیل بهترین شیمی دارو برای درمان سرطان کلورکتال است؛ اما متأسفانه مقاومت دارویی کاربران را محدود می‌کند (23). فناوری‌های در حال ظهور، مانند پروفایل‌های میکرو اورگانی DNA، قادر به شناسایی ژن‌های جدیدی هستند

درمان طولانی مدت با 5-FU و بقای متوسط، به مدت ۳ تا ۶ ماه بود. شدت دوز برنامه ریزی شده برای یک عامل 5-FU بین ۴۶۳ تا ۷۶۰ میلی گرم در مترمربع در هفته بود. بالین حال، دوزهای پایین تر از 5-FU، هنگامی که با LV ترکیب شده بودند، میزان پاسخ بیشتری نسبت به 5-FU داشتند (29).

با مطالعه پیشینه تحقیقات استنباط می شود که داروی 5-FU یک دارو با پتانسیل بالا است؛ اما استراتژی هایی برای جلوگیری از مقاومت سرطان نسبت به این دارو نیاز است. یکی از استراتژی های کاهش مقاومت به این شیمی دارو می تواند استفاده از آنتی اکسیدانتهایی مانند ویتامین C باشد. خانم ایلقمی و همکاران در سال ۲۰۱۹، استفاده از آنتی اکسیدانتهای مانند ویتامین C را با بررسی سامانمند مطالعات کلینیکال ترایل گزارش کرده اند که هرگز مصرف آنتی اکسیدانتهای و ویتامین C مانعی بر تأثیر شیمی دارو نیست (30). تأثیر تجویز همزمان ویتامین C به همراه شیمی داروی 5-FU در سرطان های دیگری مانند لنفومای خونی نیز که Nagy و همکاران در سال ۲۰۰۳ انجام دادند، نشان می دهد ویتامین C نه تنها مانع تأثیر دارو نشده است، بلکه از آثار جانبی شیمی دارو نیز محافظت کرده است. نتایج به دست آمده از این مطالعات با نتایج این مقاله مطابقت داشت. اگرچه مطالعات دیگری نیز از تأثیر نداشتن آن گزارش می کنند که با نتایج ما متفاوت به نظر می رسد. نتایج ما نشان داد ویتامین C تأثیر منفی در روند تیمار با دارو نشان نمی دهد؛ اما می توان در کاهش آثار جانبی دارو مؤثر باشد.

هدف ما بررسی احتمال تأثیر منفی و یا مثبت ویتامین C بر سلول های سرطان کولون بود. مطالعه حاضر نشان داد که شیمی دارو می تواند سرطان کلورکتال را با تأثیر بر سیگنالینگ سلولی آپوپتوز تحت تأثیر قرار دهد. میزان بیان ژن *Casp3* در سلول های HT29 تحت تأثیر شیمی دارو با غلظت های IC_{50} ، به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت تیمار شدن دو میزان تغییرات بیان ژن HT29 به روش *Real time PCR* سنجیده شد. همان طور که نتایج نشان داد، شیمی دارو توانسته بود میزان ژن *Bax* و *casp3* را افزایش دهد که یک پروآپتوز هستند. با وجود این، ویتامین C برخلاف یافته های موجود که گزارش کرده اند ممکن است اثر منفی در تأثیر دارو بر سرطان داشته باشد،

که در میانجی گری مقاومت به 5-FU دخیل اند. چنین ژن های هدفی ممکن است به عنوان هدف جدید برای شیمی درمانی ارزشمند باشند (24). میشل و همکاران در سال ۱۹۸۹، در *Mayoclinic* و *North Central Cancer Treatment Group* (NCCTG)، یک کارآزمایی بالینی تصادفی را با مقایسه ۵ رژیم شیمی درمانی، ترکیبی مختلف با یک فاکتور 5-FU به روش تزریق داخل وریدی (۵۰۰ میلی گرم در مترمربع به مدت ۵ روز) به عنوان یک کنترل، در درمان سرطان پیشرفته کولورکتال انجام دادند. در ۱۳۸ بیماری که 5-FU دریافت کرده بودند، یک مورد مرگ ناشی از درمان وجود داشت. متوسط بقای کلی در بیماران با تزریق 5-FU یک سال افزایش یافته است (25). سالمگو و همکاران در مطالعه ای نشان دادند که بیان ژن *bcl-2* (سطوح mRNA)، تمیدین سنتتازو تمیدین فسفریلاز در بیوپسی تومور پیش از درمان می تواند تومورهای را شناسایی کند که به درمان مبتنی بر 5-FU واکنش نشان نمی دهند؛ همچنین در این مطالعه، ارتباط میان بیان ژن اینترتومورال دی هیدروپیریمیدین دهیدروژناز (PDP) آنزیم کاتابولیسیم پیریمیدین و پاسخ تومورهای کولورکتال به همان پروتکل مبتنی بر 5-FU بررسی شد (26). پولارکات و همکاران، سطح Ts mRNA را با استفاده از RT-PCR تجزیه و تحلیل کردند. آنان ۵۰ بیمار مبتلا به سرطان کولورکتال را که درمان 5-FU دریافت نمودند، برای تعیین اینکه آیا پلی مورفیسم TS نتایج بالینی را پیش بینی می کند، آزمایش کردند. داده ها نشان می دهد که ژنوتیپ پلی مورفیسم TS ممکن است پدیده ای را به منظور شناسایی بیماران برای پاسخ به شیمی درمانی 5-FU داشته باشد (27). خالد جیور و همکاران 5-FU را در سرطان بررسی کردند. ۶۶ بیمار که واجد شرایط سایر اقدامات درمانی نبودند (عمدتاً به علت شیمی درمانی پیشرفته و وضعیت عملکرد ضعیف ثبت شده بودند)، در معرض 5-FU قرار گرفتند. مدت زمان متوسط درمان 5-FU، ۶۵ روز بود. در این روند یک بیمار به طور کامل از بین رفت (28). آریوک و همکاران نتایج به دست آمده در 5-FU و لووکورین برای درمان کارسینوم پیشرفته و درمان نشده کولورکتال را بررسی کردند. پاسخ های کامل با هریک از درمان ها در ۰ تا ۸ درصد از بیماران تحت درمان قرار گرفتند. در دو مطالعه،

سپاس‌گزاری

هزینه انجام این پژوهش توسط دانشجوی کارشناسی ارشد رشته ژنتیک دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهر با کد مصوب ۹۷۱۰۰۹، تأمین شده است. بدینوسیله از همه افراد شرکت کننده در مطالعه حاضر، تشکر و قدردانی می‌گردد.

References

1. Mccracken M, Olsen M, Chen JRMS, Jemal A, Thun M, Cokkinides V, et al. Cancer incidence mortality and associated risk factors among Asian and Americans of Chinese and Filipino and Vietnamese and Korean and Japanese ethnicities. *Cancer J Clin* 2007; 57:190-205. doi.10.3322/canjclin.57.4.190
2. Weir HK, Thun MJ, Hankey BF, Ries LA, Howe HL, Wingo PA, et al. Annual report to the nation on the status of cancer 1975-2000 featuring the uses of surveillance data for cancer prevention and control. *J National Cancer Inst* 2003; 95:1276-99. doi.10.1093/jnci/djg040
3. Carini F, Mazzola M, Rappa F, Jurjus A, Geagea AG, Al Kattar S, et al. Colorectal carcinogenesis role of oxidative stress and antioxidants. *Anticancer Res* 2017; 37:4759-66. doi.10.21873/anticancer.11882
4. Curtin JC. Novel drug discovery opportunities for colorectal cancer. *Exp Opin Drug Dis* 2013; 8:1153-64. doi.10.1517/17460441.2013.807249
5. Berrino F, Krogh V, Riboli E. Epidemiology studies on diet and cancer. *Tumori J* 2003; 89:581-5. doi.10.1177/030089160308900601
6. Willett WC, Stampfer MJ, Colditz GA, Rosner BA, Speizer FE. Relation of meat, fat, and fiber intake to the risk of colon cancer in a prospective study among Women. *New Eng J Med* 1990; 323:1664-72. doi.10.1056/NEJM199012133232404
7. Key TJ, Allen NE, Spencer EA, Travis RC. The effect of diet on risk of cancer. *Lancet* 2002; 360:861-8. doi.10.1016/S0140-6736(02)09958-0
8. Manerio E, Rodas VL, Costas E, Hernandez JM. Shellfish consumption a major risk factor for colorectal cancer. *Med Hyp* 2008; 70:409-12. doi.10.1016/j.mehy.2007.03.041

در این مطالعه هیچ تأثیری در کاهش و یا افزایش تأثیر دارو نداشت.

یافته‌ها نشان داد ویتامین C مانع تأثیر شیمی دارو نشد، اگرچه هیچ تأثیر مثبتی هم بر روی رشد سلول‌های سرطانی نداشت؛ بنابراین، مصرف ویتامین C از سوی بیمارانی که در حال شیمی‌درمانی هستند، هیچ ممانعتی بر تأثیر دارو نخواهد داشت و می‌تواند در برابر آثار جانبی دارو، از بیمار محافظت کند.

9. Kelsall HL, Baglietto L, Muller D, Haydon AM, English DR, Giles GG. The effect of socioeconomic status on survival from colorectal cancer in the Melbourne collaborative cohort study. *Soc Sci Med* 2009; 68:290-7. doi.10.1016/j.socscimed.2008.09.070
10. Antelo M, Castells A. Family history of colorectal cancer a new survival predictor of colon cancer? *Gastroenterology* 2009; 136:357-9. doi.10.1053/j.gastro.2008.11.059
11. Dahan L, Sadok A, Formento JL, Seitz JF, Kovacic H. Modulation of cellular redox state underlies antagonism between oxaliplatin and cetuximab in human colorectal cancer cell lines. *Brit J Pharmacol* 2009; 158:610-20. doi.10.1111/j.1476-5381.2009.00341.x
12. Wohlhueter RM, McIvor RS, Plagemann PG. Facilitated transport of uracil and 5-fluorouracil, and permeation of orotic acid into cultured mammalian cells. *J Cell Physiol* 1980; 104:309-19. doi.10.1002/jcp.1041040305
13. Cunningham D, Humblet Y, Siena S, Khayat D, Bleiberg H, Santoro A, et al. Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan refractory metastatic colorectal cancer. *New Eng J Med* 2004; 351:337-45. doi.10.1056/NEJMoa033025
14. Ionov Y, Yamamoto H, Krajewski S, Reed JC, Peruchio M. Mutational inactivation of the proapoptotic gene bax confers selective advantage during tumor clonal evolution. *Proc National Acad Sci* 2000; 97:10872-7. doi.10.1073/pnas.190210897
15. Porter AG, Janicke RU. Emerging roles of caspase3 in apoptosis. *Cell Death Dif* 1999; 699.
16. Chikazawa N, Tanaka H, Tasaka T, Nakamura M, Tanaka M, Onishi H, et al. Inhibition of Wnt signaling pathway decreases chemotherapy resistant side population colon cancer cells. *Anticancer Res* 2010; 30:2041-8.

17. Maemondo M, Inoue A, Kobayashi K, Sugawara S, Oizumi S, Isobe H, et al. Gefitinib or chemotherapy for non small cell lung cancer with mutated EGFR. *New Eng J Med* 2010; 362:2380-8. doi.10.1056/NEJMoa0909530
18. Kothakota S, Azuma T, Reinhard C, Klippel A, Tang J, Chu K, et al. Caspase3 generated fragment of gelsolin effector of morphological change in apoptosis. *Science* 1997; 278:294-8. doi.10.1126/science.278.5336.294
19. Zou H, Henzel WJ, Liu X, Lutschg A, Wang X. Apaf-1 a human protein homologous to elegans CED4 participates in cytochrome dependent activation of caspase3. *Cell* 1997; 90:405-13. doi.10.1016/S0092-8674(00)80501-2
20. Wolter KG, Hsu YT, Smith CL, Nechushtan A, Xi XG, Youle RJ. Movement of bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. *J Cell Biol* 1997; 139:1281-92. doi. 10.1083/jcb.139.5.1281
21. Yin C, Knudson CM, Korsmeyer SJ, Vandyke T. Bax suppresses tumorigenesis and stimulates apoptosis in vivo. *Nature* 1997; 385:637. doi.10.1038/385637a0
22. Riahihebbi I, Souid S, Othman H, Haoues M, Karoui H, Morel A, et al. The phenolic compound kaempferol overcomes 5fluorouracil resistance in human resistant LS174 colon cancer cells. *Sci Rep* 2019; 9:195. doi.10.1038/s41598-018-36808-z
23. Longley DB, Harkin DP, Johnston PG. 5Fluorouracil mechanisms of action and clinical strategies. *Nature Rev Cancer* 2003; 3:330-8.
24. Riccivittiani L, Lombardi DG, Piloizzi E, Biffoni M, Todaro M, Peschle C, et al. Identification and expansion of human colon cancer initiating cells. *Nature* 2007; 445:111. doi.10.1038/nature05384
25. Oconnell MJ. A phase III trial of 5fluorouracil and leucovorin in the treatment of advanced colorectal cancer a mayo clinic north central cancer treatment group study. *Cancer* 1989; 63:1026-30.
26. Steinmetz KA, Potter JD. Vegetables fruit and cancer. *Epidemiol Cancer Caus Cont* 1991; 2:325-57. doi.10.1007/BF00051672
27. Pullarkat ST, Stoehlmacher J, Ghaderi V, Xiong YP, Ingles SA, Sherrod A, et al. Thymidylate synthase gene polymorphism determines response and toxicity of 5FU chemotherapy. *Pharmacogenom J* 2001; 1:65-70.
28. Jabboury K, Holmes FA, Hortobagyi G. 5fluorouracil rechallenge by protracted infusion in refractory breast cancer. *Cancer* 1989; 64:793-7. doi.10.1002/1097-0143
29. Arbuck SG. Overview of clinical trials using 5fluorouracil and leucovorin for the treatment of colorectal cancer. *Cancer* 1989; 63:1036-44. doi.10.1002/1097-0142
30. Ilghami R, Barzegari A, Mashayekhi MR, Letourneur D, Crepin M, Pavon G. The conundrum of dietary antioxidants in cancer chemotherapy. *Nut Rev* 2019; 2:123-7. doi. 10.1093/nutrit/nuz027



Investigation of the Effects of Vitamin C on Resistance to 5-FU in Colon Cancer Cells Line HT29

Ghorbian S¹, Zarei A^{1*}

(Received: April 13, 2020

Accepted: April 09, 2021)

Abstract

Introduction: There is growing evidence about the use of antioxidants to reduce the side effects of chemotherapy and cancer drug resistance. Therefore, this study aimed to use vitamin C as an antioxidant and determine its effect on drug resistance in HT29 cells.

Materials & Methods: During this case-control study, HT29 cells were first cultured and evaluated by MTT assay for cell death in the presence of vitamin C and 5FU. DAPI staining was also performed to visualize cell apoptosis. After RNA extraction and cDNA preparation, to determine the molecular mechanism of apoptosis by the drug and the inhibition effect or aggravation of vitamin C on cellular signaling of apoptosis, expression of growth-related genes and apoptosis of Caspase-3 and Bax were measured by real-time PCR.

Findings: The results of the MTT test showed that vitamin C had no significant effect on cell apoptosis induced by 5-FU. DAPI and DNA ladder assay results from HT29 cells showed qualitative changes in cell apoptosis. In addition, real-time PCR results revealed increased expression of Bax and Caspase-3 in HT29 colon cancer cells treated with chemotherapy.

Discussions & Conclusions: Our findings showed that vitamin C did not prevent the effect of chemo drug although it had no positive effect on the growth of cancer cells. Therefore, vitamin C intake by patients undergoing chemotherapy will not affect the drug's effect on the tumor and may protect the patient from side effects.

Keywords: Apoptosis, Colorectal cancer, HT29, Vitamin C, 5fu chemistry

I. Dept of Molecular Genetics, Ahar Branch, Islamic Azad University, Ahar, Iran

*Corresponding author Email: ghorbian20@yahoo.com