



اثر داروی تریکواستاتین آ بر روی بیان ژن‌های Histone deacetylase 1(HDAC 1) and CIP/KIP family مهاری رشد سلولی و القاء آپوپتوز در سرطان ریه رده سلولی COR-L105

معصومه سنائی جهرمی: مربی، مرکز تحقیقات بیماری‌های غیر واگیر، دانشگاه علوم پزشکی جهرم، جهرم، ایران
فریدون کاوسی: دانشیار، مرکز تحقیقات بیماری‌های غیر واگیر، دانشگاه علوم پزشکی جهرم، جهرم، ایران (✉نویسنده مسئول) kavoosifraidoon@gmail.com

چکیده

کلیدواژه‌ها

تریکواستاتین آ،
هیستون داستیلاز،
ژن‌های سرکوب کننده تومور،
سرطان ریه

زمینه و هدف: سرطان ریه، یکی از علل مرگ‌ومیر ناشی از سرطان با بیش از ۱/۲ میلیون مرگ سالیانه در دنیا است. علاوه بر تغییرات ژنتیک، تعدیلات اپی ژنتیک در ایجاد و پیشرفت سرطان دخیل است. اختلال در تنظیم تعدیلات اپی ژنتیک می‌تواند بر جنبه‌های مختلف بیولوژی سلول شامل رشد، تمایز و مرگ سلولی اثر بگذارد. دو مکانیسم متیلاسیون و داستیلاسیون بهترین مکانیسم‌های دخیل در غیرفعال شدن ژن‌های ضدتوموری هستند. مهاری کننده‌های آنزیم هیستون داستیلاز یک، عامل جدیدی از عوامل درمان سرطان است. مطالعه حاضر برای بررسی اثر تریکواستاتین آ بر روی بیان ژن‌های Histone deacetylase 1(HDAC 1) and CIP/KIP (p21CIP1/WAF1, p27KIP1, and p57KIP2)، مهاری رشد سلولی و القاء آپوپتوز در سرطان ریه رده سلولی COR-L105 طراحی شد.

روش کار: سلول‌های سرطانی ریه رده COR-L105 با داروی تریکواستاتین آ تربیت و میزان زنده بون سلول، سلول‌های آپوپتوتیک و بیان ژن‌های Histone deacetylase 1(HDAC 1) and CIP/KIP (p21CIP1/WAF1, p27KIP1, and p57KIP2) به ترتیب با تکنیک‌های MTT، فلوسیتومتری و ریل تایم مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: داروی تریکواستاتین آ بطور معنی داری باعث مهاری رشد سلولی، القاء آپوپتوز، کاهش بیان ژن HDAC 1 و افزایش بیان ژن‌های p21CIP1/WAF1, p27KIP1, and p57KIP2 گردید.

نتیجه گیری: داروی تریکواستاتین آ می‌تواند با مهاری بیان ژن هیستون داستیلاز باعث افزایش بیان ژن‌های مهاری کننده توموری p21CIP1/WAF1, p27KIP1, and p57KIP2 و القاء آپوپتوز در سلول‌های سرطانی ریه گردد.

تعارض منافع: گزارش نشده است.

منبع حمایت کننده: دانشگاه علوم پزشکی جهرم


شیوه استناد به این مقاله:

Kavoosi F, Sanaei M. Effect of trichostatin A on histone deacetylase 1 (HDAC 1) and CIP/KIP (p21CIP1/WAF1, p27KIP1, and p57KIP2) gene expression, cell growth inhibition and apoptosis induction in lung cancer COR-L105 cell line. Razi J Med Sci. 2020;27(7):78-87.

*انتشار این مقاله به صورت دسترسی آزاد مطابق با CC BY-NC-SA 3.0 صورت گرفته است.

Effect of trichostatin A on histone deacetylase 1 (HDAC 1) and CIP/KIP (p21CIP1/WAF1, p27KIP1, and p57KIP2) gene expression, cell growth inhibition and apoptosis induction in lung cancer COR-L105 cell line

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

 Fraidoon Kavooosi, Associate Professor, Non-Communicable Diseases Research Center, Jahrom University of Medical Sciences, Jahrom, Iran (*Corresponding author) kavooosifraidoon@gmail.com

Abstract

Background: Lung cancer is one the leading cause of cancer-related death worldwide, with more than 1.2 million deaths each year. In addition to genetic mutations, epigenetic modifications may contribute to the induction and progression of cancer. The term epigenetic refers to several molecular mechanisms and pathways that regulate gene expression without changing the DNA sequence. These mechanisms include alterations in the histone modification, the methylation status of DNA, chromatin remodeling, and microRNAs. Cancer cells exhibit changes in histone modification patterns at individual genes. Epigenetic deregulation can affect several aspects of tumor cell biology comprising cell growth, cell differentiation, and cell death. Histones are highly conserved alkaline proteins that can become post-translationally modified at the amino acid residues located on their N and C-terminal tails. There are four core histones include histone 2 A, histone 2 B, histone 3, and histone 4, and one linker histone, histone 1. Histone modifying enzymes, such as histone acetyltransferases (HATs), histone deacetylases (HDACs), histone methyltransferases (HMTs), histone demethylases (HDMs), is often responsible for the aberrant histone modifications. HDACs and HATs are two counteracting enzyme families whose enzymatic activity controls the acetylation state of protein lysine residues. Aberrant histone acetylation is associated with several solid cancers. In mammals, HDACs form three groups based on their sequence homology and are classified as HDACs I, II, and III. These enzymes have a critical role in modulating the balance between pro- and anti-apoptotic proteins. Dysregulation of HDACs and aberrant deacetylation have been implicated in the pathogenesis of various cancers. Overexpression of these enzymes correlates with tumorigenesis. Two known mechanisms, methylation and histone deacetylation seem to be the best candidate mechanisms for inactivation of CIP/KIP (p21CIP1/WAF1, p27KIP1, and p57KIP2) and INK4 (p15INK4b, p16INK4a, p18INK4c, and p19INKd) families. Histone deacetylation is a general mechanism for the inactivation of the CIP/KIP family in various cancers such as gastric cancer, human colon cancer cell line HT -29, human breast cancer MDA231 cell line, human non-small cell lung cancer cell line, A549 cells. HDAC inhibitors have been considered to be a novel class of cancer treatment agent. These compounds include trichostatin A (TSA), butyrate, trapoxin (TPX), MS-27-275 (a synthetic benzamide derivative) and apicidin. Previously, we reported the effect of trichostatin A on hepatocellular carcinoma (HCC). The present study was aimed to investigate the effect of TSA on histone deacetylase 1 (HDAC 1), CIP/KIP (p21CIP1/WAF1, p27KIP1, and p57KIP2), cell growth inhibition and apoptosis induction in lung cancer COR-L105 cell line.

Methods: First, the lung cancer COR-L105 cells were cultured in DMEM supplemented with sodium butyrate, sodium bicarbonate, sodium pyruvate, 10% FBS and antibiotics (penicillin G and streptomycin) at 37°C in 5% CO₂ overnight and then seeded into 96-well plates (3 × 10⁵ cells per well). After 24 h, the medium was replaced with an experimental medium containing various concentrations of TSA (0, 1, 2.5, 5, 7.5, 10, and 20 μM). The control groups received DMSO only, at a concentration of 0.05%. After a period of 24 and

Keywords

Trichostatin A,
Histone deacetylase 1,
Tumor suppressor genes,
Lung cancer

Received: 01/07/2020

Published: 03/10/2020

48h, the cells were investigated by MTT assay according to Standard protocols to determine cell viability. Therefore, MTT solution was added to each well for 4 h at 37°C and then the MTT solution was changed by DMSO and shaken for 10 min to dissolve all of the crystals. Finally, the optical density was detected by a microplate reader at a wavelength of 570 nm. Each experiment was repeated three times (triplicates). To determine apoptotic cells, the COR-L105 cells were cultured at a density of 3×10^5 cells/well and incubated overnight and then treated with TSA (2.5 μ M) for different periods (24 and 48 h). Subsequently, the treated and untreated cells were harvested by trypsinization, washed with cold PBS, and resuspended in Binding buffer (1x). Finally, Annexin-V-(FITC) and PI were used according to the protocol to determine the apoptotic cells by FACScan flow cytometry (Becton Dickinson, Heidelberg, Germany). Real-time quantitative RT-PCR amplification and analysis were achieved to quantitatively estimate the expression of histone deacetylase 1 (HDAC 1) and CIP/KIP (p21CIP1/WAF1, p27KIP1, and p57KIP2) in TSA (25 μ M)-treated COR-L105 cells at different times. After treatment times, Total RNA was isolated by RNeasy mini kit (Qiagen) according to the manufacturer's protocol and then treated by RNase free DNase (Qiagen) to eliminate the genomic DNA. The RNA concentration was determined using a Biophotometer (Eppendorf). Total RNA (100 ng) was reverse-transcribed to cDNA by using the RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas) according to the manufacturer's instructions. Real-time RT-PCR was performed by the Maxima SYBR Green RoxqPCR master mix kit (Fermentas). The primer sequences are shown in Table1. Real-time PCR reactions were performed using the Steponeplus (Applied Biosystem). Data were analyzed using the comparative Ct ($\Delta\Delta$ ct) method, the relative expression level of the genes were calculated by determining a ratio between the amount of these genes and that of endogenous control. GAPDH was used as a reference gene for internal control.

Results: To test the effect of TSA (0, 1, 2.5, 5, 7.5, 10, and 20 μ M) on the lung cancer COR-L105 cell viability, MTT assay was utilized. Our findings showed that the rate of cell growth inhibition was significantly increased in than that of control groups after 24 and 48 h. Results showed that the number of viable cells decreased significantly, as the concentration of the compounds and duration increased; indicating a dose- and duration-dependent relationship ($p < 0.001$). The IC50 values were determined with approximately 2.5 μ M for TSA. Flow cytometric analysis was achieved to determine whether TSA (2.5 μ M) can induce apoptosis in the lung cancer COR-L105 line. The percentage of treated and un-treated COR-L105 apoptotic cells was evaluated by staining with annexin V-FITC and PI after 24 and 48 h of treatment. After treatment with TSA, the apoptosis percentage increased significantly. The effect of TSA (2.5 μ M) on the histone deacetylase 1 (HDAC 1) and CIP/KIP (p21CIP1/WAF1, p27KIP1, and p57KIP2) gene expression was investigated by quantitative real-time RT-PCR analysis. The result indicated that the treatment of lung cancer COR-L105 cells with TSA (2.5 μ M) for 24 and 48 h reactivated the p21CIP1/WAF1, p27KIP1, and p57KIP2 gene, down-regulated HDAC 1 significantly.

Conclusion: TSA can down-regulate HDAC 1 and up-regulate p21CIP1/WAF1, p27KIP1, and p57KIP2 gene expression and induce apoptosis in lung cancer COR-L105 cell line.

Conflicts of interest: None

Funding: Jahrom University of Medical Sciences

Cite this article as:

Kavooosi F, Sanaei M. Effect of trichostatin A on histone deacetylase 1 (HDAC 1) and CIP/KIP (p21CIP1/WAF1, p27KIP1, and p57KIP2) gene expression, cell growth inhibition and apoptosis induction in lung cancer COR-L105 cell line. *Razi J Med Sci.* 2020;27(7):78-87.

*This work is published under CC BY-NC-SA 3.0 licence.

مقدمه

سرطان ریه، یکی از علل مرگ‌ومیر ناشی از سرطان با بیش از ۱/۲ میلیون مرگ سالانه در دنیاست. علاوه بر تغییرات ژنتیک، تعدیلات اپی ژنتیک در ایجاد و پیشرفت سرطان دخیل است. واژه اپی ژنتیک، به تعدادی از مسیرها و مکانیسم‌های مولکولی اشاره دارد که بدون تغییر توالی DNA، باعث تغییر بیان ژن می‌شوند. این تغییرات شامل تغییر در تعدیلات هیستون، متیلاسیون DNA، تغییر شکل کروماتین و میکرو RNA (miRNA) است. سلول‌های سرطانی، تغییر در الگوی تعدیلات هیستونی در ژن‌های منحصربه‌فرد را نشان می‌دهند. اختلال در تنظیم تعدیلات اپی ژنتیک می‌تواند بر جنبه‌های مختلف بیولوژی سلول شامل رشد، تمایز و مرگ سلولی اثر بگذارد (۱).

هیستون‌ها، پروتئین‌هایی هستند که تعدیلات پس ترجمه‌ای بر روی آمینواسیدهای آن‌ها امکان‌پذیر است. چهار نوع هیستون وجود دارد که عبارتند از هیستون ۲ آ (histone 2 A)، هیستون ۲ ب (histone 2 B)، هیستون ۳ (histone 3) و هیستون ۴ (histone 4). آنزیم‌های تعدیل‌کننده هیستونی از قبیل هیستون استیل ترانس فراس (histone acetyltransferases)، هیستون داستیلاز (HATs)، هیستون متیل ترانس فراس (HDACs)، هیستون دمتیلاز (methyltransferases, HMTs) و هیستون دمتیلاز (histone demethylases, HDMs) مسئول تعدیلات نابجای هیستون‌ها هستند (۲). هیستون داستیلازها و هیستون استیلازها، دو خانواده از آنزیم‌ها هستند که وضعیت استیلاسیون هیستون پروتئین‌ها را کنترل می‌کنند. استیلاسیون نابجای هیستون همراه با سرطان‌های مختلف است. در پستانداران، هیستون داستیلازها بر حسب توالی به سه گروه تقسیم می‌شوند که عبارتند از هیستون داستیلاز ۱، ۲ و ۳ (HDACs I, II and III) (۳). این آنزیم‌ها نقش اساسی در تعادل بین پروتئین‌های آپوپتوزی و پیش آپوپتوزی بازی می‌کنند. بیان نامنظم ژن‌های هیستون داستیلاز و داستیلاسیون نابجا در پاتوژنز سرطان‌های مختلف دخیل است. بیان زیاد این آنزیم‌ها همراه با تومورزایی است (۴). دو مکانیسم متیلاسیون و داستیلاسیون

بهترین مکانیسم‌های دخیل در غیرفعال شدن ژن‌های ضدتوموری (p21CIP1/WAF1, p27KIP1, p15INK4b, p16INK4a, p18INK4c, and p19INKd) families هستند (۵،۶). داستیلاسیون هیستون یک مکانیسم معمول غیرفعال شدن ژن‌های خانواده CIP/KIP (p21CIP1/WAF1, p27KIP1, and p57KIP2) در سرطان‌های مختلف از قبیل سرطان معده، کولون، پستان و ریه است. مهارکننده‌های آنزیم هیستون داستیلاز یک، عامل جدیدی از عوامل درمان سرطان است. این ترکیبات شامل تریکواستاتین آ (trichostatin A, TSA)، بوتیرات (butyrate)، اتاپوکسین (trapoxin)، MS-27-275 و آپی سیدین (apicidin) است (۷). پیشتر، ما اثر تریکواستاتین آ را بر روی سرطان کبد گزارش کردیم (۸-۱۰). مطالعه حاضر برای بررسی اثر تریکواستاتین آ بر روی بیان ژن‌های histone deacetylase 1 (HDAC 1) and CIP/KIP (p21CIP1/WAF1, p27KIP1, and p57KIP2)، مهار رشد سلولی و القاء آپوپتوز در سرطان ریه رده سلولی COR-L105 طراحی شد.

روش کار

سلول‌های سرطانی ریه رده COR-L105 از بانک سلولی انستیتو پاستور کشور جمهوری اسلامی ایران (Cell Bank of Iran-Pasteur Institute) خریداری و در محلول Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) حاوی آنتی بیوتیک (penicillin G sulfate and amphotericin sodium, streptomycin) و غنی از سرم گاوی (FBS) fetal bovine serum در دمای ۳۷ درج سانتیگراد نگهداری شد. داروی تریکواستاتین آ و دیگر مواد لازم از قبیل تریپسین (trypsin-EDTA)، MTT، محیط کشت (DMEM)، کیت بیان ژن (Total RNA extraction Kit) and real-time polymerase chain reaction (PCR) kits (TRIZOL reagent) و آنکسین Annexin-V-FITC) و پروپیدیوم آیویدید (propidium iodide, PI) از سیگما (Sigma) خریداری شد.

تعیین سلول‌های زنده بوسیله تکنیک MTT: ابتدا سلول‌های سرطانی ریه رده COR-L105 با مدیوم

کشت داده و با داروی تریکوآستاتین آ با غلظت ۲/۵ میکرومول کشت داده شدند (بجز گروه کنترل که DMSO دریافت کردند) و پس از گذشت مدت زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت، تمام سلول ها با استفاده از تریپسین جمع آوری و با محلول PBS شستشو داده شدند و سپس با آنکسین و پروپیدوم آیویدید رنگ آمیزی انجام و سلول های آپوپتوتک با دستگاه FACScan™ flow cytometer مورد شمارش قرار گرفت.

تعیین میزان بیان ژن با استفاده از تکنیک ریل تایم: ابتدا سلول های سرطانی ریه رده COR-L105 در پلیت های ۲۴ خانه کشت داده شدند. پس از گذشت ۲۴ ساعت با داروی تریکوآستاتین آ با غلظت ۲/۵ میکرومول برای مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت تربیت شدند. پس از گذشت زمان تربیت، تمام RNA سلول ها بوسیله کیت RNeasy mini kit طبق پروتکل مربوطه استخراج و به منظور حذف DNA ژنومی، RNA بدست آمده با DNase RNase-free تربیت شد. غلظت RNA با استفاده از دستگاه بیوفتومتر (BioPhotometer) تعیین گردید. با استفاده از کیت RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit از RNA حاصل cDNA ساخته شد و در نهایت با استفاده از سایبرگرین، Real-time RT-PCR انجام شد. از ژن GAPDH بعنوان کنترل استفاده شد. توالی پرایمرهای استفاده شده در جدول ۱ مشخص شده است. برای آنالیز داده های مربوط به بیان ژن بدین طریق عمل شد که پس از حذف نمونه های غیر قابل قبول (با منحنی ذوب نامناسب) با استفاده از

حاوی سدیم بوتیرات، سدیم پیرووات، سدیم بیکربنات، ده درصد سرم گاوی و یک درصد آنتی بیوتیک شامل پنی سیلین جی و استرپتو مایسین در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد با غلظت ۵٪ دی اکسید کربن کشت داده شدند و پس از اینکه همپوشانی سلول ها به حدود ۸۰ درصد رسید سلول ها با تریپسین جمع آوری و پس از شستشو، در پلیت های ۹۶ خانه کشت داده شدند و برای مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه حاوی دی اکسید کربن ۵ درصد انکوبه شدند. پس از گذشت مدت زمان ۲۴ ساعت از کشت سلول ها، محیط کشت با محیط حاوی داروی تریکوآستاتین آ با غلظت های مختلف (۱، ۲/۵، ۵، ۷/۵، ۱۰ و ۲۰ میکرومول) تعویض شد (بجز گروه کنترل که DMSO با غلظت ۰/۰۵ درصد دریافت کردند) و برای مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه حاوی دی اکسید کربن ۵ درصد انکوبه شدند. پس از گذشت مدت زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت از تربیت سلول ها، سلول ها با PBS شستشو و سپس محلول MTT برای مدت ۴ ساعت اضافه شد. پس از ۴ ساعت، کریستال های رنگی ایجاد شده با DMSO حل کرده و میزان رنگ ایجاد شده با طول موج ۵۷۰ مورد بررسی قرار گرفت. برای اطمینان بیشتر هر آزمایش ۳ بار تکرار شد. میزان توکسیسیتی دارو بوسیله نرم افزار گراف پد پریسم ۸ محاسبه گردید.

تعیین سلول های آپوپتوتیک بوسیله تکنیک فلوسیتومتری: برای تعیین آپوپتوز سلولی، سلول های سرطانی ریه رده COR-L105 در پلیت های ۲۴ خانه

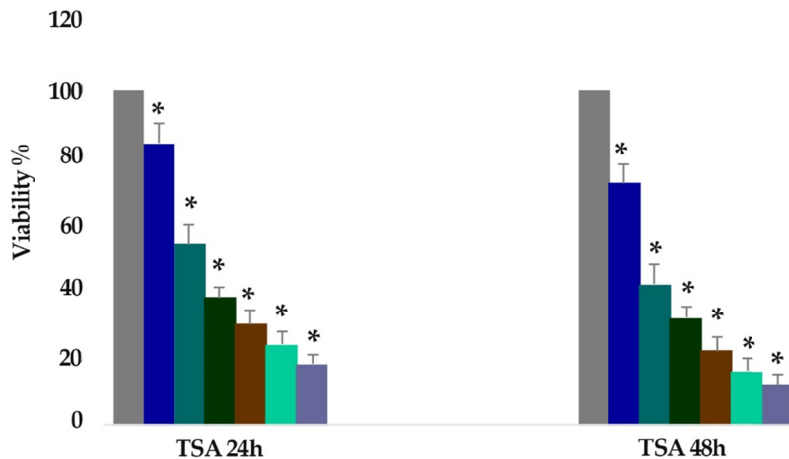
جدول ۱- توالی پرایمرهای استفاده شده در مطالعه

پرایمر	توالی پرایمر	رفرنس
HDAC1 Forward	CCT GGA TAC GGA GAT CCC TA	۱۱
Reverse	CCG CAA GAA CTC TTC CAA CT	
P21 Forward	AGG CGC CAT GTC AGA ACC GGC TGG	۱۱
Reverse	GGA AGG TAG AGC TTG GGC AGG C	
P27 Forward	ATG TCA AAC GTG CGA GTG TCT AAC	۱۱
Reverse	TTA CGT TTG ACG TCT TCT GAG GCC A	
P57 Forward	GCG GCG ATC AAG AAG CTG TC	۱۱
Reverse	CCG GTT GCT GCT ACA TGA AC	
GAPDH Forward	TCC CAT CAC CAT CTT CCA	۱۱
Reverse	CAT CAC GCC ACA GTT TCC	

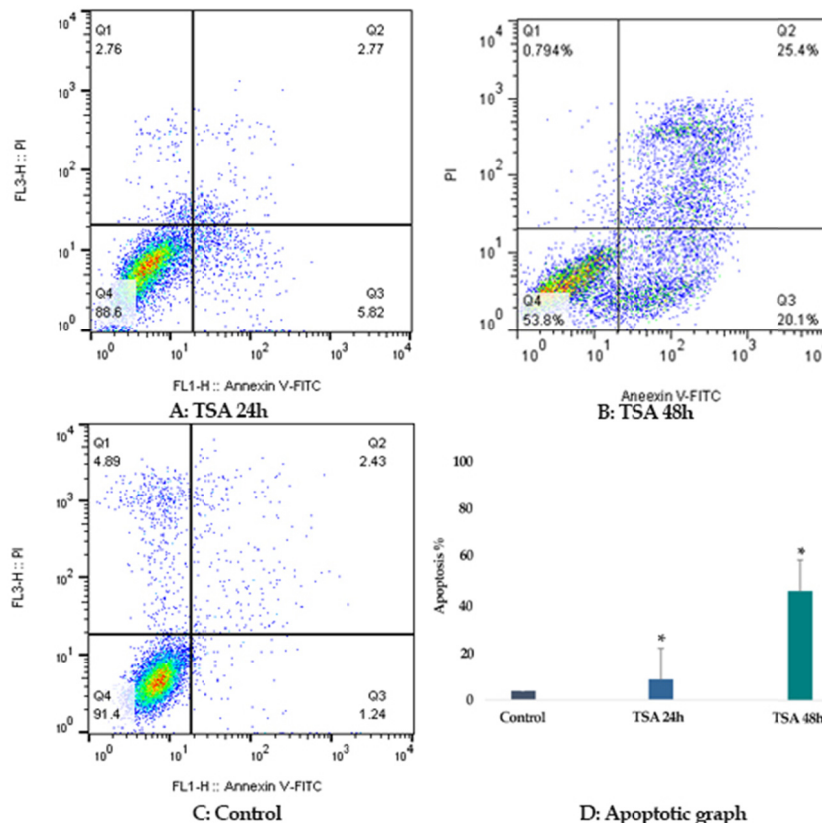
یافته‌ها

نتیجه تعیین میزان سلول‌های زنده: سلول‌های سرطانی ریه رده COR-L105 با داروی تریکواستاتین آ با غلظت‌های مختلف (۱، ۲/۵، ۵، ۷/۵، ۱۰ و ۲۰ میکرومول) برای مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت تربیت شدند و سپس بوسیله تکنیک MTT میزان سلول‌های زنده

نرم افزار اکسل و روش دلتا دلتا Ct ($\Delta\Delta Ct$) داده‌ها مورد بررسی قرار گرفت. پرایمرهای مورد نیاز با توجه به مقالات پیشین انتخاب و پس از چک کردن آن‌ها از طریق سایت NCBI و حصول اطمینان، از طریق شرکت تکاپو زیست تهیه گردید.



شکل ۱- نتیجه تعیین سلول‌های زنده در سرطان ریه رده سلولی COR-L105 که با داروی تریکواستاتین آ با غلظت‌های مختلف (۱، ۲/۵، ۵، ۷/۵، ۱۰ و ۲۰ میکرومول) تربیت شده بودند. علامت ستاره دار تفاوت معنی دار گروه‌های تربیت شده با دارو در مقایسه با گروه کنترل نشان می‌دهد ($p < 0.001$).



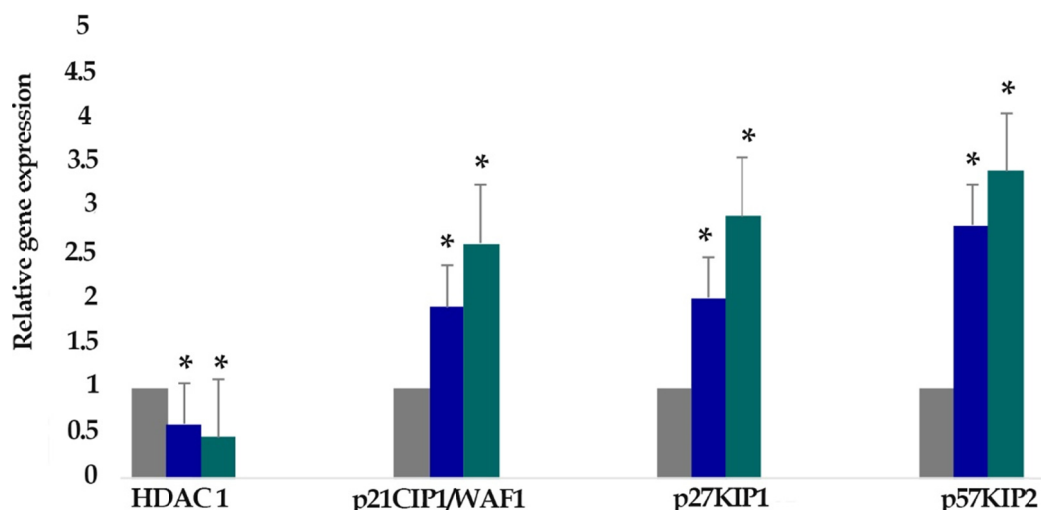
شکل ۲- نتیجه تعیین سلول‌های آپوپتوتیک در سرطان ریه رده سلولی COR-L105 که با داروی تریکواستاتین آ (۲/۵ میکرومول) تربیت شدند. علامت ستاره تفاوت معنی دار گروه‌های تربیت شده با دارو در مقایسه با گروه کنترل نشان می‌دهد ($p < 0.001$).

آپوپتوز گردید ($p < 0.001$). درصد سلول‌های آپوپتوتیک پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت به ترتیب ۸/۵ و ۴۵/۵ درصد بود که نسبت به گروه کنترل اختلاف معنی داری داشتند ($p < 0.001$). همچنین گروه‌های آزمایش با یکدیگر اختلاف معنی داری داشتند ($p < 0.001$). اثر این ترکیب بر روی آپوپتوز بصورت وابسته به زمان بود. حداکثر میزان آپوپتوز پس از ۴۸ ساعت مشاهده شد.

نتیجه تعیین بیان ژن: نتیجه تعیین بیان ژن نشان داد که داروی تریکوآستاتین آ (۲/۵ میکرومول) می‌تواند بصورت معنی داری باعث کاهش بیان ژن HDAC 1 و افزایش ژن‌های p21CIP1/WAF1, p27KIP1, and p57KIP2 شود (شکل ۳). میزان بیان ژن‌های مزبور در جدول ۲ مشخص شده است.

مشخص شد. همچنانکه در شکل ۱ مشخص شده است داروی تریکوآستاتین آ با تمام غلظت‌های استفاده شده بصورت وابسته به دوز و زمان توانست رشد سلولی را بصورت معنی داری مهار کند ($p < 0.001$). دوز موثر این دارو که توانست رشد ۵۰ درصد سلول‌ها را مهار کند ۲/۵ میکرومول بود.

نتیجه تعیین آپوپتوز سلولی: برای تعیین سلول‌های آپوپتوتیک، سلول‌ها با داروی تریکوآستاتین آ (۲/۵ میکرومول) برای مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت تربیت شدند. پس از تربیت با استفاده از رنگ آمیزی آنکسین و پروپیدیوم آیدید میزان سلول‌های آپوپتوتیک مشخص شد. همچنانکه در شکل ۲ نشان داده شده است این ترکیب بطور معنی داری باعث ایجاد



شکل ۳- نتیجه تعیین بیان ژن‌های HDAC 1, CIP/KIP (p21CIP1/WAF1, p27KIP1, and p57KIP2) در سرطان ریه رده سلولی COR-L105 که با داروی تریکوآستاتین آ (۲/۵ میکرومول) تربیت شدند. علامت ستاره تفاوت معنی دار گروه‌های تربیت شده با دارو در مقایسه با گروه کنترل نشان می‌دهد ($p < 0.001$).

جدول ۲- اثر داروی تریکوآستاتین آ (۲/۵ میکرومول) بر روی بیان ژن‌های HDAC 1, CIP/KIP (p21CIP1/WAF1, p27KIP1, and p57KIP2) در رده سلولی COR-L105

نام ژن	نام دارو	مقدار دارو (میکرومول)	مدت درمان	بیان ژن	p
HDAC 1	TSA	۲/۵	۲۴	۰/۶۰	۰/۰۰۶
HDAC 1	TSA	۲/۵	۴۸	۰/۴۵	۰/۰۰۱
p21CIP1/WAF1	TSA	۲/۵	۲۴	۱/۹	۰/۰۰۱
p21CIP1/WAF1	TSA	۲/۵	۴۸	۲/۶	۰/۰۰۱
p27KIP1	TSA	۲/۵	۲۴	۲	۰/۰۰۱
p27KIP1	TSA	۲/۵	۴۸	۲/۹	۰/۰۰۱
p57KIP2	TSA	۲/۵	۲۴	۲/۸	۰/۰۰۱
p57KIP2	TSA	۲/۵	۴۸	۳/۴	۰/۰۰۱

بحث و نتیجه گیری

مهارکننده های کینازهای وابسته به سیکلین (Cyclin-dependent kinase inhibitors, Ckis)، تنظیم کننده های منفی چرخه سلولی، کلیدهای تنظیم کننده چرخه سلولی هستند. دو گروه از این تنظیم کننده ها وجود دارد که شامل خانواده Ink4 (Ink4 family) و خانواده Cip/Kip (Cip/Kip family) می باشد. خانواده Ink4 حاوی ژن های p15Ink4a, p16Ink4b, p18Ink4c and p19Ink4d و خانواده Cip/Kip حاوی ژن های p21Cip1, p27Kip1 and p57Kip2 است (۱۲). تاکنون ۱۸ آنزیم هیستون داستیلاز در انسان شناخته شده است که این آنزیم ها به سه کلاس تقسیم می شوند. بیان بیش از حد این آنزیم ها در سرطان های مختلف از قبیل سرطان معده، سرطان مری، سرطان کولون، سرطان پستان، سرطان پروستات و سرطان ریه گزارش شده است. فعالیت زیاد این آنزیم باعث داستیلاسیون ژن های سرکوب کننده توموری از قبیل Ink4 و Cip/Kip و در نتیجه ایجاد سرطان می شود (۱۳). ترکیباتی که فعالیت آنزیم های هیستون داستیلاز را مهار می کنند تحت عنوان مهارکننده های هیستون داستیلاز شناخته می شوند. این ترکیبات به پنج گروه تقسیم می شوند (۱۴).

در این تحقیق ما گزارش کردیم که داروی تریکوآستاتین آ باعث کاهش بیان آنزیم هیستون داستیلاز یک و افزایش بیان ژن های P21, P27 و p57 می شود و از این طریق باعث مهار رشد سلولی و القاء آپوپتوز در سلول های سرطان ریه رده COR-L105 می شود. شبیه نتایج ما، دیگر محققین گزارش کرده اند که داروی تریکوآستاتین آ، باعث مهار رشد سلولی و القاء آپوپتوز در سلول های سرطان ریه رده H157 می گردد (۱۵). اثر مشابهی از این دارو در دیگر سرطان ها گزارش شده است از جمله سرطان کبد رده سلولی Huh-7, HePG2 (۱۶)، سرطان کولورکتال رده سلولی HT116, HT2, (۱۷)، سرطان معده رده سلولی SGC-7901 (۱۸)، سرطان تخمدان رده سلولی A2780 (۱۹) و سرطان پروستات رده سلولی LNCaP (۲۰). با توجه به اثر آپوپتوزی این دارو، ما برآن شدیم که مکانیسم مولکولی این دارو بیشتر مورد مطالعه قرار دهیم بنابراین اثر این دارو را بر روی بیان ژن هیستون داستیلاز یک

مورد مطالعه قرار دادیم و همچنان که ما گزارش کردیم این دارو باعث کاهش بیان ژن هیستون داستیلاز یک گردید. بنابر این ممکن است که این دارو از طریق مهار فعالیت آنزیم های هیستون داستیلاز یک، باعث افزایش بیان ژن های سرکوب کننده توموری p21Cip1, p27Kip1 and p57Kip2 و در نتیجه القاء آپوپتوز در سلول های سرطانی ریه شده باشد. دیگر محققین گزارش کرده اند که این دارو از طریق کاهش بیان ژن هیستون داستیلاز و افزایش بیان ژن P21، باعث ایجاد آپوپتوز در سلول های سرطانی استئوکلاست های بافت استخوانی (۲۱)، مثانه (۲۲) و سرطان رحم (۲۳) می شود. دیگر تحقیقات آزمایشگاهی نشان داده اند که این ترکیب از طریق افزایش بیان ژن P27 باعث القاء آپوپتوز در سرطان کلیه رده سلولی ACHN, Caki-1, A498, Caki-2 (۲۴) می گردد.

علاوه بر مکانیسم های مزبور، مکانیسم های مولکولی دیگر گزارش شده است از جمله اینکه گزارش شده است که این ترکیبات با افزایش بیان ژن P15 (INK4b) باعث ایجاد آپوپتوز در سرطان کولون انسانی رده سلولی HCT116 می شود (۲۵). همچنین گزارش شده است که این ترکیبات از طریق فعال کردن دیگر مسیرهای آپوپتوزی عمل می کنند که شامل فس (Fas), Apo-1 or CD95، تومور نکروزسیس فاکتور رسپتور یک (Tumor necrosis factor receptor-1, TNFR-1)، گیرنده های آپوپتوزی تی ان اف لیگاند (TNF-related apoptosis-inducing ligand) DR-3 و (DR-3, Apo3) and DR-6 می باشد (۲۶). دیگر مکانیسم های گزارش شده برای این ترکیبات شامل افزایش بیان پروتئین های پره آپوپتوزی از قبیل پروتئین های خانواده های Bcl-2 از قبیل Bim, Bmf, Bax, Bak and Bik و همچنین پروتئین های آنتی آپوپتوزی از قبیل Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-w and Mcl-1 (۲۷) می باشد. در این تحقیق، ما وضعیت پروتئین ژن های هیستون داستیلاز یک، P21, P27, and P57 مورد بررسی قرار ندادیم بنابراین بررسی پروتئین این ژن ها پیشنهاد می گردد.

تقدیر و تشکر

با تشکر از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی جهرم که حمایت مالی لازم را انجام داده اند. این مقاله

Yao T, Hosoi F, et al. Expression profile of class I histone deacetylases in human cancer tissues. *Oncol Rep.* 2007;18(4):769-74.

14. Marks PA, Richon VM, Rifkind RA. Histone deacetylase inhibitors: inducers of differentiation or apoptosis of transformed cells. *J Natl Cancer Inst.* 2000;92(15):1210-6.

15. Kim HR, Kim EJ, Yang SH, Jeong ET, Park C, Lee JH, et al. Trichostatin A induces apoptosis in lung cancer cells via simultaneous activation of the death receptor-mediated and mitochondrial pathway. *Exp Mol Med.* 2006;38(6):616-24.

16. Yamashita Yi, Shimada M, Harimoto N, Rikimaru T, Shirabe K, Tanaka S, et al. Histone deacetylase inhibitor trichostatin A induces cell-cycle arrest/apoptosis and hepatocyte differentiation in human hepatoma cells. *Int J Cancer.* 2003;103(5):572-6.

17. Meng J, Zhang HH, Zhou CX, Li C, Zhang F, Mei QB. The histone deacetylase inhibitor trichostatin A induces cell cycle arrest and apoptosis in colorectal cancer cells via p53-dependent and-independent pathways. *Oncol Rep.* 2012;28(1):384-8.

18. Wu ZQ, Zhang R, Connie C, Zhang JF, Zhang YQ. Histone deacetylase inhibitor trichostatin A induced caspase-independent apoptosis in human gastric cancer cell. *Chin Med J.* 2007;120(23):2112-8.

19. Muscolini M, Cianfrocca R, Sajeve A, Mozzetti S, Ferrandina G, Costanzo A, et al. Trichostatin A up-regulates p73 and induces Bax-dependent apoptosis in cisplatin-resistant ovarian cancer cells. *Mol Cancer Ther.* 2008;7(6):1410-9.

20. Liu Z, Marquez M, Nilsson S, Holmberg AR. Incubation with somatostatin, 5-aza decitabine and trichostatin up-regulates somatostatin receptor expression in prostate cancer cells. *Oncol Rep.* 2008;20(1):151-4.

21. Yi T, Baek JH, Kim HJ, Choi MH, Seo SB, Ryoo HM, et al. Trichostatin A-mediated upregulation of p21 WAF1 contributes to osteoclast apoptosis. *Exp Mol Med.* 2007;39(2):213-21.

22. Li GC, Zhang X, Pan TJ, Chen Z, Ye ZQ. Histone deacetylase inhibitor trichostatin A inhibits the growth of bladder cancer cells through induction of p21WAF1 and G1 cell cycle arrest. *Int J Urol.* 2006;13(5):581-6.

23. Wu Y, Guo SW. Histone deacetylase inhibitors trichostatin A and valproic acid induce cell cycle arrest and p21 expression in immortalized human endometrial stromal cells. *Eur J Obst Gynecol Reprod Biol.* 2008;137(2):198-203.

24. Park WH, Jung CW, Park JO, Kim K, Kim WS, Im YH, et al. Trichostatin inhibits the growth of ACHN renal cell carcinoma cells via cell cycle arrest in association with p27, or apoptosis. *Int J Oncol.* 2003;22(5):1129-34.

25. Hitomi T, Matsuzaki Y, Yokota T, Takaoka Y,

حاصل طرح تحقیقاتی است که با کد اخلاقی به شماره IR.JUMS.REC.1398.108 در کمیته تحقیقاتی دانشگاه علوم پزشکی جهرم به ثبت رسیده است.

References

1. Barlési F, Giaccone G, Gallegos-Ruiz MI, Loundou A, Span SW, Lefesvre P, et al. Global histone modifications predict prognosis of resected non small-cell lung cancer. *J Clin Oncol.* 2007;25(28):4358-64.

2. Chervona Y, Costa M. Histone modifications and cancer: biomarkers of prognosis? *Am J Cancer Res.* 2012;2(5):589.

3. Mottet D, Castronovo V. Histone deacetylases: target enzymes for cancer therapy. *Clin Exp Metastasis.* 2008;25(2):183-9.

4. Zhang H, Shang YP, Chen Hy, Li J. Histone deacetylases function as novel potential therapeutic targets for cancer. *Hepatol Res.* 2017;47(2):149-59.

5. Shin JY, Kim HS, Park J, Park JB, Lee JY. Mechanism for inactivation of the KIP family cyclin-dependent kinase inhibitor genes in gastric cancer cells. *Cancer Res.* 2000;60(2):262-5.

6. Kim WY, Sharpless NE. The regulation of INK4/ARF in cancer and aging. *Cell.* 2006;127(2):265-75.

7. Fang J-Y, Lu Y-Y. Effects of histone acetylation and DNA methylation on p21WAF1 regulation. *World J Gastroenterol.* 2002;8(3):400.

8. Sanaei M, Kavooosi F, Salehi H. Genistein and trichostatin a induction of estrogen receptor alpha gene expression, apoptosis and cell growth inhibition in hepatocellular carcinoma HepG 2 cells. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2017;18(12):3445.

9. Sanaei M, Kavooosi F, Roustazadeh A, Golestan F. Effect of genistein in comparison with trichostatin a on reactivation of DNMTs genes in hepatocellular carcinoma. *J Clin Transl Hepatol.* 2018;6(2):141.

10. Kavooosi F. Effect of curcumin and trichostatin a on the expression of DNA methyltransferase 1 in hepatocellular carcinoma cell line hepa 1-6. *Iran J Pediatr Hematol Oncol.* 2018;8(4):193-201.

11. Sanaei M, Kavooosi F. Effect of 5-aza-2'-deoxycytidine in comparison to valproic acid and trichostatin A on histone deacetylase 1, DNA methyltransferase 1, and CIP/KIP family (p21, p27, and p57) genes expression, cell growth inhibition, and apoptosis induction in colon cancer SW480 cell line. *Adv Biomed Res.* 2019;8.

12. Laine H, Sulg M, Kirjavainen A, Pirvola U. Cell cycle regulation in the inner ear sensory epithelia: role of cyclin D1 and cyclin-dependent kinase inhibitors. *Dev Biol.* 2010;337(1):134-46.

13. Nakagawa M, Oda Y, Eguchi T, Aishima SI,

Sakai T. p15INK4b in HDAC inhibitor-induced growth arrest. *FEBS Lett.* 2003;554(3):347-50.

26. Ashkenazi A. Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. *Nature Rev Cancer.* 2002;2(6):420-30.

27. Xu W, Parmigiani R, Marks P. Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action. *Oncogene.* 2007;26(37):5541-52.