



بررسی تاثیر مهارکننده پروتئازوم (MG132) در تنظیم مرگ سلولی، آپوپتوز، فعالیت کاسپازها، میزان گونه‌های فعال اکسیژن و پتانسیل غشای میتوکندری در رده سلولی سرطان سینه (MCF-7)

وحید سلیمی: دانشیار، گروه ویروس شناسی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

زهرآ شهسواری: استادیار، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

معصومه توکلی برکی: دانشیار، گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران (*نویسنده مسئول) Tavakoli.m@iums.ac.ir

چکیده

کلیدواژه‌ها

MG132

آپوپتوز،

مرگ سلولی،

سرطان سینه،

کاسپاز

زمینه و هدف: MG132 به عنوان مهارکننده مسیر پروتئازوم در تنظیم احتمالی مرگ سلول‌های سرطانی مورد توجه قرار گرفته است. این مطالعه با هدف روشن کردن اثر احتمالی MG132 بر تنظیم رشد و القای آپوپتوز با تاکید بر نقش کاسپازها، گونه‌های فعال اکسیژن و میتوکندری در سلول‌های سرطانی MCF-7 طراحی شده است.

روش کار: مطالعه حاضر از نوع مطالعات علوم پایه و در سطح سلول می‌باشد. برای این منظور، سلول‌های MCF-7 در گروه‌های تیمار با غلظت‌های مختلف MG132 (۰.۵، ۱، ۵ و ۱۰ میکرومول) در زمان‌های انکوباسیون ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت قرار گرفتند. اثر سمیت سلولی MG132 بر رشد MCF-7 با استفاده از روش MTT بررسی گردید. رنگ آمیزی Annexin-V-FITC و رنگ آمیزی PI برای تشخیص آپوپتوز اولیه و تاخیری با استفاده از فلوسیتومتری استفاده گردید. سطح پتانسیل غشای میتوکندری ($\Delta\psi_m$) با استفاده از رنگ لیپوفیل JC-1 تغییر رنگ و جذب نوری حاصل از آن، تشکیل گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) با استفاده از پروب فلورسنس $7,2$ - dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) و فعالیت کاسپازهای ۳ و ۸ به روش الایزا مورد بررسی قرار گرفت. برای تجزیه و تحلیل و مقایسه داده‌ها از تحلیل واریانس یک طرفه ناپارامتریک (ANOVA) با آزمون تعقیبی Dennet و آزمون تعقیبی توکی با استفاده از نرم افزار GraphPad Prism استفاده گردید.

یافته‌ها: بر اساس نتایج حاصل از این مطالعه، MG132 باعث ایجاد القای مرگ سلولی در حالت وابسته به دوز و زمان در سلول‌های سرطانی MCF-7 گردید. کاهش درصد سلول‌های زنده پس از تیمار با غلظت‌های ۵ و ۱۰ میکرومول از MG132 پس از ۴۸ ساعت منجر به افزایش درصد سلول‌های آپوپتوزی اولیه و نیز افزایش فعالیت آنزیم‌های کاسپاز ۳ و کاسپاز ۸ در این سلول‌ها گردید. همچنین نتایج این مطالعه نشان داد که القای آپوپتوز در سلول‌های MCF-7 بدنبال تیمار با MG132 با افزایش معنی دار تولید ROS درون سلولی ($P < 0.001$) و نیز کاهش قابل توجه پتانسیل غشای میتوکندری ($P < 0.001$) همراه است.

نتیجه‌گیری: نتایج مطالعه حاضر بر نقش موثر مهار سیستم پروتئازوم از طریق MG132 در توقف تکثیر سلول‌های MCF-7 و القای آپوپتوز و پتانسیل این ترکیب برای طراحی روش‌های درمانی مؤثرتر در کنترل رشد سلول‌های سرطانی سینه تاکید دارد.

تعارض منافع: گزارش نشده است.

منبع حمایت‌کننده: دانشگاه علوم پزشکی ایران

شیوه استناد به این مقاله:

Salimi V, Shahsavari Z, Tavakoli-Yaraki M. Evaluation of the Effect of Proteasome Inhibitor (MG132) in Regulating Cell Death, Apoptosis, Caspase Activity, the Amount of Reactive Oxygen Species and Mitochondrial Membrane Potential in Breast Cancer Cell Line (MCF-7). Razi J Med Sci. 2022;29(5):16-30.

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

Evaluation of the Effect of Proteasome Inhibitor (MG132) in Regulating Cell Death, Apoptosis, Caspase Activity, the Amount of Reactive Oxygen Species and Mitochondrial Membrane Potential in Breast Cancer Cell Line (MCF-7)

Vahid Salimi: Associate Professor, Department of Virology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Zahra Shahsavari: Assistant Professor, Department of Clinical Biochemistry, Faculty of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Masoumeh Tavakoli-Yaraki: Associate Professor, Department of Biochemistry, School of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran (* Corresponding author) tavakoli.m@iums.ac.ir

Abstract

Background & Aims: Breast cancer imposes a great burden of cancer-related mortality and morbidity in women worldwide. Scientific efforts are in progress to improve the efficiency of current therapeutic strategies and reduce chemoresistance (1). Due to the fact that the homeostasis of cancer cell growth is dependent on the balance between cell proliferation and cell death, the emerging role of pro-apoptotic agents to promote apoptosis and attenuate cancer cell evasion from apoptosis has opened up promising cancer therapeutic approaches (2). On the other hand, the process of protein breakdown, which involves the loss of toxic, incorrectly folded, or accumulated proteins play a critical role in normal cell fate. The protein breakdown is mainly implemented by the proteasome system that breaks the proteins into short peptides and their constituent amino acids and transfer them to the cytoplasm to reuse in the synthesis of new proteins (3). If protein breakdown is disrupted, the accumulation of incorrectly folded proteins leads to errors and induction of apoptosis (4). Due to the great importance of proteasomes for cells, inhibition of their function has been proposed as a way to induce apoptosis in cancer cells (5). MG132 has been considered as a proteasome pathway inhibitor and postulated to regulate cancer cell growth and death, recently (6). It has been proposed that MG132 synergized with bevacizumab and/or cisplatin to inhibit cancer cell proliferation by triggering reactive oxygen species generation (6-8). However, the lack of sufficient evidence regarding the relevance of MG132 on breast cancer cell growth provoked us to unravel the possible effect of MG132 and its underlying mechanism in breast cancer. Thus, this study is designed to elucidate the effect of MG132 on growth regulation and induction of apoptosis by emphasizing the role of caspases, reactive oxygen species, and mitochondria in MCF-7 cancer cells.

Methods: In this study, the human breast cancer cell lines, MCF-7 which pathologically originated from invasive carcinoma of the ducts of the breast was obtained from Pasteur Institute of Iran and cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum, 100 U/ml of penicillin and 100 µg/ml of streptomycin and maintained at 37 °C, 5% CO₂ and 100% humidity in the incubator. Cells were treated with different concentrations of MG132 (0.5, 1, 5, and 10 µmol) at incubation times of 12, 24, and 48 hours. The cytotoxic effect of MG132 on MCF-7 growth was investigated using MTT assay and the results were expressed in terms of the percentage of viable cells relative to the control. Annexin-V-FITC staining and PI staining were used to diagnose early and late apoptosis using flow cytometry. The level of mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$) was investigated using JC-1 lipophilic dye and its accumulation in mitochondria, which is associated with fluorescence emission and change of emission from green (520

Keywords

MG132,
Apoptosis,
Cell Death,
Breast Cancer,
Caspase

Received: 11/06/2022

Published: 13/08/2022

nm) to red (590 nm). The formation of reactive oxygen species (ROS) after treatment with different concentrations of MG132 was performed using a fluorescence probe dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA). To evaluate the possible involvement of caspases, the activity of caspase 3 and caspase 8 was examined by the ELISA method. To determine the specificity and accuracy, all experiments were repeated at least three times. The non-parametric one-way analysis of variance (ANOVA) with Dennet's post hoc test and Tukey's post hoc test were applied for analysis of differences using Graph Pad Prism version 7 (Graph Pad Software, San Diego California)

Results: Based on data, a significant reduction in the percentage of viable breast cancer cells (MCF-7) was detected following treatment by MG132 that was occurred in a dose and time-dependent manner. Treatment of MCF-7 cells with 5 μmol and 10 μmol of MG132 for 48 hours reduced cell viability by about 40% and 50%, respectively. Annexin-V and PI double staining method was applied to evaluate whether the cytotoxic effect of MG132 was related to the induction of apoptosis. According to the protocol, annexin-V positive, PI negative cells accounts as early apoptotic cells and annexin-V positive, PI-positive cells account for late apoptotic cells. Decreasing the percentage of viable cells after treatment with 5 and 10 μmol of MG132 after 48 hours has increased the percentage of early apoptotic cells. The percentage of early apoptotic cells was 15% after treatment with 5 μmol of MG132 and 30% after treatment with 10 μmol of MG132. Also, due to the considerable role of the caspase cascade as executors of apoptosis, the activity of caspase 3 and 8 was assessed. A significant increase in the caspase-3 activity was observed after treatment with 10 μmol of MG132 in MCF-7 cells. Also, the level of caspase-8 activity in the mentioned time showed a significant increase in both 5 and 10 μmol of MG132 indicating that the MG132-induced apoptosis in MCF-7 cells occurred in a caspase-dependent manner. Based on the results of this study, a significant increase in the intracellular ROS level of MCF-7 cells was observed while cells were treated with 5 and 10 μmol of MG132 for 48 hours. Increases in intracellular ROS levels indicate MG132-induced apoptosis in MCF-7 cells is associated with the induction of oxidative stress. Also, reduced mitochondria membrane potential ($\Delta\Psi\text{m}$) reflects mitochondrial impairment and accounts as a hallmark of apoptosis (9). Our data showed that treatment of MCF-7 cells with 1, 5, and 10 μmol of MG132 for 48 hours, reduced the mitochondria membrane potential significantly, indicating the fact that MG132 influences mitochondria to induce apoptosis in breast cancer.

Conclusion: The data presented in this study revealed that MG132 inhibits the growth of breast cancer cells and induces apoptosis by activating caspases 3 and 8, increasing intracellular ROS level, and decreasing mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi\text{m}$). Also, our results showed a significant difference in the effect of MG132 on the mentioned assays in untreated (control) breast cancer cells compared to the treated cells and the observed effects on the treated cells depending on the concentration of MG132. These results emphasize the effective role of inhibiting the proteasome system through MG132 in stopping the proliferation of MCF-7 cells and inducing apoptosis and the potential of this combination to design more effective therapies in controlling the growth of breast cancer cells.

Conflicts of interest: None

Funding: Iran University of Medical Sciences

Cite this article as:

Salimi V, Shahsavari Z, Tavakoli-Yaraki M. Evaluation of the Effect of Proteasome Inhibitor (MG132) in Regulating Cell Death, Apoptosis, Caspase Activity, the Amount of Reactive Oxygen Species and Mitochondrial Membrane Potential in Breast Cancer Cell Line (MCF-7). Razi J Med Sci. 2022;29(5):16-30.

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

مقدمه

سرطان پستان دومین سرطان پس از سرطان پوست و شایع‌ترین علت مرگ و میر ناشی از سرطان در زنان ۴۰ تا ۴۴ ساله می‌باشد که در حدود ۳۲ درصد از کل سرطان‌های زنان و ۱۹ درصد از مرگ‌های ناشی از سرطان در زنان را شامل می‌شود (۱). سرطان پستان از پوشش اپی‌تلیایی مجاری انتهایی لوبول‌ها (نوع لوبولار) به وجود می‌آید که می‌تواند مهاجم یا غیرمهاجم باشد (۲). تا کنون علت مشخص و قطعی برای بروز سرطان پستان همانند سایر سرطان‌ها شناخته نشده است اما نتایج مطالعات اپیدمیولوژیک نقش مجموعه عوامل ژنتیکی، محیطی و هورمونی را در بروز این سرطان موثر و قابل توجه دانسته‌اند (۳)؛ اما در صورت ابتلا به سرطان پستان تاکنون پیشرفت‌های قابل ملاحظه‌ای در برنامه‌های چندجانبه درمانی سرطان پستان صورت گرفته است که بطور کلی شامل درمان‌های اصلی (جراحی) و درمان‌های کمکی (پرتودرمانی، ایمنی درمانی، ژن درمانی، کنترل سیتوتیک بیماری، شیمی درمانی و هورمون درمانی) می‌باشد (۴). یکی از مکانیسم‌های عمل درمان‌های کمکی، القاء آپوپتوز در سلول‌های سرطانی می‌باشد (۵). رشد سلول‌های توموری نه تنها وابسته به افزایش تکثیر سلولی است، بلکه به افزایش طول عمر سلول یا زنده ماندن آن از طریق مهار مرگ سلولی یا آپوپتوز نیز بستگی دارد (۶). آپوپتوز نیز به گونه‌ای از مرگ برنامه‌ریزی شده اطلاق می‌گردد که در آن مورفولوژی و مکانیسم ویژه و خاصی وجود دارد که عبارتند از از دست رفتن آب درون سلولی است که منجر به تغییر حجم و اندازه سلول می‌شود، کوچکتر بودن و شکل نامنظم سلول‌های آپوپتوزی، متراکم شدن کروماتین، ایجاد قطعات DNA در اندازه‌های نوکلئوزومی تا الیگونوکلئوزومی و از بین رفتن غشای هسته (۷). در طی فرایند آپوپتوز غشاء سیتوپلاسمی دچار تغییرات ساختاری شده که مهم‌ترین آن‌ها چرخش فسفاتیدیل سرین‌های سمت درون سلولی غشاء سیتوپلاسمی به سمت خارج سلولی می‌باشد. در معرض قرار گرفتن فسفاتیدیل سرین موجب شناسایی این سلول‌ها توسط ماکروفاژها و فاگوسیتیه (Phagocytosis) شدن آن‌ها می‌گردد (۸). نتایج

تحقیقات مولکولی در خصوص مکانیسم آپوپتوز در سلول‌های نرمال و سرطانی موجب گشته تا با استفاده از تفاوت‌های مکانیسم آپوپتوزی در بین این دو بافت افق جدیدی از تحقیقات بیوشیمیایی، فارماکولوژیکی و ژنتیکی در مسیر طراحی داروها و روش‌های درمانی جدید گشوده شود (۹). در این رویکرد، هدف طراحی روش درمانی است که سبب تغییر هدفداری در مسیر آپوپتوز شود (۱۰). طول عمر پروتئین بوسیله تنظیم تجزیه پروتئین کنترل می‌گردد که می‌تواند از چند دقیقه مثل سیلکین‌های میتوزی تا طول عمری برابر با طول عمر یک ارگانیسم باشد (۱۱). دو عملکرد مهم برای فرایند تجزیه پروتئین‌ها وجود دارد که عبارتند از: ۱) حذف و از بین رفتن‌های پروتئین‌های سمی و همچنین پروتئین‌هایی که به طور نادرست تاخوردیده یا تجمع یافته‌اند یا پروتئین‌هایی که بواسطه جهش در ژن کد کننده آن‌ها آسیب دیده‌اند یا به دلیل متابولیت‌های سلولی آسیب دیده‌اند، ۲) تجزیه کنترل شده پروتئین‌هایی طبیعی، مکانیسم قدرتمندی را برای نگهداری پروتئین‌هایی و فعالیت‌شان در سطح مناسب فراهم می‌آورد و امکان تغییر سریع در این سطوح را برای کمک به سلول‌ها در پاسخ به تغییر شرایط می‌دهد. یکی از مهم‌ترین مسیر تجزیه پروتئین‌ها استفاده از پروتئوزوم می‌باشد که پروتئین‌ها از طریق یک فرایند وابسته به انرژی و با دخالت ساختارهایی شبیه چارونین‌ها تاخوردگی خود را از دست داده و وارد پروتئوزوم شده و در آن به پپتیدهای کوتاه ۴ تا ۱۰ اسید آمینه‌ای تبدیل می‌شوند (۱۲). سپس این پپتیدها به درون سیتوپلاسم منتقل شده و در آن جا به اسیدهای آمینه سازنده خود تجزیه می‌شوند تا دوباره در سنتز پروتئین‌های جدید مورد استفاده قرار گیرند. با توجه به اهمیت زیاد پروتئوزوم‌ها برای سلول‌ها، مهار عملکرد آن‌ها به عنوان راهکاری برای القای آپوپتوز و هدف درمانی جدید مطرح شده است (۱۳). یکی از مهم‌ترین مهارکننده‌های عملکرد پروتئوزوم‌ها، ترکیب MG132 می‌باشد که بر اساس شواهد می‌تواند رشد سلول‌های سرطانی را متوقف نماید (۱۴). نتایج مطالعات در خصوص نقش MG132 در کنترل مرگ سلول‌های سرطانی نشان داد که MG132 می‌تواند با القای آپوپتوز با کمک واسطه‌های مختلف رشد سلول سرطانی را

مولکولی برای طراحی درمان‌های کمکی مؤثرتر در سرطان سینه فراهم نماید.

روش کار

کشت، نگهداری و تکثیر رده سلولی سرطانی

سینه: در این مطالعه از رده سلولی سرطان سینه MCF-7 استفاده گردید که از بانک سلولی ایران واقع در انستیتو پاستور خریداری گردید. رده سلولی MCF-7 که منشأ انسانی داشته، از نظر آسیب‌شناسی از کارسینومای مهاجم مجاری سینه (Invasive ductal carcinoma) نشات گرفته و از افوزیون جنبی خانم ۶۹ ساله‌ای در مرکز سرطان میشیگان در سال ۱۹۷۳ میلادی به دست آمده است. از نظر ریخت‌شناسی MCF-7 سلول اپی تلیالی است و به صورت تک لایه و چسبیده به کف فلاسک رشد می‌کند و این رده سلولی دارای گیرنده استروژن می‌باشد. سلول‌ها در انکوباتور (آلمان، Memmert) حاوی ۵٪ دی اکسید کربن (CO₂)، ۹۵٪ رطوبت و دمای ۳۷ °C نگهداری شدند و روزانه از نظر رشد و تراکم سلولی، ریخت‌شناسی و کنترل آلودگی توسط میکروسکوپ معکوس (آلمان، Zeiss) مورد بررسی قرار گرفتند. تعویض محیط کشت (-RPMI 1640، آمریکا، GIBCO) سلول‌ها بر اساس میزان رشد و دانسیته آن‌ها در زمان‌های مورد نیاز انجام گرفت. زمانی که تراکم سلول‌ها در فلاسک به ۸۰ تا ۸۵٪ می‌رسید، سلول‌ها به منظور تکثیر بیشتر به فلاسک‌های جدید منتقل می‌شدند. برای این منظور، ابتدا محیط کشت فلاسک تخلیه و به آن محلول تریپسین-EDTA (آمریکا، Sigma) استریل اضافه می‌گردید. بعد از مدت زمان مناسب انکوباسیون سلول‌ها با نسبت ۱:۳ به فلاسک‌های جدید منتقل و در انکوباتور (آلمان، Memmert) در شرایط ذکر شده در بالا نگهداری می‌شدند. برای شمارش سلول‌ها از لام نتوبار یا هموسایتومتر و محلول ۱٪ تریپان بلو (آمریکا، Sigma) استفاده گردید. استفاده از تریپان بلو برای شمارش سلول‌ها بر اساس قابلیت این رنگ در افتراق بین سلول‌های زنده و مرده است. حجم معینی از سوسپانسیون سلول‌های تریپسینه شده بعد از همگن

کاهش دهد. در این راستا نشان داده شد که MG132 مسیره‌های سیگنال دهی آپوپتوتیک را در سلول‌های سرطانی استئوسارکوما (U2OS) فعال می‌کند و می‌تواند فسفوریلاسیون Akt (Protein kinase B) و Erk (Extracellular signal-regulated kinase 1/2) را کاهش داده و بیان پروتئین‌های پروآپوپتوتیک از جمله کاسپاز ۳ و ۷ را افزایش دهد (۱۵). در مطالعه دیگری نشان داده شد که مهارکننده پروتئازوم حداقل تا حدی از طریق تعدیل فعالیت فاکتور رونویسی FOXO3 باعث القای آپوپتوز در سلول سرطانی تیروئید می‌شود (۱۶). همچنین نشان داده شد که مهار پروتئازوم فاکتور هسته‌ای کاپا-زنجیره سبک-افزایش دهنده سیگنال‌دهی سلول‌های B فعال (NF-κB) را کاهش می‌دهد که یک پروموتور شناخته‌شده در القای مقاومت به درمان از طریق ماکروفاژها است و MG132 می‌تواند در برنامه‌ریزی مجدد ماکروفاژها و القای مرگ سلول سرطانی سینه موثر باشد (۱۷). در مطالعه‌ای بر روی سلول‌های لوکمیا (U937) مشخص گردید MG132 به همراه Pentoxifylline می‌تواند با کاهش بیان پروتئین‌های آنتی آپوپتوزی، توقف چرخه سلولی در فاز G1، افزایش فعالیت کاسپاز های ۳ و ۸ و کاهش پتانسیل غشای میتوکندری باعث القای آپوپتوز و توقف رشد سلول‌های سرطانی فوق گردد (۱۸). در سلول‌های کارسینومای کیسه صفرا، MG132 می‌تواند از طریق مسیر خارجی آپوپتوز و فعال کردن کاسپازهای ۳ و ۸ و نیز فعال کردن گیرنده غشایی (DR5) که منجر به فعال شدن سیتوکاین‌های التهابی پیش برنده مرگ سلولی از جمله TRAIL می‌شود، آپوپتوز را در این سلول‌ها القا نماید (۱۹). اما اطلاعات اندکی از مکانیسم مولکولی موثری که MG132 از آن طریق بتواند در کنترل رشد سلول‌های سرطانی سینه و نیز اهداف داخل سلولی آن موثر باشد، وجود دارد. از اینرو، مطالعه حاضر به بررسی اثر احتمالی MG132 بر تنظیم رشد و القای آپوپتوز با تاکید بر نقش کاسپاز ها، گونه‌های فعال اکسیژن و میتوکندری در سلول‌های سرطانی MCF-7 می‌پردازد. نتایج این مطالعه می‌تواند شواهد مهمی را در راستای استفاده از راهکار مهار پروتئازوم‌ها به عنوان هدف

با تعداد سلول‌های زنده متناسب است. نتایج بر حسب درصد سلول‌های زنده نسبت به کنترل بیان گردید و برای اطمینان از صحت نتایج، آزمایشات در هر غلظت حداقل ۳ بار تکرار گردید.

بررسی آپوپتوز با فلوسایتومتری: برای بررسی نوع مرگ سلولی و تعیین کمی درصد سلول‌های دچار آپوپتوز اولیه و ثانویه از فلوسایتومتری (آمریکا، LifeTech) استفاده گردید. برای این منظور به دنبال تیمار سلول‌ها با غلظت‌های ۱، ۵ و ۱۰ میکرومول از MG132 به مدت ۴۸ ساعت، محیط رویی چاهک‌های حاوی سلول جمع‌آوری و سلول‌های چسبیده نیز پس از تریپسینه شدن، از چاهک‌ها جمع‌آوری گردیدند. لازم به ذکر است علت انتخاب غلظت‌های فوق برای بررسی القای آپوپتوز بر مبنای نتایج حاصل از بررسی سیتوتوکسیسیته سلول‌ها بوده است و غلظت‌هایی برای بررسی آپوپتوز انتخاب گردیدند که بیش از ۲۰٪ القای مرگ در سلول‌های ایجاد کرده باشند. سلول‌ها به مدت ۵ دقیقه سلانتریفوژ (۵۰۰،۴ g درجه) (آلمان، Eppendorf) شدند. رسوب سلولی در PBS (ایران، ویژن آریا) سرد سوسپانسیون شده و به میکروتیوب (ایران، پارس ژن) جدید منتقل گردیدند. سپس سلول‌ها در ۵۰۰ میکرولیتر بافر اتصال به آرامی مخلوط شدند. پس از افزودن ۵ میکرولیتر محلول Annexin-V و ۵ میکرولیتر محلول PI (آمریکا، Biovision)، انکوباسیون سلول‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در تاریکی انجام گردید. سوسپانسیون حاصل به لوله فلوسایتومتری منتقل و توسط دستگاه فلوسایتومتری (آمریکا، LifeTech) حداقل تا یک ساعت آنالیز گردید.

سنجش فعالیت کاسپاز-۳: کاسپاز-۳ یک سیستمین پروتئاز درون سلولی است که مهم‌ترین کاسپاز فرودست و عمل‌کننده در فرایند آپوپتوز به شمار می‌رود و جزء مشترک در مسیر داخلی و خارجی آپوپتوز است. جهت سنجش فعالیت کاسپاز-۳ (آمریکا، Biovision) از روش رنگ سنجی که بر اساس هیدرولیز سوبسترای پپتیدی کاسپاز-۳ (Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-p-nitroanilide) استوار است و منجر به آزاد شدن پارانیتروانیلین (pNA) می‌شود، استفاده گردید.

سازی، با حجم مساوی از محلول تریپان بلو مخلوط گردیده و به محفظه زیر لامل سنگی لام نئوبار منتقل گردید. لام فوق از ۴ مربع ۴ عددی تشکیل شده که سلول‌های موجود در ۴ مربع بیرونی شمرده شده و میانگین آن‌ها محاسبه گردید.

تیمار سلول‌های رده سرطانی سینه و بررسی سیتوتوکسیسیته با استفاده از روش MTT: برای

این منظور سلول‌های موجود در فلاسک بعد از بررسی ظاهر و عدم وجود آلودگی تریپسینه شده و پس از شمارش سلولی، با دانسیته مناسب به هر یک از چاهک‌ها منتقل گردیدند. پس از گذشت ۲۴ ساعت انکوباسیون و اطمینان از قرار گرفتن سلول‌ها در فاز رشد لگاریتمی، محیط رویی سلول‌ها تخلیه شده و محیط کشت حاوی ۰،۵، ۱، ۵ و ۱۰ میکرومول از MG132 (آمریکا، Tocris) به سلول‌ها اضافه گردید و سلول‌ها به مدت ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت انکوبه گردیدند. لازم به ذکر است MG132 یک پپتید-آلدئید با نام کامل (carbobenzoxyl-L-leucyl-L-leucyl-L-leucinal) است که مهارکننده طبیعی پروتئازوم بوده و جزء تری‌ترین‌ها و یک مشتق گیاهی محسوب می‌شود. ترکیب فوق دارای وزن مولکولی ۴۷۵.۶۳ بوده و حلال آن اتانل (آلمان، MERCK) است. برای تهیه محلول استوک مقدار ۱ میلی گرم از MG132 را در ۲۰۱ میلی‌لیتر از اتانل حل کرده تا به غلظت ۱ میلی مولار برسد و از آن برای تهیه سایر غلظت‌ها استفاده گردید. برای بررسی میزان سیتوتوکسیته غلظت‌های مختلف ترکیب فوق و بعد از گذشت ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت، به هر چاهک محتوی سلول مقدار ۲۰ میکرو لیتر محلول MTT (غلظت ۵mg/ml در PBS) (آلمان، MERCK) اضافه و به مدت ۴ ساعت در انکوباتور (آلمان، Memmert) انکوبه گردیدند. سپس محیط کشت به دقت خارج شده و به هر چاهک ۲۰۰ میکرولیتر DMSO (آلمان، MERCK) به عنوان حلال افزوده گردید و میزان جذب نوری هر چاهک سلولی در طول موج ۵۷۰ نانومتر توسط دستگاه ELISA-reader (اسپکتروفوتومتر) (استرالیا، Organon teknika) خوانش گردید. لازم به ذکر است، میزان جذب به طور مستقیم

۳۰۰ μl محیط کشت به همراه ۱ میکرولیتر از ترکیب FITC-IETD-FMK به هر نمونه اضافه و به مدت یک ساعت در ۳۷°C و ۵٪ Co2 انکوبه گردیدند. پس از دو مرحله سانتریفوژ در 3000 rpm به مدت ۵ دقیقه شستشو، میزان جذب نوری هر چاهک توسط-ELISA reader (استرالیا، Organon teknika) در 535 نانومتر خوانش گردید.

اندازه‌گیری گونه‌های واکنش‌پذیر اکسیژن: برای اندازه‌گیری گونه‌های واکنش‌پذیر اکسیژن (ROS) درون سلولی در محیط کشت سلول‌ها از پروب فلورسنس 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) (آمریکا، Biovision) استفاده گردید. غلظت نهایی μM ۲۰ از ترکیب DCFH-DA به محیط کشت سلول‌ها اضافه گردید. پس از ۴۵ دقیقه انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی‌گراد، محلول سوبسترا از چاهک‌های سلولی حذف شده و سلول‌ها با PBS شسته شدند. در مرحله بعد جهت بررسی تولید ROS توسط سلول‌ها، سلول‌ها با ۱، ۵ و ۱۰ میکرومول از MG132 به مدت ۴۸ انکوبه گردیدند. میزان فلورسنس حاصل در طول موج تحریک 485 nm و نشر 528 nm با استفاده از دستگاه خوانش فلورسنس (استرالیا، Organon teknika) قرائت گردید. میزان ROS تولید شده توسط هر گروه سلولی به صورت RFU (Relative Fold Unit) گزارش گردید.

اندازه‌گیری پتانسیل غشاء میتوکندری: برای اندازه‌گیری پتانسیل غشاء میتوکندری از رنگ JC-1 (آمریکا، Biovision) استفاده گردید که این رنگ لیپوفیل کاتیونی پتانسیل حاصل از تجمع در میتوکندری را با نشر فلورسانس نشان می‌دهد که با تغییر نشر از سبز (۵۲۰ نانومتر) به قرمز (۵۹۰ نانومتر) می‌باشد؛ بنابراین دپلاریزه شدن غشاء میتوکندری با کاهش در میزان نسبت نشر سبز به قرمز همراه است. برای این منظور، سلول‌ها با ۱، ۵ و ۱۰ میکرومول از MG132 به مدت ۴۸ تیمار شده و بعد از اتمام زمان تیمار سلول‌ها با ۱۰ میکرولیتر از محلول staining solution (آمریکا، Biovision) به مدت ۱۵ دقیقه انکوبه گردیدند. پس از سانتریفوژ و افزودن assay buffer و شستشو و سانتریفوژ (آلمان، Eppendorf) مجدد،

غلظت pNA تولید شده با میزان فعالیت کاسپاز-۳ رابطه مستقیمی داشته و میزان جذب نوری آن توسط اسپکتروفوتومتری (استرالیا، Organon teknika) در طول موج ۴۰۵ نانومتر سنجیده می‌شود. برای این منظور، سلول‌های تیمار شده با غلظت‌های ۵ و ۱۰ میکرومول از MG132 یعنی غلظت‌هایی که توانسته بودند آپوپتوز را به طور معنی‌داری القا نمایند به مدت ۴۸ ساعت بعد از تریپسینه شدن جمع‌آوری و به میکروتیوب‌های جدید منتقل گردیدند. سلول‌ها به مدت ۵ دقیقه (۶۰۰ g و ۴°C) سانتریفوژ (آلمان، Eppendorf) شده و رسوب سلولی با PBS شستشو و مجدداً سانتریفوژ گردید. این بار به رسوب سلولی، بافر لیزات (آمریکا، Biovision) افزوده و به مدت ۱۵ تا ۲۰ دقیقه روی یخ انکوبه گردید. لیزات سلولی در ۲۰۰۰۰ g به مدت ۱۵ دقیقه در ۴°C سانتریفوژ شده و رسوب حاصل در ۳۷°C به مدت ۴۵ تا ۹۰ دقیقه انکوبه گردید. جذب نوری هر چاهک در ۴۰۵ نانومتر با -ELISA reader (استرالیا، Organon teknika) قرائت گردید. با استفاده از منحنی استاندارد pNA، غلظت این ترکیب در هر چاهک و به دنبال آن فعالیت کاسپاز محاسبه گردید. ضمن اینکه نتایج از مقایسه میزان جذب نمونه‌ای که در آن آپوپتوز القا شده است با نمونه‌های کنترل بدون القای آپوپتوز گزارش گردیده است که بصورت میزان افزایش فعالیت کاسپاز در نمودار نشان داده شده است.

سنجش کاسپاز-۸ فعال: برای سنجش فعالیت کاسپاز ۸ (آمریکا، Biovision) که از مهم‌ترین کاسپاز های فعال در مسیر خارجی آپوپتوز است، از ترکیب IETD-FMK کونژوگه با فلورسئین (FITC)، به عنوان مهارکننده اختصاصی کاسپاز-۸، استفاده می‌شود. این معرف نفوذپذیر به سلول و غیرسمی است و به طور برگشت ناپذیر به جایگاه فعال آنزیم متصل می‌شود. برای این منظور، سلول‌های تیمار شده با غلظت‌های ۵ و ۱۰ میکرومول از MG132 یعنی غلظت‌هایی که توانسته بودند آپوپتوز را به طور معنی‌داری القا نمایند، به مدت ۴۸ ساعت بعد از تریپسینه شدن و پس از سانتریفوژ (آلمان، Eppendorf) در ۲۰۰ g به مدت ۵ دقیقه،

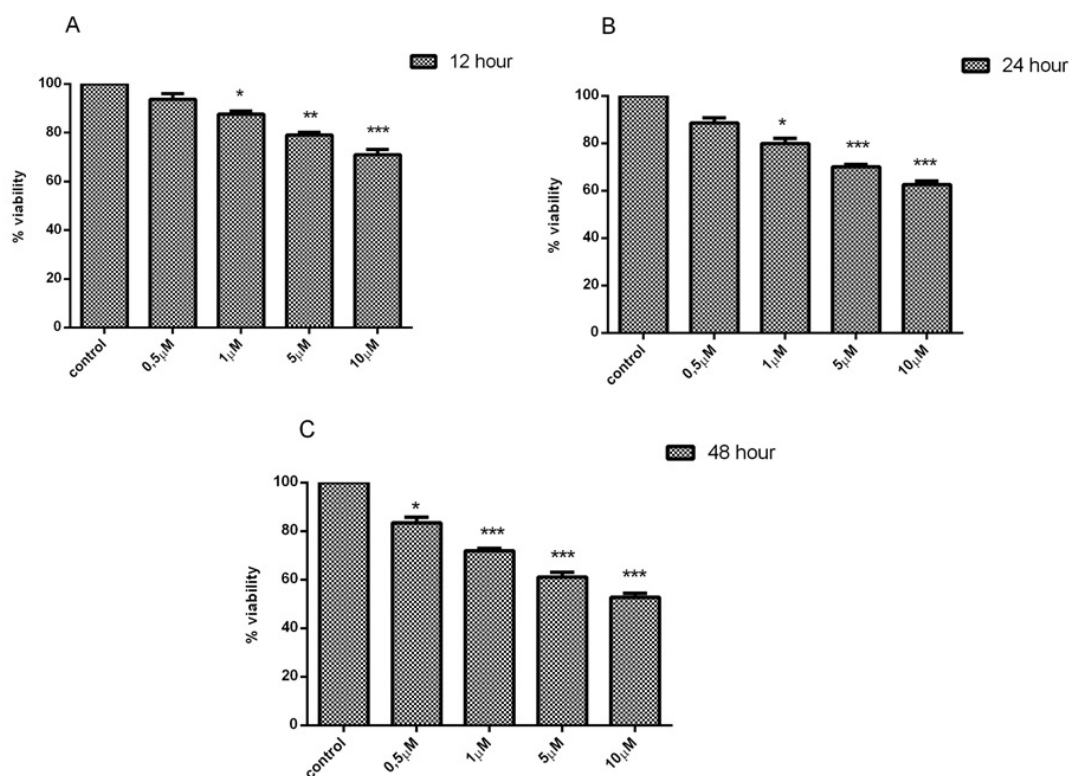
داده شد.

یافته‌ها

بررسی اثر MG132 بر روی رشد رده سلولی MCF-7: برای بررسی اثر سمیت MG132 بر سرطان سینه و رشد طبیعی سلول‌ها، سلول‌ها به مدت ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت در معرض غلظت‌های مختلف MG132 (۰.۵، ۱، ۵ و ۱۰ میکرومول) قرار گرفتند و زنده‌مانی سلول‌ها با استفاده از روش MTT ارزیابی شد. لازم به ذکر است بر اساس نتایج مطالعات گذشته دیده شده است که MG132 می‌تواند در غلظت‌های پایین (۰.۵ میکرومول) تا غلظت‌های بالاتر در سلول‌ها منجر به توقف رشد گردد (۲۰). از این رو در مطالعه حاضر بر اساس مطالعه اولیه ای (pilot) که با دامنه ای از سلول‌های MCF-7 انجام گرفت، دامنه غلظتی که

فلورسنس حاصل در طول موج تحریک ۴۸۵ nm و نشر 528 nm (سبز) و ۵۹۰ (قرمز) با استفاده از دستگاه خوانش فلورسنس (استرالیا، Organon teknika) خوانش گردید. نتایج بصورت نسبت شدت فلورسانس سبز به قرمز که نشان دهنده تجمع رنگ aggregate به منومری است گزارش گردید.

آنالیز آماری: برای تجزیه و تحلیل و مقایسه داده‌ها از تحلیل واریانس یک طرفه ناپارامتریک (ANOVA) با آزمون تعقیبی Denett و آزمون تعقیبی توکی با استفاده از نرم افزار GraphPad Prism استفاده گردید. برای تعیین ویژگی و دقت، تمام آزمایش‌ها در حداقل سه بار تکرار انجام گردید. داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار ارائه گردیدند و تفاوت‌ها برای $P < 0.05$ ، $P < 0.01$ و $P < 0.001$ معنی دار در نظر گرفته شد. تفاوت‌های آماری با ستاره تعیین روی هر شکل و به صورت $P < 0.05$ ، $P < 0.01$ ، $P < 0.001$ نشان



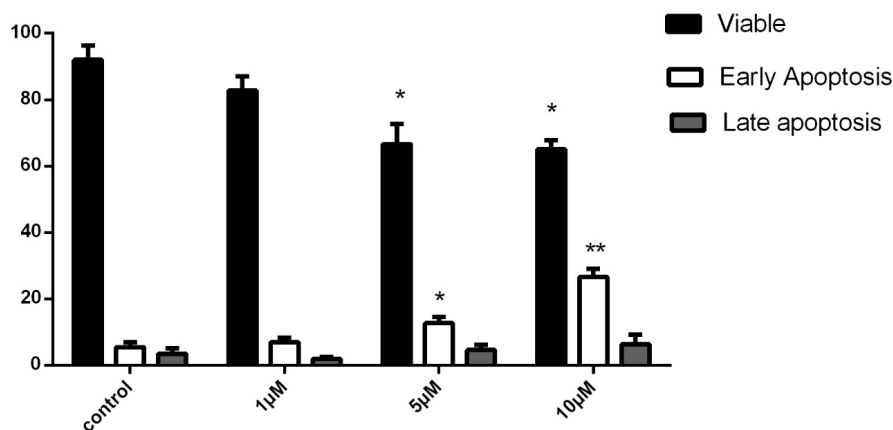
شکل ۱- تاثیر غلظت‌های مختلف MG132 بر روی مرگ سلول‌های MCF-7

نتایج آنکوباسیون ۱۲ ساعت (A) آنکوباسیون ۲۴ ساعت (B) و آنکوباسیون ۴۸ ساعت (C) سلول‌های MCF-7 نشان دهنده کاهش تعداد سلول‌های زنده همزمان با افزایش غلظت MG132 می‌باشد. نتایج بر اساس $\text{mean} \pm \text{SD}$ در مقایسه با کنترل ارائه شده است. نتایج $P < 0.05$ ، $P < 0.01$ ، $P < 0.001$ معنی دار است.

این کاهش بیشتر می‌شود. الگوی مهار رشد سلولی ناشی از MG132 به روشی وابسته به دوز و زمان برای برای این سلول‌ها بوده است. تیمار سلول‌های MCF-7 با ۵ میکرومول و ۱۰ میکرومول MG132 به مدت ۴۸ ساعت منجر به کاهش زنده‌مانی سلولی به ترتیب حدود ۴۰ درصد و ۵۰ درصد گردید (شکل 1.C).

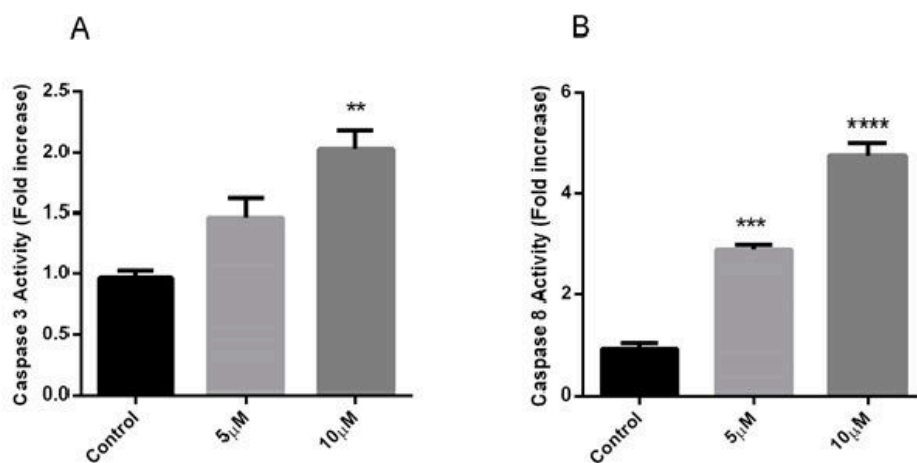
بررسی اثر MG132 بر روی القای آپوپتوز در رده سلولی MCF-7: روش رنگ‌آمیزی دوگانه Annexin-V و PI به عنوان یک روش انتخابی برای تعیین اینکه آیا

بتواند در کمترین زمان رشد سلول‌ها را بطور مشخصی کاهش دهد انتخاب گردید و سایر آزمایشات با این دامنه غلظتی بررسی گردید. نتایج تیمار سلول‌ها نسبت به چاهک شاهد متناظر خود مقایسه گردیدند و درصد سلول‌های زنده نسبت به کنترل محاسبه گردید. نتایج کمی بر اساس $\text{mean} \pm \text{SD}$ در مقایسه با کنترل به صورت درصد ارائه شده است. نتایج ما کاهش قابل توجهی را در درصد سلول‌های سرطان سینه زنده (MCF-7) نشان می‌دهد که با افزایش غلظت MG132



شکل ۲- تاثیر غلظت‌های مختلف MG132 بر درصد آپوپتوز اولیه و تاخیری سلول‌های MCF-7

نتایج انکوباسیون ۴۸ ساعت، افزایش معنی‌دار درصد سلول‌ها در مرحله آپوپتوز اولیه (ستون سفید) را در غلظت‌های ۵ و ۱۰ میکرومول از MG132 نشان می‌دهد. نتایج بر اساس $\text{mean} \pm \text{SD}$ در مقایسه با کنترل ارائه شده است. نتایج $P < 0.05$ * و $P < 0.001$ ** معنی‌دار است.



شکل ۳- تاثیر غلظت‌های مختلف MG132 بر فعالیت کاسپاز ۳ و ۸ در سلول‌های MCF-7

نتایج افزایش معنی‌دار میزان فعالیت کاسپاز ۳ را در غلظت ۱۰ میکرومول از MG132 نشان می‌دهد (A). همچنین میزان فعالیت کاسپاز ۸ با افزایش غلظت MG132 افزایش یافت (B). نتایج بر اساس $\text{mean} \pm \text{SD}$ در مقایسه با کنترل ارائه شده است. نتایج $P < 0.01$ ** و $P < 0.001$ *** معنی‌دار است.

داد (B.۳).

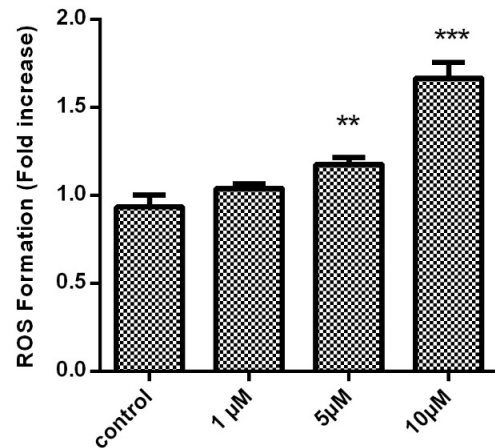
بررسی اثر MG132 بر میزان ROS درون سلولی در رده سلولی MCF-7: همانطور که نتایج مطالعات گذشته نشان می‌دهد، در سلول‌هایی که دچار آپوپتوز شده‌اند، سطح ROS داخل سلولی برای حفظ شرایط اکسیداتیو سلول افزایش می‌یابد. برای بررسی احتمال تولید ROS در پاسخ به MG132، سلول‌ها با غلظت‌های مختلف MG132 (۱، ۵ و ۱۰ میکرو مولار) به مدت ۴۸ ساعت تیمار شدند و سطح تولید ROS بر این اساس ارزیابی گردید. بر اساس نتایج، افزایش قابل توجهی در سطح ROS داخل سلولی سلول‌های MCF-7 در غلظت‌های ۵ و ۱۰ میکرو مولار مشاهده گردید (شکل ۴). افزایش در سطح ROS داخل سلولی نشان می‌دهد آپاپتوز القا شده توسط MG132 در سلول‌های MCF-7 با القای شرایط اکسیداتیو همراه است.

بررسی اثر MG132 بر تغییر در پتانسیل غشای میتوکندری در رده سلولی MCF-7: پتانسیل غشای میتوکندری ($\Delta\Psi_m$) منعکس کننده عملکرد میتوکندری است و کاهش سطح ($\Delta\Psi_m$) به عنوان یکی از نشانگرهای آپوپتوز در نظر گرفته می‌شود. به منظور مشخص کردن نقش احتمالی میتوکندری در آپوپتوز القا شده توسط MG132، سلول‌ها با ۱، ۵ و ۱۰ میکرومول MG132 به مدت ۴۸ ساعت تحت تیمار قرار گرفتند و با JC-1 به عنوان یک رنگ برچسب‌دار چربی دوست که قادر به ورود به میتوکندری است، آنکوبه شدند. تغییر رنگ از سبز به قرمز نشان دهنده افزایش پتانسیل غشاء میتوکندری است. JC-1 در سلول‌های سالم با رنگ قرمز شدید تجمع می‌یابد و تمایل دارد به صورت مونومر باقی بماند و در سلول‌های آپوپتوزی که پتانسیل غشایی در آن‌ها کم است رنگ سبز را نشان می‌دهد. تغییر رنگ قرمز به سبز نشان دهنده کاهش پتانسیل غشای میتوکندری است. بر اساس نتایج حاصل از این مطالعه، همانطور که در شکل ۵ نشان داده شده است، MG132 به طور قابل توجهی باعث کاهش پتانسیل غشای میتوکندری ($\Delta\Psi_m$) به صورت وابسته به دوز در سلول‌های MCF-7 گردید.

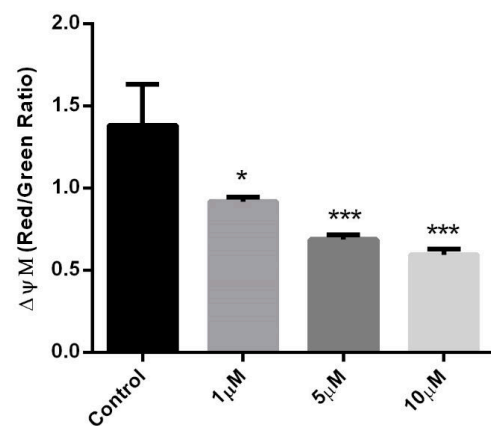
اثر سمیت سلولی مشاهده شده از MG132 می‌تواند با القای آپوپتوز در این سلول‌ها همراه باشد، استفاده گردید. برای این منظور، سلول‌ها با غلظت‌های ۱، ۵ و ۱۰ میکرومولار MG132 به مدت ۴۸ ساعت تیمار شدند و با روش فلوسایتومتری بر اساس روش ذکر شده در بخش روش اجرا آنالیز و بررسی گردیدند. ابتدا دستگاه فلوسایتومتری با استفاده از سلول‌های رنگ آمیزی نشده تنظیم گردید و سپس سلول‌های کنترل و تیمار شده مورد سنجش قرار گرفتند. سلول‌ها بر اساس نوع رنگ گرفتنی در یکی از ۴ مربع خروجی دستگاه قرار گرفته و از یکدیگر متمایز گردیدند. سلول‌هایی که دچار آپوپتوز اولیه شده‌اند بصورت $\text{Anexin-V}^+ \text{PI}^-$ سلول‌های دچار آپوپتوز دیررس به صورت $\text{Anexin}^+ \text{PI}^+$ شناسایی شدند. نتایج مطالعه حاضر، افزایش قابل توجهی را در درصد سلول‌های آپوپتوز زودرس و دیررس پس از تیمار با غلظت‌های مختلف MG132 برای سلول‌های MCF-7 نشان داد (شکل ۲). بر اساس داده‌های این مطالعه، درصد سلول‌های آپوپتوز اولیه پس از تیمار با ۵ میلی‌مولار MG132 به میزان ۱۵٪ و پس از تیمار با ۱۰ میلی‌مولار MG132 به میزان ۳۰٪ مشاهده گردید.

بررسی اثر MG132 بر روی فعالیت کاسپاز ۳ و ۸ در رده سلولی MCF-7: با توجه به نقش قابل توجه آبشار کاسپازها به عنوان آنزیم‌های کلیدی اجرایی مسیر آپوپتوز، در این بخش، فعالیت کاسپاز ۳ و کاسپاز ۸ در آپوپتوز القا شده توسط MG132 در سلول‌های سرطانی سینه مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور، سلول‌ها با ۵ و ۱۰ میکرومول MG132 به مدت ۴۸ ساعت تیمار شدند و فعالیت کاسپازهای ۳ و ۸ در آن‌ها بررسی گردید. لازم به ذکر است غلظت‌های ۵ و ۱۰ میکرومول از MG132 توانسته بودند آپوپتوز را به طرز معنی‌داری در سلول‌های فوق القا نمایند. همانطور که در شکل ۳ نشان داده شده است، افزایش قابل توجهی در فعالیت کاسپاز ۳ بعد از تیمار با غلظت ۱۰ میکرومول MG132 مشاهده گردید (شکل A.۳). همچنین سطح فعالیت کاسپاز ۸ در زمان ذکر شده در هر دو غلظت ۵ و ۱۰ میکرومول MG132 افزایش معنی‌داری را نشان

گسترش سرطان کم رنگ می‌شود و تا کنون مکانیسم آپوپتوز در سطح مولکولی در سلول‌های توموری شناخته نشده است (۶)؛ بنابراین القاء آپوپتوز و شناخت عوامل بیوشیمیایی دخیل در این فرایند می‌تواند ابزار مولکولی موثری برای درمان سرطان‌ها باشد (۴). مسیر یوبیکوئیتین-پروتئازوم، مسئول میانجی‌گری بیشتر پروتئولیز درون سلولی، نقش مهمی در تنظیم بسیاری از فرایندهای طبیعی سلولی، از جمله چرخه سلولی، تمایز و آپوپتوز دارد (۱۲). بسیاری از مولکول‌های مرتبط با سرطان وجود دارند که در آنها سطح پروتئین موجود در سلول‌ها توسط مسیر پروتئوزومی تنظیم می‌شود (۱۳). مهارکننده پروتئازوم پپتید-آلدئید MG132 (carbobenzoxyl-L-leucyl-L-leucyl-L-leucinal) یک مهارکننده طبیعی پروتئازوم تری‌ترین است که از یک گیاه دارویی مشتق شده است و قادر به سرکوب رشد سرطان پروستات انسانی در موش‌های برهنه است (۲۱). MG132 یک پپتید آلدئید است که با اتصال کووالانسی به محل فعال زیرواحدهای بتا، فعالیت پروتئازوم S20 را مهار و به طور موثر فعالیت پروتئولیتیک کمپلکس پروتئازوم S26 را مسدود می‌کند (۲۲). نشان داده شده است که MG132 باعث مرگ سلولی آپوپتوز از طریق تشکیل ROS در سلول‌های کارسینومای ریه (A549) می‌شود. تشکیل ROS و کاهش گلوتاتیون به دلیل مهارکننده‌های پروتئازوم ممکن است باعث اختلال عملکرد میتوکندری و متعاقب آن انتشار سیتوکروم شود که منجر به از دست دادن زنده‌مانی سلول می‌شود (۲۳). افزایش استرس اکسیداتیو و نقص در عملکرد میتوکندری در القای مرگ سلولی آپوپتوز نقش دارد. انتقال نفوذپذیری غشا میتوکندری به عنوان یک رویداد مرکزی در جریان اشکال سمی و اکسیداتیو آسیب سلولی شناخته می‌شود. باز شدن منافذ انتقال نفوذپذیری میتوکندری باعث دیپلاریزاسیون پتانسیل گذر غشایی، آزاد شدن کلسیم (Ca²⁺) و سیتوکروم c و از بین رفتن فسفوریلاسیون اکسیداتیو می‌شود که منجر به از دست دادن زنده ماندن سلول می‌شود (۲۴). اما اطلاعات اندکی از مکانیسم مولکولی موثر در کنترل رشد سلول‌های



شکل ۴- تاثیر غلظت‌های مختلف MG132 بر میزان تولید گونه‌های فعال اکسیژن سلول‌های MCF-7
 نتایج آنکوباسیون ۴۸ ساعت، افزایش معنی دار میزان ROS درون سلولی را در غلظت‌های ۵ و ۱۰ میکرومول از MG132 نشان می‌دهد. نتایج بر اساس $\text{mean} \pm \text{SD}$ در مقایسه با کنترل ارائه شده است. نتایج $P < 0.01$ ** ، $P < 0.001$ *** معنی دار است.



شکل ۵- تاثیر غلظت‌های مختلف MG132 بر میزان پتانسیل غشای میتوکندری سلول‌های MCF-7
 نتایج آنکوباسیون ۴۸ ساعت، کاهش معنی دار مقدار پتانسیل غشاء میتوکندری را در سلول‌های تحت تیمار با MG132 نشان می‌دهد. نتایج بر اساس $\text{mean} \pm \text{SD}$ در مقایسه با کنترل ارائه شده است. نتایج $P < 0.05$ * ، $P < 0.01$ ** ، $P < 0.001$ *** معنی دار است.

بحث

هموستاز سلول‌های سرطانی وابسته به تعادل بین میزان تکثیر و مرگ سلول‌ها است و آپوپتوز مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی است که در زمان ایجاد و

در سلول‌های سرطانی سر و گردن وابسته به تولید گونه‌های فعال اکسیژن بوده است (۲۷). در مطالعه‌ای که بر روی سلول‌های سرطانی لوکمی انجام گرفت تیمار سلول‌ها با MG132 با کاهش پروتئین‌های آنتی آپوپتوزی از جمله Bcl-2 و Bcl-XL و القای آپوپتوز وابسته به کاسپازها همراه بوده است (۱۸). کاسپازها اندوپروتئازهایی هستند که مسئول هیدرولیز کردن اهدافشان در شرایط وابسته به سیستئین می باشند. عملکرد کاسپازها منجر به تولید مولکول‌های سیگنال دهی فعال می‌شود که در پردازش آپوپتوز و التهاب نقش دارند (۲۸). انواع مختلف کاسپازها در مسیر آپوپتوز فعال می‌شوند که در میان آن‌ها، کاسپاز ۸ به عنوان کاسپاز آغازگر و کاسپاز ۳ به عنوان کاسپاز اجرایی طبقه‌بندی می‌شوند (۱۰). نتایج مطالعه ما نشان داد که فعالیت کاسپاز ۸ به صورت وابسته به دوز در رده سلولی سرطان سینه افزایش یافته است. قابل ذکر است که فعالیت کاسپاز ۳ نیز در سلول‌های سرطانی سینه به دنبال افزایش غلظت MG132 افزایش نشان داد. در خصوص وابستگی عملکردی MG132 به فعالیت کاسپازها برای القای آپوپتوز، نتایج مطالعات دیگر نیز همراستا با مطالعه حاضر نشان می‌دهند که MG132 برای تنظیم مرگ سلولی به فعالیت کاسپازها نیاز دارد. در همین راستا مطالعه‌ای که بر روی سلول‌های کارسینومای کیسه صفرا انجام گرفت نشان داد MG132 می‌تواند از طریق مسیر خارجی آپوپتوز و فعال کردن کاسپازهای ۳ و ۸، آپوپتوز را در این سلول‌ها القا نماید (۱۹). همچنین فعال شدن کاسپازها بدنبال تیمار سلول‌ها با MG132 در سایر سلول‌های سرطانی از جمله سلول‌های سرطانی استئوسارکوما، لوکمی و تیروئید مشاهده گردید (۱۵، ۱۶، ۱۸). به منظور مشخص کردن مکانیسم القای آپوپتوز ناشی از MG132 در سرطان سینه، نتایج مطالعه حاضر نشان داد که MG132 می‌تواند سطح تولید ROS داخل سلولی را افزایش دهد و همانطور که شواهد قبلی نشان می‌دهد تجمع ROS منجر به ایجاد اختلال در برخی عملکردهای سلولی و القای آپوپتوز می‌شود. همانطور که شواهد نشان می‌دهند ROS در سلول‌های سرطانی نقش اصلی را در تنظیم و القای

سرطانی و نیز اهداف داخل سلولی MG132 به خصوص در سرطان سینه وجود دارد. برای پرداختن به این موضوع، مجموعه‌ای از آزمایش‌ها برای مشخص کردن نقش احتمالی اثر ضد سرطانی MG132 بر رشد سلول‌های سرطان سینه طراحی و بررسی گردید. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که MG132 میزان سلول‌های سرطانی زنده MCF-7 را به صورت وابسته به دوز و زمان کاهش می‌دهد. برای تعیین اثر سمیت سلولی MG132 محدوده غلظتی (۰.۵-۱۰ میکرو مولار) از MG132 در فواصل زمانی مختلف مورد بررسی قرار گرفت. بر این اساس، غلظت ۵ و ۱۰ میکرومول MG132، درصد سلول‌های زنده MCF-7 را به ترتیب حدود ۴۰ و ۵۰ درصد کاهش داد که با تأثیر MG132 بر سایر سلول‌های سرطانی همخوانی دارد. اثر سمیت سلولی MG132 در سایر مطالعات نیز نشان داده شده است به گونه‌ای که MG132 در دامنه غلظتی ۰.۵ تا ۲ میکرومول در سلول‌های مزوتلیوما توانست بطور قابل ملاحظه‌ای تکثیر سلول‌های فوق را کاهش دهد (۲۰). همچنین تیمار سلول‌های سرطانی استخوانی استئوسارکوما با غلظت‌های ۱-۵ میکرومول از MG132 منجر به کاهش زنده مانی سلول‌ها بعد از ۷۲ ساعت می‌گردد به طوری که غلظت ۵ میکرومول توانست بعد از بازه زمانی فوق تعداد سلول‌های زنده را به ۳۰٪ کاهش دهد (۱۵). همچنین نتایج مطالعه حاضر نشان داد که اثر سمیت سلولی MG132 با القای آپوپتوز در رده سلولی سرطان سینه همراه است، نتایج مطالعات نشان می‌دهد که در سلول‌های EC9706 (سلول‌های سرطان مری) ترکیب MG132 در حالت وابسته به دوز و زمان مرگ را در سلول‌های فوق القا می‌کند که این مرگ با افزایش فعالیت کاسپاز ۸ و ۳ همراه بوده است (۱۴). در مطالعه‌ای که توسط stoll و همکاران انجام گرفت نشان داده شد که این ترکیب می‌تواند آپوپتوز را در سلول‌های سرطانی تیروئید القا نماید (۲۵). همچنین در مطالعه دیگری بر روی سلول‌های سرطان تخمدان که مقاوم به cisplatin بودند، نشان داده شد که MG132 آپوپتوز را در این سلول‌ها القا می‌نماید (۲۶) همچنین در مطالعه دیگری نشان داده شد که القاء آپوپتوز توسط MG132

سرطانی گلیوبلاستوما نیز گزارش گردیده است (۱۸، ۲۶، ۳۲). بنابراین به نظر می رسد MG132 با تحریک تولید ROS باعث کاهش پتانسیل غشای میتوکندری و فعال شدن کاسپاز ها شده که می تواند به نفوذ پذیری بیشتر میتوکندری و القای آپوپتوز در سلول های سرطانی از جمله سلول های سرطانی سینه کمک کند.

نتیجه گیری

داده های ارائه شده در این مطالعه نشان می دهد که MG132 رشد سلول های سرطان سینه را متوقف می کند و القای آپوپتوز را از طریق فعال سازی کاسپاز ۳ و ۸، افزایش سطح ROS داخل سلولی و کاهش پتانسیل غشای میتوکندری ($\Delta\Psi_m$) القا می کند. همچنین، نتایج ما تفاوت معنی داری را در مورد اثر MG132 بر سنجش های ذکر شده در سلول های بدون تیمار (کنترل) سرطان سینه نسبت به سلول های تیمار شده نشان داد و اثرات مشاهده شده بر روی سلول های تیمار شده وابسته به غلظت MG132 است. بر اساس نتایج مطالعه حاضر، MG132 می تواند به عنوان ترکیبی با قابلیت مهار تکثیر و القای آپوپتوز در سلول های سرطانی سینه (MCF-7) به عنوان هدف درمانی در کنار داروهای شیمی درمانی موجود مورد توجه قرار گیرد اگرچه بررسی های مکانیسمی بیشتر برای مشخص شدن مسیر مولکولی دقیق این ترکیب برای کنترل تکثیر سلول های فوق در این راستا ضروری است.

تقدیر و تشکر

مطالعه حاضر در معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی ایران با شماره طرح ۲۵۳۷۲-۳۰-۰۴-۹۳ در دانشگاه علوم پزشکی ایران به ثبت رسیده است و هزینه های طرح توسط دانشگاه تامین گردید.

References

- Jin S, Ye K. Targeted drug delivery for breast cancer treatment. *Recent Pat Anti-Cancer Drug Discov.* 2013;8(2):143-53.
- Fisusi FA, Akala EO. Drug Combinations in Breast Cancer Therapy. *Pharm Nanotechnol.*

آپوپتوز ایفا می کند و در نتیجه تکثیر سلول های سرطانی، بقا و مقاومت دارویی را تعدیل می کند (۲۹). سطوح بیش از حد سلولی ROS باعث آسیب به پروتئین ها، اسیدهای نوکلئیک، لیپیدها، غشاها و اندامک ها می شود که می تواند منجر به فعال شدن فرآیندهای مرگ سلولی مانند آپوپتوز شود. ROS نقش مرکزی در سیگنال دهی سلولی و همچنین در تنظیم مسیرهای اصلی آپوپتوز با واسطه میتوکندری، گیرنده های مرگ و شبکه آندوپلاسمی ایفا می کند (۳۰). در مطالعه ای که بر روی سلول های سرطانی دهانه رحم انجام گرفت نشان داده شد که MG132 با غلظت موثر ۵ میکرومول بدنبال ۲۴ ساعت انکوباسیون می تواند باعث مهار رشد و تکثیر سلول ها شود که با القای آپوپتوز و افزایش مقدار ROS داخل سلولی همراه است (۲۶). همچنین همراستا با نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان داده شد که در سلول های سرطانی لوکمیایا MG132 می تواند با تحریک تولید ROS و افزایش فعالیت کاسپاز های ۳ و ۱۰ رشد سلول های فوق را مهار نماید (۳۱). شواهد مطالعات نشان می دهد که یکی از اهداف ROS درون سلولی، میتوکندری است که پتانسیل غشایی آن تحت تأثیر ROS قرار خواهد گرفت. به منظور بررسی احتمال درگیر بودن میتوکندری در آپوپتوز القا شده توسط MG132 در سلول های MCF-7، پتانسیل غشای میتوکندری مورد بررسی قرار گرفت و نتایج نشان داد که MG132 در حالت وابسته به غلظت منجر به کاهش پتانسیل غشای میتوکندری می گردد. در مطالعه ای که بر روی سلول های PC12 انجام گرفت، نشان داده شد که مهار پروتئازوم قادر به القاء سیتوکروم C و افزایش پروتئین Bax و کاهش پروتئین BCL-2 می گردد که نشان دهنده نقش موثر میتوکندری در این فرایند است (۲۱). در مطالعه دیگر نشان داده شده است که MG132 قادر به توقف رشد سلول های سرطانی ریه همزمان با افزایش تولید ROS درون سلولی می باشد که با نتایج مطالعه حاضر هم راستا می باشد (۲۳). کاهش پتانسیل غشای میتوکندری بدنبال تیمار سلول ها با MG132 در سلول های سرطانی لوکمیایا، سلول های سرطانی دهانه رحم و سلول های

- 2019;7(1):3-23.
3. Moo TA, Sanford R, Dang C, Morrow M. Overview of Breast Cancer Therapy. *PET Clin.* 2018;13(3):339-54.
 4. Shien T, Iwata H. Adjuvant and neoadjuvant therapy for breast cancer. *Jpn J Clin Oncol.* 2020;50(3):225-9.
 5. Zhang J, Pan S, Jian C, Hao L, Dong J, Sun Q, et al. Immunostimulatory Properties of Chemotherapy in Breast Cancer: From Immunogenic Modulation Mechanisms to Clinical Practice. *Front Immunol.* 2021;12:819405.
 6. Strasser A, Vaux DL. Cell Death in the Origin and Treatment of Cancer. *Mol Cell.* 2020;78(6):1045-54.
 7. Quarleri J, Cevallos C, Delpino MV. Apoptosis in infectious diseases as a mechanism of immune evasion and survival. *Adv Protein Chem Struct Biol.* 2021;125:1-24.
 8. Montinaro A, Areso Zubiaur I, Saggau J, Kretz AL, Ferreira RMM, Hassan O, et al. Potent pro-apoptotic combination therapy is highly effective in a broad range of cancers. *Cell Death Differ.* 2021.
 9. Tavakoli-Yaraki M, Karami-Tehrani F, Salimi V, Sirati-Sabet M. Induction of apoptosis by Trichostatin A in human breast cancer cell lines: involvement of 15-Lox-1. *Tumour Biol.* 2013;34(1):241-9.
 10. Salimi V, Shahsavari Z, Safizadeh B, Hosseini A, Khademian N, Tavakoli-Yaraki M. Sodium butyrate promotes apoptosis in breast cancer cells through reactive oxygen species (ROS) formation and mitochondrial impairment. *Lipids Health Dis.* 2017;16(1):208.
 11. Wang D, Xu Q, Yuan Q, Jia M, Niu H, Liu X, et al. Proteasome inhibition boosts autophagic degradation of ubiquitinated-AGR2 and enhances the antitumor efficiency of bevacizumab. *Oncogene.* 2019;38(18):3458-74.
 12. Wang J, Fang Y, Fan RA, Kirk CJ. Proteasome Inhibitors and Their Pharmacokinetics, Pharmacodynamics, and Metabolism. *Int J Mol Sci.* 2021;22(21).
 13. Fricker LD. Proteasome Inhibitor Drugs. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2020;60:457-76.
 14. Dang L, Wen F, Yang Y, Liu D, Wu K, Qi Y, et al. Proteasome inhibitor MG132 inhibits the proliferation and promotes the cisplatin-induced apoptosis of human esophageal squamous cell carcinoma cells. *Int J Mol Med* 2014;33(5):1083-8.
 15. Lee HK, Park S-H, Nam MJ. Proteasome inhibitor MG132 induces apoptosis in human osteosarcoma U2OS cells. *Hum Exp Toxicol.* 2021;40(11):1985-97.
 16. Qiang W, Sui F, Ma J, Li X, Ren X, Shao Y, et al. Proteasome inhibitor MG132 induces thyroid cancer cell apoptosis by modulating the activity of transcription factor FOXO3a. *Endocrine.* 2017;56(1):98-108.
 17. Wu H, Tao A, Martin JD, Quader S, Liu X, Takahashi K, et al. Proteasome Inhibitor-Loaded Micelles Enhance Antitumor Activity Through Macrophage Reprogramming by NF- κ B Inhibition. *J Pharm Sci.* 2017;106(9):2438-46.
 18. Bravo-Cuellar A, Hernández-Flores G, Lerma-Díaz JM, Domínguez-Rodríguez JR, Jave-Suárez LF, De Célis-Carrillo R, et al. Pentoxifylline and the proteasome inhibitor MG 132 induce apoptosis in human leukemia U937 cells through a decrease in the expression of Bcl-2 and Bcl-XL and phosphorylation of p65. *J Biomed Sci.* 2013;20(1):13.
 19. Zhu W, Zhan D, Wang L, Ma D, Cheng M, Wang H, et al. Proteasome inhibitor MG132 potentiates TRAIL-induced apoptosis in gallbladder carcinoma GBC-SD cells via DR5-dependent pathway. *Oncol Rep.* 2016;36(2):845-52.
 20. Yuan BZ, Chapman JA, Reynolds SH. Proteasome Inhibitor MG132 Induces Apoptosis and Inhibits Invasion of Human Malignant Pleural Mesothelioma Cells. *Transl Oncol.* 2008;1(3):129-40.
 21. Yang W, Monroe J, Zhang Y, George D, Bremer E, Li H. Proteasome inhibition induces both pro- and anti-cell death pathways in prostate cancer cells. *Cancer Lett.* 2006;243(2):217-27.
 22. Emanuele S, Calvaruso G, Lauricella M, Giuliano M, Bellavia G, D'Anneo A, et al. Apoptosis induced in hepatoblastoma HepG2 cells by the proteasome inhibitor MG132 is associated with hydrogen peroxide production, expression of Bcl-XS and activation of caspase-3. *Int J Oncol.* 2002;21(4):857-65.
 23. Han YH, Park WH. MG132 as a proteasome inhibitor induces cell growth inhibition and cell death in A549 lung cancer cells via influencing reactive oxygen species and GSH level. *Hum Exp Toxicol.* 2010;29(7):607-14.
 24. Fulda S, Debatin KM. Modulation of apoptosis signaling for cancer therapy. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2006;54(3):173-5.
 25. Stoll SJ, Pitt SC, Chen H. Follicular thyroid cancer cell growth inhibition by proteasome inhibitor MG132. *J Surg Res.* 2009;156(1):39-44.
 26. Han YH, Moon HJ, You BR, Park WH. The effect of MG132, a proteasome inhibitor on HeLa cells in relation to cell growth, reactive oxygen species and GSH. *Oncol Rep.* 2009;22(1):215-21.
 27. Sung ES, Park KJ, Choi HJ, Kim CH, Kim YS. The proteasome inhibitor MG132 potentiates TRAIL receptor agonist-induced apoptosis by stabilizing tBid and Bik in human head and neck squamous cell carcinoma cells. *Exp Cell Res.* 2012;318(13):1564-76.
 28. Fulda S, Debatin KM. Apoptosis signaling in tumor therapy. *Ann N Y Acad Sci.* 2004;1028:150-6.
 29. Cui Q, Wang JQ, Assaraf YG, Ren L, Gupta P, Wei L, et al. Modulating ROS to overcome multidrug resistance in cancer. *Drug Resist Updat.* 2018;41:1-25.
 30. Redza-Dutordoir M, Averill-Bates DA. Activation of apoptosis signalling pathways by

reactive oxygen species. *Biochim Biophys Acta*. 2016;1863(12):2977-92.

31. Park S, Park JA, Yoo H, Park HB, Lee Y. Proteasome inhibitor-induced cleavage of HSP90 is mediated by ROS generation and caspase 10-activation in human leukemic cells. *Redox Biol*. 2017;13:470-6.

32. Zanotto-Filho A, Braganhol E, Battastini AM, Moreira JC. Proteasome inhibitor MG132 induces selective apoptosis in glioblastoma cells through inhibition of PI3K/Akt and NFkappaB pathways, mitochondrial dysfunction, and activation of p38-JNK1/2 signaling. *Invest New Drugs*. 2012;30(6):2252-62.