بررسی اثر مهاری کال پروتکتین انسانی بر تکثیر رده سلولی سرطان معده انسان (AGS) در شرایط آزمایشگاهی

محمدعلی شکرگذار Ph.D.[1,2*]، حکیمه زالی M.Sc.[1,2]، مصطفی رضایی طاویرانی Ph.D.[2,3]

۱. انستیتو پاستور ایران، بانک سلولی ایران
۲. دانشگاه خاتم، گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی
۳. دانشگاه علوم پزشکی ایلام، دانشکده پزشکی
* آدرس مکاتبه: تهران، صندوق‌پستی: ۱۳۱۶۴، انستیتو پاستور ایران، بانک سلولی ایران
پست الکترونیک: Email: mashokrgozar@pasteur.ac.ir

چکیده

دریافت مقاله: ۸۵/۴/۱۹، پذیرش مقاله: ۸۵/۷/۱۷

هدف: ارزیابی تاثیر غلظت‌های مختلف کال پروتکتین بر میزان تکثیر رده سلول سرطانی معده (AGS) انسان، در فواصل زمانی مختلف و در مقایسه با رده سلولی نرمال (فیبروبلاست لثه انسان) در شرایط آزمایشگاهی

مواد و روش‌ها: کال پروتکتین از سلول‌های نوتروفیل انسان با روش‌های کروماتوگرافی تخلیص شد. در این مطالعه از رده سلولی سرطان معده انسان (AGS) در محیط کشت RPMI، حاوی ۱۰درصد FBS استفاده شده است. تعداد سلول‌های مورد مطالعه در این آزمایش حدود ۱۰۰۰۰ سلول بوده است که در حضور غلظت‌های مختلف ۲۵ ،۵۰ ، ۱۰۰ ، ۲۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از کال پروتکتین در فواصل زمانی ۲۴ ، ۴۸ و ۷۲ ساعت انکوبه شده‌اند. جهت بررسی اثر مهاری کال پروتکتین بر رده سلولی نرمال از غلظت ۷۰میکروگرم بر میلی‌لیتر این ماده (تقریبا دو برابر غلظت مربوط به LC50 در سلول‌های AGS بعد از گذشت ۴۸ ساعت) بر سلول‌های فیبروبلاست لثه (HGF) استفاده شد. در مطالعه اثر مهاری کال پروتکتین بر رشد سلول‌ها از روش رنگ سنجی (MTT assay) استفاده شده است.

یافته‌ها: درصد بقای سلول‌ها با افزایش غلظت کال پروتکتین کاهش می‌یابد به طوری که در غلظت ۴۰۰میکروگرم بر میلی‌لیتر این میزان بعد از ۲۴ ساعت به صفر می‌رسد. از طرفی بقای سلول با افزایش زمان انکوباسیون نسبت عکس دارد و بعد از ۷۲ ساعت به پایین‌ترین حد خود می‌رسد. LC50 در طی سه زمان انکوباسیون ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به ترتیب شامل ۹۶/۷۸، ۳۸/۶۶ و ۹/۸۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر محاسبه شد. نتایج حاصل از اثر کال پروتکتین بر سلول‌های AGS (سرطانی) و HGF (نرمال) بر اثر مهاری بیشتر کال پروتکتین بر روی سلول‌های سرطانی گواهی می‌کند.

نتیجه‌گیری: نتایج به دست آمده نشان می‌دهند که کال پروتکتین، رشد سلول‌های سرطانی را نسبت به سلول‌های طبیعی به طور قابل ملاحظه‌ای کاهش می‌دهد. این نتایج نشان می‌دهد که کال پروتکتین می‌تواند کاندیدای مناسبی به عنوان یک داروی ضد سرطان معده مطرح باشد.

کلیدواژگان: رده سلولی سرطان معده (AGS)، کال پروتکتین، تکثیر سلولی، MTT assay

فصلنامه پزشکی یاخته، سال هشتم، شماره ٤، زمستان ۱۳۸۵، صفحات ۲۶۳-۲۵۸

مقدمه

کال پروتکتین انسانی پروتیینی است که اثر مهاری بر رشد سلول‌های سرطانی دارد و می‌توان آن را ازخون استخراج کرد، بنابراین می‌تواند به عنوان یک مارکر سرطان در تشخیص زودرس و یا به عنوان یک عامل درمانی مورد استفاده واقع شود. این پروتیین هترودایمری با دو زیر واحد ۱۰ و ۱۴ کیلو دالتونی است و هر کدام از زیر واحدهای آن دارای جایگاه‌های اتصال متمایزی برای دو عنصر کلسیم و روی است. این پروتیین در سیتوزول نوتروفیل، مونوسیت و ماکروفاژهای تحریک شده مشاهده شده است. غلظت پلاسمایی کال پروتکتین در افراد سالم کمتر از ۱میکروگرم بر میلی‌لیتر است که در شرایط التهابی، آلودگی به ویروس HIV و سرطان، غلظت پلاسمایی آن افزایش چشم‌گیری می‌یابد. غلظت این پروتیین در افراد مبتلا به بیماری‌های التهابی روده در مدفوع افزایش می‌یابد و به علت پایداری آن در مدفوع و تاثیرپذیری ناچیز آن از عوامل محیطی، اخیرا به عنوان شاخص ارزشمندی با حساسیت و اختصاصی بودن بالا برای تشخیص عوارض التهابی روده بزرگ مطرح شده است. ماکروفاژهای بافتی و مونوسیت‌های خون در بحران‌های التهابی بیان مثبتی از کال پروتکتین دارند. در حالی که بیان این پروتیین در ماکروفاژهای ساکن بافت و ماکروفاژهایی که در التهاب مزمن وجود دارد منفی است (۱، ۲، ۳، ۴).

پراکندگی داخل سلولی کال پروتکتین با مرحله فعال شدن ماکروفاژها مرتبط است. ماکروفاژهای طبیعی محتوی این پروتیین در بخش سیتوزولی خود هستند، اما درنتیجه عامل محرک غشای سلول، کال پروتکتین به غشای سلولی منتقل و با پروتیین‌های سیتواسکلتونی همراه می‌شود و دلالت بر این دارد که کال پروتکتین وابسته به حرکت سلولی فاگوسیتوزیز یا انتقال سیگنال است. به علاوه مطالعات نشان می‌دهد که بیان کال پروتکتین در غشای منوسیت نیز

صورت می‌گیرد (۴).

آزاد سازی کال پروتکتین به وسیله یک مسیر ترشحی جدید که شامل پروتیین کیناز C است صورت می‌گیرد. این مسیر ترشحی از مسیر ترشحی متناوبی که برای IL1 شرح داده می‌شود پیروی می‌کند. IL1 نیز مانند کال پروتکتین فاقد یک سکانس رهبر یا ناحیه ترانس ممبرن است که در وزیکول درون سلولی کوچکی قرار می‌گیرد و بعد از فعال‌سازی مونوسیت پراکنده می‌شود.

کال پروتکتین‌هایی که در سیتوزول بیان می‌شوند سیگنال پپتید و انتهای N گلیکوزیله خود را از دست می‌دهند. بنابراین نمی‌توانند از غشا عبور کنند و کال پروتکتین‌های خارج سلولی باید در اثر ریزش پروتیین از غشای سلول باشد. در نوتروفیل، آزاد شدن کال پروتکتین به خارج از سلول به دنبال تشکیل کمپلکس با آراشیدونیک اسید صورت می‌گیرد. مکانیسم مشابهی نیز می‌تواند خروج کال پروتکتین از سلول‌های اپیتلیال را تحریک کند (۵).

پژوهش‌های انجام شده نشان می‌دهد کال پروتکتین اثر بازدارنده بر رشد سلولی (cytostatic activity) دارد. به نظر می‌رسد قدرت بازدارندگی رشد سلولی این پروتیین با سینتیک تکثیر سلولی رابطه‌ای مستقیم دارد (۱، ۶). همچنین نشان داده شده است که این پروتیین به ویژه از رشد و تکثیر برخی باکتری‌ها، مخمر کاندیدا آلبیکانز و برخی سلول‌های سرطانی جلوگیری می‌کند (۱، ۷).

سرطان معده از شایع‌ترین سرطان‌ها در آسیا و جهان محسوب می‌شود. شیوع آن در کشورهای در حال توسعه حدود ۴۰ تا ۶۰ نفر در ۱۰۰/۰۰۰ نفر است. اما این نسبت در کشورهای پیشرفته به مقدار ۵ تا ۱۰ نفر در ۱۰۰/۰۰۰ نفر کاهش یافته است (۸) . در ایران در مناطق ساحلی دریای خزر شیوع بیشتری دارد و اکثرا از نوع آدنوکارسینومای اپیدمیک است و میزان ابتلا به آن نسبت مستقیمی با سن دارد. به طوری که هر چه سن بالاتر می‌رود میزان ابتلا به آن افزایش می‌یابد؛ این نسبت در مردها نیز نسبت به خانم‌ها بیشتر است (۹، ۱۰).

سرطان معده عموما یک بیماری خاموش است که تا اواخر سیر خود بدون نشانه باقی می‌ماند. تشخیص به موقع بیماری دشوار است و بهترین راه تشخیص سرطان معده و حتی افتراق یک زخم خوش خیم از نوع بدخیم نیازمند ارزیابی دقیق از جمله رادیوگرافی ،آندوسکوپی، سیتولوژی ، و نهایتا مطالعه بیوپسی است (۸).

درمان سرطان معده مشکل است مگر اینکه قبل از گسترش بیماری، تشخیص داده شود. متاسفانه، چون سرطان معده در مراحل اولیه علایم کمی دارد، بیماری معمولا وقتی تشخیص داده می‌شود که کاملا پیشرفته است. اما این سرطان پیشرفته می‌تواند مداوا شود و تا حدودی در فرد بهبودی ایجاد کند. روش‌های درمانی شامل جراحی، شیمی درمانی یا پرتو درمانی است و شیوه‌های درمانی دیگری نیز در کلینیک‌های تحقیقاتی در دست مطالعه هستند. عمل جراحی بهترین و عمده‌ترین روش درمان برای سرطان معده است که ممکن است قسمتی از معده (پارشیال گاستروکتومی) و یا کل آن (توتال گاستروکتومی) برداشته شود و چون سرطان معده می‌تواند به سیستم‌های لنفاوی سرایت کند، عقده‌های لنفاوی نزدیک به تومور نیز اغلب با عمل جراحی از بدن خارج می‌شوند (۸، ۹).

نتایج شیمی درمانی نیز بستگی به فاز بیماری دارد که می‌تواند منجر به درمان قطعی یا موقتی بیماری گردد. معمولا اگر سرطان در مراحل نهایی تشخیص داده شود درمان موقتی بوده و با متاستاز دادن سرطان دوباره عود می‌کند.

بر اساس مطالب ذکر شده، لزوم انجام تحقیقات روی داروهایی که اثر اختصاصی بر سلول‌های سرطانی دارند و در عین حال سیستمیک نباشند، دارای کارآیی بیشتر باشند و توانایی ریشه‌کن کردن سلول‌های سرطانی در مراحل انتهایی را داشته باشند کاملا محسوس است . لذا با توجه به مطالعات انجام شده، کال پروتکتین می‌تواند به عنوان یک کاندیدای مناسب جهت مهار رشد سلول‌های سرطانی مطرح باشد. در همین ارتباط طبق تحقیقات انجام شده در شرایط آزمایشگاهی نشان داده شده است که کال پروتکتین از رشد برخی رده‌های سلول سرطانی نظیر آدنوکارسینومای سینه موش (MM46)، هپاتومای موش (MH134)، ملانومای موش (B16)، فیبروسارکومای موش (L-929)، استئوسارکومای خرگوش (Ros17/2.8)، آدنوکارسینومای سینه انسان (MCF-7) و لوکمیای انسانی (MOLT) در محیط کشت جلوگیری می‌کند (۱۱). این پروتیین اثر خود را از طریق القای آپوپتوز بر روی سلول‌ها اعمال می‌کند. کال پروتکتین، اپیتوز را در یک مکانیسم دو گانه القا می‌کند. یکی خروج روی (Zn^{+2}) از سلول‌های هدف و دیگری از طریق اتصال به سطح سلولی سلول‌های هدف که شاید از طریق رسپتور لیگاند باشد (۲). همچنین کال پروتکتین از رشد ماکروفاژها، لنفوسیت‌های تحریک شده با میتوژن و نیز در غلظت‌ها و زمان‌های بالاتر، از رشد سلول‌های فیبروبلاست در محیط کشت جلوگیری می‌کند. به نظر می‌رسد توان مهار رشد سلولی این پروتیین با قدرت و توان تکثیر سلولی رابطه مستقیمی دارد (۴، ۵، ۱۱).

در رابطه با خواص التهابی کال پروتکتین در حیوانات آزمایشگاهی مطالعات محدودی صورت گرفته اما در خصوص خواص ضد توموری آن در بدن جانوران (*in vivo*) تا به حال مطالعه‌ای انجام نشده است (۱۲، ۱۳).

لذا با توجه به مطالعات انجام شده در شرایط آزمایشگاهی (*in vitro*) و در بدن جانوران(*in vivo*)، کال پروتکتین می‌تواند به عنوان یک کاندید مناسب جهت مهار رشد سلول‌های سرطانی در انسان مطرح باشد.

در همین ارتباط تاکنون اثر کال پروتکتین بر رده سلول سرطانی معده ارزیابی نشده است که با توجه به لزوم تحقیق در رابطه با سرطان معده در این مطالعه بر آن شدیم تا تاثیر غلظت‌های مختلف کال پروتکتین بر میزان مهار تکثیر رده سلول انسانی سرطان معده (AGS) را در فواصل زمانی مختلف ارزیابی کنیم. این مطالعه در مقایسه با رده سلولی نرمال (فیبروبلاست لثه انسان) و درشرایط آزمایشگاهی (*in vitro*) ارزیابی گردید.

مواد و روش‌ها

مواد مصرفی

سرم جنین گاوی (Fetal calf serum: FCS) و محیط کشت RPMI (شرکت Gibco آلمان)، پنی سیلین، استرپتومایسین، فیلتر سر سرنگی ۰/۲۲ میکرومتر، تریپسین، سوکروز، دکستران، آگاروز، رنگ MTT و تریپان بلو (شرکت سیگما St. Louis, MO, USA)، فلاسک T25 (شرکت NUNC دانمارک)، DTT، EDTA، PMSE و دیگر معرف‌ها و نمک‌ها با درجه خلوص بالا (شرکت Merck آلمان) و Q- سفاروز، SP- سفاروز از شرکت Pharmacia تهیه شده اند. برای انجام آزمایش‌ها از آب بدون یون استفاده شده است.

روش‌ها

تهیه کال پروتکتین

تخلیص کال پروتکتین بر اساس روش کار مشروح در منبع ۱۴ این مقاله انجام شده که اینجا نیز به اختصار تشریح شده است. از دکستران و Nacl برای جدا کردن پلاسما و از فایکول برای جدا کردن انواع سلول‌های خونی و جداسازی گرانولوسیت‌ها استفاده شد. سلول‌ها با روش سونیکاتور لیز شدند که در این عمل با توجه به پاره شدن لیزوزوم‌ها، برای جلوگیری از اثر تخریبی آنزیم‌های لیزوزومی روی پروتیین‌ها از مواد مهارکننده آنزیمی شامل ۱میلی‌مولار EDTA، ۱میلی‌مولار DTT، ۰/۵میلی‌مولار PMSF و ۰/۲ مولار سوکروز استفاده شد. برای خارج کردن بسیاری از محتویات سلول حتی غشای اندامک‌ها از سانتریفوژ با دور بالا (۱۵۰۰۰ در ۲۰دقیقه) استفاده شد. برای جداسازی کال پروتکتین از سایر پروتیین‌ها از ستون کروماتوگرافی Q سفارز و SP سفارز استفاده شد. در ۳ مورد از ۲۰ مورد نمونه جمع‌آوری شده جذب مناسب برای پروتیین وجود دارد. برای این سه نمونه الکتروفورز SDS PAGE گذاشته و وزن مولکولی نمونه تعیین شد. سپس به منظور جدا کردن نمک‌های متصل به ستون، باند اصلی دیالیز شد. با انجام سه بار دیالیز و حذف نمک‌ها با استفاده از بافر دیالیز استات که pH آن ۴/۵ و شامل استات، EDTA و DTT است، بار پروتیین مثبت و در مرحله بعد جداسازی با ستون SP سفارز (سولفو پروپیل) انجام شد. نمونه به دست آمده با روش برادفورد تعیین MTT غلظت و با فیلتر سر سرنگی ۰/۲۲ میکرومتر استریل شدند (۱۴).

رده سلولی

رده‌های سلولی انسانی AGS [human caucasian gastric adenocarcinoma (NCBI: C-131)] و فیبروبلاست لثه [Human Gingival Fibroblast: (HGF)(NCBI: C-131)] از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه شدند. سلول‌ها در فلاسک T25 و در محیط کشت RPMI-1640 حاوی ۱۰درصد FBS، در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد، حاوی ۵ درصد CO_2 و ۹۰درصد رطوبت کشت داده شدند. پس از رشد و ازدیاد، سلول‌ها به کمک تریپسین ۰/۲۵درصد از کف پلیت جدا شدند و پس از شمارش به میزان ۱۰۰۰۰ سلول به چاهک‌های پلیت ۹۶ حفره‌ای منتقل شدند. در تمامی موارد برای هر سه چاهک آزمایش در نظر گرفته شد و کلیه آزمایش‌ها دوبار تکرار شدند. از آنجا که سلول‌های فوق چسبنده‌اند و جهت ارزیابی باید در شرایط نرمال رشد قرار داشته باشند، تمامی آزمایش‌ها بعد از ۱۸ ساعت انکوباسیون در چاهک‌های پلیت کشت سلول (چسبیدن کامل سلول به پلیت) انجام گرفت.

انکوباسیون سلول‌ها با غلظت‌های مختلف کال پروتکتین

غلظت منبع اصلی کال پروتکتین تخلیص شده ۲میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در PBS بود که از آن غلظت‌های ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در محیط کشت تهیه (مطالعه اولیه نشان داد که مقادیر PBS اضافه شده به محیط ناچیز بوده و تاثیری در رشد و تکثیر سلول نداشته است) و در فواصل زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت با سلول‌های AGS انکوبه شدند. سلول‌هایی که در غلظت صفر کال پروتکتین انکوبه شده بودند به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شدند.

روش سنجش میزان فعالیت حیاتی و سمیت در رده‌های سلولی مجاور شده با کال پروتکتین با استفاده از رنگ استاندارد

سنجش قابلیت حیات و رشد سلول‌ها با روش‌های مختلفی انجام می‌شود. از آن جمله استفاده از نمک زرد رنگ تترازولیوم (MTT assay) است که این نمک به وسیله سلول‌های زنده جذب و سبب تشکیل کریستال‌های بنفش رنگ نا محلول فرمازان می‌شود (۱۵). این کریستال‌ها خارج از سلول با افزودن یک شوینده حل می‌شوند. این رنگ با روش‌های طیف سنجی قابل سنجش و اندازه‌گیری است. برای هر سلول یک رابطه خطی میان تعداد سلول‌های زنده و میزان جذب اندازه‌گیری شده وجود دارد که این رابطه امکان تعیین دقیق هر گونه تغییراتی را در میزان تکثیر سلول‌ها فراهم می‌سازد.

رنگ آمیزی MTT

این روش بر اساس احیای رنگ (Dimethylthiazol Diphenyl Tetrazolium Bromide) محلول به یک فراورده نامحلول (Formazan) بنفش آبی توسط فعالیت آنزیم ردوکتاز میتوکندری در سلول‌های زنده استوار است (۱۵). جهت تهیه محلول MTT با غلظت ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، ۵۰ میلی‌گرم از پودر MTT در ۱۰ میلی‌لیتر از PBS، ۰/۱۵ مولار حل و هنگام استفاده در رنگ آمیزی ۱۰ برابر با PBS استریل رقیق شد تا محلول ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از MTT به دست آید. پس از انکوباسیون سلول‌های AGS با غلظت‌های مختلف کال پروتکتین در فواصل زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، پلیت‌هایی که در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و CO_2 ۵ درصد انکوبه شده بودند با ۱۰ میکرولیتر محلول MTT ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر رنگ آمیزی شدند. پس از ۳ تا ۵ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی‌گراد مایع رویی سلول‌ها برداشته و به جای آن ۱۰۰ میکرولیتر محلول ایزوپروپانل (Merck, Germany) به چاهک‌های مربوطه

اضافه شد. سپس پلیت مربوطه به مدت ۱۰ الی ۱۵ دقیقه روی شیکر قرار گرفت و توسط یک میکروتیتر پلیت ریدر (ELISA-reader, Organon-Teknika, Netherland) در ۵۷۰ نانومتر خوانده شد. میزان سمیت ایجاد شده با استفاده از فرمول ذیل مورد محاسبه قرار گرفت.

۱۰۰× میانگین جذب سلول‌های تحت اثر ماده توکسیک / میانگین جذب کنترل منفی −۱= درصد کشندگی

درصد کشندگی−۱= درصد بقا

جهت کم کردن میزان خطای آزمایش در چند عدد از چاهک‌های بدون سلول نیز رنگ MTT اضافه و سپس شستشو داده و همراه دیگر چاهک‌ها میزان جذب آن خوانده شد و در نهایت از کل جذب‌ها کم شد.

قبل از انجام آزمایش اصلی، جهت بهینه کردن شرایط آزمایش و مشخص کردن تعداد سلول لازم برای هر چاهک و نیز زمان و غلظت مناسب کال پروتکتین، مطالعه اولیه با تعداد سلول‌های کمتر و بیشتر از ۱۰۰۰۰، زمان‌های انکوباسیون کمتر از ۲۴ ساعت (۱۲، ۶ و ۱۸ ساعت) و غلظت‌های پایین‌تر از ۲۵میکروگرم بر میلی‌لیتر انجام گرفت. بر اساس تجارب به دست آمده، با توجه به محدود بودن فضا در چاهک کنترل، تعداد مناسب سلول برای چاهک نباید بیشتر از ۱۰۰۰۰ سلول باشد. چرا که پس از گذشت زمان ۷۲ ساعت به علت تکثیر بالا سلول‌ها دچار مرگ و میر می‌شوند. در مورد غلظت‌های مهارکنندگی کال پروتکتین مشاهده شد که غلظت‌های پایین‌تر ۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر از آن اثر مهاری بسیار کمی دارد. بر اساس این آزمایش‌ها غلظت‌های مناسب کال پروتکتین تعیین شد. در مورد انتخاب زمان مناسب انکوباسیون جهت مشاهده اثر مهارکنندگی کال پروتکتین بر سلول‌های مورد مطالعه نیز چون در فواصل کوتاه مدت ۶، ۱۲ و ۱۸ ساعتی تغییرات بقای سلولی قابل ملاحظه نیست فواصل زمانی ۲۴ ساعتی انتخاب شد.

تعیین LC50 کال پروتکتین در رده سلولی مورد آزمایش (میزان مرگ سلول ها به میزان ۵۰ درصد در غلظت خاصی از پروتیین)

جهت تعیین دوز ۵۰ درصد کشندگی عصاره‌ها در رده‌های سلولی، تمامی اطلاعات به دست آمده (در صد توکسیسیتی) از کنترل‌ها و تست‌ها با نرم‌افزار کامپیوتری Pharm-PCS statistical package(Springer-Verlag, New York) ارزیابی و میزان دقیق LC50 مربوطه تعیین شد. از آنجایی که آزمایش‌های مربوط به ارزیابی سیتوتوکسیسیتی دو بار تکرار می‌شد محاسبه SD+LC50 امکان‌پذیر بود.

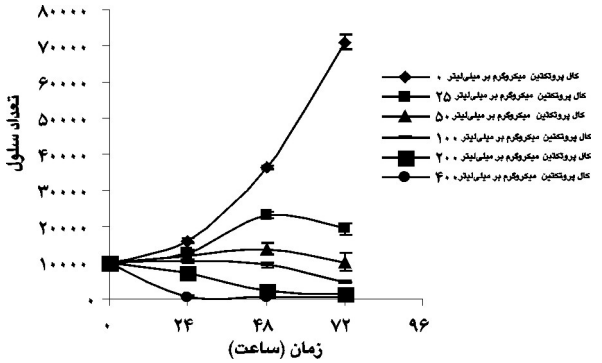
آنالیزهای آماری

همه نتایج به دست آمده در این مطالعه بر اساس تعداد آزمایش‌های شش‌تایی استوار است که با گرفتن میانگین و محاسبه انحراف معیار میزان تغییرات محاسبه شد. جهت مقایسه میانگین‌ها از روش آماری t-test و آنالیز واریانس یک طرفه استفاده شد و در هر تست $p<0.05$ در نظر گرفته شد.

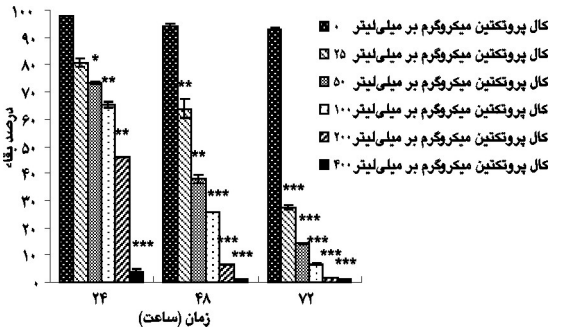
یافته‌ها

نتایج مربوط به تخلیص کال پروتکتین در مقاله‌ای جداگانه به چاپ رسیده است (۱۴) و در این مطالعه نتایج مربوط به اثرات بیولوژیک کال پروتکتین بر سلول‌های سرطانی و نرمال ارایه شده است.

نمودار رشد سلول‌های AGS در غیاب کال پروتکتین (کنترل منفی) و نیز غلظت‌های مختلف پروتیین مورد نظر در نمودارهای ۱ و ۲ به نمایش گذاشته شده است.



نمودار ۱: نمودار رشد سلول‌های AGS بعد از مجاورت با غلظت‌های مختلف کال پروتکتین در فواصل زمانی مختلف. مقادیر در نمودار معرف میانگین ±SD است.

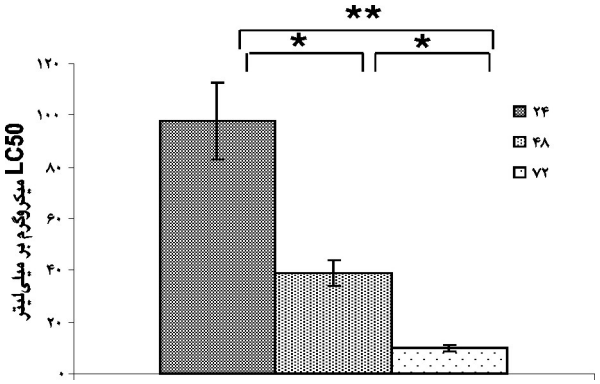


نمودار ۲: میزان بقای سلول‌های AGS بعد از مجاورت با غلظت‌های مختلف کال پروتکتین در فواصل زمانی مختلف. میانگین‌های به دست آمده در این مطالعه با میانگین کنترل دو به دو و با روش آماری T-test مورد مقایسه قرار گرفتند و موارد معنی‌دار با × مشخص شدند که مقادیر آن p<0.05 :*.p<0.01: و p<0.001:*** تعیین شده است. مقادیر ستون‌ها در نمودار معرف میانگین ±SD است.**

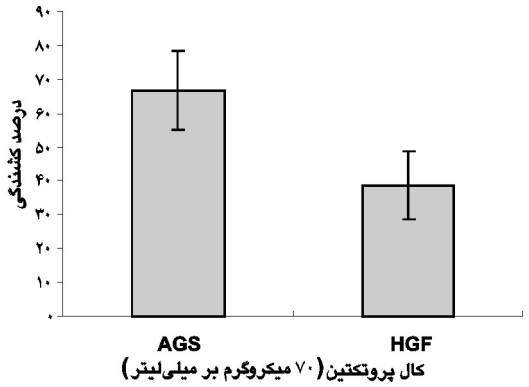
نتایج نشان داد کال پروتکتین در غلظت ۲۵میکروگرم بر میلی‌لیتر تا۴۸ ساعت تاثیر قابل ملاحظه‌ای بر مرگ و میر سلول‌ها ندارد ولی از آن زمان به بعد سلول‌ها دچار مرگ و میر می‌شوند.

در غلظت ۵۰میکروگرم بر میلی‌لیتر میزان بقای سلول‌ها تا ۴۸ ساعت تقریبا ثابت مانده ولی بعد از آن شروع به مرگ و میر می‌کنند. در غلظت‌های ۱۰۰میکروگرم بر میلی‌لیتر نیز میزان بقا تا ۲۴ ساعت ثابت

است و بعد از آن سلول‌ها دچار مرگ و میر می‌شوند. در غلظت‌های ۲۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از ابتدا سلول‌ها دچار مرگ می‌شود. به طوری که پس از ۲۴ ساعت میزان بقای سلول‌ها به صفر می‌رسد. LC50 کال پروتکتین در خصوص سلول‌های AGS در هر سه فاصله زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت محاسبه شد و به لحاظ آماری مورد مقایسه قرار گرفت که نتایج آن در نمودار ۳ به نمایش گذاشته شده است. همچنین مرگ و میر سلول‌های AGS و HGF در غلظت ۷۰میکروگرم بر میلی‌لیتر کال پروتکتین (تقریبا دو برابر غلظت LC50 در سلول‌های AGS) بعد از گذشت ۴۸ ساعت مورد مقایسه قرار گرفت (نمودار ۴). در این بررسی با وجود اختلاف بین میانگین فعالیت حیاتی سلول‌های AGS و HGF (مقاومت بیشتر سلول‌های HGF در برابر کال پروتکتین) به لحاظ آماری این اختلاف معنی‌دار نیست.



نمودار ۳: مقایسه LC50 کال پروتکتین در طی سه زمان انکوباسیون بر روی سلول‌های AGS. میانگین‌های به دست آمده در این مطالعه با میانگین کنترل دو به دو و با روش آماری t-test مورد مقایسه قرار گرفتند و موارد معنی‌دار با* مشخص شدند که مقادیر آن p<0.05 :*، p<0.01: تعیین شده است. مقادیر ستون‌ها در شکل معرف میانگین ±SD است.**



نمودار ۴: مقایسه مرگ و میر سلول‌های AGS و HGF بعد از مجاورت با کال پروتکتین در غلظت ۷۰میکروگرم بر میلی‌لیتر (LC50) بر آنها بعد از ۴۸ ساعت. مقادیر ستون‌ها در شکل معرف میانگین ±SD است.

بحث

با توجه به نتایج به دست آمده (نمودار ۱) مشاهده می‌شود که تکثیر سلول‌های سرطانی AGS در حضور کال پروتکتین درزمان‌های مختلف انکوباسیون کاهش می‌یابد. نشان داده شده است که اثر مهاری کال پروتکتین بر سلول‌های ذکر شده به غلظت کال پروتکتین وابسته است. به طوری که دزهای بالاتر کال پروتکتین اثر مهاری شدیدتری اعمال می‌کنند. تاثیر زمان انکوباسیون بر قدرت مهاری کال پروتکتین به گونه‌ای رخ می‌دهد که در زمان‌های انکوباسیون طولانی‌تر اثر بخشی دزهای پایین‌تر کال پروتکتین چشم‌گیر است.

درصد بقای سلول‌ها درحضور غلظت‌های مختلف کال پروتکتین به صورت تابعی از زمان انکوباسیون در نمودار ۲ نمایش داده شده است. با توجه به این نتایج ملاحظه می‌شود که بقای سلول‌ها در حضور کال پروتکتین، نسبت به نمونه کنترل منفی کاهش می‌یابد. همچنین غلظت‌های بالاتر کال پروتکتین به صورت نمایی باعث کاهش بقای سلولی می‌شوند. اما غلظت‌های متوسط کال پروتکتین تا حدود زیادی به صورت خطی منجر به کاهش بقا سلولی شده‌اند و کال پروتکتین در غلظت‌های کمتر فقط در زمان‌های انکوباسیون بالا توانسته است اثر قابل ملاحظه‌ای بر کاهش بقا سلولی داشته باشد. به نظر می‌رسد که مقاومت سلول در برابر غلظت‌های پایین کال پروتکتین همانند مقاومت دیگر سلول‌ها در مقابل عوامل آسیب زا، ناشی از وقوع پدیده ترمیم باشد (۱۱).

در سلول‌های مختلف نرمال و سرطانی، غلظت مناسبی از کال پروتکتین که منجر به مهار سنتز DNA و رشد سلولی می‌شود ۵۰ تا ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و زمان لازم جهت اعمال اثر مهاری بر رشد سلولی از ۱۸ تا ۴۸ ساعت گزارش شده است (۱۹-۱۶،۱۱، ۳-۱). در این مطالعه غلظتی از کال پروتکتین که تقریبا نصف سلول‌ها (AGS) دچار مرگ و میر می‌شوند در طی سه زمان ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به ترتیب شامل ۹۶/۷۸، ۳۸/۶۶ و ۹/۸۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر تعیین شد. در همین ارتباط با مطالعات اولیه انجام شده در خصوص سرعت تکثیر سلول‌های AGS (سلول سرطانی) و فیبروبلاست (سلول نرمال) به این نتیجه رسیدیم که سرعت رشد سلول‌های AGS تقریبا برابر سرعت رشد سلول‌های فیبروبلاست لثه است. لذا در شرایط برابر از لحاظ سرعت تکثیر مقایسه اثر کال پروتکتین در خصوص تاثیر بر تکثیر این دو نوع سلول که یکی سرطانی و دیگری طبیعی است کاملا امکان‌پذیر می‌نماید. هر چند در مطالعاتی که تا کنون انجام شده اثر مهاری کال پروتکتین انسانی بر سلول‌های فیبروبلاست لثه مورد آزمایش قرار نگرفته اما مشخص شده است کال پروتکتین اثر مهاری بیشتری را بر سلول‌های سرطانی نسبت به نرمال دارد (۱۷، ۲۰) و نتایج تحقیقات مطالعه حاضر نیز آن را تایید می‌کند.

نتایج به دست آمده در این مطالعه نشان می‌دهند که کال پروتکتین رشد سلول‌های سرطانی را نسبت به سلول‌های طبیعی به طور قابل ملاحظه‌ای کاهش می‌دهد. به نظر می‌رسد با مطالعه اثر مهاری کال پروتکتین بر بقای دیگر دودمان‌های سلولی سالم و سرطانی در شرایط آزمایشگاهی (*in vitro*) و سپس در بدن جانوران (*in vivo*) بتوان هدف مناسبی برای اثر بخشی کال پروتکتین در بدن انسان پیدا کرد تا در آینده بتوان از این پروتیین در درمان بیماری‌های صعب‌العلاج همچون سرطان استفاده کرد.

References

1. Yui S, Nakatani Y, Mikamim M. Calprotectin (S100A8/S100A9), an Inflammatory Protein Complex from Neutrophils with a Broad Apoptosis-Inducing Activity. Biol Pharm Bull 2003; 26(6): 753-760

2. Ghavami S, Kerkhoff C. Mechanism of apoptosis induced by s100A8/A9 in colon cancer cell lines; the role of ROS and the effect of metal ions. J Leuk Biol 2004; 76(6): 169-175

3. Nakatani Y, Yamazaki M, Walter J, Chazin WJ, Yui S. Regulation of S100A8/A9 (calprotectin) binding to tumor cells by zinc ion and its implication for apoptosis-inducing activity mediators. Inflammation 2005; 5: 280–292

4. Poullis A, Irwin AG, Dearing M, Gordon C, Britten AJ, Heenan S, Maxwell JD. Repeat planar white cell scanning to monitor short-term therapy of active inflammatory bowel disease: a methodological study and comparison with clinical scores and novel inflammatory markers. Eur J Gastroenterol Hepatol 2006; 18(6): 607-614

5. Karen F, Mark C. Calprotectin expression by gingival epithelial cells. Infec Immun 2001; 69(5): 3248–3254

6. Ishikawa k, Nakagawa A, Tanaka I, Suzuki M, Nishihira J: The structure of human MRP8, a member of the S100 calcium-binding protein family, by MAD phasing at 1.9 resolution. Acta Cryst 2000; 56: 559-566

7. Yui S, Nakatani Y, Hunter MJ, Chazin WJ, Yamazaki M. Implication of extracellular zinc exclusion by recombinant human calprotectin (MRP 8, MRP 14) from target cells in its apoptosis- indusing activity. MI 2002; 11(3): 165-172

8. Rougier PH, Lasser P, Ducreux M. Preoperative chemotherapy of locally advanced gastric cancer. Ann Oncol 1994; 5(suppl 3): 59–68

9. Derakhshan MH, Yazdanbod A, Sadjadi AR, Shokoohi B, McColl KEL, Malekzadeh R. High incidence of adenocarcinoma arising from the right side of the gastric cardia in NW Iran .Gut 2004; 53:1262-1266

10. Nouraie M, Pourshams A, Kamangar F, Sotoudeh M, Derakhshan MH, Akbari MR, Fakheri H, Zahedi MJ, Caldwell K, Abnet CC, Taylor PR, Malekzadeh R, Dawsey SM. Ecologic study of serum selenium and upper gastrointestinal cancers in Iran. World J Gastroenterol. 2004; 10(17): 2544-2546

11. Yui S, Mikami M, Yamazaki M. Induction of apoptotic cell death in mouse lymphoma and human leukemia cell lines by a calcium-binding protein complex, calprotectin, derived from inflammatory peritoneal exudate cells. J Leukoc Biol 1995; 58(6):650-658

12. Mikami M, Kitahara M, Kitano M, Ariki Y, Mimaki Y, Sashida Y, Yamazaki M, Yui S. Suppressive activity of lycoricidinol (narciclasine) against cytotoxicity of neutrophil-derived calprotectin, and its suppressive effect on rat adjuvant arthritis model. Biol Pharm Bull 1999; 22(7): 674-678

13. Ryckman C, Vandal K, Rouleau P, Talbot M, Tessier FA. Proinflammatory activities of S100: proteins S100A8, S100A9, and S100A8/A9 induce neutrophil chemotaxis and adhesion. J Immunol 2003; 170: 3233-3242

14. Yousefi R, Ardestani SK, Saboury AA, Kariminia A, Zeinali M, Amani M. Investigation on the surface hydrophobicity and aggregation kinetics of human calprotectin in the presence of calcium. J Biochem Mol Biol 2005; 38(4): 407-413

15. Francis D, Rapid RL. Colorometric assay for cell growth and survival: modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. J Immunol Meth 1986; 89: 271-277

16. Yui S, Mikami M, Yamazaki M. Purification and characterization of the cytotoxic factor in rat peritoneal exudates cells:its identification as calcium binding protein complex,calprotectin. J Leukocyte Biol 1995; 58: 307-316

17. Yui S, Mikami M, Tsurumaki K, Yamazaki M. Growth-inhibitory and apoptosis inducing activities of calprotectin derived from inflammatory exudate cells on normal fibroblasts: regulation by metal ions. J Leukoc Biol 1997; 61: 50-57

18. Yui S, Mikami M, Kitahara M, Yamazaki M. The inhibitory effect of lycorine on tumor cell apoptosis induced by polymorphonuclear leukocyte-derived calprotectin.Immunopharmacology 1998; 40(2): 151-162

19. Johne B, Fagerhol MK, Lyberg T, Prydz H, Brandtzaeg P, Naess-Anderen CF, Dale I. Functional and clinical aspects of the myelomonocyte protein calprotectin. J Clin Pathol: Mol Pathol 1997; 50: 113-123

20. Murao S, Collart F, Huberman E. A protein complex expressed during terminal differentioation of monomyelocytic cells is an inhibitor of cell growth. Cell Growth Differ 1990; 1: 447-454