

اثر مواد پکتینی بر القا رها سازی نیتریک اکساید و مهار تکثیر سلولی در دودمان سلولی سرطان پروستات انسانی LNCaP

فاطمه منصوری، حوری سپهری* و لادن دلفی

تهران، دانشگاه تهران، پردیس علوم، دانشکده زیست‌شناسی، گروه علوم جانوری

تاریخ پذیرش: ۹۴/۸/۱

تاریخ دریافت: ۹۴/۱/۲۸

چکیده

پکتین یک ترکیب پلی‌ساکاریدی پیچیده است که علاوه بر دارا بودن فواید غذایی، دارای اثرات ضد سرطانی نیز است. نیتریک اکساید (NO) یک مولکول فعال پیام‌رسان در بسیاری از فرآیندهای فیزیولوژیکی است که در سلول‌های توموری می‌تواند نقش آنتی‌آپوپتوتیک یا پروآپوپتوتیک داشته باشد. در این مطالعه اثر AP (پکتین سیب) و MCP (پکتین تغییر یافته مرکبات) بر میزان ترشح NO و القای آپوپتوز در دودمان سلولی سرطان پروستات انسانی (LNCaP) مطالعه شده است. برای این منظور سلول‌های LNCaP با دوزهای متفاوت AP و MCP در زمان‌های ۶، ۲۴ و ۴۸ ساعت تیمار شدند و سپس میزان آزاد شدن NO و مهار تکثیر سلولی توسط این مواد بررسی گردید. در ابتدا تیمار سلول‌های LNCaP با SNP به‌عنوان یک دهنده NO، نشان داد که NO در سلول‌های LNCaP نقش مهاری بر تکثیر سلول‌ها دارد. نتایج نشان می‌دهد که انکوباسیون ۶ ساعته با دوزهای مختلف AP و MCP تغییری در سنتز و ترشح NO و میزان تکثیر سلولی ایجاد نمی‌کند در حالیکه تیمار ۲۴ و ۴۸ ساعته موجب افزایش معنی‌دار ترشح NO و مهار تکثیر سلول‌ها در مقایسه با گروه کنترل می‌گردد. بررسی چرخه سلولی در این سلول‌ها نشان داد که با افزایش غلظت پکتین تعداد سلول‌هایی که در مرحله Sub-G1 از چرخه سلولی هستند افزایش می‌یابد. این امر می‌تواند نشان‌دهنده هدایت سلول‌ها به سمت آپوپتوز باشد. این نتایج به همراه افزایش ترشح NO نشان می‌دهد که مشتقات پکتینی استفاده‌شده در این تحقیق می‌توانند از مسیر رها سازی NO سبب القا آپوپتوز در سلول‌های LNCaP گردند.

واژه‌های کلیدی: پکتین، نیتریک اکساید، آپوپتوز، سلول‌های LNCaP

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۱۶۱۱۱۲۶۲۶، پست الکترونیکی: hsepehri@khayam.ut.ac.ir

مقدمه

به‌شدت وابسته به غلظت کلسیم داخل سلولی است، در حالیکه iNOS در مقادیر طبیعی کلسیم نیز فعال می‌شود (۳، ۵ و ۲۶). NO در فرآیندهای سرطانی نقش تنظیمی مهمی دارد اما شناسایی نقش دوگانه NO در پیشرفت و یا سرکوب سرطان دشوار است (۱۱ و ۳۳). اثر NO بر وقایع پیام‌رسانی سلول به‌شدت تحت تأثیر غلظت، نوع محیط و مدت‌زمان در معرض قرارگیری آن می‌باشد (۳ و ۹). به‌طور کلی مقادیر پایین NO ضد آپوپتوزی بوده و رشد تومور را ترویج می‌بخشند، در مقابل مقادیر بالای NO در

نیتریک اکساید (NO) یک پیام‌بر فیزیولوژیک لیپوفیل با قابلیت انتشار بالا و نیمه‌عمر کوتاه است که بسیاری از پاسخ‌های فیزیولوژیک نظیر کشیدگی عروق (Vascular tone)، تنفس سلولی، مهاجرت، ارتباطات سیناپسی، رگ‌زایی، ایمنی و آپوپتوز را تنظیم می‌کند (۸ و ۱۹). NO به‌وسیله آنزیمی به نام نیتریک اکساید سنتاز (NOS) از ال-آرژنین سنتز می‌شود. سه ایزوفرم مختلف از NOS به نام-eNOS (اپتلیومی)، nNOS (نورونی) و iNOS (القای) شناخته شده است که فعالیت eNOS و nNOS

مواد و روشها

کشت سلول: دودمان سلولی سرطان پروستات انسانی LNCaP، از بانک سلولی ایران (NCBI) تهیه شد و در محیط RPMI-1640 (Gibco-USA) حاوی ۱۰٪ سرم جنین گاو (Gibco-USA) (FBS) در شرایط بهینه (دمای ۳۷ درجه سانتیگراد، رطوبت ۹۵٪ و CO_2 ۵٪) کشت داده شد. به منظور جلوگیری از آلودگی ۱۰۰ IU/ml پنی‌سیلین و ۱۰۰ μ g/ml استرپتومایسین (Gibco-USA) به محیط کشت اضافه گردید. استوک MCP از Econugen-USA، AP از Sigma-Switzerland و SNP از Merck- Germany تهیه گردید.

مورفولوژی و درصد بقا: سلول‌های LNCaP با تراکم 10^4 سلول در هر چاهک پلیت ۹۶ تایی کشت داده شد. سلول‌ها پس از ۲۴ ساعت با تعویض محیط در غلظت‌های ۵ mg/ml و ۳، ۱/۵، ۱، ۰/۵ از MCP و AP و نیز غلظت‌های ۱۰ mM و ۱، ۰/۵، ۰/۱ از SNP به مدت ۶، ۲۴ و ۴۸ تیمار شدند. مورفولوژی سلول‌ها با میکروسکوپ فاز معکوس (CETI- Belgium) و درصد بقا با استفاده از روش MTT در طول موج ۵۷۰ nm مورد بررسی قرار گرفت. **سنجش نیتریک اکساید:** به منظور بررسی اثر مشتقات پکتینی و SNP بر ترشح نیتریک اکساید از روش غیرمستقیم سنجش NO بر پایه واکنش گریس (Griess) استفاده شد. تعداد 10^5 سلول در پلیت ۲۴ تایی با غلظت‌های مختلف AP، MCP و SNP به مدت ۶، ۲۴ و ۴۸ تیمار شد. پس از تیمار ۵۰ μ l از محیط رویی هر چاهک به ترتیب و بافاصله زمانی ۱۰ دقیقه با ۵۰ μ l سولفانیل آمید و NED (Merck- Germany) شیک و جذب در طول موج ۴۹۰ nm با دستگاه پلیت ریدر (Bio Tek- UK) خوانده شد.

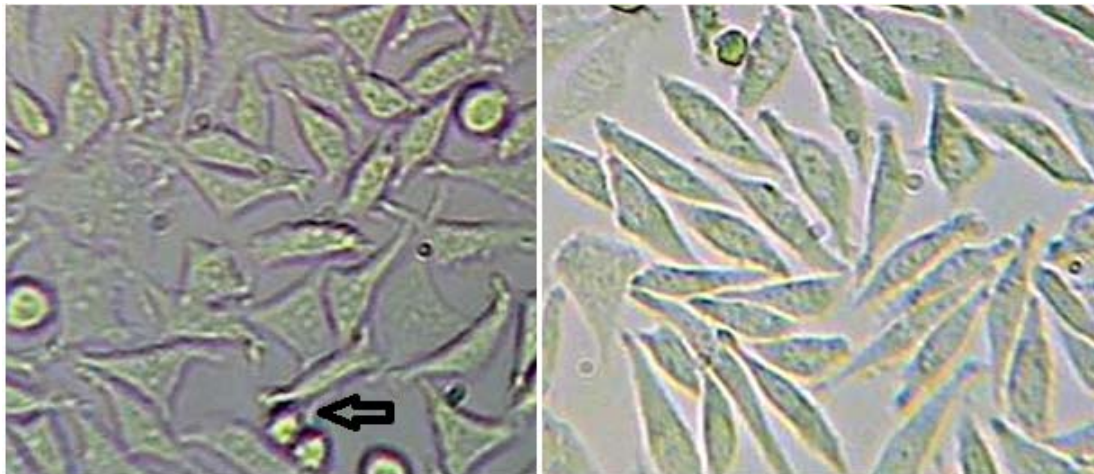
چرخه سلول: سلول‌ها پس از کشت و تیمار با غلظت‌های مختلف MCP و AP، به مدت یک ساعت در اتانول ۷۰٪ و

طولانی مدت از رشد تومور جلوگیری می‌کنند (۸ و ۹). عمدتاً NO طی واکنشی به نام S نیتروزیلاسیون (Nitrosylation) یا نیتراسیون (nitration) با سیستمین گروه تیول ترکیب شده و تولید نیتروزوتیول‌های پایدار می‌کند. بسیاری از پروتئین‌ها به واسطه داشتن سیستمین با این واکنش قابل تنظیم هستند. NO بسیاری از اثرات خود را از این طریق ایجاد می‌کند (۱۰). **پکتین** یک پلیمر طبیعی تشکیل‌دهنده دیواره سلولی در اغلب گیاهان است که حدود ۷۰٪ آن از گالاکتورونیک اسید تشکیل شده است. پکتین به طور وسیعی در صنعت غذایی به عنوان قوام دهنده و تثبیت‌کننده مورد استفاده قرار می‌گیرد (۲۰، ۲۲ و ۲۷). منابع اصلی استخراج پکتین پوست مرکبات، قاله سیب و چغندر قند می‌باشد (۲). اگرچه پکتین توسط مسیر فوقانی دستگاه گوارش هضم نمی‌شود اما فواید زیادی بر سلامت انسان دارد (۱۸). پکتین دارای اثرات کاهشدهنده کلسترول است و نقش مهمی در پیشگیری از بیماری‌های قلبی، فشارخون و دیابت دارد. شواهد قابل توجهی نیز در خصوص نقش پکتین در جلوگیری از سرطان و متاستاز وجود دارد (۴، ۷ و ۲۸). پکتین‌ها می‌توانند با گالکتین (Galectin) (پروتئین متصل شونده به کربوهیدرات) سطح سلول‌های سرطانی باند شده و در چسبندگی سلول-سلول و سلول-ماتریکس و در نتیجه متاستاز اختلال ایجاد کنند. پکتین نه تنها باعث مهار متاستاز می‌شود بلکه آپوپتوز را نیز در سلول‌های سرطانی القا می‌کند (۱۹، ۲۰ و ۲۷). یکی از مکانیزم‌های عمده مقاومت دارویی مهار مسیرهای آپوپتوتیک است که موجب پیشرفت تومورها می‌شود. لذا هدف بسیاری از درمان‌های رایج برای سرطان القای آپوپتوز در آنها است (۱۱ و ۹). سرطان پروستات یکی از رایج‌ترین سرطان‌های شناخته شده است که متأسفانه درمان‌های محدودی برای آن وجود دارد (۶). هدف از این پژوهش بررسی اثرات ترکیبات پکتینی بر رشد سلول‌های سرطان پروستات انسانی LNCaP و تولید نیتریک اکساید تحت تأثیر این مواد در سلول‌های مذکور می‌باشد.

آنالیز آماری: با استفاده نرم‌افزار SPSS version 16 و تست پارامتریک ANOVA یک‌طرفه و دوطرفه انجام شده است. $P < 0,05$ به‌عنوان اختلاف معنی‌دار محاسبه و نتایج به‌صورت \pm SEM میانگین ($n = 3$) نشان داده شده است.

نتایج

مورفولوژی سلول‌ها: سلول‌های LNCaP، سلول‌های اپی-تیلالی چسبیده می‌باشند که به‌صورت نرمال کشیده و زاویه‌دار هستند و سلول‌های در حال تقسیم نیز بین آن‌ها دیده می‌شود (شکل ۱).



شکل ۱- مورفولوژی سلول‌های LNCaP در حالت طبیعی بدون تیمار، سلول‌ها کشیده و به کف چسبیده هستند. علامت پیکان یک سلول در حال تقسیم را نشان می‌دهد (25X).

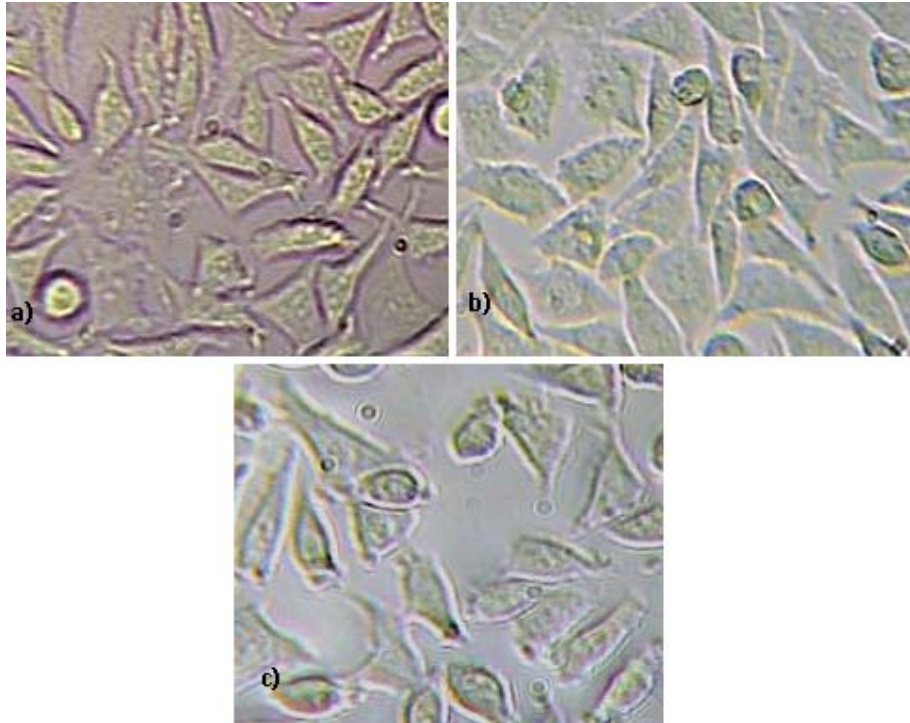
شود. این کریستال‌ها در حلال (DMSO) حل شده و جذب آن قابل‌اندازه‌گیری است. رابطه‌ای مستقیم بین میزان جذب و تعداد سلول‌های زنده وجود دارد. نتایج تست MTT نشان داد که تیمار ۶ ساعت سلول‌های LNCaP با مواد پکتینی و نیز SNP اثر معنی‌داری بر کاهش درصد بقای این سلول‌ها نسبت به گروه کنترل ندارد. در حالیکه انکوباسیون ۲۴ و ۴۸ ساعت این سلول‌ها با مواد پکتینی و نیز SNP با افزایش دوز موجب کاهش معنی‌دار بقای سلول‌ها نسبت به گروه کنترل می‌شود (شکل‌های ۴، ۵ و ۶). لازم به ذکر است با استفاده از تست Anova دوطرفه اختلاف معنی‌داری بین ساعت ۲۴ و ۴۸ مشاهده نگردید.

دمای ۴ درجه سانتیگراد فیکس شدند. سپس رنگ PI اضافه گردید و چرخه سلول با استفاده از دستگاه فلوسایتومتری (Beckman- Germany) و نرم‌افزار Flowjo بررسی شد.

DNA laddering: سلول‌ها با غلظت‌های مختلف MCP و AP تیمار شدند و سپس DNA با استفاده از کیت خریداری‌شده از شرکت سیناژن- ایران (Cinna) (pureDNA) استخراج گردید. در نهایت DNA بدست آمده بر روی ژل آگارز الکتروفورز شد. عکسبرداری از ژل با دستگاه ژل داگ (uvi doc- UK) انجام شد.

سلول‌ها پس از ۲۴ ساعت با غلظت‌های پایین مواد پکتینی تغییر محسوسی را متحمل نشدند در حالیکه تیمار ۲۴ ساعت با غلظت ۵ mg/ml مواد پکتینی سبب ایجاد تغییرات قابل‌مشاهده‌ای شامل گرانوله شدن سلول و کاهش حجم در مقایسه با حالت طبیعی گردید (شکل ۲b و c) و (شکل ۳ b و c).

اثر مشتقات پکتینی و SNP بر درصد بقا: MTT یک سوبسترای زردرنگ است که می‌تواند وارد سلول‌های زنده شود و در صورت وجود میتوکندری فعال در سلول به شکل کریستال‌های آبی به نام فورمازان درون سلول ظاهر



شکل ۲- مورفولوژی سلول‌های LNCaP تیمار شده با دوز بی‌اثر پکتین: (a) گروه کنترل (b) AP (1 mg/ml) MCP (c) (1 mg/ml) دوز بی‌اثر سبب تغییر محسوسی در مورفولوژی سلول‌ها نسبت به گروه کنترل نمی‌شود (25X).

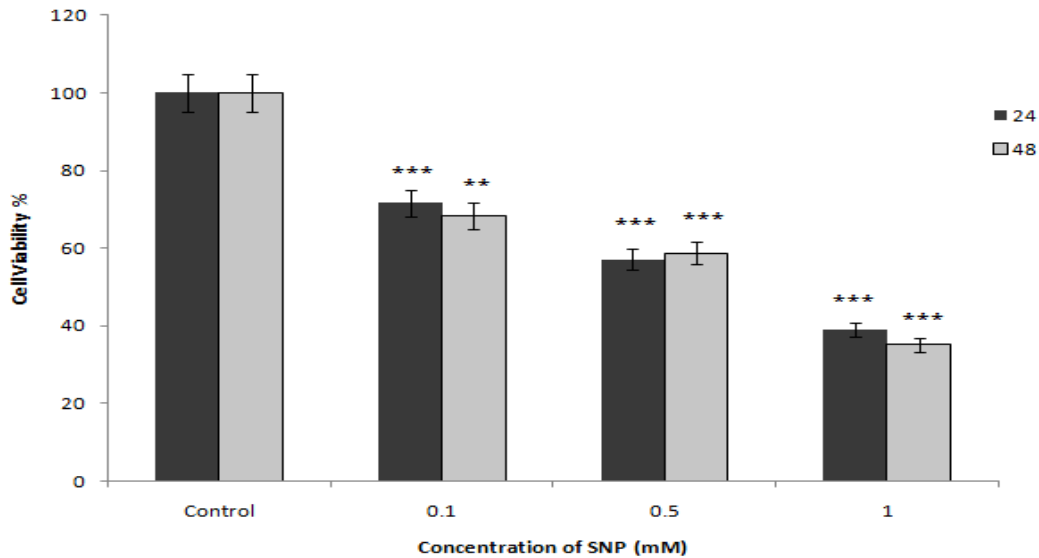


شکل ۳- مقایسه مورفولوژی سلول‌های تیمار شده با دوز مؤثر (a: 5 mg/ml) کنترل (b) AP (c) MCP همانطور که در تصویر نشان داده شده است سلول‌ها تحت اثر غلظت‌های بالای مواد پکتینی چروکیده می‌شوند و حالت طبیعی خود را از دست می‌دهند. در تیمار با MCP گرانوله شدن سلول‌ها نیز قابل‌رؤیت است (25X).

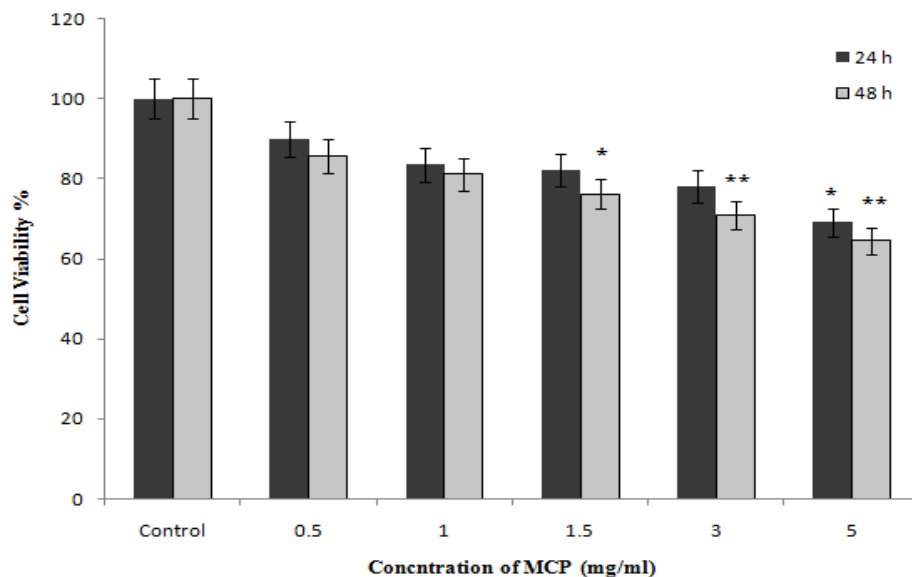
مقدار نیتريت با دستگاه پلیر قابل‌اندازه‌گیری است. رابطه مستقیمی بین مقدار جذب و میزان ترشح نیتريك اکساید وجود دارد. مقدار ترشح نیتريك اکساید از طریق فرمول زیر محاسبه می‌شود.

$$\text{میزان ترشح نیتريك اکساید} = \frac{\text{میلنگین جذب نمونه های تیمار شده}}{\text{میلنگین جذب نمونه های کنترل}}$$

سنجش نیتريك اکساید با واکنش گریس: از آنجاکه NO یک گاز ناپایدار است به‌سرعت به متابولیت‌های خود یعنی نیتريت و نیترات تجزیه می‌شود. در این روش نیتريت نخست با سولفانیل‌آمید واکنش داده و یک نمک ناپایدار دیازونیوم راتشکیل می‌دهد. سپس این واسطه با محلول دوم واکنش NED واکنش می‌دهد و ترکیبات پایدار آزو را تولید می‌کند. شدت رنگ صورتی حاصل به‌منظور سنجش



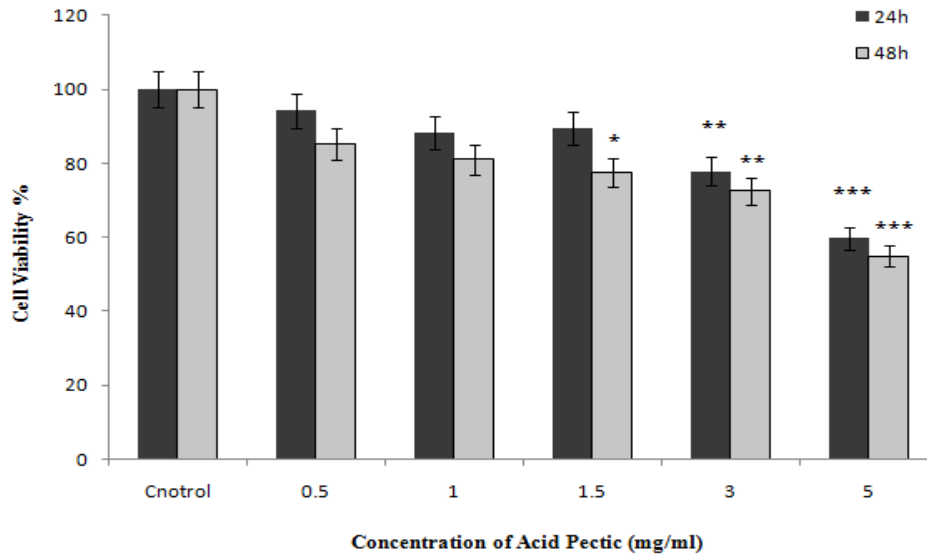
شکل ۴- درصد بقای سلول‌های LNCaP پس از تیمار با غلظت‌های مختلف SNP در زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت با استفاده از تست MTT. مقادیر ارائه شده معادل $\text{mean} \pm \text{S.E.M}$ می‌باشد. ($n=3$ و $P < 0.05$ ، $*$). همانطور که مشاهده می‌شود تیمار ۲۴ ساعت با غلظت‌های ۱ و ۰/۵، ۰/۱ موجب کاهش معنی‌دار بقای سلول‌ها نسبت به گروه کنترل می‌شود. نتایج در تیمار ۴۸ ساعت نیز به همان شکل می‌باشد.



شکل ۵- درصد بقای سلول‌های LNCaP پس از تیمار با غلظت‌های مختلف MCP در زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت با استفاده از تست MTT. مقادیر ارائه شده معادل $\text{mean} \pm \text{S.E.M}$ می‌باشد. ($n=3$ و $P < 0.05$ ، $*$). تیمار ۲۴ ساعت فقط در غلظت ۵ mg/ml موجب کاهش معنی‌دار بقای سلول‌ها نسبت به گروه کنترل می‌شود در حالیکه تیمار ۴۸ ساعت موجب کاهش معنی‌دار بقای سلول‌ها در سه غلظت ۵، ۳، ۱/۵ می‌گردد.

سلول‌های LNCaP به وسیله NO آزاد شده می‌باشد. تیمار ۲۴ ساعت با SNP در غلظت‌های ۱ و ۰/۵ موجب افزایش معنی‌دار ترشح NO نسبت به گروه کنترل گردید.

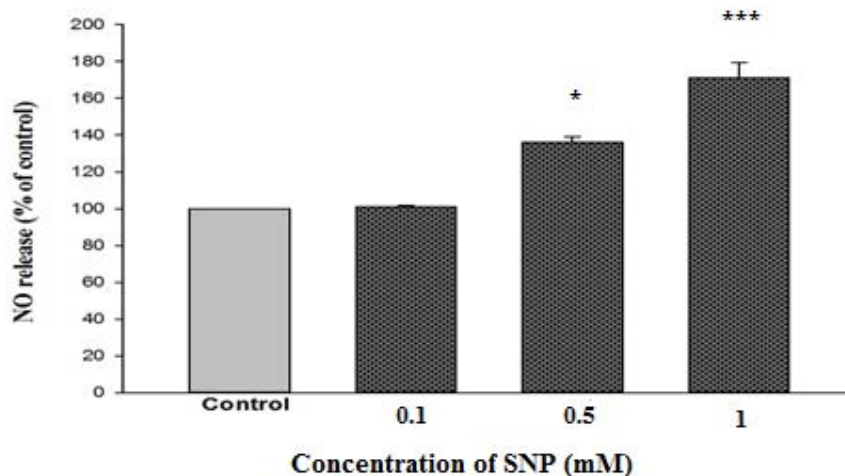
SNP یک دهنده NO است و در این پژوهش به عنوان کنترل مثبت مورد استفاده قرار گرفت. هدف از استفاده از یک کنترل مثبت (SNP) حصول اطمینان از مهار تکثیر



شکل ۶- درصد بقای سلول‌های LNCaP پس از تیمار با غلظت‌های مختلف AP در زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت با استفاده از تست MTT. مقادیر ارائه شده معادل $\text{mean} \pm \text{S.E.M}$ می‌باشد. ($n=3$ و $P < 0.05$ ، *). تیمار ۲۴ و ۴۸ ساعت سلول‌ها در غلظت‌های ۰.۵، ۱، ۳، ۵ mg/ml اسیدپکتیک موجب کاهش معنی‌دار بقای سلول‌ها نسبت به گروه کنترل می‌گردد.

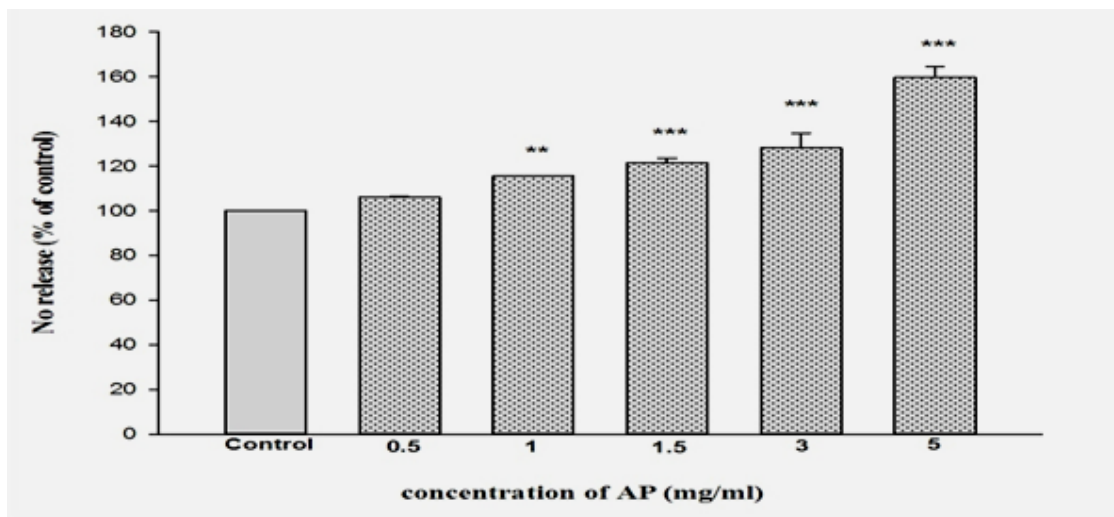
افزایش معنی‌دار ترشح NO نسبت به گروه کنترل در این سلول‌ها شد (شکل‌های ۸ و ۹). لازم به ذکر است که تیمار AP و MCP در تیمار ۴۸ ساعت افزایش معنی‌داری در ترشح NO نسبت به ساعت ۲۴ ایجاد نکردند.

این در حالی است که تیمار ۴۸ ساعت سلول‌ها با SNP افزایش معنی‌داری نسبت به تیمار ۲۴ ساعت نشان نداد (شکل ۷). تیمار ۲۴ ساعت سلول‌های LNCaP با AP و MCP در غلظت‌های ۱، ۱/۵، ۳ و ۵ mg/ml موجب

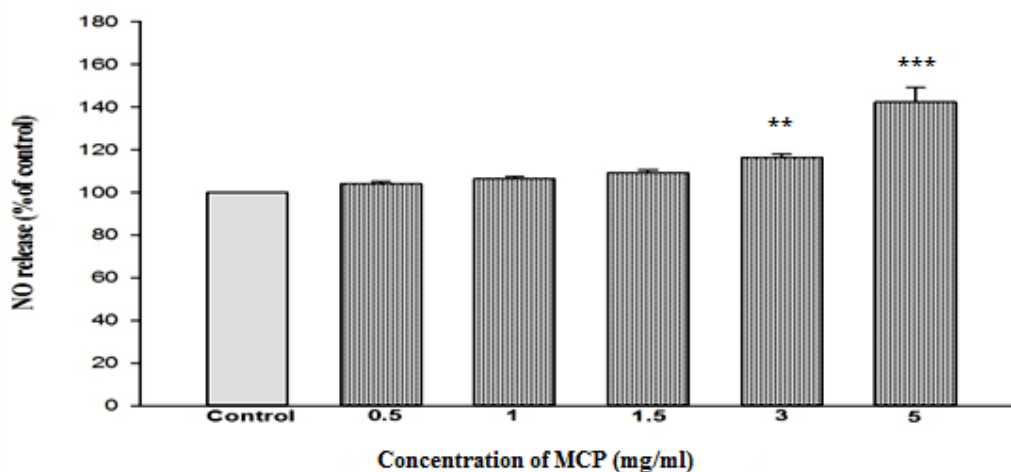


شکل ۷- اثر غلظت‌های متفاوت SNP بر ترشح نیتریک اکساید در سلول‌های LNCaP پس از ۲۴ ساعت. غلظت‌های ۰.۱، ۰.۵ mM باعث افزایش معنی‌دار ترشح نیتریک اکساید در سلول‌های تحت تیمار نسبت به گروه کنترل می‌شوند. مقادیر ارائه شده معادل $\text{mean} \pm \text{S.E.M}$ می‌باشند.

($n=3$ و $P < 0.05$ ، * $P < 0.01$ ، ** $P < 0.001$ ، ***)



شکل ۸- اثر غلظت‌های متفاوت AP بر ترشح نیتریک اکساید در سلول‌های LNCaP پس از ۲۴ ساعت. غلظت‌های ۰.۵، ۱، ۳، ۵ و ۱۰ mg/ml باعث افزایش معنی‌دار ترشح نیتریک اکساید در سلول‌های تحت تیمار نسبت به گروه کنترل می‌شوند. مقادیر ارائه‌شده معادل $\text{mean} \pm \text{S.E.M}$ می‌باشند ($n=3$ و $P < 0.05$ ، $** = P < 0.01$ ، $*** = P < 0.001$)



نمودار ۹- اثر غلظت‌های متفاوت MCP بر ترشح نیتریک اکساید در سلول‌های LNCaP پس از ۲۴ ساعت. غلظت‌های ۰.۵، ۱، ۳ و ۵ mg/ml باعث افزایش معنی‌دار ترشح نیتریک اکساید در سلول‌های تحت تیمار نسبت به گروه کنترل می‌شوند. مقادیر ارائه‌شده معادل $\text{mean} \pm \text{S.E.M}$ می‌باشند. ($n=3$ و $P < 0.05$ ، $** = P < 0.01$ ، $*** = P < 0.001$)

محتوای DNA سلول‌های آپوپتوزی از محتوای DNA سلول‌های طبیعی کمتر بوده و این سلول‌ها با پیک Sub-G1 در هیستوگرام DNA قابل‌مشاهده هستند (۲۵). لذا تعداد سلول‌های موجود در فاز Sub-G1 میتواند شاخصی برای احتمال وقوع آپوپتوز باشد. تیمار ۲۴ ساعت سلول‌های LNCaP با AP به‌صورت وابسته به دوز سبب افزایش تعداد سلول‌های در ناحیه Sub-G1 در مقایسه با گروه کنترل

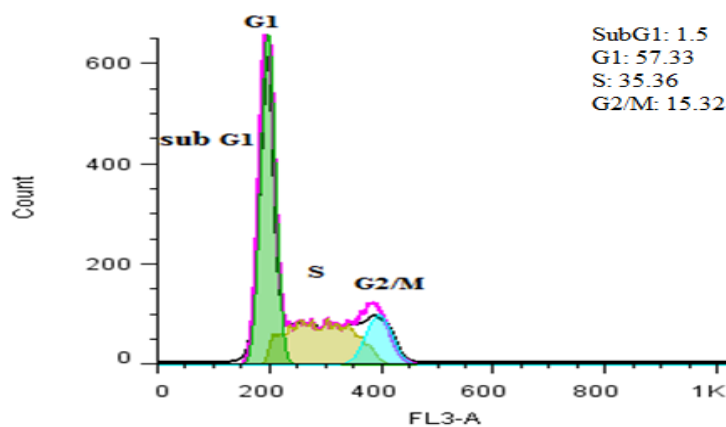
چرخه سلولی: در مراحل پایانی آبخار آپوپتوتیک، DNA کروموزومی توسط آنزیم اندونوکلاز به قطعات نوکلئوزومی تجزیه می‌گردد. در نتیجه شمار زیادی از قطعات DNA که اندازه آن‌ها در حدود ۱۸۰ bp است در داخل سلول انباشته می‌شوند. اگر این سلول‌ها با اتانول فیکس و مجدداً هیدراته شوند قطعات DNA با وزن مولکولی پایین‌تر از دیواره سلول نشت می‌کنند. در نتیجه

اگرچه تیمار ۴۸ ساعت سلول‌ها با مواد پکتینی درصد سلول‌های موجود در فاز Sub-G1 را می‌افزاید اما این افزایش در مقایسه با ساعت ۲۴ معنی‌دار نمی‌باشد.

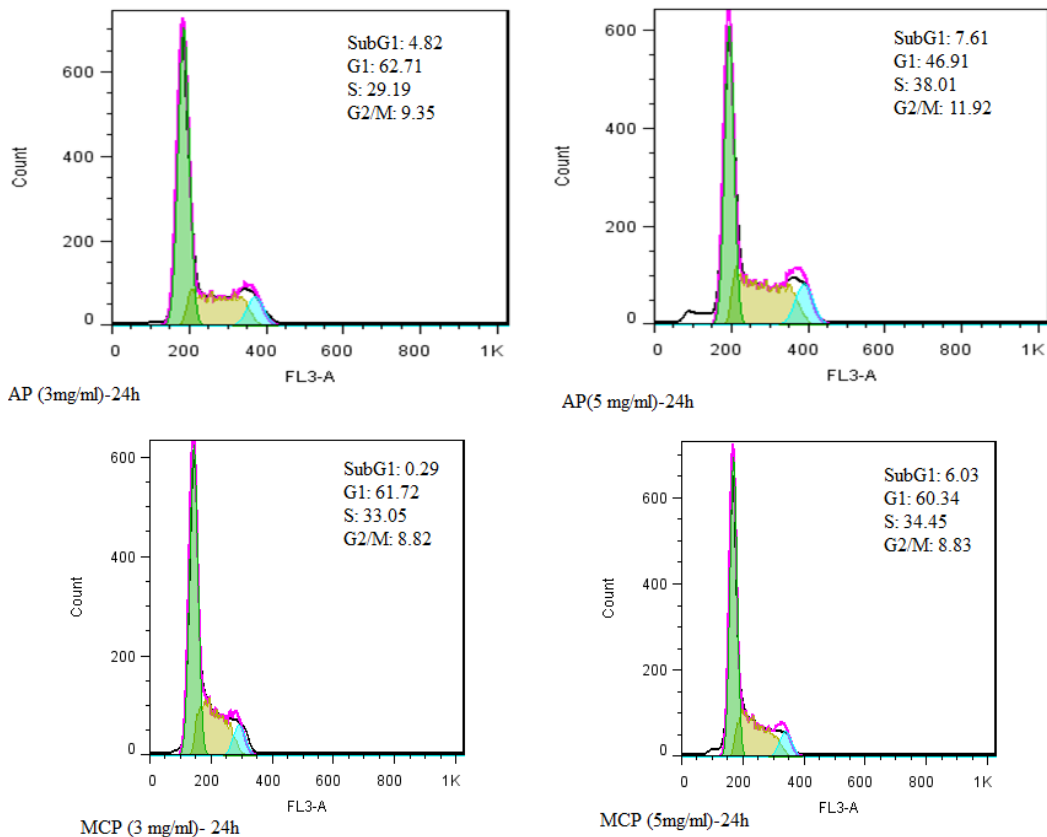
گردید. تیمار سلول‌ها با MCP نیز به صورت وابسته به دوز سبب افزایش تعداد سلول‌ها در فاز Sub-G1 گردید. درصد سلول‌های موجود در فاز Sub-G1 در تیمار ۲۴ و ۴۸ ساعت با AP و MCP در جدول ۱ نشان داده شده است.

جدول ۱- اثر AP و MCP بر پیشرفت چرخه سلولی در سلول‌های LNCaP با روش فلوسایتومتری

Sub-G1	Dose (mg/ml)	Treatment	Time
0.29	3	MCP	24h
6.03	5		
4.82	3	AP	
7.61	5		
2.33	1.5	MCP	48h
5.73	3		
8.32	5		
6.52	1.5	AP	
7.53	3		
22.4	5		



شکل ۱۰- هیستوگرام چرخه سلولی برای سلول‌های LNCaP در حالت کنترل



شکل ۱۱- هیستوگرام چرخه سلولی سلول‌های LNCaP پس از تیمار با MCP ، AP

با توجه به روند افزایشی بروز سرطان در اندام‌های مختلف بدن نیاز به درمان‌های مؤثر با حداقل عوارض جانبی ضروری به نظر می‌رسد. در این رابطه برخی از مولکول‌های زیستی غیرسمی دارای خاصیت ضد توموری بوده و قادر به کاستن دوز مصرفی داروهای شیمیایی هستند (۳۴). پکتین یکی از عمده‌ترین ترکیبات دیواره سلولی و احتمالاً پیچیده‌ترین ماکرومولکول طبیعت است که دارای اثرات ضد سرطانی می‌باشد (۳۱ و ۳۱). متأسفانه سلول‌های انسان قادر به تولید آنزیم تجزیه‌کننده پکتین نیستند لذا استفاده از برگه‌های اصلاح شده آنها گسترش یافته است (۲۴). MCP پکتین تغییر یافته مرکبات با pH است که در آب راحت‌تر حل شده و قابلیت جذب بالاتری در بدن دارد (۳۲ و ۳۳). مطالعات درون تنی و برون تنی نشان داده‌اند که MCP به‌طور مؤثری بر ضدسرطان‌هایی نظیر پروستات، کولون، سینه، ملانوما، (Multiple Myeloma) و هماتزیوسارکوم

نردبان DNA : یکی از ویژگی‌های کلاسیک آپوتوز شکستن DNA ژنومی به قطعات کوچکتر ۱۸۰-۲۰۰ bp است. نردبان DNA یک روش کیفی برای ارزیابی مرگ سلول با استفاده از شناسایی این قطعات می‌باشد. در این روش سلول‌های آپوتوتیک یک نردبان مجزا تشکیل می‌دهند در حالیکه سلول‌های نکروتیک تشکیل اسمیر می‌دهند (یا اصلاً DNA شان قطعه‌قطعه نمی‌شود). DNA سلول‌های سالم نیز به‌صورت یک باند با وزن مولکولی زیاد در بالای ژل باقی می‌ماند (۱۲). همانطور که در تصویر مشخص است در غلظت‌های ۵، ۳، ۱/۵ mg/ml از AP و MCP، DNA خرد شده است در حالیکه DNA نمونه کنترل به‌صورت یک باند در بالای ژل قرار گرفته است (شکل ۱۲).

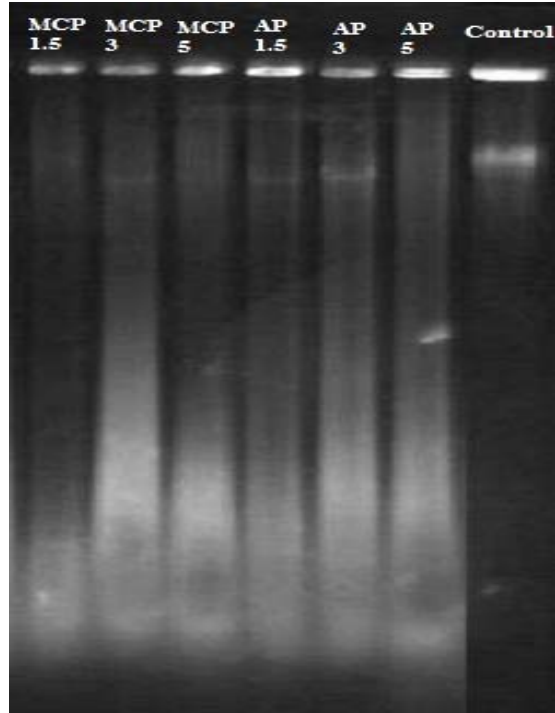
بحث

پیچیده است. NO تحت شرایط ویژه می‌تواند ژنوتوکسیک باشد، در عین حال مطالعات متعددی بر نقش سرکوب‌کننده NO در فنوتیپ بسیاری از سرطان‌ها تأکید دارد. اثرات تحریکی و مهاري NO بر پیشرفت سرطان وابسته به فاکتورهای متنوعی است. NO در جنبه‌های مختلف متاستاز نیز تأثیرگذار است این در حالی است که ۹۰٪ مرگ‌ومیر ناشی از سرطان به دلیل متاستاز می‌باشد (۸).

هدف از این پژوهش

- ۱- بررسی نقش مهاري یا تحریکی NO بر بقای سلولهای LNCaP
 - ۲- تولید NO تحت تأثیر MCP, AP در سلولهای LNCaP
 - ۳- بررسی نقش مشتقات پکتینی در مهار سلولهای LNCaP
 - ۴- ارتباط احتمالی مهار تکثیر و تولید NO در این سلولها
- تیمار سلول‌های LNCaP با غلظت‌های مختلف SNP به‌عنوان یک دهنده NO موجب کاهش معنی‌دار بقای سلول‌ها در تمام دوزهای مورد استفاده گردید. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که NO در سلول‌های سرطان پروستات نقش پروآپتوتیک داشته و بر بقای سلول‌ها اثر مهاري دارد. درصد بقای سلول‌ها در حضور مواد پکتینی با استفاده از تست MTT نیز مورد بررسی قرار گرفت و مشاهده شد که MCP و AP هر دو موجب کاهش معنی‌دار درصد بقای سلول‌ها نسبت به حالت کنترل می‌گردند. با تعیین اثر مهاري ترکیبات پکتینی بر بقای سلول‌های LNCaP، بار دیگر سلول‌ها به‌منظور سنجش مقدار NO آزاد شده با MCP و AP تیمار شدند. این بار تیمار ۲۴ و ۴۸ ساعت هر دو ترکیب پکتینی افزایش معنی‌دار تولید NO را موجب شد. به‌منظور تأیید اثر کاهشی مواد پکتینی بر بقای سلول‌ها، LNCaP، میزان تخریب DNA سلول‌های تیمار شده با استفاده از روش DNA laddering و نیز تغییرات چرخه سلولی با استفاده از تکنیک فلوسایتومتری مورد بررسی

(Hemangiosacrum) عمل می‌کند (۱۷). احتمالاً MCP اثرات خود را از طریق مهار گالکتین‌ها و به‌ویژه گالکتین ۳ (Gal3) ایجاد می‌کند.



شکل ۱۷- DNA استخراج‌شده از سلول‌های LNCaP تیمار شده با غلظت‌های مختلف AP و MCP وجود اسمیر در تمامی غلظت‌های AP و MCP و به‌خصوص در غلظت‌ها بالاتر مشاهده گردید. Gal3 متنوع‌ترین عضو از خانواده لکتین‌های باند شونده به گالاکتوز است که در طیف گسترده‌ای از عملکردها نظیر تکثیر سلولی، آپوپتوز، رگ‌زایی، پیشرفت تومور و متاستاز دخیل است (۱۳ و ۱۴). اوکامی و همکاران نشان دادند که پکتین سیب می‌تواند تعداد تومورهای کولون در موش‌های تحت تأثیر آزوکسی‌متان را کاهش دهد در حالیکه پکتین مرکبات چنین اثری را نشان نمی‌دهد (۲۳). در سال ۲۰۱۰ نیز لی و همکاران اثر پکتین تغییر یافته سبب (MAP) را بر سه نوع دودمان سلولی سرطان کولون مورد بررسی قرار دادند و دریافتند که MAP اثرات مهاري بر رشد دارد و آپوپتوز را نیز در این سلول‌ها القا می‌کند، همچنین عملکرد مهمی در جلوگیری از متاستاز کبدی می‌باشد (۱۳، ۲۷ و ۳۲). نقش NO در اتیولوژی و پیشرفت سرطان بسیار

در سلول‌های LNCaP بیان می‌شود. لازم به ذکر است که گالکتین ۱ به دلیل رفتار پیش برنده آپوپتوز یک هدف درمانی بالقوه برای درمان سرطان است (۱۶ و ۲۱). به نظر می‌رسد که مسیر اثرات پکتین در این سلول‌ها از طریق مسیری مستقل از گالکتین ۳ می‌باشد. از طرف دیگر با توجه به افزایش ترشح NO در حضور AP و MCP می‌توان احتمال آپوپتوز در این سلول‌ها، حداقل در بخشی از طریق تولید NO باشد زیرا در مقایسه با SNP که کنترل مثبت بوده است، تأیید این مطلب را می‌توان مشاهده کرد. در توضیح این موضوع شاید بتوان اثر NO را با کلسیم مرتبط دانست. NO می‌تواند از طریق نیتروزیلاسیون، رسپتورهای رایانودینی و NMDA را تحت تأثیر قرار بدهد (۱۰ و ۱۵). با افزایش کلسیم سیتوزولی، بار کلسیم در میتوکندری نیز افزایش خواهد یافت. افزایش کلسیم میتوکندری نیز به‌نوبه خود موجب نفوذپذیری غشای آن و آزادسازی فاکتورهای آپوپتوتیک و در نهایت آپوپتوز می‌شود (۱۶). اما قطعاً به‌منظور ردیابی مسیرهای انتقال پیام آزمایش‌های مولکولی دقیق‌تر و بیشتری لازم است.

گرفت. خرد شدن DNA در تمامی سلول‌های تیمار شده با غلظت‌های موردنظر MCP و AP مشاهده گردید که این خرد شدن هم مشخصه سلول‌های آپوپتوتیک و هم نکروتیک است. نتایج حاصل از بررسی چرخه سلولی نیز نشان داد که درصد Sub-G1 و در نتیجه وقوع آپوپتوز در سلول‌های LNCaP تحت تیمار، به‌صورت وابسته به دوز افزایش یافته است. این مشاهده می‌تواند مؤید وقوع آپوپتوز در این سلول‌ها باشد. به‌طور کلی در این تحقیق مشاهده شد که مواد پکتینی بر بقای سلول‌های LNCaP اثر کاهشی داشته و بسیار محتمل است که این اثر از طریق القای آپوپتوز باشد، چراکه رنگ‌آمیزی با پروپیدیوم آیواید (PI) و انجام تست نکروز و نیز رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید و آکریدین اورنج، حاکی از سطح بسیار پایین سلول‌های نکروتیک در تیمار با مواد پکتینی است. اگرچه گزارش‌هایی مبنی بر عدم بیان گالکتین ۳ در سلول‌های LNCaP وجود دارد (۲۹ و ۳۰)، اما گزارشات نشان داده‌اند که سایر انواع گالکتین‌ها و به‌ویژه گالکتین ۱ نیز به‌اندازه گالکتین ۳ در پیشرفت سرطان دخیل‌اند و این گالکتین به میزان زیادی

منابع

- Alphons, G.J., Voragen, G.J., Coenen Rene, P., and Verhoef Henk, A., Schols, 2009. Pectin, a versatile polysaccharide present in plant cell walls. *Struct Chem*, 20, PP:263–275.
- Baississe, S., Ghannem, H., Fahloul, D., and Lekbir, A., 2010. Comparison of Structure and Emulsifying Activity of Pectin Extracted from Apple Pomace and Apricot Pulp. *World Journal of Dairy & Food Sciences*, 5 (1), PP: 79-84.
- Bonavida, B., Baritaki, S., 2011. Dual role of NO donors in the reversal of tumor cell resistance and EMT: Downregulation of the NF-jB/Snail/YY1/RKIP circuitry. *Nitric Oxide*, 24, PP: 1–7.
- Bergman, M., Djaldetti, M., Salman, H., and Bessler, H., 2010. Effect of citrus pectin on malignant cell proliferation. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 64, PP: 44–47.
- Choi, B.M., Pae, H.O., Jang, S., Kim, Y.M., and Chung, H.T., 2002. Nitric Oxide as a Pro-apoptotic as well as Anti-apoptotic Modulator. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 35(1), PP: 16-126.
- Choudhari, S.K., Chaudhary, M., Bagde, S., Gadbail, A.R., and Joshi, V., 2013. Nitric oxide and cancer: a review. *World Journal of Surgical Oncology*, 11, 118 p.
- Glinsky, V.V., and Raz, A., 2009. Modified citrus pectin anti metastatic properties: one bullet, multiple targets, *Carbohydrate Research*, 344, PP: 1788–1791.
- Hickok, J.R., and Thomas, D.D., 2010. Nitric Oxide and Cancer Therapy: The Emperor has NO Clothes. *Curr Pharm Des*. 16(4), PP: 381–391.
- Huerta-Yepe, S., Vega, M., Jazirehi, A., Garban, H., Hongo, F., Cheng, G., and Bonavida, B., 2004. Nitric oxide sensitizes prostate carcinoma cell lines to TRAIL-mediated apoptosis via inactivation of NF-jB and inhibition of Bcl-xL expression, *Oncogene*, 23, PP: 4993–5003.

10. Jordi, M., and Mata, M., 2010. Nitric oxide and cancer. *World J Hepatol*, 27 2(9), PP: 337-344.
11. Kim, P., Zamora, R., Petrosko, P., and Billiar, T.R., 2001. The regulatory role of nitric oxide in apoptosis. *International Immunopharmacology*, 1 (8), PP: 1421- 1444.
12. Matassov D, Kagan T, Leblanc J, Sikorska M, Zakeri Z., 2004. Measurement of apoptosis by DNA fragmentation Methods. *Molecular Biology*, 282:1-17.
13. Li, L., Niu, Y., Wu, H., Sun, Y., Li, Q., Kong, X., Liu, L., and Mei, Q., 2010. Modified Apple Polysaccharides Could Induce Apoptosis in Colorectal Cancer Cells. *Journal of Food Science*, 75 (8), PP: 224-229
14. Leclere, L., Cutsem, P.V., and Carine Michiels, C., 2013. Anti-cancer activities of pH or heat-modified pectin. *Front Pharmacol*, 8 (4), 128 p.
15. Leon, L., Jeannin, J.F., and Bettaieb, A., 2008. Post-translational modifications induced by nitric oxide (NO): Implication in cancer cells apoptosis. *Nitric Oxide*, 19, PP: 77–83.
16. Simeng Suy, D.J., Gentilini, L.D., and Giribaldi, L., et al., 2013. A Unique Galectin Signature in Human Prostate Cancer Progression Suggests Galectin-1 as a Key Target for Treatment of Advanced Disease. *Cancer Res*, 73, PP: 86-96.
17. Mohnen, D., 2008. Pectin structure and biosynthesis. *Plant Biology*, 11, PP: 266–277.
18. Maxwell, E.G., Belshaw, N.J, Waldron, K.W., and Morris, V.J., 2012. Pectin An emerging new bioactive food polysaccharide. *Trends in Food Science & Technology*, 24, PP: 64e-73.
19. Muntané, J., De la Rosa, A.J., Marín, L.M., and Padillo, F.J., 2013. Nitric oxide and cell death in liver cancer cells. *Mitochondrion*, 13, PP: 257–262.
20. Munarin, F., Tanzi, M.C., and Petrini, P., 2012. Advances in biomedical applications of pectin gels. *International Journal of Biological Macromolecules*, 51, PP: 681– 689.
21. Nangia-Makker, P., Conklin, J., Hogan, V., and Raz, A., 2002. Carbohydrate-binding proteins in cancer, and their ligands as therapeutic agents. *TRENDS in Molecular Medicine*, 8 (4), PP: 187-192.
22. Ochoa-Villarrea, M., Aispuro-Hernandez, E., Vargas-Arispuro, I., Angel Martinez-Téllez, M., 2012. Plant Cell Wall Polymers: Function, Structure and Biological Activity of Their Derivatives. Chapter4, Page. 145-173.
23. Ohkami, H., Tazawa, K., Yamashita, O., Shimizu, T., and Murai, K., 1995. Effect of Apple Pectin on Fecal Bacterial Enzymes in Azoxymethane-induced Rat Colon Carcinogenesis. *Jpn. J. Cancer Res*. 86, PP: 523-529.
24. Ping-Hsiu, H., Li-Chun, F., Cian-Song, H., Yuh-Tai, W., and Ming-Chang, W., 2012. The uptake of oligogalacturonide and its effect on growth inhibition, lactate dehydrogenase activity and galactin-3 release of human cancer cells. *Food Chemistry*, 132, PP: 1987–1995.
25. Pozarowski, P., and Darzynkiewicz, Z., 2004. Analysis of Cell Cycle by Flow Cytometry. *Methods in Molecular Biology*, 281, PP: 301-311.
26. Reynolds, M.M., Witzeling, S.D., and Damodaran, V., et al., 2013. Applications for nitric oxide in halting proliferation of tumor cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 431, PP: 647–651.
27. Suryakant, K., and Niture, L. R., 2013. Plant Pectin: A Potential Source for Cancer Suppression. *American Journal of Pharmacology and Toxicology*, 8 (1), PP: 9-19.
28. Sharma, B.R., Naresh, L., Dhuldhoya, N.C., Merchant, S.U., and Merchant. U.C., 2006. An Overview on Pectins. *Journal Times Food Processing*, PP: 44-51.
29. Wang, Y., Nangia-Makker, P., Tait, L., and Balan, V., et al., 2009. Regulation of Prostate Cancer Progression by Galectin-3. *The American Journal of Pathology*, 174 (4), PP: 1515-1523
30. Wang, Y., Balan, V., Gao, X., Reddy, P.G., Kho, D., Tait, L., and Raz, A., 2013. The significance of galectin-3 as a new basal cell marker in prostate cancer. *Cell Death and Disease*, 4, e753 p.
31. William, G.T., Knox, J.P., and Mikkelsen, J.D., 2006. Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel. *Trends in Food Science & Technology*, 17, PP: 97–104.
32. Yan, J., and Katz, A., 2010. PectaSol-C Modified Citrus Pectin Induces Apoptosis and Inhibition of Proliferation in Human and Mouse Androgen-Dependent and - Independent Prostate Cancer Cells. *Integrative Cancer Therapies*, 9(2), PP: 197–203.
33. Yu, S.h., Jia, L., Zhang, Y., and Wu, D., et al., 2013. Increased expression of activated endothelial nitric oxide synthase contributes to antiandrogen resistance in prostate cancer cells

- by suppressing androgen receptor transactivation. *Cancer Letters*, 328, PP: 83–94.
34. Zong, A., Cao, H., and Wang, F., 2012. Anticancer polysaccharides from natural resources: A review of recent research, *Carbohydrate Polymers*, 90, PP: 1395–1410.

Effect of Pectin Substances on NO Release and Apoptosis Induction in Human Prostate Cancer cells LnCap

Mansoori F., Sepehri H. and Delphi L.

Animal Biology Dept., Faculty of Biology, College of Sciences, University of Tehran, Tehran, I.R. of Iran

Abstract

Pectin is a complex polysaccharide compound with food and anticancer properties. NO as a signaling molecule. It plays role in various physiological process. It may have pro or anti apoptotic role in cancer cells. In this research the effect of apple pectin (AP) and modified citrus pectin (MCP) on NO releasing and apoptosis induction of human prostate cancer cell, LnCap, is under investigated. The cells were treated with different concentration of AP and MCP for 6, 24 and 48h. The amount of NO and proliferatin inhibition were studied. At first SNP treatment indicated that NO has an inhibitory role in LnCap cells. The results showed that long term incubation of cells with AP and MCP caused significant changes in NO release and proliferation rate. Under this condition cell cycle arrested in Sub-G1 phase though apoptosis was occurred. Therefore, AP and MCP could induce apoptosis in LnCap cell via NO release.

Key words: Pectin, Nitric Oxide, Apoptosis, Lncap cells