

بررسی اثربختین تغییر یافته مرکبات (MCP) و دوکسوروبیسین بر قدرت زیستایی، مورفولوژی و چرخه سلولی در دو دودمان سلولی سرطان پروستات انسانی، DU-145 و LNCaP

نویسندگان: نجمه تهرانیان^۱، حوری سپهری^{۲*}، فیروزه بیرامی جمال^۳، پروین مهدی پور^۴، آرش حسین نژاد^۵، عبدالفتاح صراف نژاد^۶، ابراهیم حاجی زاده^۷، لادن دلفی^۸

- ۱- دانشجوی دکترا، گروه فیزیولوژی، پردیس علوم، دانشگاه تهران.
 - ۲- استاد، گروه فیزیولوژی پردیس علوم دانشگاه تهران.
 - ۳- دانشیار، گروه ژنتیک، پژوهشگاه مهندسی ژنتیک و زیست فناوری.
 - ۴- استاد، گروه ژنتیک، دانشکده پزشکی، دانشگاه تهران.
 - ۵- استادیار، گروه نانویوتکنولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تهران و مرکز تحقیقات غد.
 - ۶- استاد، گروه پاتولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران.
 - ۷- دانشیار، گروه آمارحیاتی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس.
 - ۸- دانشجوی دکتری گروه فیزیولوژی، پردیس علوم، دانشگاه تهران.
- *نویسنده مسول: دکتر حوری سپهری
E-mail: sepehri@khayam.ut.ac.ir

چکیده:

مقدمه و هدف: سرطان پروستات از شایعترین سرطانها در دنیا بشمار می رود بطوریکه در بین مردان دومین علت مرگ ناشی از سرطان می باشد. در این پژوهش اثر *MCP (پکتازول) و دوکسوروبیسین (Dox) * بر کاهش میزان زیستایی و نیز تاثیر آن بر آپوپتوز و چرخه سلولی در دودمان سلولی سرطان پروستات انسانی یعنی DU-145 و LNCaP مورد مطالعه قرار گرفته است.

مواد و روشها: سلولهای DU-145 و LNCaP با غلظتهای مختلف MCP و دوکسوروبیسین و یا ترکیبی از دو دارو مورد تیمار قرار گرفتند. زیستایی سلولها با استفاده از روش MTT، مورفولوژی سلولی با میکروسکوپ معکوس و رنگ آمیزی گیمسا و پیشرفت سیکل سلولی نیز از طریق روش فلوسایتومتری و با استفاده از نرم افزار فلوماکس بررسی شد. نتایج: در سلولهای DU-145 و LNCaP تیمار با دوز IC50 دوکسوروبیسین، سبب چروکیده شدن سلولها و تیمار با دوز IC50 پکتازول موجب گرانبه و کوچک شدن سلولها شد در حالی که تیمار با ترکیب دو داروی پکتازول و دوکسوروبیسین باعث هم چروکیده شدن و هم گرانبه و کوچک شدن سلولها شد و در سلولهای DU-145 قدرت زیستایی سلولها از میزان ۴۷،۰۴٪ در تیمار با Dox به تنهایی تا میزان ۲۹،۳۶٪ در تیمار با ترکیب دو داروی MCP و Dox کاهش نشان داد. در سلولهای LNCaP قدرت زیستایی سلولها از میزان ۴۷،۰۴٪ در تیمار با Dox به تنهایی تا میزان ۲۹،۳۶٪ در تیمار با ترکیب دوکسوروبیسین گردد. در سلولهای DU-145 ترکیب دو دارو سبب توقف چرخه سلولی در مرحله Sub G1 و آپوپتوز و در سلولهای LNCaP موجب توقف چرخه سلولی در مرحله G2M مهار شد. نتیجه گیری: MCP سبب افزایش اثر دوکسوروبیسین در کاهش زیستایی سلولهای DU-145 از طریق آپوپتوز و در سلولهای LNCaP از راه توقف چرخه سلولی می شود. واژگان کلیدی: سرطان پروستات، دودمان سلولی سرطانی DU-145 و LNCaP، سیکل سلولی و آپوپتوز، MCP (پکتازول)، دوکسوروبیسین

دوماهنامه علمی-پژوهشی
دانشگاه شاهد
سال نوزدهم- شماره ۹۵
آبان ۱۳۹۰

وصول: ۱۳۹۰/۵/۱۸
آخرین اصلاحات: ۱۳۹۰/۸/۱۵
پذیرش: ۱۳۹۰/۸/۱۶

مقدمه

سرطان پروستات از شایعترین سرطانها در دنیا بشمار می‌رود بطوریکه در بین مردان دومین علت مرگ ناشی از سرطان می‌باشد (۱). سرطان پروستات در واقع توموری وابسته به آندروژن است که محرومیت از آندروژن اغلب بعنوان اولین درمان برای بیماران دارای سرطان پیشرفته بکار می‌رود اما در ۲۰٪ موارد بیماران نسبت به درمان مقاوم می‌گردند به طوری که در مدت سه سال سرطان آنها تبدیل به کارسینومای غیروابسته به آندروژن می‌گردد که سریع‌انجبر به مرگ می‌شود (۲). چرا که سلولهای وابسته به آندروژن نظیر LNCaP و غیروابسته به آندروژن مانند DU-145 می‌توانند در ایجاد آن دخیل باشند (۳،۴،۵). MCP به نظر می‌رسد در پیشگیری و درمان سرطان متاستاتیک خصوصاً تومورهای توپر نظیر ملانوما و سرطانهای پروستات، کولون و پستان مؤثر باشد. دانشمندان معتقدند که MCP با استفاده از مهار دو فرآیند کلیدی دخیل در پیشرفت سرطان، عمل می‌نماید، آنژیوژن و متاستاز (۶،۷). پکتازول نوع خاصی از MCP است که تولید آن با استفاده از شرایط خاصی تحت کنترل دقیق وزن مولکولی و درجه استریفیکیشن انجام پذیرفت و در حال حاضر تنها براند MCP است که برای مطالعات کلینیکی بر روی انسان مورد تایید قرار گرفته است (۸). امروزه این ماده را بعنوان کاهش دهنده آنتی ژن پروستات^۲ (PSA) در بیماران مبتلا به سرطان پروستات می‌شناسند (۹،۱۰،۱۱). برای درمان سرطانها راههای مختلف درمانی وجود دارد از جمله شیمی‌درمانی که اغلب برای کنترل و درمان سرطان پروستات به کار می‌رود از جمله داروهای شیمی‌درمانی دوکسوروبیسین^۴ است که دارای طیف وسیع درمانی در انواع سرطانها از جمله سرطان پروستات می‌باشد. دوکسوروبیسین سبب تحریک آپوپتوز در سلولهای سرطانی پروستات می‌گردد (۱۲،۱۳). آپوپتوز یکی از انواع مرگ برنامه ریزی شده سلول می‌باشد (۹). درمان با دوز بالای دوکسوروبیسین سبب شکستن DNA در بیش از ۴۰٪ سلولهای LNCaP

به شکل وابسته به دوز و در دوزهای پایین سبب توقف چرخه سلولی در مرحله G1 از طریق مسیر P53 می‌شود (۱۴). چرخه سلولی فرایندی است که عبور از یک مرحله چرخه سلولی به مرحله دیگر توسط پروتئینهای مختلف از جمله کینازهای وابسته به سیکلین (CDK) با حداقل ۹ نوع (CDK1-CDK) پروتئینهای تنظیمی چرخه سلولی و پروتئینهای مهارکننده‌های سیکلینی (CKI) به عنوان تنظیم کننده‌های منفی آن با دو زیر مجموعه خانواده INK4 و Cip/Kip شامل پروتئینهای p21, p27 و p57 به شمار می‌رود (۱۵). در استفاده از دوکسوروبیسین در بیماران مبتلا به سرطان پروستات به علت دارا بودن عوارض جانبی نظیر مهار سیستم ایمنی و کاردیومیوپاتی و اثر روی سلولهای طبیعی دارای محدودیت در دوز مصرفی می‌باشد (۱۳). در پژوهش‌های اخیر نیز تمایل بر این است که این دارو همراه با داروهای گیاهی و طبیعی مصرف گردد تا در صورت امکان مقدار دوز این دارو کاهش یابد (۱۴،۱۳) که در این راستا درمان ترکیبی MCP با Dox مورد توجه قرار گرفته است (۱۶). مکانیسم عمل دقیق MCP هنوز کاملاً شناخته شده نیست اما آزمایش‌ها نشان می‌دهد که MCP می‌تواند موجب توقف چرخه سلولی و آپوپتوز سلول‌های سرطانی گردد (۹). طبق تحقیقات انجام شده پکتازول MCP می‌تواند سبب تحریک آپوپتوز و مهار پرولیفراسیون در سلولهای سرطانی پروستاتی وابسته و غیر وابسته به آندروژن در انسان و موش گردد. Jan Yan در سال ۲۰۱۰ گزارش نمود که MCP می‌تواند سبب مهار پرولیفراسیون و آپوپتوز در رده‌های سلولی LNCaP, PC3, CASP2.1, CASP1.1 و BPH-1 گردد که از طریق مهار فعالیت MAP Kinase، افزایش سطح بیان پروتئین پروآپوپتوتیک Bim و تحریک کاسپاز ۳- در سلولهای PC3 و CASP1.1 عمل می‌نماید (۱۶). هدف این پژوهش بررسی اثر MCP (پکتازول) و دوکسوروبیسین (Dox) بر کاهش میزان زیستایی و نیز تاثیر آن بر آپوپتوز و چرخه سلولی در دودمان سلولی سرطان پروستات انسانی یعنی DU-145 و LNCaP است.

دمای ۴۰c برای دو ساعت در محیط بدون نور قرار گرفتند سپس ماده PI به آنها اضافه شد و نیم ساعت در دمای ۳۷ oc قرار گرفتند و سپس چرخه سلولی با استفاده از دستگاه فلوسایتومتری و برنامه فلوماکس بررسی شد.

روشهای آماری

روش ANOVA یکطرفه با ($P < 0.05$) انجام شد تکرار برای هر آزمایش حداقل سه بار انجام شده است. برای انجام تجزیه و تحلیل از نرم افزار SPSS 13 استفاده شد.

نتایج

مورفولوژی سلولهای DU-145

سلولهای DU145 بلافاصله پس از قرار گیری در محیط کشت و قبل از چسبیدن به کف منظره ای گرد و شناور نشان می دهند

این سلولها پس از ۲۴ ساعت قرار گرفتن در محیط کشت در صورت مناسب بودن شرایط به کف فلاسک می چسبند و شروع به تقسیم شدن می کنند. (شکل ۱)

سلولهای LNCaP بلافاصله پس از قرار گیری در محیط کشت و قبل از چسبیدن به کف ظرف گرد و شناور هستند.

این سلولها پس از ۲۴ ساعت قرار گرفتن در محیط کشت مناسب به کف فلاسک می چسبند و شروع به تقسیم شدن می کنند، از نظر مورفولوژی کشیده و دارای زواید می باشند. در این زمان اغلب سلولهای در حال تقسیم شدن در بین آنها مشاهده می گردند (شکل ۲).

مواد و روشها

دودمانهای سلولی و مواد:

دو دودمان سلولی DU-14 و LNCaP سرطان پروستات انسانی از بانک سلولی ایران (NCBI) تهیه شد و در RPMI-۱۶۴۰ و سرم جنین گاو (FBS) ال-گلوتامین ۱ درصد، پنی سیلین ۱۰۰ IU/ml، استرپتومایسین ۱۰۰ µg/ml در دمای ۳۷ oc و ۵ درصد و رطوبت ۹۵- ۹۰ درصد کشت داده شد ۱۰۰ mg. محلول استوک 10mg/mh، MCP از Econugenies.cost.Loismo و دوکسوروبیسین از FBEWE pharma تهیه شد.

تعیین مورفولوژی و اندازه گیری مهار رشد سلولی

با استفاده از روش MTT

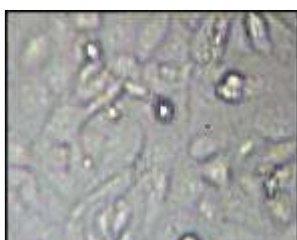
سلولهای DU-145 و LNCaP با تراکم 1X10⁵ سلول در هر چاهک (well) در پلیت ۹۶ تایی کشت داده شد. سلولها در فاز رشد بعد از یک شبانه روز نگهداری با تعویض محیط در غلظت های مختلف MCP (5 mg/ml - 3 - 1 - 0.5) و دوکسوروبیسین با غلظت های (500 nM - 250 - 100 - 50 - ۱۰۲۵) یا ترکیبی از هر دو دارو در ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت تحت تیمار قرار داده شدند و در انتهای هر مرحله، در ابتدا با استفاده از میکروسکوپ معکوس از سلولها عکسبرداری و سپس، زیستایی سلولی با استفاده از روش MTT در طول موج ۵۷۰ nM بوسیله اسپکتروفتومتر اندازه گیری شد. غلظت مورد نیاز جهت مهار رشد ۵۰ درصد سلولها (IC₅₀) با استفاده از منحنی Dose Response تعیین شد.

چرخه سلولی

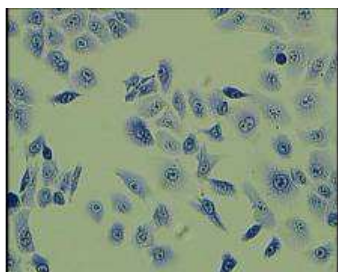
سلولها پس از کشت و تیمار با محیطهای مختلف (MCP/DOX و MCP، DOX) و با محلول متوقف کننده در



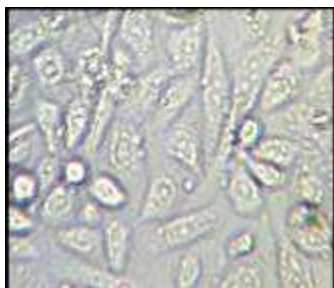
شکل ۱- سلول‌های DU145 پس از ۲۴ ساعت قرار گیری در محیط کشت. سلول‌ها به کف ظرف چسبیده اند و در حال دست و پا باز کردن می‌باشند. سلول‌های در حال تقسیم گرد هستند. (بزرگ نمایی X ۲۵۰).
سلول‌ها پس از سپری شدن مدت ۸ ساعت کاملاً به کف فلاسک چسبیده و کشیده شده اند و سلول‌های در حال تقسیم به وفور در بین آنها یافت می‌شود. (شکل ۲)



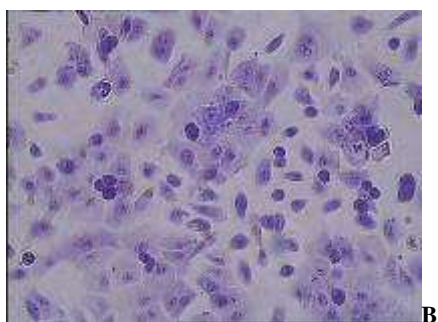
شکل ۲- سلول‌های DU145 پس از ۸ ساعت قرار گیری در محیط کشت (بزرگ نمایی X ۲۵۰).
سلول‌ها به طور کامل به کف ظرف چسبیده و کشیده شده اند. سلول‌ها ظاهری سنگفرشی را نشان می‌دهند.



شکل ۳- سلول‌های DU145 پس از رنگ آمیزی گیمسا. چند هستکی بودن این سلول‌ها پس از این رنگ آمیزی کاملاً مشخص است. (بزرگ نمایی X ۲۰)
مورفولوژی سلول‌های LNCaP



شکل 4-A - سلول‌های LNCaP پس از ۲۴ ساعت قرار گیری در محیط کشت.
سلول‌های LNCaP به کف ظرف چسبیده اند و در حال دست و پا باز کردن می‌باشند. سلول‌های در حال تقسیم گرد هستند. (بزرگ نمایی X ۲۵۰).

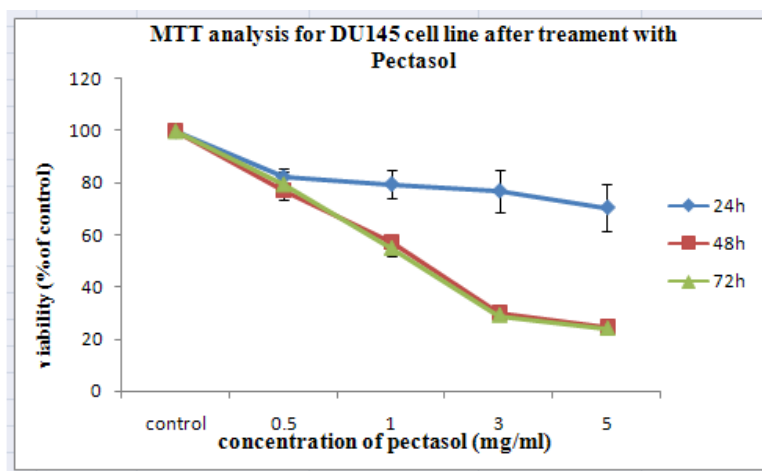


شکل B-4 - در تصویر سمت راست، مورفولوژی طبیعی سلول‌های LNCaP، بوسیله رنگ آمیزی گیمسا، نشان داده شده‌اند

اثر (MCP) PectaSol بر درصد زیستایی سلول‌های DU145 بوسیله تست MTT برای بررسی اثر MCP در غلظت‌های مختلف و زمانهای ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بر روی بقای سلول‌های DU145 از تست MTT استفاده شد. پس از تیمار سلول‌ها در غلظت‌های ۰/۵، ۱، ۳ و ۵ mg/ml زیستایی سلول‌ها خوانده شد.

همانطور که در شکل ۵ مشاهده می‌شود MCP در ۲۴ ساعت تیمار با غلظت‌های مختلف اختلاف معناداری را نشان نمی‌دهد ولی در زمانهای ۴۸ و ۷۲ ساعت زیستایی سلول در غلظت ۳ و ۵ mg/ml ارتباط معناداری را نشان می‌دهد ($p < 0.001$) که نشانه وابستگی به دوز است. درباره وابستگی به زمان باید گفت این اختلاف بین زمانهای ۲۴ ساعت با ۴۸ و ۷۲ ساعت معنادار است ($p < 0.01$) ولی بین زمانهای ۴۸ و ۷۲ ساعت اختلاف معناداری مشاهده نشد لذا زمان ۴۸ ساعت برای تیمارهای بعدی در نظر گرفته شد. بنابراین می‌توان اینگونه نتیجه‌گیری کرد که، درصد زیستایی سلول‌های DU145 تحت تأثیر MCP در یک حالت وابسته به دوز و زمان کاهش نشان می‌دهد ($p < 0.001$).

همانطور که در شکل ۵ مشاهده می‌شود MCP در ۲۴ ساعت تیمار با غلظت‌های مختلف اختلاف معناداری را نشان نمی‌دهد ولی در زمانهای ۴۸ و ۷۲ ساعت زیستایی سلول در غلظت ۳ و ۵ mg/ml ارتباط معناداری را نشان می‌دهد ($p < 0.001$) که نشانه وابستگی به دوز است. درباره وابستگی به زمان باید گفت این اختلاف بین زمانهای ۲۴ ساعت با ۴۸ و ۷۲ ساعت معنادار است



شکل ۵- اثر غلظت‌های متفاوت MCP بر درصد زیستایی سلول‌های DU145 پس از ۲۴، ۴۸/۷۲ ساعت انکوباسیون با استفاده از تست MTT. غلظت‌های ۳ و ۵ mg/ml MCP باعث کاهش معنی دار بقای سلول‌های تیمار نسبت به گروه کنترل شده است. مقادیر ارائه شده معادل $\text{mean} \pm \text{S.E.M}$ می‌باشند. ($n=3$ و $p < 0.001$)

اثر Dox بر درصد زیستایی سلول‌های DU145
 بوسیله تست MTT
 برای بررسی اثر غلظت‌های مختلف Dox در زمانهای ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تیمار بر روی بقای سلول‌های DU145 از تست MTT استفاده شد. پس از تیمار سلول‌ها در غلظت‌های ۱۰، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۵۰، ۵۰۰ nM، از Dox خوانده شد.

میزان IC50 پس از ۴۸ ساعت تیمار (بهترین زمان پاسخگویی) ۳ mg/ml برای MCP و ۲۵۰ nM برای دوکسوروبیسین به دست آمد (جدول ۳).

اثر ترکیبی دو داروی MCP و دوکسوروبیسین بر مهار رشد سلول‌های DU-145 با استفاده از تست MTT پس از ۴۸ ساعت تیمار

بررسی اثر ترکیبی دو داروی MCP و دوکسوروبیسین با استفاده از دوزهای فزاینده این دو دارو در مدت ۴۸ ساعت تیمار انجام گرفت. در آزمایش اول ۲۵۰ و ۲۵ nM از داروی دوکسوروبیسین در ۲۴ ساعت اول و سپس به آن ۳ mg/ml داروی MCP در ۲۴ ساعت دوم اضافه شد. نتیجه این مطالعه نشان می‌دهد که قدرت زیستایی سلول‌ها از میزان ۴۷،۰۴ درصد در تیمار با DOX به تهایی تا میزان درصد ۲۹،۳۶ در تیمار با ترکیب دو داروی MCP و DOX کاهش نشان داد (شکل ۶ و جدول ۲).

میزان IC50 ۱/۵ برابر کاهش نشان داد (جدول ۲). در آزمایش دوم ۲۵۰ nM دوکسوروبیسین و ۳ mg/ml MCP هم‌زمان برای ۴۸ ساعت بکار گرفته شد که سبب کاهش قدرت زیستایی سلول به میزان ۳۸/۶ درصد شد (جدول ۲).

اثر Dox بر درصد زیستایی سلول‌های DU145
 بوسیله تست MTT

برای بررسی اثر غلظت‌های مختلف Dox در زمانهای ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تیمار بر روی بقای سلول‌های DU145 از تست MTT استفاده شد. پس از تیمار سلول‌ها در غلظت‌های ۱۰، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۵۰، ۵۰۰ nM، از Dox خوانده شد.

Dox در ۲۴ ساعت تیمار با غلظت‌های مختلف اختلاف معناداری را نشان نمی‌دهد ولی در زمانهای ۴۸ ساعت و ۷۲ ساعت زیستایی سلول در غلظت‌های Dox، ۵۰۰، ۲۵۰، ۱۰۰ nM ارتباط معناداری را نشان می‌دهد ($p < 0.001$) که نشانه وابستگی به دوز است. درباره وابستگی به زمان باید گفت این اختلاف بین زمانهای ۲۴ ساعت با ۴۸ و ۷۲ ساعت معنادار است ($p < 0.02$) ولی بین زمانهای ۴۸ و ۷۲ ساعت اختلاف معناداری مشاهده نشد لذا زمان ۴۸ ساعت برای تیمارهای بعدی در نظر گرفته شد. بنابراین می‌توان اینگونه نتیجه گیری کرد که، درصد زیستایی سلول‌های DU145 تحت تأثیر Dox در یک حالت وابسته به دوز و زمان کاهش نشان می‌دهد ($p < 0.001$).

اثر MCP و Dox بر مهار رشد سلول‌های DU-145 با استفاده از تست MTT پس از ۴۸ ساعت تیمار تیمار سلول‌های DU-145 به مدت ۴۸ ساعت با دوزهای مختلف MCP (۰.۵-۵ mg/ml) و دوکسوروبیسین

جدول ۱. اثر دوکسوروبیسین و MCP بر زیستایی دوزده سلولی DU-145 و LNCaP بعد از ۴۸ ساعت تیمار

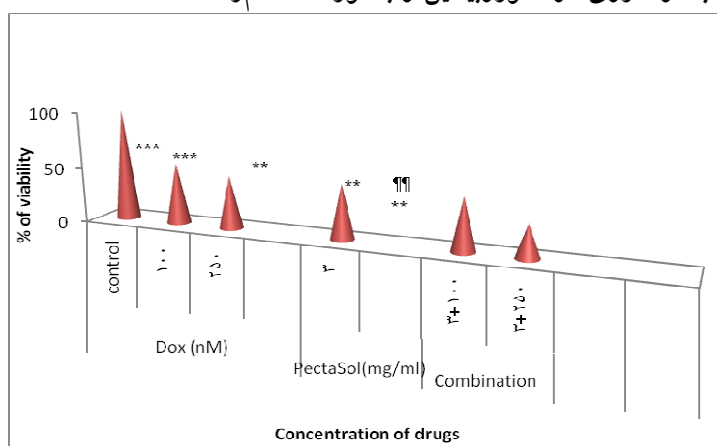
رده سلولی	ماده درمانی	دوز دارویی	میزان کاهش زیستایی درصد	IC50	P.value
DU-145	Dox	10-500Nm	24-76.3	250Nm	0.001
	PectaSol	0.5-5mg.ml	23-75.3	3mg/ml	0.001
LNCaP	Dox	10-500nM	15-67	290nM	0.001
	PectaSol	1-10mg.ml	22-65	4mg/ml	0.001

جدول ۲. اثر ترکیبی دو داروی دوکسوروبیسین و MCP بر زیستایی دو رده سلولی DU-145 و LNCaP بعد از ۸ ساعت تیمار

P.val	میزان کاهش IC50	میزان زیستایی درصد	دوز دارویی	ماده درمانی	دودمان سلولی
0.001		55.02	100Nm	Dox	DU-145
0.001		47.04	250 nM		
0.001		49.08	3mg/ml	Pectasol	
0.001		47.24	100nM+3mg/ml	Dox+Pectasol	
0.001	1.5 fold	29.36	250nM+3mg/ml		
0.001		28.6	250nM/3mg/ml	Dox/Pectasol	
0.001		62	100 Nm	Dox	LNCaP
0.001		52.25	290 nM		
0.001		53.21	4mg/ml	Pectasol	
0.001		52.50	100nM+4mg/ml	Dox+Pectasol	
0.001	1.3 fold	32.50	290nM+4mg/ml		
0.001		31.6	290nM/4mg/ml	Dox/Pectasol	

Dox+Pectasol = تیمار با داروی دوکسوروبیسین برای ۲۴ ساعت اول و سپس افزودن MCP برای ۲۴ ساعت دوم

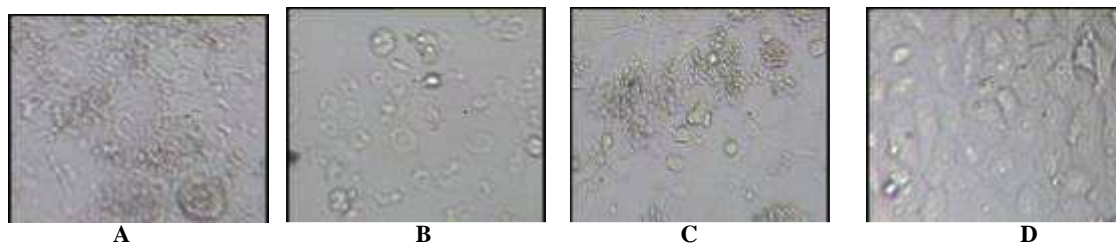
Dox/Pectasol = تیمار با دو داروی دوکسوروبیسین و به طور Dox هم زمان



شکل ۶- درصد زیستایی سلول های DU-145 پس از ۸ ساعت تیمار با غلظت های مختلف MCP و دوکسوروبیسین یا ترکیبی از دو دارو. - زیستایی سلول ها با استفاده از روش MTT. - ترکیب هر دو ماده باعث افزایش معنی دار مهار تکثیر سلول های تحت تیمار نسبت به گروه کنترل شده است. - مقادیر ارائه شده نتیجه حداقل سه بار آزمایش مستقل و به صورت $mean \pm S.E.M$ می باشند.

*P<0.05 vs control

¶P<0.05 vs 250nM Doxorubicin+3mg/ml Pectasol.



شکل ۷- تغییرات مورفولوژیکی سلول های DU-145 پس از تیمار با محیط های مختلف

A- Pectasol 3 mg/ml + 250nM Dox اثر چروکیده، گرانوله و کوچک شدن سلول ها.

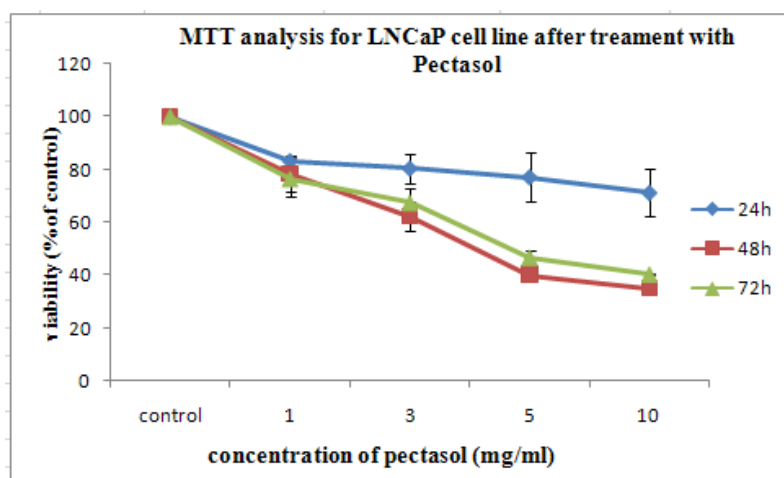
B- Doxorubicin 250nM اثر چروکیده شدن سلول ها.

C- 3mg/ml Pectasol اثر گرانوله و کوچک شدن سلول ها

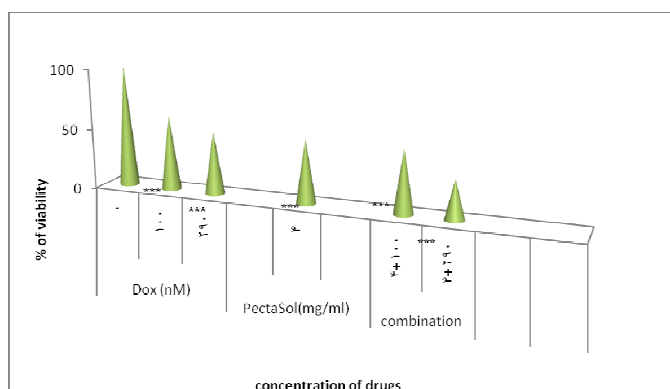
D- گروه کنترل



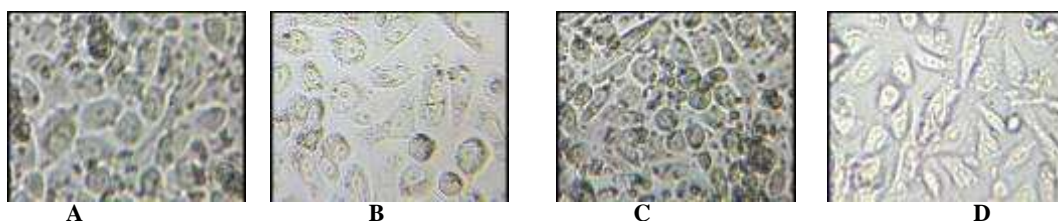
شکل ۸- تغییرات مورفولوژیکی سلول‌ها پس از تیمار با MCP ۳ mg/ml / Dox 250 nM، کاهش حجم سلول، گرانوله شده سلول‌ها و پروکیده شدن غشای سلولی در این تصاویر با رنگ آمیزی گیمسا، قابل مشاهده است.



شکل ۹- اثر غلظت‌های متفاوت MCP بر درصد زیستایی سلول‌های LNCaP پس از ۲۴، ۴۸، ۷۲ ساعت انکوباسیون با استفاده از تست MTT. غلظت‌های ۳ و ۵ mg/ml MCP باعث کاهش معنی دار بقای سلول‌های تحت تیمار نسبت به گروه کنترل شده است. مقادیر ارائه شده معادل $\text{mean} \pm \text{S.E.M}$ می‌باشند. ($n=3$ و $p<0.001$)



شکل ۱۰- کردار درصد زیستایی سلول‌های LNCaP پس از ۴۸ ساعت تیمار با غلظت‌های مختلف MCP و دوکسوروبیسین یا ترکیبی از دو دارو. زیستایی سلول‌ها با استفاده از روش MTT مورد ارزیابی قرار گرفت. ترکیب هر دو ماده باعث افزایش معنی دار مهار تکثیر سلول‌های تحت تیمار نسبت به گروه کنترل شده است. مقادیر ارائه شده نتیجه حداقل سه بار آزمایش مستقل و به صورت $\text{mean} \pm \text{S.E.M}$ می‌باشند. $*P<0.05$ vs untreated cells (control).



شکل - ۱۱ D.C.B.A - تغییرات مورفولوژیکی سلول‌های LNCaP پس از تیمار با محیط‌های مختلف

A- PectaSol 4 mg/ml + 290nM Dox ۲۹۰ نانومول و کوچک شدن سلول‌ها.

B- Doxorubicin 290nM چروکیده شدن سلول‌ها.

C- 4mg/ml PectaSol گرانوله و کوچک شدن سلول‌ها

D- گروه کنترل



شکل ۱۲- تغییرات مورفولوژیکی سلول‌ها پس از تیمار با MCP ۲۹۰nM Dox/mg/ml کاهش حجم سلول، گرانوله شده

سلول‌ها و چروکیده شدن غشای سلولی در این تصاویر با رنگ آمیزی گیمسا، قابل مشاهده است.

جدول ۳. اثر MCP و دوکسوروبیسین بر پیشرفت چرخه سلولی در رده سلولی DU-145 و LNCaP با روش فلوسایتومتری

رده سلولی	ماده درمانی	دوز دارویی	SubG1 در صد	G1 در صد	S در صد	G2M در صد
DU-145	Cont (کنترل)	250nM Dox	۱۷/۲	۴۳/۲	۳۰/۵	۸/۷
	PectaSol	3mg/ml	۱۲/۲	۲۳/۵	۵۴/۵	۲۰/۵
	Dox+PectaSol	250nM+3mg/ml	۴۶/۹	۱۹/۹	۱۵	۸/۲
	PectaSol+Dox	3mg/ml+250nM	۴۵/۳	۱۸/۶	۲۲/۱	۲/۳
	Doxo/PectaSol	250nM/3mg/ml	۵۴/۶	۲۴/۵	۱۵/۷	۱۲/۶
LNCaP	Cont (کنترل)	290nM Dox	۷/۷	۶/۱	۱۰/۸	۳۰
	PectaSol	4mg/ml	۱۳/۸	۸/۳	۶/۴	۵۳/۵
	Doxo+PectaSol	290nM+4mg/ml	۳/۶	۲/۱	۷/۱	۴۶/۲
	PectaSol+Dox	4mg/ml+290nM	۲/۱	۱۸/۲	۲۱/۷	۴۲/۹
	Doxo/PectaSol	290nM/4mg/ml	۱۶/۲	۶/۹	۳/۲	۶۱/۶
			۳/۵	۴/۴	۲۴/۱	۵۲/۵

اثر (MCP/PectaSol) بر درصد زیستایی سلول‌های

LNCaP بوسیله تست MTT

برای بررسی اثر MCP در غلظت‌های مختلف و زمانهای ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بر روی بقای سلول‌های DU145 از تست MTT استفاده شد. پس از تیمار سلول‌ها

در غلظت‌های ۱، ۰.۳ و ۱۰ mg/ml از MCP، زیستایی سلول‌ها بررسی شد.

همانطور که در شکل ۹ مشاهده می‌شود MCP در ۲۴ ساعت تیمار با غلظت‌های مختلف اختلاف معناداری را نشان نمی‌دهد ولی در زمانهای ۴۸ ساعت و ۷۲ ساعت زیستایی سلول در غلظت ۳ mg/ml و ۰.۳ mg/ml ارتباط معناداری

سلول‌ها در غلظت‌های 10، 25، 50، 100، 250 و 500 nM از Dox، سلول‌ها توسط رنگ MTT انکوبه شدند و جذب آنها در طول موج 570 nm توسط دستگاه میکروپلیت ریدر خوانده شد. (جدول ۳)

Dox در ۲۴ ساعت تیمار با غلظت‌های مختلف اختلاف معناداری را نشان نمی‌دهد ولی در زمانهای ۴۸ ساعت و ۷۲ ساعت زیستایی سلول در غلظت‌های Dox، 500 nM، 250، 100 ارتباط معناداری را نشان می‌دهد ($p < 0.001$) که نشانه وابستگی به دوز است. درباره وابستگی به زمان باید گفت این اختلاف بین زمانهای ۲۴ ساعت با ۴۸ و ۷۲ ساعت معنادار است ($p < 0.02$) ولی بین زمانهای ۴۸ و ۷۲ ساعت اختلاف معناداری مشاهده نشد لذا زمان ۴۸ ساعت برای تیمارهای بعدی در نظر گرفته شد. بنابراین می‌توان اینگونه نتیجه‌گیری کرد که، درصد زیستایی سلول‌های LNCaP تحت تأثیر Dox در یک حالت وابسته به دوز و زمان کاهش نشان می‌دهد ($p < 0.001$).

آثار MCP و دوکسوروبیسین بر مهار رشد رده سلولی LNCaP پس از ۴۸ ساعت تیمار با استفاده از MTT تیمار سلول‌های LNCaP به مدت ۴۸ ساعت با دوزهای مختلف MCP (۱-۱۰ mg/ml) و دوکسوروبیسین (۵۰۰-۱۰۰ nM) موجب کاهش چشمگیری در قدرت تکثیر و زیستایی سلول‌ها به میزان ۶۵ درصد - ۲۲ با ($P < 0.001$) و ۶۵ درصد - ۱۵ ($P < 0.001$) شد (جدول ۱).

میزان IC50 برای سلول‌های LNCaP عبارت است از ۲۹۰ nM برای دوکسوروبیسین و ۴ mg/ml برای MCP. (جدول ۱)

اثر ترکیبی دو داروی MCP و دوکسوروبیسین بر مهار رشد سلول‌های LNCaP با استفاده از تست MTT پس از ۴۸ ساعت تیمار

بررسی اثر ترکیبی دو داروی MCP و دوکسوروبیسین با استفاده از دوزهای فزاینده این دو دارو در مدت ۴۸ ساعت تیمار انجام گرفت. در آزمایش اول ۱۰۰ nM و ۲۹۰ از داروی دوکسوروبیسین در ۲۴ ساعت اول و

را نشان می‌دهد ($p < 0.001$) که نشانه وابستگی به دوز است. درباره وابستگی به زمان باید گفت این اختلاف بین زمانهای ۲۴ ساعت با ۴۸ و ۷۲ ساعت معنادار است ($p < 0.02$) ولی بین زمانهای ۴۸ و ۷۲ ساعت اختلاف معناداری مشاهده نشد لذا زمان ۴۸ ساعت برای تیمارهای بعدی در نظر گرفته شد. بنابراین می‌توان اینگونه نتیجه‌گیری کرد که، درصد زیستایی سلول‌های DU145 تحت تأثیر MCP در یک حالت وابسته به دوز و زمان کاهش نشان می‌دهد ($p < 0.001$).

عکسبرداری از سلول‌های DU145 پس از تیمار با MCP و رنگ آمیزی گیمسا

به منظور بررسی دقیقتر تغییرات مورفولوژیکی سلول‌های DU-145 پس از تیمار، تعداد 5×10^5 سلول را روی کاور اسلیپ کشت داده و سپس توسط غلظت‌های ۱، ۰، ۵، ۱۰، ۳ mg/ml از مشتقات پکتینی تیمار کردیم. پس از گذشت ۴۸ ساعت از تیمار سلول‌ها، آنها را رنگ آمیزی گیمساکرده و با میکروسکوپ نوری بررسی کردیم. از این سلول‌ها عکسبرداری شد که مؤید تغییرات مورفولوژیکی مشاهده شده با میکروسکوپ اینورت در بخش قبل است. (شکل ۸)

اثر MCP و Dox بر مورفولوژی سلول‌های DU-145 پس از ۴۸ ساعت تیمار

از نظر مورفولوژی نیز همان‌طور که در شکل 7 مشاهده می‌شود تیمار با دوز 250 nM دوکسوروبیسین سبب چروکیده شدن سلول‌ها و تیمار با دوز ۳ mg/ml پکتازول موجب گرانوله و کوچک شدن سلول‌ها شد در حالی که تیمار با ترکیب دو داروی پکتازول و دوکسوروبیسین باعث هم چروکیده شدن و هم گرانوله و کوچک شدن سلول‌های DU-145 شد.

اثر Dox بر درصد زیستایی سلول‌های LNCaP بوسیله تست MTT

برای بررسی اثر غلظت‌های مختلف Dox در زمانهای ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تیمار بر روی بقای سلول‌های LNCaP از تست MTT استفاده شد. پس از تیمار

توقف چرخه سلولی در مرحله S(54,5 درصد در مقابل 30,5 درصد در مقایسه با گروه کنترل) شد. نکته جالب توجه اینکه تیمار با MCP پس از تیمار با دوکسوروبیسین سبب توقف چشمگیر سیکل سلولی در مرحله SubG1 شد (45,3 درصد در مقایسه با دوکسوروبیسین به تنهایی 12,2 درصد) تیمار با دوکسوروبیسین پس از تیمار با MCP منجر به افزایش توقف چرخه سلولی در مرحله SubG1 (54,6 درصد در مقایسه با دوکسوروبیسین به تنهایی 12,2 درصد) شد. تیمار سلول‌ها با هر دو داروی دوکسوروبیسین و MCP هم‌زمان برای 48 ساعت، سبب توقف قویتر چرخه سلولی در مرحله S/G1 (35,5 درصد و 33 درصد) شد (جدول-3).

آثار MCP و دوکسوروبیسین بر پیشرفت چرخه سلولی در رده سلولی LNCaP

در سلول‌های LNCaP تیمار با MCP و دوکسوروبیسین و ترکیب دو دارو به هر سه صورت 24 ساعت اول MCP سپس برای 24 ساعت دوم دوکسوروبیسین و برعکس و یا به‌طور هم‌زمان پس از 48 ساعت سبب مهار چرخه سلولی در مرحله G2M شد. (جدول 3).

به‌رغم بیلینها دلار هزینه تحقیقات در سال، هنوز سرطان دومین عامل مرگ در جهان بشمار می‌رود. یکی از علل کشنده بودن کانسر تمایل آن برای متاستاز به سایر ارگانهای بدن است. متاسفانه تاکنون امکانات کمی برای جلوگیری از متاستاز سرطان در اختیار است. یک پلی ساکارید میوه ای مخصوص تحت عنوان پکتین تغییر شکل یافته مرکبات یک موقعیت استثنایی برای جلوگیری از تجمع، چسبندگی و متاستاز سلول‌های سرطانی را فراهم کرده است. 1. تحقیقات بالینی نشان می‌دهد که پکتین سبب محدود کردن پیشرفت بیماری در مردان دچار سرطان پیشرفته پروستات می‌شود. MCP بنظر می‌رسد در پیشگیری و درمان سرطان متاستاتیک به‌خصوص، تومورهای توپر نظیر ملانوما و سرطانهای پروستات، کولون و پستان مؤثر

سپس به آن 4 mg/ml داروی MCP در 24 ساعت دوم اضافه شد. نتیجه این مطالعه نشان می‌دهد که قدرت زیستایی سلول‌ها از میزان 52,25 درصد در تیمار با DOX به تنهایی تا میزان 32,55 درصد در تیمار با ترکیب دو داروی MCP و DOX کاهش نشان داد (شکل 10 و جدول 2).

میزان IC50 در سلول‌های LNCaP 1/3 برابر کاهش نشان داد (جدول 2). در آزمایش دوم 290 nm دوکسوروبیسین و 4 mg/ml MCP هم‌زمان برای 48 ساعت بکار گرفته شد که سبب کاهش قدرت زیستایی سلول به میزان 16/6 درصد شد (جدول 2) از نظر مورفولوژی نیز همان‌طور که در شکل 11- D.C.B.A مشاهده می‌شود تیمار با دوز 290 nM دوکسوروبیسین سبب چروکیده شدن سلول‌ها و تیمار با دوز 4 mg/ml پکتازول موجب گرانبه و کوچک شدن سلول‌ها شد در حالی که تیمار با ترکیب دو داروی پکتازول و دوکسوروبیسین باعث هم چروکیده شدن و هم گرانبه و کوچک شدن سلول‌های LNCaP شد.

عکسبرداری از سلول‌های LNCaP پس از تیمار با MCP و رنگ آمیزی گیمسا

به‌منظور بررسی دقیقتر تغییرات مورفولوژیکی سلول‌های LNCaP پس از تیمار، تعداد 5x10⁵ سلول را روی کاور اسلیپ کشت داده و سپس توسط غلظت‌های 1، 4 mg/ml از مشتقات پکتینی تیمار کردیم. پس از گذشت 48 ساعت از تیمار سلول‌ها، آنها را رنگ آمیزی گیمسا کرده و با میکروسکوپ نوری بررسی کردیم. از این سلول‌ها عکسبرداری شد که مؤید تغییرات مورفولوژیکی مشاهده شده با میکروسکوپ اینورت در بخش قبل است. (شکل 12)

آثار MCP و دوکسوروبیسین بر پیشرفت چرخه سلولی در رده سلولی DU-145

در سلول‌های DU-145 تیمار با MCP پس از 48 ساعت سبب توقف چرخه سلولی در مرحله SubG1 (46,97 درصد در مقابل 17,29 درصد در مقایسه با گروه کنترل) شد. در حالی که تیمار با دوکسوروبیسین سبب

مستقل از آندروژن و LNCaP وابسته به آندروژن پرداختیم.

یافته‌های پژوهش حاضر نشان می‌دهد که MCP به‌طور موجب افزایش اثر درمانی دوکسوروبیسین بردودمانهای سلول‌های سرطان پروستات انسانی از طریق کاهش قدرت زیستایی و تکثیر سلول‌ها می‌شود. در این ترکیب دو ماده MCP و دوکسوروبیسین با هم کاهشی ۱,۵ برابری در سلول‌های DU-145 و ۱,۳ برابری در میزان IC50 در سلول‌های LNCaP ایجاد کرد. همین‌طور دوز IC50 ترکیب این دو دارو سبب هم گرانوله و کوچک شدن و هم چروکیده شدن هر دو دودمان سلولی شد. نظر به اینکه داروی شیمیایی دوکسوروبیسین دارای عوارض جانبی نظیر مهار سیستم ایمنی و کاردیومیوپاتی است کاهش مقدار این دارو موجب کم شدن عوارض جانبی ذکر شده در بیمار می‌شود و محدودیت بکار بردن این دارو را در شیمی درمانی کمتر می‌کند. [13] در همین راستا شیمی درمانی ترکیبی مورد توجه بیشتری قرار گرفته است تا بتوان به ترکیباتی دست یافت که با مکانیسم شناخته شده سبب افزایش اثر درمانی و کاهش دوز موثر داروهای ضد سرطانی کلینیکی گردد [13]. سایر مطالعات نشان داده که MCP می‌تواند از طریق افزایش حساسیت سلول‌ها به این داروها و کاهش IC50 دوکسوروبیسین تا ۱۰,۷ برابر در سلول‌های آنژیوسارکوما انسانی و همانژیوسارکوما عمل کند. [14]

یافته‌های مطالعه حاضر نشان می‌دهد که MCP به‌طور سینرژیستی اثر درمانی دوکسوروبیسین را در سرطان پروستات انسانی افزایش می‌دهد که این عمل در سلول‌های DU-145 از طریق تحریک آپوپتوز (توقف در مرحله G2M) و در سلول‌های LNCaP از طریق تحریک مهار چرخه سلولی (توقف در مرحله G2M) انجام می‌شود. Tyagi AK و همکارانش در سال ۲۰۰۲ گزارش کردند که دوکسوروبیسین به تنهایی سبب توقف چرخه سلولی در مرحله G2M در سلول‌های DU-145 می‌شود [12]. Bar-on و همکارانش در سال ۲۰۰۷

باشد. دانشمندان معتقدند که MCP با استفاده از مهار دو فرآیند کلیدی دخیل در پیشرفت سرطان، آنژیوزنز و متاستاز عمل می‌کند. ۲. طبق تحقیقات انجام شده MCP می‌تواند سبب تحریک آپوپتوز و مهار پرولیفراسیون در سلول‌های سرطانی پروستاتی وابسته و غیر وابسته به آندروژن در انسان و موش گردد. Jan Yan در سال ۲۰۱۰ گزارش کرد که MCP می‌تواند سبب مهار پرولیفراسیون و آپوپتوز در رده‌های سلولی PC3, LNCaP, CASP1.1, CASP2.1, BPH-1 گردد که از طریق مهار فعالیت MAP Kinase، افزایش سطح بیان پروتئین پروآپوپتوتیک Bim و تحریک کاسپاز ۳- در سلول‌های PC3 و CASP1.1 عمل می‌کند. در سال ۲۰۰۰ هاشی ۱ و همکارانش به این نتیجه رسیدند که، اندازه تومور کولون کاشته شده در موش‌ها، با مصرف خوراکی MCP، کاهش نشان می‌دهد. [17] در ضمن طبق بررسی مادار ۲ و همکارانش در سال ۲۰۰۱ رژیم غذایی غنی از پکتین موجود در پوست پرتقال (۱۵ درصد) بر روی موش‌هایی که مورد تزریق دی متیل هیدرازین قرار گرفته بودند، کاهش تعداد endophytic tumors و فعال شدن کاسپاز ۳ و همچنین افزایش فعالیت T cell killers در تومورها، را نشان داد که همه این خصوصیات بیانگر اثر ضد توموری پکتین‌ها می‌باشند. (۱۸) علاوه بر اینها در همین سال تحقیقات نشان داد که apoptotic index کولون، در موش‌هایی که ۱۵ درصد پکتین مرکبات در رژیم غذایی خود مصرف کنند، میزان بالاتری دارد. این حالت به علت کاهش بیان پروتئین آنتی آپوپتوزی Bcl-2 و هم‌زمان فعال شدن کاسپاز ۱ و آنزیم PARP۳ به‌عنوان سوسترای کاسپازها، تشخیص داده شد. در ضمن پکتین‌ها فعالیت ضد موتازنی را بر علیه ترکیبات نیترو آروماتیک نشان دادند. [19 و 20 و 21 و 22] در این تحقیق به بررسی آثار MCP روی پرولیفراسیون سلول‌های سرطانی پروستات DU-145

1. Hayashi, A.
2. Madar, Z.
3. poly(ADP)ribose polymerase

منابع

1. Kaighn ME. Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC3). *Invest. Urol.* (1979); 17: 16-23
2. Charrier JP. Two-dimensional antigen in sera of men with prostate cancer or benign prostate hyperplasia. *Electrophoresis.* (1999); 20:1075-81
2. Joanne Nicholas, Modified Citrus Pectin, Life Extension Site. March; 2009.
3. Glinsky V.V and Raz A: Modified citrus pectin anti-metastatic properties: one bullet, multiple targets. *Carbohydr Res.* 2009; 344(14):1788-1791.
5. Elsadek B, Graeser R, N Esser N, Schäfer-Obodozie C, Tsurumi C and Abu Ajaj K: In vivo evaluation of a novel albumin-binding prodrug of doxorubicin in an orthotopic mouse model of prostate cancer (LNCaP). *Prostate Cancer and Prostatic Diseases.* 2011 ; 14: 14-21.
6. Sanches C, Mendoza P, Contreras HR, and Vergara J: Expression of Resistance Proteins in Prostate Cancer Is Related With Cell Sensivity to Chemotherapeutic Drugs. *The Prostate.* 2009; 69: 1448-1459.
7. Nehme A, Varadarajan P, and Sellakumar G: Modulation docetaxel-induced apoptosis and cell cycle arrest by all-trans retinoic acid in prostate cancer cells. *British Journal of Cancer.* 2001 ;84(11): 1571-1576.
8. Kang J, Bu J, Hao Y, and Chen F: Subtoxic concentration of doxorubicin enhances TRAIL-induced apoptosis in human prostate cancer cell line LNCaP. *Prostate Cancer and Prostatic Diseases.* 2005; 8: 274-279.
9. Stone KR. Isolation of a human prostate carcinoma cell line (DU145). *Int. J. cancer.* (1978) ; 21:274-81.
10. Charrier JP. Two-dimensional antigen in sera of men with prostate cancer or benign prostate hyperplasia. *Electrophoresis.* (1999) ; 20:1075-81.
11. Horoszewicz JS. LNCaP moder of human prostatic carcinoma. *Cancer Res.* (1983) ; 43: 1809-18.
12. Tyagi AK, Singh RP, Agrawal C, Chan DCF and Agrawal R: Silibinin induced Growth Inhibition. G2-M Arrest. and Apoptosis. *Clinical Cancer Research.* 2002 ;8: 3512-3519.
13. Collins L, Zhu T, GUO J, Xiao ZJ and Chen C-Y: Phellinus Linteus Sensitises apoptosis induced by doxorubicin in prostate cancer. *British Journal of Cancer.* 2006;95: 282-288.
14. Johnson KD, Glinskii OV, Mossin VV and Turk JR: Galactin-3 as a potential therapeutic target in tumors Arising from Malignant. Neoplasia . 2007;9(8): 662-670.
15. Lodish s, Alberts F, Second Edition, Cellular & Molecular Biology, 348-362.
16. Yan J and Katz A16. PectaSol-C modified citrus pectin induces apoptosis and inhibition of proliferation in human and mouse androgen-dependent and -independent prostate cancer cells. *Integr Cancer Ther.* 2010 ;9(2): 197-203.

نشان دادند که دوکسوروبیسین سبب تحریک مهار در مرحله G2M در سلول‌های MDA-MB-BT و G1/S و در سلول‌های MCF-7 سرطان پستان می‌شود [23]. MCP نیز می‌تواند سبب افزایش پاسخ آپتوتوتیک سلول‌های توموری به شیمی‌درمانی شود. [14] نتیجه‌گیری: براساس یافته‌های ما MCP می‌تواند سبب تقویت اثر سایتوتوکسیک دوکسوروبیسین روی رده‌های سلولی سرطانی

DU-145 و LNCaP سرطان پروستات گردد که این امر در ارتباط با افزایش اثر سایتوتوکسیستی پیشرونده دوکسوروبیسین و MCP به صورت همراه با هم در تحریک مرگ سلولی از طریق آپتوتوز (Sub-G1) در رده سلولی DU-145 و توقف چرخه سلولی در رده سلولی LNCaP (G2-M) است که می‌تواند با دوز پایین و عوارض جانبی کم قابل دسترسی باشد.

تقدیر و تشکر

حمایت مالی این پروژه توسط معاونت محترم پژوهشی پردیس علوم دانشگاه تهران انجام گرفت. نویسندگان از خانمها زیبا مقبولی و مریم مبینی بدلیل همکاری در کارهای آزمایشگاهی تقدیر و تشکر می‌کند.

17. Hayashi, A. Effects of daily oral administration of quercetin chalcone and modified citrus pectin. *Altern. Med. Rev.* (2000); 5: 546–552.
18. Kossoy G. Effects of a 15% orange-pulp diet on tumorigenesis and immune response in rats with colon tumors. *Oncol Rep.* (2001); 8:1387-1391.
19. Avivi-Green C. Dietary regulation and localization of apoptosis cascade proteins in the colonic crypt. *J Cell Biochem.*(2000); 77:18-29
20. Avivi-Green C. Apoptosis cascade proteins are regulated in vivo by high intracolonic butyrate concentration: correlation with colon cancer inhibition. *Oncol Res.* (2000) ; 12:83-95.
21. Avivi-Green, C. Pectin-enriched diet affects distribution and expression of apoptosis cascade proteins in colonic crypts of dimethylhydrazine-treated rats. *Int. J. Mol. Med.*(2000); 6: 689–698.
22. Hensel, A. and Meier, K. Pectins and xyloglucans exhibit antimutagenic activities against nitroaromatic compounds. *Planta Med.* (1999); 65: 395–399.
23. Bar-On O, Shapira M, and Hershko DD: Differential effect of doxorubicin treatment on cell cycle arrest and SKP2 expression in breast Cancer cells. *Anticancer Drugs*, 2007;18(10): 1113-1121.
24. Jackson CL, Dreaden TM, Theobald LK, Tran NM, Beal TL and Eid M: Pectin induces apoptosis in human prostatic cancer cells: correlation of apoptotic function with pectin structure. *Glycobiology*, 2007;17(8): 805-819 Strongly Synergizes Human Prostate Carcinoma DU-145 Cells to Doxorubicin-.

Daneshvar

Medicine

*Scientific-Research
Journal of Shahed
University
Seventeenth Year,
No.95
October, November
2011*

Received: 9/8/2011

Last revised: 6/11/2011

Accepted: 7/11/2011

The effect of modified citrus pectin (MCP) on viability, morphology, and cell cycle arrest of DU-145 and LNCaP prostate cancer cell lines

Najmeh Tehranian¹, Houri Sepehri^{*2}, Firouzeh Biramijamal³, parvin Mehdipour⁴, Arash Hossein-Nezhad⁵, Abdolfattah Sarrafnejad⁶, Ebrahim Hajizadeh⁷, Ladan Delphi⁸

1. Animal Biology Department, School of Biology, Faculty of Sciences, Tehran University, Tehran, Iran.

2- Professor, Animal Biology Department, School of Biology, Faculty of Sciences, Tehran University, Tehran, Iran.

3. Associate Professor, National Institute of Genetic Engineering & Biotechnology, Tehran, Iran.

4- Professor, Department of Medical Genetics, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

5- Assistant Professor, Bio & Nanotechnology Department, Endocrinology and Metabolism Research Center, Shariati Hospital, Tehran university of Medical Sciences, Tehran, Iran.

6- Professor, Department of Pathology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

7- Associate Professor, Department of Biostatistics, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

8- Professor, Animal Biology Department, School of Biology, Faculty of Sciences, Tehran, Iran.

E-mail: sepehri@khayam.ut.ac.ir

Abstract

Background and Objective: This study was conducted to evaluate the effect of PectaSol on modification of Doxorubicin (Dox) cytotoxicity and apoptosis and cell cycle in prostate cancer cell lines (DU-145 & LNCaP)

Materials and Methods: Human prostate carcinoma DU-145 and LNCaP cell lines were treated with various concentrations of pectaSol, Dox, or a combination of both. Cell viability was determined via the MTT assay and cell cycle progression was determined by flow cytometry using Flowmax Software.

Results: DU-145 (androgen independent) cell lines were more sensitive than LNCaP (androgen dependent) cell lines. Combination of PectaSol and Dox resulted in a 17.6% and 19.6% ($p < 0.001$) decrease in the viability of the DU-145 and LNCaP cells. The IC₅₀ values decreased 1.5 fold and 1.3 fold in the DU-145 and LNCaP cells, respectively. Treatment with both drugs led to an increase in Sub-G1 arrest (54.6% versus 12.2% in Dox) in DU-145. In LNCaP cells, combination of both drugs led to an increase in G2-M arrest (61.68% versus 53.56% in Dox).

Conclusion: Based on our findings, the progressive cytotoxicity effect of Dox and PectaSol together induce rapid cell death in DU-145 through apoptosis and in LNCaP cells through cell cycle arrest (G2-M arrest).

Key words: Prostate Cancer, DU-145 and LNCaP cell lines, Cell cycle arrest, Apoptosis, PectaSol, Doxorubicin