مجله دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، شهریور ۱۳۹۷، دوره ۷۶، شماره ۶، صفحه‌های ۳۷٤ تا ۳۷۹

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 15:57 IRDT on Monday June 24th 2019

بررسی اثر ایکوزاپنتاینوییک اسید روغن ماهی بر تکثیر سلولی و فعالیت کاسپاز-۳ در رده سلولی سرطانی کولورکتال انسانی

فهیمه کلب‌خانی
محمدرضا سام*

گروه زیست فناوری سلولی و مولکولی، پژوهشکده زیست فناوری، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

چکیده

دریافت: ۱۳۹٦/۱۱/۱٤ ویرایش: ۱۳۹٦/۱۱/۲۱ پذیرش: ۱۳۹۷/۰٦/۱۷ آنلاین: ۱۳۹۷/۰٦/۲۷

زمینه و هدف: استفاده از ترکیبات طبیعی با سمیت اندک بر سلول‌های طبیعی، جهت درمان سرطان کولورکتال اهمیت زیادی دارد. در مطالعه حاضر، اثر ایکوزاپنتاینوییک اسید (Eicosapentaenoic acid, EPA) روغن ماهی بر تعداد سلول‌ها، تکثیر سلولی و فعالیت کاسپاز-۳ در رده سلولی سرطان کولورکتال انسانی LS174T بررسی گردید.

روش بررسی: این مطالعه تجربی در آزمایشگاه کشت سلول، پژوهشکده زیست فناوری دانشگاه ارومیه از فروردین تا شهریور سال ۱۳۹٦ انجام گردید. پانصد هزار سلول LS174T در محیط کشت کامل در $37^\circ C$ و ٥٪ Co_2 به مدت ٢٤ ساعت کشت داده شدند. سپس سلول‌ها با غلظت‌های ٥٠ تا ٢٠٠ µmol ایکوزاپنتاینوئیک اسید به مدت ٤٨ ساعت تیمار شدند و تعداد سلول‌ها با استفاده از لام نئوبار شمارش گردید و فعالیت کاسپاز-۳ با روش کالریمتری اندازه‌گیری شد. همچنین پنج هزار سلول با غلظت‌های یاد شده از ایکوزاپنتاینوییک اسید تیمار شده و در زمان‌های ٢٤ تا ٧٢ ساعت، تکثیر سلولی با استفاده از آزمون WST-1 بررسی گردید.

یافته‌ها: تیمار سلول‌ها با غلظت‌های ٥٠ تا ٢٠٠ µmol ایکوزاپنتاینوییک اسید، تعداد سلول‌ها را به‌طور وابسته به دوز کاهش و تکثیر سلولی را به‌صورت وابسته به دوز و زمان کاهش داد. پس از ٧٢ ساعت تیمار سلول‌ها با ٢٠٠ µmol ایکوزاپنتاینوییک اسید، میزان تکثیر سلولی ۳۰/۳٪ در مقایسه با سلول‌های تیمار نشده محاسبه شد. پس از ٤٨ ساعت تیمار، فعالیت کاسپاز-۳ با غلظت‌های افزاینده ایکوزاپنتاینوییک اسید، افزایش یافت. به‌طوری‌که در غلظت ٢٠٠ µmol ایکوزاپنتاینوییک اسید، فعالیت کاسپاز-۳، ۳/٤ برابر سلول‌های تیمار نشده محاسبه شد.

نتیجه‌گیری: ایکوزاپنتاینوییک اسید تعداد سلول‌های بدخیم کولورکتال و تکثیر آن‌ها را کاهش می‌دهد و فعالیت کاسپاز-۳ را که یک پروتیین اجرایی در القای آپوپتوز است فعال می‌کند.

کلمات کلیدی: کاسپاز-۳، تکثیر سلولی، سرطان کولورکتال، ایکوزاپنتاینوییک اسید.

* نویسنده مسئول: ارومیه، خیابان شهید بهشتی، پژوهشکده زیست‌فناوری، دانشگاه ارومیه.
تلفن: ۰٤٤-۳۳٤٤۰۱۹۹
E-mail: m.sam@urmia.ac.ir

مقدمه

سرطان کولورکتال در رتبه سوم از نظر مرگ‌ومیر در سرتاسر جهان قرار دارد که به‌طور برابر، مردان و زنان را تحت تاثیر قرار می‌دهد.[1] سرطان کولورکتال از شایعترین سرطان‌های دستگاه گوارش در ایران محسوب می‌شود.[2] سالانه در ایران در حدود ٥٠٠٠ بیمار مبتلا به سرطان کولورکتال گزارش می‌شود. مطالعات همه‌گیرشناسی نشان می‌دهند که تغذیه در ابتلا به سرطان کولورکتال نقش مهمی دارد.[3] اغلب افراد مبتلا به سرطان کولورکتال جهت درمان تحت عمل جراحی، شیمی‌درمانی یا پرتودرمانی قرار می‌گیرند که این روش‌ها دارای عوارض جانبی فراوانی هستند.[4] به‌همین دلیل استفاده از روش‌هایی که دارای حداقل عوارض جانبی باشند در الویت قرار دارند. در این بین استفاده از ترکیبات طبیعی مورد توجه فراوان قرار گرفته است.[5] مطالعات آزمایشگاهی، نقش اسیدهای چرب امگا-۳ در

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 15:57 IRDT on Monday June 24th 2019

پیشگیری از سرطان در مراحل مختلف از جمله تکثیر سلول‌های سرطانی، بقا، رگ‌زایی، التهاب و متاستاز را نشان داده‌اند.[6] بر خلاف داروهای شیمی‌درمانی، این ترکیبات سمیت انتخابی داشته و کمترین آسیب را به سلول‌های سالم وارد می‌کنند.[7] نتایج نشان می‌دهند که ایکوزاپنتاینوییک اسید (Eicosapentaenoic acid, EPA) اثر مهاری بر سرطان روده بزرگ با تعدیل متابولیسم چربی و مهار سنتز پروستاگلاندین E2 در سلول‌های تومور دارد.[8] مصرف EPA در بیماران مبتلا به سرطان روده بزرگ با بهبود عملکرد سیستم ایمنی بدن همراه بوده است.[8] به‌تازگی گزارش شده است که EPA در فرم اسید چرب آزاد (که بهتر از روده کوچک انسان جذب می‌شود) تعداد و اندازه پولیپ‌های رکتوم را در یک مطالعه کنترل شده در بیماران مبتلا به پولیپ آدنوماتوز خانوادگی کاهش می‌دهد.[9] مطالعات همه‌گیرشناسی نقش اسیدهای چرب امگا-۳ را به‌عنوان عوامل بازدارنده سرطان نشان می‌دهند.[10] اسیدهای چرب امگا-۳ در روغن ماهی باعث تحریک پاسخ ایمنی و افزایش آپوپتوز در سلول‌های سرطانی می‌شود و دارای اثرات ضد توموری در مراحل شروع سرطان کولون هستند و با کاهش تکثیر سلولی باعث کاهش پیشرفت پولیپ‌های کولورکتال می‌شوند.[11] نشان داده شده است که تغذیه با اسیدهای چرب امگا-۳ باعث کاهش رشد تومور و افزایش پاسخ تومور به شیمی‌درمانی می‌شود.[12] مصرف EPA پراکسیداسیون چربی را افزایش می‌دهد و افزایش پراکسیداسیون چربی، رشد تومور را در روده مهار می‌کند.[12] هدف از انجام مطالعه حاضر تعیین اثر EPA به‌دست آمده از روغن ماهی بر تعداد سلول‌های بدخیم و تکثیر آن‌ها و القای فعالیت آنزیم کاسپاز-۳ در رده سلولی سرطان کولورکتال LS174T بود.

روش بررسی

این مطالعه تجربی در آزمایشگاه کشت سلول، پژوهشکده زیست فناوری دانشگاه ارومیه از فروردین تا شهریور ۱۳۹۶ انجام گردید. ایکوزاپنتاینوییک اسید از Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany خریداری شد. محیط کشت سلولی، تریپسین و سرم جنین گاوی از PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria تهیه شدند. رده سلولی سرطانی کولورکتال LS174T از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران خریداری شد. کیت سنجش تکثیر سلولی WST-1 از شرکت Roche Diagnostics, Mannheim, Germany خریداری شد. کیت کاسپاز-۳ از شرکت Abcam, Cambridge, MA, USA خریداری شد.

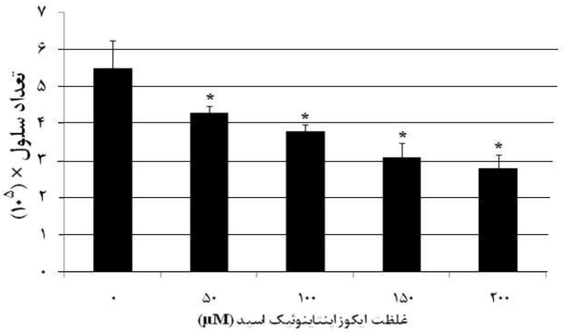
در بررسی شمارش سلولی، پانصدهزار سلول LS174T در هر یک از چاهک‌های یک پلیت ٦ خانه‌ای ریخته شد و به مدت ٤٨ ساعت در انکوباتور $37^{\circ}C$ و ۵٪ گاز دی‌اکسیدکربن کشت داده شدند. سپس سلول‌ها با محیط کشت تازه دارای ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ µmol EPA تیمار شده و به مدت ٤٨ ساعت در انکوباتور کشت سلولی قرار داده شدند. پس از تیمار ٤٨ ساعته، محیط کشت خارج شد و سلول‌ها با ۱ ml بافر فسفات استریل شستشو داده شدند. برای جدا کردن سلول‌ها از کف چاهک‌ها از ۵۰۰ µl تریپسین دارای EDTA به مدت دو دقیقه استفاده شد. سپس تریپسین با محیط کشت دارای سرم جنین گاوی خنثی شد و پس از یک بار شستشو، سلول‌ها جهت شمارش آماده گردیدند. برای شمارش سلولی از لام نئوبار استفاده شد. یک قطره از سوسپانسیون سلولی در لام نئوبار قرار داده شد و تعداد سلول‌ها در زیر میکروسکوپ نوری و در چهار گوشه لام نئوبار شمارش شدند و میانگین تعداد آن‌ها در محاسبات شمارش سلولی مورد استفاده قرار گرفت.

در بررسی تکثیر سلولی، پنج هزار سلول در هر خانه از یک پلیت ۹٦ خانه‌ای کشت داده شدند. پس از ٤٨ ساعت، محیط کشت سلول‌ها تعویض و EPA در غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ µmol اضافه شد و پلیت‌های کشت سلولی در انکوباتور $37^{\circ}C$ دارای ۵٪ گاز دی‌اکسیدکربن به مدت ۲٤، ٤٨ و ۷۲ ساعت قرار داده شد. در هر مرحله زمانی، ۱۰۰ µl از محیط کشت سلول خارج شده و به ۱۰۰ µl محیط کشت باقی‌مانده در چاهک‌ها، ۱۰ µl محلول WST-1 اضافه شد و پلیت به مدت چهار ساعت در انکوباتور $37^{\circ}C$ دارای ۵٪ گاز دی‌اکسید کربن قرار داده شد. در پایان انکوباسیون، همگن‌سازی محیط کشت انجام شد و جذب نوری در هر چاهک توسط دستگاه خواننده الایزا (BioTek Instruments Inc., Vermont, USA) در طول موج ٤۹۲ نانومتر و طول موج مرجع ٦۳۰ نانومتر اندازه‌گیری و میزان تکثیر سلولی از طریق فرمول مربوطه محاسبه شد.

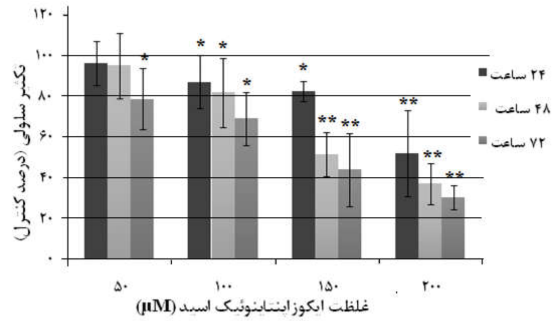
در بررسی کاسپاز-۳، پانصد هزار سلول LS174T در هر یک از چاهک‌های یک پلیت ٦ خانه‌ای ریخته شد و سلول‌ها به مدت ٤٨ ساعت در انکوباتور $37^{\circ}C$ دارای ۵٪ گاز دی‌اکسیدکربن کشت داده

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 15:57 IRDT on Monday June 24th 2019

شدند. سپس محیط کشت سلول‌ها با محیط کشت تازه دارای ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و µmol ۲۰۰، EPA تعویض گردید و سلول‌ها به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور کشت سلولی قرار داده شدند. پس از گذشت ۴۸ ساعت، محیط کشت سلولی خارج شد و سلول‌ها با ml ۱ بافر فسفات استریل شستشو داده شدند. برای جدا کردن سلول‌ها از کف پلیت از µl ۵۰۰ تریپسین دارای Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) به مدت دو دقیقه استفاده شد. سپس خنثی‌سازی تریپسین با استفاده از محیط کشت دارای سرم جنین گاوی انجام شد و سلول‌ها به مدت پنج دقیقه سانتریفوژ شدند. محیط رویی سلول‌ها خارج شد و رسوب سلولی به مدت ۲۰ دقیقه با محلول لیزکننده سلولی موجود در کیت مجاور شده و مجموعه بر روی یخ قرار داده شد. سپس به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت بالا سانتریفوژ انجام شد. محیط رویی از سلول‌ها جدا شد. غلظت پروتیین به روش برادفورد اندازه‌گیری گردید و بر اساس پروتکل موجود در کیت به ازای هر µg ۵۰ پروتیین، µl ۵۰ از محلول Reaction buffer دارای mmol ۱۰، DTT، µl ۵ سوبسترای DEVD-p-NA به هر نمونه اضافه شد و پلیت به مدت یک ساعت در دمای $^{\circ}C$ ۳۷ قرار داده شد. پس از پایان مدت گفته شده، میزان جذب نمونه در طول موج nm ۴۰۵ جهت نمونه تیمار شده و نشده اندازه‌گیری شد و میزان فعالیت کاسپاز-۳ نسبت به کنترل محاسبه و نمایش داده شد. جهت مقایسه میانگین نتایج کمی و مقایسه آن‌ها با یکدیگر، از آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون مقایسات چندگانه توکی (Tukey) استفاده شد. در همه محاسبات ارزش عددی P<۰/۰۵ معنادار در نظر گرفته شد.



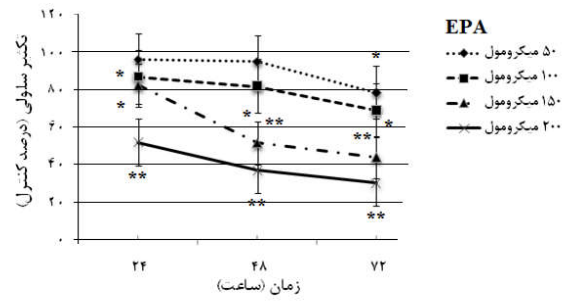
نمودار ۱: اثر EPA بر تعداد سلول‌های LS174T در غلظت‌های مختلفی از آن پس از ۴۸ ساعت تیمار. میزان معناداری نتایج در مقایسه با سلول‌های کنترل تیمار نشده محاسبه شده است *P<۰/۰۵، **P<۰/۰۱.



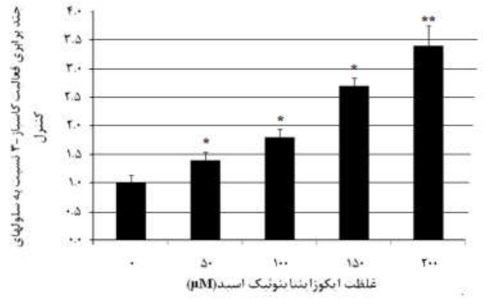
نمودار ۲: اثر EPA بر میزان رشد و تکثیر سلول‌های LS174T در غلظت‌های مختلفی از آن. میزان معناداری نتایج در مقایسه با سلول‌های کنترل تیمار نشده محاسبه شده است *P<۰/۰۵، **P<۰/۰۱.

یافته‌ها

تعداد سلول‌ها در ۴۸ ساعت پس از تیمار با EPA شمارش گردید. در این زمینه تعداد سلول‌های شمارش شده به‌طور وابسته به غلظت، کاهش چشمگیری داشت. به‌طوری‌که در غلظت µmol ۲۰۰ از EPA بیشترین کاهش تعداد سلول‌ها دیده شد و تعداد سلول‌ها از $۵/۵×۱۰^۵$ در سلول‌های تیمار نشده به $۲/۸×۱۰^۵$ کاهش یافت (نمودار ۱). در تیمار سلول‌های LS174T با غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و µmol ۲۰۰، EPA به مدت ۲٤، ۴۸ و ۷۲ ساعت، رشد و تکثیر سلول‌ها به‌صورت معناداری کاهش یافت. این کاهش در رشد و تکثیر سلولی به‌صورت وابسته به دوز بود. به‌طوری‌که بیشترین میزان کاهش تکثیر سلولی در دوز µmol ۲۰۰، EPA مشاهده شد (نمودار ۲). در نمودار ۳ همانطور که مشاهده می‌شود در غلظت‌های یادشده از EPA، کاهش تکثیر سلولی وابسته به زمان نیز مشاهده گردید، به‌طوری‌که بیشترین کاهش در رشد و تکثیر سلول‌ها پس از ۷۲ ساعت تیمار مشاهده شد و میزان تکثیر سلولی به ۳۰/۳٪ سلول‌های کنترل تیمار نشـده در غلظـت µmol ۲۰۰، EPA کاهـش یافـت. بـه‌منظور بررسی علت کاهش تکثیر سلول‌های تیمار شده LS174T و مطالعـه‌ی القـای



نمودار ۳: اثر EPA بر میزان رشد و تکثیر سلول‌های LS174T در بازه‌های مختلف زمانی. میزان معناداری نتایج در مقایسه با سلول‌های کنترل تیمار نشده محاسبه شده است *P<۰/۰۵، ** P<۰/۰۱.



نمودار ٤: اثر EPA بر فعالیت کاسپاز-۳ در سلول‌های LS174T پس از ٤۸ ساعت تیمار با غلظت‌های مختلفی از EPA. میزان معناداری نتایج در مقایسه با سلول‌های کنترل تیمار نشده محاسبه شده است *P<۰/۰۵، ** P<۰/۰۱.

آپوپتوز در این سلول‌ها، از اندازه‌گیری فعالیت کاسپاز-۳ به‌عنوان مارکر اصلی آپوپتوز استفاده شد. بر مبنای نتایج، با افزایش غلظت EPA میزان فعالیت کاسپاز-۳ افزایش داشت، به‌طوری که در غلظت μmol ۲۰۰، EPA این میزان به ۳/٤ برابر سلول‌های کنترل تیمار نشده رسید (نمودار ٤).

بحث

در مطالعه حاضر، تیمار سلول‌های LS174T با EPA باعث کاهش تعداد سلول‌ها، کاهش تکثیر آن‌ها و القای آپوپتوز گردید. در مطالعات مشابهی، تیمار سلول‌های سرطانی کولورکتال Caco2 با EPA و DHA موجب مهار رشد سلولی گردید و باعث القای آپوپتوز با تجمع سلول‌ها در فاز G2/M شد که نتایج مطالعه حاضر، از این نظر با نتایج این پژوهشگران همخوانی دارد.[۱۳و۱٤] در مطالعه دیگری، Hawcroft و همکارانش با تیمار سلول‌های سرطانی روده بزرگ موش MC-29 با EPA باعث کاهش رشد تومور و کاهش تکثیر سلول‌های بدخیم شدند.[۹] در مطالعه حاضر نیز EPA به‌صورت وابسته به زمان و غلظت، رشد و تکثیر سلول‌های سرطانی کولورکتال را کاهش داد که از این نظر همسو با مطالعه Hawcroft بود. در مطالعه‌ی دیگری که توسط Sam و همکارانش انجام شد، تیمار سلول‌های سرطان خون با EPA به‌طور وابسته به دوز و زمان، تکثیر این سلول‌های بدخیم را کاهش داد.[۱۵] این مطالعه به همراه مطالعات یادشده می‌تواند حاکی از اثر جامع EPA در انواع مختلفی از سلول‌های سرطانی باشد.

فرار سلول‌های توموری از آپوپتوز از ویژگی‌های بارز همه سرطان‌ها است. نشان داده شده است که EPA، آپوپتوز را در رده سلولی سرطان کولون SW620 القا می‌کند و اثر داروهای شیمی درمانی مانند ۵-فلورو یوراسیل (FU-5) و میتومایسین C را افزایش می‌دهد.[۷] بسیاری از مطالعات نیز گزارش کرده‌اند که EPA، آپوپتوز را از طریق مسیر میتوکندری القا می‌کند و فعالیت کاسپاز-۳ را افزایش می‌دهد.[۷] Ahangar و همکارانش نشان دادند کهEPA، آپوپتوز را با فعال‌سازی کاسپاز-۳ در سلول‌های سرطانی کولورکتال القا می‌کند.[۱٦] در مطالعه حاضر نیز میزان فعالیت کاسپاز-۳ به‌صورت وابسته به غلظت EPA افزایش یافت که از این نظر، نتایج مطالعه حاضر با مطالعه Ahangar و همکارانش همخوانی دارد. در مطالعه مشابهی نیز تیمار رده‌های سلولی سرطان کولورکتال HT-29 و HCA-7 با EPA منجر به القای آپوپتوز در این سلول‌ها شد.[۹و۱۷] Abdi و همکارانش نشان دادند که EPA، آپوپتوز را در سلول‌های میلوما از طریق فعال‌سازی کاسپاز-۳ و مسیر میتوکندریایی القا می‌کنند.[۱۸] با توجه به داده‌های به‌دست آمده از این مطالعه، نتایج مطالعه حاضر با مطالعات سایر محققین در یک راستا قرار گرفته و همدیگر را تایید می‌کنند. در مطالعه حاضر، تعداد سلول‌های بدخیم و تکثیر آن‌ها در غلظت μmol ۲۰۰، EPA پس از ۷۲ ساعت تیمار، بیشترین میزان کاهش را نشان داد که می‌توان این کاهش را به فعال شدن بهتر آپوپتوز در

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 15:57 IRDT on Monday June 24th 2019

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 15:57 IRDT on Monday June 24th 2019

سلول‌های بدخیم در یک بازه زمانی طولانی پس از تیمار نسبت داد. در این مطالعه EPA روغن ماهی که ترکیبی سالم و بدون اثر سمی برای سلول‌های بدن محسوب می‌شود، سلول‌های بدخیم کولورکتال را به‌طور موثری از بین برد که می‌تواند به‌عنوان یک ترکیب موثر به همراه سایر داروهای شیمی‌درمانی در بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال مورد استفاده قرار گیرد. EPA تعداد سلول‌های بدخیم کولورکتال و تکثیر آن‌ها را کاهش می‌دهد و فعالیت کاسپاز-۳ را که یک پروتیین اجرایی در القای آپوپتوز است فعال می‌کند.

سپاسگزاری: این مقاله حاصل بخشی از پایان‌نامه با عنوان "بررسی اثر ایکوزاپنتاینوییک اسید به‌دست آمده از روغن ماهی بر آپوپتوز، تکثیر سلولی و بیان ژن BMI-1 در سلول‌های سرطانی کولورکتال" در مقطع کارشناسی ارشد دانشگاه ارومیه در سال ۱۳۹٦ می‌باشد.

References

1. Sala-Vila A, Folkes J, Calder PC. The effect of three lipid emulsions differing in fatty acid composition on growth, apoptosis and cell cycle arrest in the HT-29 colorectal cancer cell line. *Clin Nutr* 2010;29(4):519-24.
2. Safaee A, Fatemi SR, Ashtari S, Vahedi M, Moghimi-Dehkordi B, Zali MR. Four years incidence rate of colorectal cancer in Iran: a survey of national cancer registry data - implications for screening. *Asian Pac J Cancer Prev* 2012;13(6):2695-8.
3. Dolatkhah R, Somi MH, Bonyadi MJ, Asvadi Kermani I, Farassati F, Dastgiri S. Colorectal cancer in Iran: molecular epidemiology and screening strategies. *J Cancer Epidemiol* 2015.
4. Siegel R, Desantis C, Jemal A. Colorectal cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin* 2014;64(2):104-17.
5. Laviano A, Rianda S, Molfino A, Rossi Fanelli F. Omega-3 fatty acids in cancer. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2013;16(2):156-61.
6. Eltweri AM, Thomas AL, Metcalfe M, Calder PC, Dennison AR, Bowrey DJ. Potential applications of fish oils rich in omega-3 polyunsaturated fatty acids in the management of gastrointestinal cancer. *Clin Nutr* 2017;36(1):65-78.
7. D'Eliseo D, Velotti F. Omega-3 Fatty Acids and Cancer Cell Cytotoxicity: Implications for Multi-Targeted Cancer Therapy. *J Clin Med* 2016;5(2). pii: E15.
8. Minoura T, Takata T, Sakaguchi M, Takada H, Yamamura M, Hioki K, et al. Effect of dietary eicosapentaenoic acid on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rats. *Cancer Res* 1988;48(17):4790-4.
9. Hawcroft G, Loadman PM, Belluzzi A., Hull MA. Effect of eicosapentaenoic acid on E-type prostaglandin synthesis and EP4 receptor signaling in human colorectal cancer cells. *Neoplasia* 2010;12(8):618-27.
10. Kim B, Giardiello FM. Chemoprevention in familial adenomatous polyposis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2011;25(4-5):607-22.
11. Kuppusamy P, Yusoff MM, Maniam GP, Ichwan SJ, Soundharrajan I, Govindan N. Nutraceuticals as potential therapeutic agents for colon cancer: a review. *Acta Pharm Sin B* 2014;4(3):173-81.
12. Pardini RS. Nutritional intervention with omega-3 fatty acids enhances tumor response to anti-neoplastic agents. *Chem Biol Interact* 2006;162(2):89-105.
13. Jordan A, Stein J. Effect of an omega-3 fatty acid containing lipid emulsion alone and in combination with 5-fluorouracil (5-FU) on growth of the colon cancer cell line Caco-2. *Eur J Nutr* 2003;42(6):324-31.
14. Kim EJ, Kim WY, Kang YH, Young H, Ha Y, Bach LA, et al. Inhibition of Caco-2 cell proliferation by (n-3) fatty acids: Possible mediation by increased secretion of insulin-like growth factor binding protein-6. Nutr Res 2000;20(10):1409-21.
15. Sam MR, Esmaeillou M, Sam S, Shokrgozar MA. Fish-oil-derived eicosapentaenoic acid decreases survivin expression and induces wt-p53 accumulation with caspase-3 activation in acute lymphoblastic leukemia cells. *Hum Exp Toxicol* 2018;37(7):714-724.
16. Ahangar P, Sam MR, Nejati V, Habibian R. Treatment of undifferentiated colorectal cancer cells with fish-oil derived docosahexaenoic acid triggers caspase-3 activation and apoptosis. *J Cancer Res Ther* 2016;12(2):798-804.
17. Allred CD, Talbert DR, Southard RC, Wang X, Kilgore MW. PPARgamma1 as a molecular target of eicosapentaenoic acid in human colon cancer (HT-29) cells. *J Nutr* 2008;138(2):250-6.
18. Abdi J, Garssen J, Faber J, Redegeld FA. Omega-3 fatty acids, EPA and DHA induce apoptosis and enhance drug sensitivity in multiple myeloma cells but not in normal peripheral mononuclear cells. *J Nutr Biochem* 2014;25(12):1254-62.

Tehran University Medical Journal, September 2018; Vol. 76, No. 6: 374-379 Original Article

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 15:57 IRDT on Monday June 24th 2019

The effect of fish-oil derived eicosapentaenoic acid on cell proliferation and caspase-3 activity in human colorectal cancer cell line

Fahimeh Kalbkhani M.Sc.
Mohammad Reza Sam Ph.D.*

Department of Cellular and Molecular Biotechnology, Institute of Biotechnology, Urmia University, Urmia, Iran.

*Corresponding author: Institute of Biotechnology, Shahid Beheshti St., Urmia University, Urmia, Iran.
Tel: +98- 44-33440199
E-mail: m.sam@urmia.ac.ir

Abstract

Received: 03 Feb. 2018 Revised: 10 Feb. 2018 Accepted: 08 Sep. 2018 Available online: 18 Sep. 2018

Background: Using natural compounds with low toxicity on normal cells and high efficacy on malignant cells is highly appreciated for treatment of colorectal cancer (CRC). In the present study, the effect of fish-oil derived eicosapentaenoic acid (EPA) on the cell number, cell proliferation rate and caspase-3 enzyme activity in LS174T human colorectal cancer cell line was investigated.

Methods: This experimental study was performed in cell culture lab, Institute of Biotechnology, affiliated to the Urmia University, Urmia, Iran from April to September 2017. LS174T colorectal cancer cells at a density of 5×10^5 cells per well were cultured in RPMI-1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and kept at 37 °C in a humidified incubator with 5% CO_2 for 24 hours. Thereafter, the cells were treated with 50, 100, 150 and 200 μmol EPA for 48 hours and cell numbers were counted using neobauer chamber and caspase-3 activities were measured by performing the caspase-3 colorimetric assay (Abcam, Cambridge, MA, USA). Furthermore, 5×10^3 LS174T colorectal cancer cells were cultured and treated with the above-mentioned EPA concentrations for 24, 48 and 72 hours, after which cell proliferation rate was evaluated by WST-1 proliferation assay (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany).

Results: Treatment of LS174T colorectal cancer cells with 50, 100, 150 and 200 μmol EPA decreased the number of cells in a dose-dependent manner. We also found that treatment of malignant cells with increasing EPA concentrations (50 to 200 μmol) significantly decreased cell proliferation in a dose and time dependent manner. After a 72 hours treatment of LS174T cells with 200 μmol EPA, cell proliferation was calculated to be 30.3% compared to untreated control cells. Following 48 hours treatment, caspase-3 activity increased with increasing EPA concentrations in which at 200 μmol EPA, caspase-3 activity increased by 3.4 fold compared to untreated control cells.

Conclusion: Fish-oil derived eicosapentaenoic acid as a safe compound decreases the number of colorectal cancer cells and their proliferation rate and activates caspase-3 enzyme, as an executor protein in apoptosis.

Keywords: caspase-3, cell proliferation, colorectal cancer, eicosapentaenoic acid.