

مقایسه اثر دوکوزاهگزامینوئیک اسید و ایکوزاپنتائینوئیک اسید روغن ماهی بر تکثیر رده سلولی سرطان کولورکتال: گزارش کوتاه

چکیده

دریافت: ۱۳۹۲/۰۴/۱۱ پذیرش: ۱۳۹۲/۰۷/۲۷ آنلاین: ۱۳۹۲/۱۱/۱۲

زمینه و هدف: در مراحل پیشرفته سرطان کولورکتال اغلب به درمان‌های کلاسیک مقاوم است. بنابراین جستجو جهت ارائه روش‌های درمانی جدید با حداقل عوارض در مدیریت سرطان کولورکتال مورد توجه است. در این زمینه، تاثیر مهار کننده قدرتمند رشد سلولی، ایکوزاپنتائینوئیک اسید و دوکوزاهگزامینوئیک اسید روغن ماهی بر ضدسلول‌های سرطانی نشان داده شده است. در مطالعه حاضر، اثر ضدسرطانی ایکوزاپنتائینوئیک اسید (EPA) و دوکوزاهگزامینوئیک اسید (DHA) به عنوان اسیدهای چرب غیر اشباع در سلول‌های سرطانی کولورکتال LS174T بررسی گردید. **روش بررسی:** سلول‌های سرطانی در محیط کشت RPMI-1640 غنی شده با سرم جنین گاوی در ۳۷ درجه و انکوباتور مرطوب کشت داده شدند. سلول‌های سرطانی در غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میکرومول EPA یا DHA به مدت ۲۴-۷۲ ساعت تیمار شدند. پس از تیمار سلولی، پاسخ سلولی به دوزهای به کار رفته در زمان‌های ۲۴-۷۲ ساعت با روش‌های زنده مانی سلولی و آزمون MTT ارزیابی شد.

یافته‌ها: در بررسی زنده مانی سلولی نشان داده شد که اسیدهای چرب غیر اشباع، تکثیر سلول‌های تیمار شده را در مقایسه با سلول‌های تیمار نشده در غلظت ۱۵۰ میکرومول DHA و EPA به میزان معناداری کاهش می‌دهند. در این زمینه میزان زنده مانی سلول‌ها در غلظت ۱۵۰ میکرومول DHA و EPA به ترتیب $1/5 \pm 3/1\%$ و $2/6 \pm 3/0\%$ محاسبه شد. علاوه بر این، تیمار سلول‌ها با غلظت‌های افزایش یافته DHA و EPA، به میزان معناداری، رشد سلولی را به‌طور وابسته به دوز و زمان کاهش می‌دهد. پس از ۷۲ ساعت تیمار سلول‌ها با ۱۵۰ میکرومول DHA و EPA، میزان رشد سلولی به ترتیب $5/5 \pm 1/9\%$ و $5/2 \pm 2/0\%$ در مقایسه با سلول‌های کنترل تیمار نشده محاسبه شد.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان می‌دهند که اسیدهای چرب امگا-۳ تکثیر سلولی را کاهش می‌دهند و می‌توانند دیدگاه‌های جدیدی در درمان تومورهای بدخیم فراهم کنند.

کلمات کلیدی: سرطان کولورکتال، اسیدهای چرب، ایکوزاپنتائینوئیک اسید (EPA)، دوکوزاهگزامینوئیک اسید (DHA).

پریناز آهنگر^۱

محمد رضا سام^{۳،۲،۱*}

وحید نجاتی^۱

۱- گروه بافت‌شناسی و جنین‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

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

۳- شرکت فناوری بن باخته‌های رویان، بانک خون بندناف رویان واحد آذربایجان غربی، ارومیه، ایران.

* نویسنده مسئول: ارومیه، خیابان شهید بهشتی، گروه زیست فناوری سلولی و مولکولی، پژوهشکده زیست فناوری، دانشگاه ارومیه، ایران.

تلفن: ۰۴۴۱-۳۴۴۰۱۹۹

E-mail: m.sam@urmia.ac.ir

مقدمه

درمانی جدید با حداقل عوارض جانبی دارای اهمیت خاصی می‌باشد. مطالعات اپیدمیولوژیکی نشان داده‌اند که بخش قابل توجهی از بروز و یا کاهش بیماری‌های مختلف ممکن است با عادت‌های غذایی ارتباط داشته باشد.^۱ شواهد موجود نشان می‌دهند که اسیدهای چرب امگا-۳ در جلوگیری از بیماری‌های التهابی روده که منجر به ایجاد سرطان می‌شود، مفید می‌باشند و بین رشد سلول‌های اپیتلیال روده و آپوپتوز

سرطان کولورکتال از سرطان‌های شایع در ایران می‌باشد.^۱ درمان اساسی این سرطان برداشتن کامل تومور همراه با پرتودرمانی و یا شیمی‌درمانی می‌باشد. در مراحل پیشرفته سرطان کولورکتال اغلب مقاوم به درمان‌های کلاسیک می‌باشد.^۲ در نتیجه یافتن روش‌های

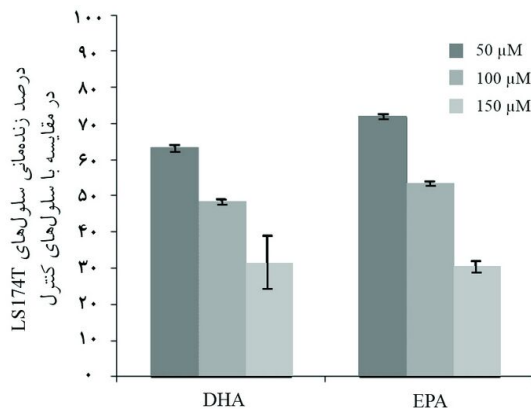
۱۵ دقیقه دیگر ادامه یافت. در پایان انکوباسیون شدت رنگ ایجاد شده توسط دستگاه الیزا در طول موج ۴۹۲ نانومتر ثبت و میزان رشد سلولی توسط فرمول زیر محاسبه شد.

$$\text{میزان رشد} = \frac{\text{جذب نوری شاهد بدون سلول} - \text{جذب نوری نمونه}}{\text{جذب نوری شاهد بدون سلول} - \text{جذب نوری سلول تیمار نشده}} \times 100$$

تجزیه و تحلیل داده‌ها از روش آنالیز واریانس یک طرفه (One-Way Analysis of variance) و نرم‌افزار SPSS ویراست ۱۸ استفاده گردید. در تمام بررسی‌ها میزان معناداری آزمون‌ها $P < 0.05$ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

اثر EPA و DHA بر زنده‌مانی سلول‌های LS174T در تیمار سلولی با DHA، EPA در غلظت‌های ۵۰ تا ۱۵۰ میکرومولار، میزان زنده‌مانی سلول‌ها به‌طور معناداری کاهش یافت. به‌طوری‌که در غلظت ۱۵۰ میکرومولار DHA و EPA، میزان زنده‌مانی سلول‌ها به‌ترتیب $31 \pm 5/1\%$ و $30 \pm 2/6\%$ گردید (نمودار ۱).



نمودار ۱: اثر ۴۸ ساعت تیمار سلول‌های LS174T در غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میکرومولار DHA و EPA در زنده‌مانی سلول‌های LS174T در مقایسه با سلول‌های کنترل (سلول‌های تیمار نشده). نتایج میانگین دو بار آزمایش و هر بار سه تا چهار تکرار می‌باشد. بالاترین میزان معناداری در غلظت ۱۵۰ میکرومولار DHA و EPA بود که $P < 0.001$ محاسبه گردید.

آن‌ها تعادل ایجاد می‌کنند.^۴ مطالعات متعددی نشان داده‌اند که Eicosapentaenoic Acid (EPA) و Docosahexaenoic Acid (DHA) در شرایط آزمایشگاهی رشد سلول‌های سرطانی را مهار کرده و منجر به آپوپتوز آن‌ها می‌گردند.^۵ اسیدهای چرب مذکور که از خانواده غیراشباع با زنجیره‌ی طویل می‌باشند به صورت انتخابی سلول‌های توموری را از بین می‌برند.^۶ با توجه به این موارد مطالعه حاضر به منظور بررسی اثر اسیدهای چرب EPA و DHA در کاهش تکثیر و زنده‌مانی رده سلولی سرطانی کولورکتال LS174T انجام پذیرفت.

روش بررسی

این مطالعه‌ی تجربی و در آزمایشگاه کشت سلول، پژوهشکده زیست فناوری دانشگاه ارومیه طی سال‌های ۹۲-۹۱ انجام گردید. دوکوزاهگزامیونیک اسید، ایکوزاپنتایونیک اسید، MTT و Dimethyl sulfoxide (DMSO) از Sigma Aldrich، Steinheim، Germany تهیه شدند. محیط کشت RPMI-1640، سرم جنین گاوی و تریپسین از PAA Laboratories GmbH، Austria خریداری شدند. رده سلولی LS174T از Pasteur Institute of Iran (IPI)، Tehran، Iran فراهم شد.

آزمون زنده‌مانی سلول‌ها (Viability): $2/5 \times 10^5$ سلول در چاهک‌های پلیت شش خانه‌ای قرار داده شدند. پس از ۲۴ ساعت، محیط کشت حاوی ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میکرومولار EPA و DHA به هر چاهک اضافه شد. سپس پلیت مربوطه به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه قرار داده شد. در پایان مدت تیمار، سلول‌ها تریپسین شده و پس شستشوی سلولی، $50 \mu\text{l}$ میکرولیتر از محیط کشت حاوی سلول به $50 \mu\text{l}$ محلول تریپان بلو افزوده گردید و توسط لام نتوبار شمارش و درصد سلول‌های زنده محاسبه گردید.

آزمون MTT: 5000 سلول به هر یک از چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای افزوده شد. پس از ۲۴ ساعت، محیط کشت حاوی ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میکرومولار EPA و DHA به هر چاهک افزوده شد و پلیت‌ها به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در انکوباتور کشت سلولی انکوبه شدند. پس از اتمام زمان انکوباسیون، محلول MTT (5 mg/ml) به محیط کشت هر چاهک اضافه شد و انکوباسیون چهار ساعت ادامه یافت. سپس DMSO به چاهک‌ها اضافه شد و انکوباسیون به مدت

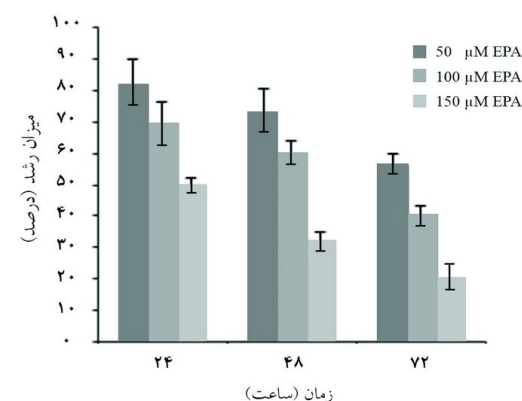
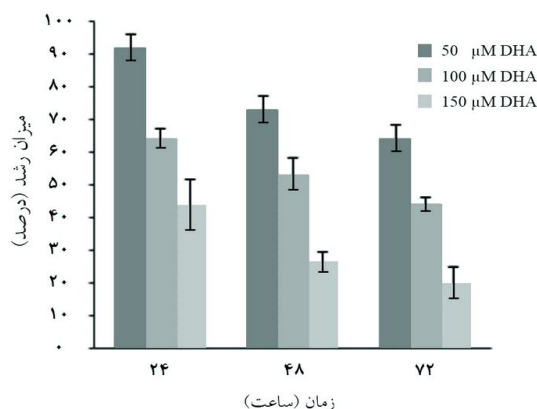
پروتورمانی می‌باشد که عوارض جانبی بسیاری داشته و سلول‌های سرطانی در اکثر موارد نسبت به شیمی‌درمانی و یا پرتوهای یونیزان مقاوم می‌شوند. به همین علت ضروری است که درمان‌های مکمل دیگری جهت افزایش کارایی درمان به کار گرفته شود.^۸ در طول چند دهه گذشته، مطالعات زیادی به منظور بررسی اثرات اسیدهای چرب غیر اشباع در سرطان کولورکتال انجام شده است.^۹ در این زمینه محققین نشان داده‌اند که DHA و EPA آپوپتوز را در رده سلولی سرطان کولورکتال HT-29 با واسطه پراکسیداسیون غشاء القا می‌کنند.^{۱۱} توانایی بسیاری از اسیدهای چرب در مهار رشد سلول‌های سرطانی کولون در *In vitro* و مدل‌های حیوانی حاکی از آن است که استفاده از اسیدهای چرب امگا-۳ ممکن است برای بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال روش درمانی مفیدی باشد. نشان داده شده است که ترکیب اسیدهای چرب با رادیوتراپی و شیمی‌درمانی کارایی درمان را افزایش می‌دهد.^{۱۲} و^{۱۳} نتایج مطالعه ما در آزمایشگاه با نتایج مطالعات انجام شده توسط Petrik در این زمینه سازگار است.^{۱۵}

در مطالعه حاضر، رشد و تکثیر سلول‌های بدخیم در غلظت ۱۵۰ میکرومولار از اسیدهای چرب پس از تیمار ۷۲ ساعت بیش‌ترین میزان کاهش را نشان داد که می‌توان این کاهش را به فعال شدن بهتر آپوپتوز سلول‌های بدخیم در تیمار با غلظت بالاتر اسیدهای چرب در بازه زمانی طولانی‌تر نسبت داد.

در همین زمینه بررسی بیان ژن‌های موثر در تکثیر و آپوپتوز سلول‌های بدخیم در تیمار با DHA و EPA در همین آزمایشگاه در دست بررسی است. از مزایای استفاده از اسیدهای چرب امگا-۳ می‌توان به منشاء طبیعی آن‌ها، کاهش عوارض جانبی، ارزان بودن، نداشتن اثر منفی بر سلول‌های طبیعی و قابلیت استفاده از آن‌ها به صورت خوراکی اشاره کرد.^{۱۶}

بنابراین پیشنهاد می‌شود کارایی اسیدهای چرب امگا-۳ به همراه درمان‌های رایج در بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال مورد بررسی و مطالعه قرار گیرد.

سپاسگزاری: این تحقیق با حمایت و پشتیبانی صندوق حمایت از پژوهشگران ریاست جمهوری و دانشگاه ارومیه انجام شده است که بدین وسیله نویسندگان مقاله حاضر از مسئولین گرامی تشکر و قدردانی می‌نمایند.



نمودار ۲: میزان رشد سلول‌های تیمار شده LS174T در مقایسه با کنترل در غلظت‌های ذکر شده DHA (الف) و EPA (ب) در بازه‌های زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از تیمار. نتایج میانگین دو بار آزمایش و هر بار سه تا چهار تکرار می‌باشد. بالاترین میزان معناداری در غلظت ۱۵۰ میکرومولار DHA و EPA در بازه زمانی ۷۲ ساعت تیمار $P < 0.001$ محاسبه گردید.

اثر DHA و EPA بر تکثیر و رشد سلولی: پس از تیمار سلول‌های LS174T با غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میکرومولار DHA و EPA در ۲۴-۷۲ ساعت، تکثیر سلول‌های بدخیم به‌طور وابسته به دوز و زمان کاهش یافت که حداکثر میزان کاهش رشد در تیمار ۷۲ ساعت در ۱۵۰ میکرومولار DHA و EPA مشاهده گردید (نمودار ۲).

بحث

شایع‌ترین نوع سرطان دستگاه گوارش در ایران سرطان کولورکتال است.^۷ درمان این سرطان مستلزم جراحی، شیمی‌درمانی و

References

1. 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.
2. Andre N, Schmiegel W. Chemoradiotherapy for colorectal cancer. *Gut* 2005;54(8):1194-202.
3. Nkondjock A, Shatenstein B, Maisonneuve P, Ghadirian P. Specific fatty acids and human colorectal cancer: an overview. *Cancer Detect Prev* 2003;27(1):55-66.
4. Johnson IT. Anticarcinogenic effects of diet-related apoptosis in the colorectal mucosa. *Food Chem Toxicol* 2002;40(8):1171-8.
5. Burdge G. Alpha-linolenic acid metabolism in men and women: nutritional and biological implications. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2004;7(2):137-44.
6. Jiang WG, Bryce RP, Horrobin DF. Essential fatty acids: molecular and cellular basis of their anti-cancer action and clinical implications. *Crit Rev Oncol Hematol* 1998;27(3):179-209.
7. Iran Ministry of Health and Medical Education Health Deputy. Iranian Annual of National Cancer Registration Report. Tehran: Center for Diseases Control, Non-communicable Deputy Cancer Office; 2007.
8. Krishna R, Mayer LD. Multidrug resistance (MDR) in cancer. Mechanisms, reversal using modulators of MDR and the role of MDR modulators in influencing the pharmacokinetics of anti-cancer drugs. *Eur J Pharm Sci* 2000;11(4):265-83.
9. Seegers JC, Lottering ML, Panzer A, Bianchi P, Stark JH. Comparative anti-mitotic effects of lithium gamma-linolenate, gamma-linolenic acid and arachidonic acid, on transformed and embryonic cells. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1998;59(4):285-91.
10. Chen ZY, Istfan NW. Docosahexaenoic acid is a potent inducer of apoptosis in HT-29 colon cancer cells. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2000;63(5):301-8.
11. Clarke RG, Lund EK, Latham P, Pinder AC, Johnson IT. Effect of eicosapentaenoic acid on the proliferation and incidence of apoptosis in the colorectal cell line HT29. *Lipids* 1999;34(12):1287-95.
12. Rudra PK, Krokan HE. Cell-specific enhancement of doxorubicin toxicity in human tumour cells by docosahexaenoic acid. *Anticancer Res* 2001;21(1A):29-38.
13. Xue H, Sawyer MB, Field CJ, Dieleman LA, Baracos VE. Nutritional modulation of antitumor efficacy and diarrhea toxicity related to irinotecan chemotherapy in rats bearing the ward colon tumor. *Clin Cancer Res* 2007;13(23):7146-54.
14. Germain E, Chajès V, Cognault S, Lhuillery C, Bougnoux P. Enhancement of doxorubicin cytotoxicity by polyunsaturated fatty acids in the human breast tumor cell line MDA-MB-231: relationship to lipid peroxidation. *Int J Cancer* 1998;75(4):578-83.
15. Petrik MB, McEntee MF, Johnson BT, Obukowicz MG, Whelan J. Highly unsaturated (n-3) fatty acids, but not alpha-linolenic, conjugated linoleic or gamma-linolenic acids, reduce tumorigenesis in Apc(Min/+) mice. *J Nutr* 2000;130(10):2434-43.
16. Bégin ME, Das UN, Eells G, Horrobin DF. Selective killing of human cancer cells by polyunsaturated fatty acids. *Prostaglandins Leukot Med* 1985;19(2):177-86.

Comparative study on the effect of fish-oil derived docosahexaenoic and eicosapentaenoic acid on proliferation of colorectal cancer cell line: *a brief report*

Parinaz Ahangar M.Sc.^{1,2}
 Mohammad Reza Sam
 Ph.D.^{1,2,3*}
 Vahid Nejati Ph.D.¹

1- Department of Histology and Embryology, Faculty of Sciences, Urmia University, Urmia, Iran.
 2- Department of Cellular and Molecular Biotechnology, Institute of Biotechnology, Urmia University, Urmia, Iran.
 3- Royan Stem Cell Technology Company, West Azerbaijan Cord Blood Bank, Urmia, Iran.

* Corresponding author: Department of Cellular and Molecular Biotechnology, Institute of Biotechnology, Urmia University, Shahid Beheshti St., Urmia, Iran.
 Tel: +98- 441-3440199
 E-mail: m.sam@urmia.ac.ir

Abstract

Received: 02 July 2013 Accepted: 19 Oct. 2013 Available online: 01 Feb. 2014

Background: In advanced stages, Colorectal cancer remains often refractory to classic therapies. In consequence, search for new therapeutic modalities with minimal toxicity is of particular interest in colon cancer management. In this regard, powerful growth-inhibitory effect has been shown for fish-oil derived Eicosapentaenoic Acid (EPA) and Docosahexaenoic Acid (DHA) against cancer cells. In the present study, we evaluated the anti-cancer effect of EPA and DHA (n3-polyunsaturated fatty acids, n3-PUFAs) on the human colorectal cancer cell line (LS174T) on a dose-response and time-course basis.

Methods: LS174T cells were cultured in RPMI-1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum at 37 °C in a humidified incubator. Cancer cells were treated to various concentrations of EPA and DHA (50, 100, 150 µM/L) and incubated for 24-72 hours. Following treatments, dose-response and time-course cytotoxicity using viability and MTT assays were performed.

Results: Viability analysis showed that 150 µM/L PUFAs decreased significantly the proliferation of treated cells, as compared to untreated cells. In this regard, cell viabilities were found to be 31±5.1% and 30±2.6% for DHA and EPA respectively. Moreover, treatment of cells with increasing concentrations of EPA and DHA significantly decreased growth rates in a dose- and time-dependent manner. Following 72 hours treatments with 150 µM/L PUFAs, growth rates were found to be 19±5.5% and 20±5% for DHA and EPA relative to untreated cells respectively.

Conclusion: The results of this study indicate that n3-PUFAs decrease cell proliferation and could provide new approaches in malignant tumor therapeutic strategies.

Keywords: colorectal neoplasm, docosahexaenoic acid, eicosapentaenoic acid, fatty acid.