مقاله پژوهشی

ارمغان دانش، مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی یاسوج
دوره ۲۷، شماره۳، مرداد و شهریور ۱۴۰۱(شماره پی در پی ۱۵۲)

اثر داروی والپروئیک اسید بر بیان ژن‌های SOCS1, SOCS3, JAK1, JAK2, STAT3, STAT5Aو STAT5B در سرطان کبد رده سلولی HepG2

معصومه سنائی جهرمی، فریدون کاوسی*

مرکز تحقیقات بیماری‌های غیر واگیر، دانشگاه علوم پزشکی جهرم، جهرم، ایران

تاریخ وصول: ۱۴۰۰/۰۹/۱۸ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۲/۲۷

چکیده

زمینه و هدف: فعال شدن نابجای مسیرهای گوناگون داخل سلولی در تمایز، رشد، آپوپتوز و بقاء سلولی دخیل است. مسیرهای داخل سلولی شناخته شده مختلف از قبیل JAK/STAT باعث تومورزایی و ایجاد سرطان می‌شوند. این مسیر، یک نقش مهم در عملکردهای مختلف سلولی بازی می‌کند و به وسیله سیتوکین‌ها فعال می‌شود. ژن‌های سرکوب کننده مسیر سیتوکین (Suppressors of cytokine signaling, SOCSs)، یک نقش محوری در تنظیم سیستم ایمنی بازی می‌کنند. لذا هدف از تحقیق، تعیین و تأثیر داروی والپروئیک اسید بر بیان ژن‌های SOCS1, SOCS3, JAK1, JAK2, STAT3, STAT5Aو STAT5B در سرطان کبد رده سلولی HepG2 بود.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی که در سال ۱۳۹۹ انجام شد، سلول‌های سرطانی کبد رده HepG2 از انستیتو پاستور خریداری شدند و همپوشانی سلول‌ها به حدود ۸۰ درصد رسید. با استفاده از تریپسین، سلول‌ها جمع‌آوری و پس از شستشو، در پلیت‌های ۹۶ خانه کشت داده شدند. پس از گذشت مدت زمان ۲۴ ساعت از کشت سلول‌ها، محیط کشت تخلیه و محیط حاوی داروی والپروئیک اسید با غلظت‌های مختلف(۰، ۱، ۵، ۷/۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰ و ۲۵ میکرومول) جایگزین شد(گروه کنترل فقط حلال دارو یعنی DMSO دریافت کردند). پس از گذشت مدت زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت، سلول‌ها با محلول PBS شستشو داده شدند. برای تعین میزان زنده بودن سلول، از تکنیک MTT استفاده شد. برای تعین میزان سلول‌های آپوپتوتیک و بیان ژن سلول‌ها با داروی والپروئیک اسید با غلظت ۶/۶۴۳ میکرومول برای مدت ۲۴ ساعت و ۵/۴۰۱ میکرومول برای مدت ۴۸ ساعت تریت شدند و پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت به ترتیب از تکنیک‌های فلوسیتومتری و ریل تایم برای تعین سلول‌های آپوپتوتیک وبیان ژن‌های SOCS1, SOCS3, JAK1, JAK2, STAT3, STAT5A و STAT5B استفاده شد. داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از آزمون‌های آماری آنالیز واریانس یک طرفه و تست توکی تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: داروی والپروئیک اسید به طور معنی‌داری باعث افزایش بیان ژن‌های SOCS1 و SOCS3، کاهش بیان ژن‌های JAK1, JAK2, STAT3, STAT5A و STAT5B مهار رشد سلولی شد. این ترکیب به طور معنی‌داری باعث ایجاد آپوپتوزگردید($p<۰/۰۰۱$). درصد سلول‌های آپوپتوتیک پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت به ترتیب ۲۲/۳۸ و ۵۰/۳ بود. حداکثر میزان آپوپتوز پس از ۴۸ ساعت مشاهده گردید.

نتیجه‌گیری: داروی والپروئیک اسید می‌تواند از طریق مسیر JAK/STAT باعث القاء آپوپتوز در سرطان کبد رده HepG2 شود. به نظر می رسد داروی والپروئیک اسید، اثر آپوپتوتیک خود را از طریق کاهش بیان ژن‌های STAT5B , JAK1, JAK2, STAT3 و افزایش ژن‌های SOCS1 و SOCS3 انجام دهد.

واژه‌های کلیدی: والپروئیک اسید، مسیر JAK/STAT ، سرطان کبد، آپوپتوز

نویسنده مسئول: فریدون کاوسی، جهرم، دانشگاه علوم پزشکی جهرم، مرکز تحقیقات بیماری‌های غیر واگیر

Email: kavoosifraidoon@gmail.com

مقدمه

فعال شدن نابجای مسیرهای گوناگون داخل سلولی در تمایز، رشد، آپوپتوز و بقاء سلولی دخیل است. این مسیرها در القاء و پیشبرد سرطان دخیل هستند. مسیرهای داخل سلولی شناخته شده که باعث تومورزایی و ایجاد سرطان می‌شود شامل؛ Ras/Raf/MAPK ،Wnt/β-catenin ،PI3K/Akt/mTOR و JAK/STAT است(۲و۱). مسیر JAK/STAT یک نقش مهم در عملکردهای مختلف سلولی از قبیل تکثیر و پاسخ التهابی بازی می‌کند(۳). این مسیر می‌تواند به وسیله سیتوکین‌ها و فاکتورهای رشد مختلف از قبیل؛ اینترفرون‌ها، اینترلوکین‌ها و اعضای خانواده فاکتورهای رشد اپیدرمی که به گیرنده‌های غشایی متصل می‌شوند فعال شود. ناحیه سیتوپلاسمی این گیرنده‌ها به پروتئین جک(JAK) متصل شده و باعث فعال شدن جک می گردد. جک فعال شده با فسفوریله کردن تیزوزین ناحیه سیتوپلاسمی گیرنده، یک ناحیه برای اتصال STAT ایجاد می‌کند. سپس STAT فسفوریله شده به صورت جفت و زوج(dimer) فعال در می‌آید و به هسته مهاجرت می‌کند. در ادامه، STAT به ناحیه پروموتر(Promoter) ژن‌های هدف از قبیل MCL-1 متصل شده و باعث بیان آنها می‌شود(٤). خانواده جک در انسان شامل؛ JAK3، JAK2، JAK1 و TYK2 و اعضای خانواده STAT شامل؛ STAT5A، STAT5B، STAT4، STAT3، STAT2، STAT1 و STAT6 است.

ژن‌های سرکوب کننده مسیر سیتوکین(Suppressors of cytokine signaling, SOCSs)، یک نقش محوری در تنظیم سیستم ایمنی بازی می کنند. خانواده SOCS شامل؛ SOCS1, SOCS2 SOCS3, SOCS4, SOCS5, SOCS6, SOCS7 و cytokine-inducible SH2 domain protein (CIS or CISH) است. CIS یک تنظیم کننده وابسته و غیر وابسته به STAT در سیستم ایمنی است. این پروتئین‌ها به تیروزین فسفوریله شده گیرنده متصل شده و برای متصل شدن با STAT رقابت می کنند. SOCS پروتئین‌ها حاوی تقریباً ٤٠ جعبه آمینواسیدی(aminoacid box) هستند که SOCS box نامیده می‌شود، این پروتئین‌ها مرحله پایانی مسیر JAK/STAT را تنظیم می کنند(٥).

پژوهش‌های اخیر نشان داده است که دِاستیلاسیون ژن‌های SOCS(به عنوان ژن‌های سرکوب کننده سرطان) باعث خاموش شدن ژن و القاء سرطان‌های مختلف از قبیل سرطان کبد می‌شود(٦). استیلاسیون هیستون، حاصل یک تعادل بین فعالیت دو گروه از آنزیم‌ها، شامل؛ هیستون دِاستیلاز(histone deacetylases, HDACs) و هیستون استیل ترانسفراز(histone acetyltransferases, HATs) است(۷). یک ارتباط قوی بین فعالیت آنزیم‌های هیستون دِاستیلاز از قبیل؛ آنزیم‌های کلاس دوآ(۹، ۷، ٥، HDAC4)، هیستون دِاستیلاز ۲ و ۸، هیستون دِاستیلاز ۱۰ و هیستون دِاستیلاز ۱۱ و ایجاد سرطان کبد وجود دارد(۸).

ترکیبات مهارکننده آنزیم‌های هیستون دِاستیلاز علیه آنزیم‌های مزبور عمل می‌کنند، این ترکیبات تمایز سلولی، توقف چرخه سلولی، مرگ سلولی، کاهش رگ‌سازی(angiogenesis) و تعدیل پاسخ ایمنی را القاء می‌کنند. این داروها به پنج گروه قابل تقسیم هستند که عبارتند از؛ اسیدهای چرب باز بخیره کوتاه(short-chain fatty, acids)، هیدوکسامیک اسیدها، تتراپپتیدهای حلقوی، بنزامیدها و مهارکننده سرتوئین(۹). پیشتر ما تأثیر داروی تریکو استاتین آرا به عنوان یک داروی مهار کننده آنزیم هیستون دِاستیلاز را بر روی کلاس یک هیستون دِاستیلاز(۳، ۲، ۱ HDACs) و کلاس دو(٦، ٥، ٤ HDACs) بر سرطان کولون رده سلولی(LS 180 و LS 174T) گزارش کردیم(۱۱و۱۰). به علاوه، ما اثر داروی والپروئیک اسید را بر کلاس یک هیستون دِاستیلاز (۳، ۲، ۱ HDACs) بر سرطان کبد رده سلولی WCH-17 و HepG2 مورد بررسی قرار داریم(۱٤-۱۲). مضافاً این که ما گزارش کردیم داروی والپروئیک اسید باعث افزایش بیان ژن‌های $SOCS_1$ و $SOCS_3$ در سرطان کولون رده سلولی SW48 می‌شود(۱٥). به هر حال پژوهش‌های زیادی مسیر نامنظم JAK/STAT را در بسیاری از سرطان‌ها گزارش کرده‌اند(۱٦). لذا هدف از تحقیق موجود تعیین و تأثیر داروی والپروئیک اسید بر بیان ژن‌های SOCS1, SOCS3, JAK1, JAK2, STAT3, STAT5Aو STAT5B در سرطان کبد رده سلولی HepG2 بود.

روش بررسی

در این مطالعه تجربی که در سال ۱۳۹۸ انجام شد، سلول‌های سرطانی کبد رده HepG2 از بانک سلولی انستیتو پاستور کشور جمهوری اسلامی ایران (Cell Bank of Iran-Pasteur Institute) خریداری و در محلول Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) حاوی آنتی‌بیوتیک، پنی‌سیلین(penicillin G sodium)، استرپتومایسین(streptomycin) و آمفوتریپسین (amphotericin B) و غنی از سرم گاوی fetal bovine serum (FBS) در دمای ۳۷ درج سانتی‌گراد نگهداری شد. داروی والپروئیک اسید و دیگر مواد لازم از قبیل؛ محیط کشت(DMEM)، تریپسین(trypsin-EDTA)، MTT، کیت بیان ژن(Total RNA extraction Kit(TRIZOLreagent and real-time polymerase chain reaction (PCR) kits)، آنکسین Annexin-V-(FITC) و پروپیدیوم آیودید (propidium iodide, PI) از سیگما (Sigma) خریداری گردید.

ابتدا سلول‌های سرطانی کبد رده HepG2 کشت داده شدند و پس از این که همپوشانی سلول‌ها به حدود ۸۰ درصد رسید با استفاده از تریپسین سلول‌ها تریپسینه و جمع‌آوری شده و سپس با محلول FBS دو بار شستشو داده و در پلیت‌های ۹٦ خانه کشت داده شدند. در هر خانه از پلیت ^{5} ۱۰ ×۳ سلول کشت داده شد. پس از گذشت مدت زمان ۲٤ ساعت از کشت سلول‌ها، محیط کشت تخلیه و محیط حاوی داروی والپروئیک اسید با غلظت‌های مختلف(۰، ۱، ٥، ۷,٥، ۱۰، ۱٥، ۲۰ و ۲٥ میکرومول) جایگزین شد(گروه کنترل

فقط حلال دارو یعنی DMSO دریافت کردند). پس از گذشت مدت زمان ۲٤ و ٤۸ ساعت، سلول‌ها با محلول PBS شستشو و سپس محلول MTT برای مدت ٤ ساعت به آن‌ها اضافه شد. پس از ٤ ساعت، کریستال‌های رنگی ایجاد شده را با DMSO حل کرده و میزان رنگ ایجاد شده با طول موج ۵۷۰ مورد بررسی قرار گرفت. برای افزایش ضریب اطمینان، هر آزمایش ۳ بار تکرار شد. با استفاده از این روش، دوز مؤثر دارو به دست آمد که در جدول ۱ ذکر شده است. یادآور می‌شود که برای ادامه بررسی، یعنی بررسی میزان سلول‌های آپوپتوتیک و بیان ژن از این دوز استفاده شد.

برای تعیین میزان آپوپتوز سلولی، سلول‌های سرطانی کبد رده HepG2 در پلیت‌های ۲٤ خانه کشت داده(به ازای هر خانه $۱۰^{۵}$ ×۳ سلول) و با داروی والپروئیک اسید با غلظت مشخص شده در جدول ۱ کشت داده شدند(گروه کنترل فقط حلال دارو یعنی DMSO دریافت کردند). پس از گذشت مدت زمان ۲٤ و ٤۸ ساعت، تمام سلول‌ها با استفاده از تریپسین جمع‌آوری و با محلول PBS شستشو داده شدند و سپس آنکسین و پروپیدیوم آیودید اضافه کرده و برای مدت ۱۵ دقیقه در دمای اطاق و در تاریکی نگهداری شدند و در نهایت سلول‌های آپوپتوتک با دستگاه FACScanTM flow cytometer مورد شمارش قرار گرفت.

ابتدا سلول‌های سرطانی کبد رده HepG2 در پلیت‌های ۲٤ خانه کشت داده شدند. پس از گذشت ۲٤ ساعت، سلول‌ها با داروی والپروئیک اسید با غلظت مشخص شده در جدول ۱ برای مدت ۲٤ و ٤۸ ساعت تریت شدند و سپس تمام RNA سلول‌ها به وسیله کیت RNeasy mini kit طبق پروتکل مربوطه استخراج و به منظور حذف DNA ژنومی، RNA به دست آمده با کیت RNase-free DNase تریت شد. غلظت RNA با استفاده از دستگاه بیوفتومتر(BioPhotometer) تعیین گردید. با استفاده از کیت RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit از RNA حاصل cDNA ساخته شد و در نهایت با استفاده از سایبرگرین، Real-time RT-PCR انجام شد. از ژن GAPDH به عنوان کنترل استفاده شد. توالی پرایمرهای استفاده شده در جدول ۲ مشخص شده است. تفاوت نسبی نمونه مورد آزمایش در مقابل نمونه کنترل با فرمول $۲^{-}\Delta\Delta Ct$ محاسبه شد.

داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزار گراف پد پریسم ۸ و آزمون‌های آماری آنالیز واریانس یک طرفه و تست توکی تجزیه و تحلیل شدند.

جدول ۱: دوز مؤثر دارو که از طریق تکنیک MTT به دست آمده و برای بررسی بیان ژن و آپوپتوز سلولی

Cell line	Drug/ µM	Duration/Hour	IC50	LogIC50	R squared
HepG2	VPA	۲٤	٦/٦٤۳	۱/۱۵۱ الی ۰/٤۸۵۱	۰/۹۷۸۵
HepG2	VPA	٤۸	۵/٤۰۱	۰/۹۵۲۵ الی۰/٤۹٤۱	۰/۹٦۲۸

جدول ۲: توالی پرایمرهای استفاده شده برای ژن‌های SOCS1, SOCS3, JAK1, JAK2, STAT3, STAT5A **و** SOCS5B **در سرطان کبد رده سلولی** HepG2

Primer	Primer sequences (5' to 3')	طول محصول	رفرنس	درجه اتصال
SOCS1 Forward Reverse	AGCAGCTCGAAAAGGCAGTC ACACTCACTTCCGCACCTTC	۲۹۸	۱۷	۵۸
SOCS3 Forward Reverse	ACCAGCGCCACTTCTTCACG GTGGAGCATCATACTGATCC	۳۸۷	۱۷	۵۸
JAK1 Forward Reverse	CCACTACCGGATGAGGTTCTA GGGTCTCGAATAGGAGCCAG	۲۱۳	۱۸	۵۸
JAK2 Forward Reverse	GATGAGAATAGCCAAAGAAAACG TTGCTGAATAAATCTGCGAAAT	۱٦۰	۱۹	۵۸
STAT3 Forward Reverse	GCTTTTGTCAGCGATGGAGT ATTTGTTGACGGGTCTGAAGTT	۱۷٤	۱۹	۵۸
STAT5A Forward Reverse	AATGAGAACACCCGCAACG TTCCTGAAGTGGGCACTGAG	۱۰۱	۱۹	۵۸
STAT5B Forward Reverse	ACTGCTAAAGCTGTTGATGGATAC TGAGTCAGGGTTCTGTGGGTA	۱۷٤	۱۹	۵۸
GAPDH Forward Reverse	TGTGGGCATCAATGGATTTGG ACACCATGTATTCCGGGTCAAT	۱۱٦	۲۰	۵۸

یافته‌ها

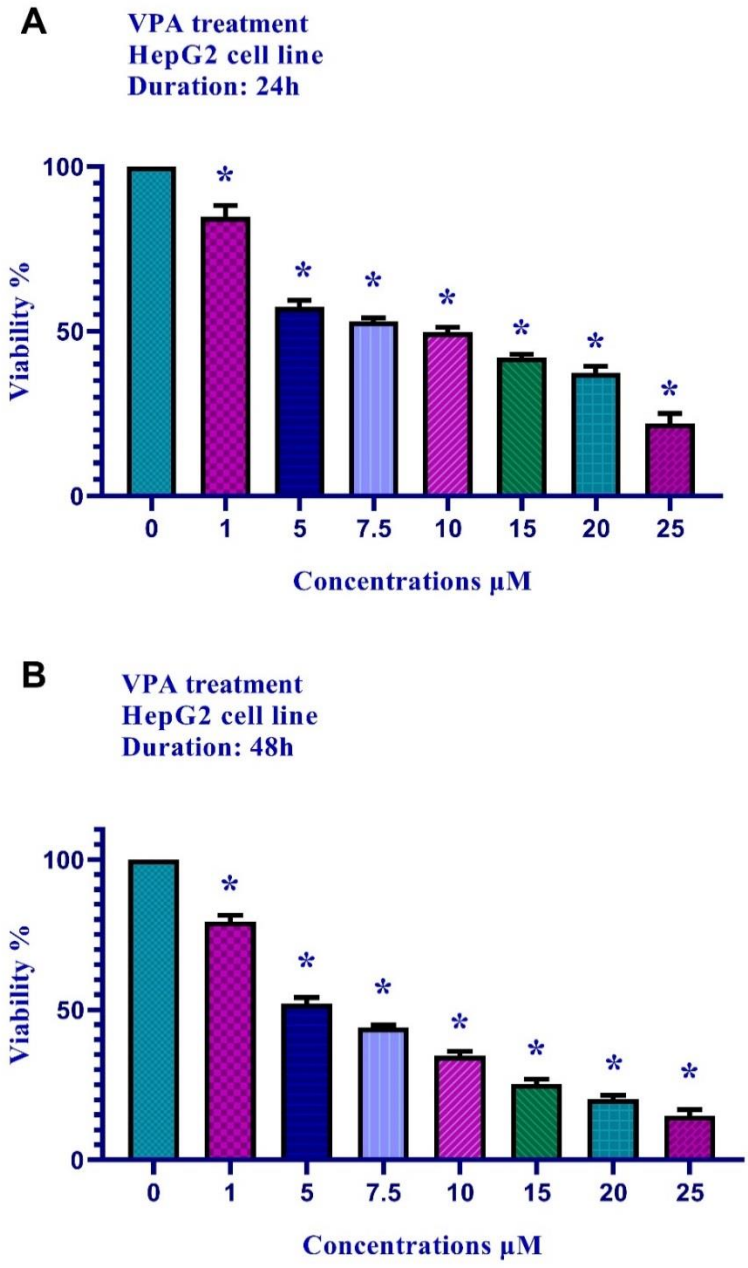
سلول‌های سرطانی کبد رده HepG2 با داروی والپروئیک اسید با غلظت‌های مختلف که در قسمت روش‌ها ذکر شده است برای مدت ۲٤ و ٤۸ ساعت تریت شدند سپس میزان سلول‌های زنده به وسیله تکنیک MTT مشخص شد. هم‌چنان که در شکل ۱ مشخص شده است این دارو توانست با تمام غلظت‌های استفاده شده به صورت وابسته به دوز رشد سلولی را به صورت معنی‌داری مهار کند($p<۰/۰۰۱$). دوز مؤثر این دارو که توانست رشد ۵۰ درصد سلول‌ها را مهار کند در جدول ۱ مشخص شده است.

برای تعیین سلول‌های آپوپتوتیک کبد رده HepG2، سلول‌ها با داروی والپروئیک اسید(با غلظت مشخص شد) برای مدت ۲٤ و ٤۸ ساعت تریت شدند. پس از تریتمنت سلول‌ها، با استفاده از رنگ‌آمیزی آنکسین و پروپیدیوم آیدید میزان سلول‌های آپوپتوتیک مشخص گردید. این ترکیب به طور معنی‌داری باعث ایجاد آپوپتوز گردید(شکل ۲)($p<۰/۰۰۱$) درصد سلول‌های آپوپتوتیک پس از ۲٤ و ٤۸ ساعت به ترتیب ۲۲/۳۸ و ۵۰/۳ بود($p<۰/۰۰۱$). حد اکثر میزان آپوپتوز پس از ٤۸ ساعت مشاهده گردید(شکل ۳).

نتیجه تعیین بیان ژن نشان داد که داروی والپروئیک اسید(با غلظت مشخص شده می‌تواند به صورت معنی‌داری باعث کاهش بیان ژن‌های JAK1, STAT5B , JAK2, STAT3 ، افزایش ژن‌های SOCS1 و SOCS3 شود(شکل ٤). میزان بیان ژن‌های مزبور در

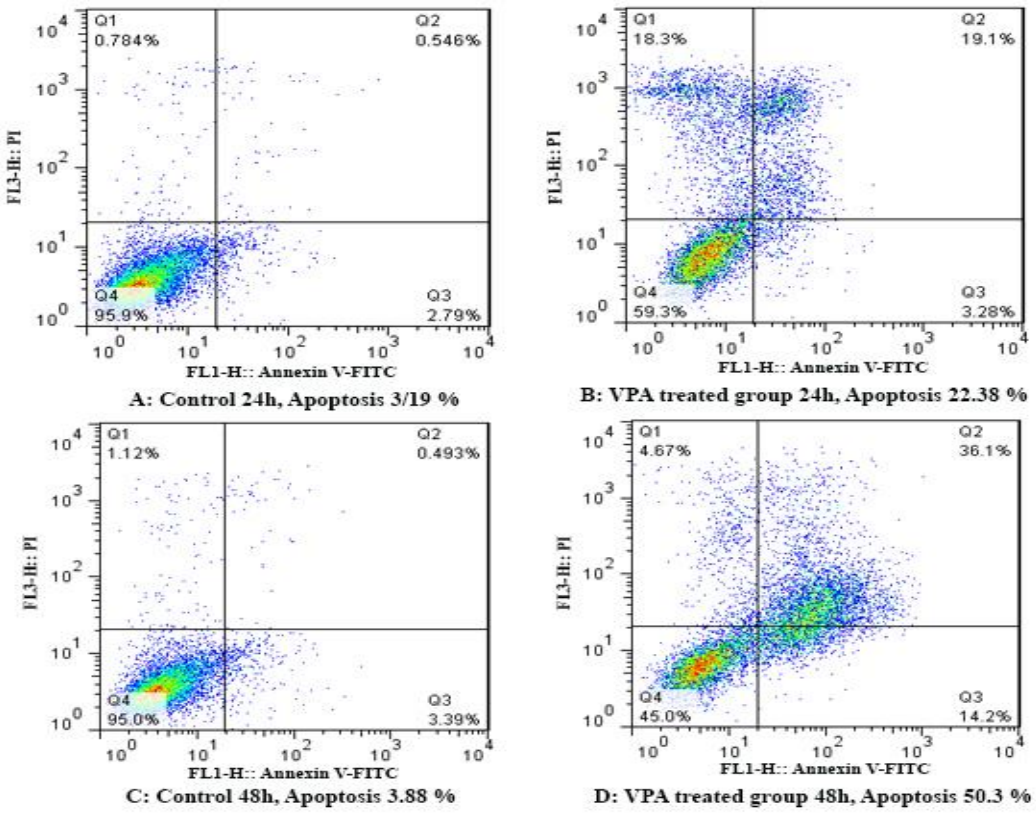
جدول ۳ مشخص شده است. بیشترین میزان بیان ژن، پس از مدت ٤٨ ساعت مشاهده شد.

پس از تریت سلول ها با دارو با غلظت ٥/٤ میکرومول



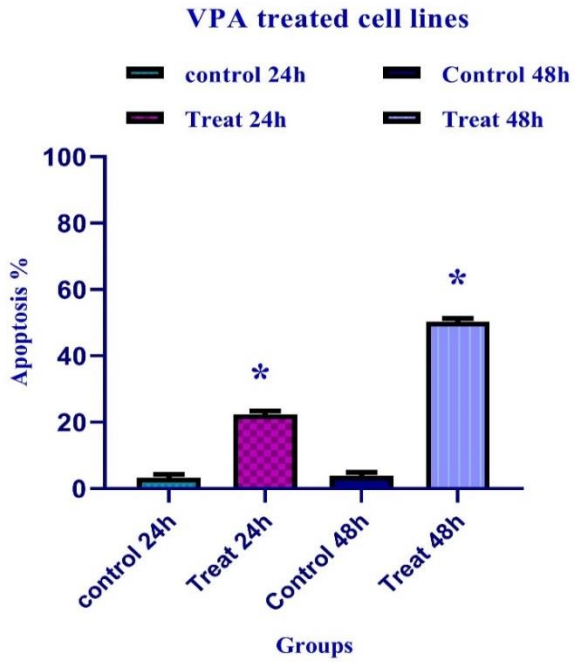
شکل ۱: نتیجه تعیین سلول‌های زنده در سرطان کبد رده HepG2 **که با داروی والپروئیک اسید با غلظت های مختلف(۰، ۱، ۵، ۷,۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰ و ۲۵ میکرومول) برای مدت ۲٤ و ٤٨ تریت شده بودند**

* تفاوت معنی‌دار گروه‌های تریت شده با دارو در مقایسه با گروه کنترل نشان می‌دهد(p<۰/۰۰۱)

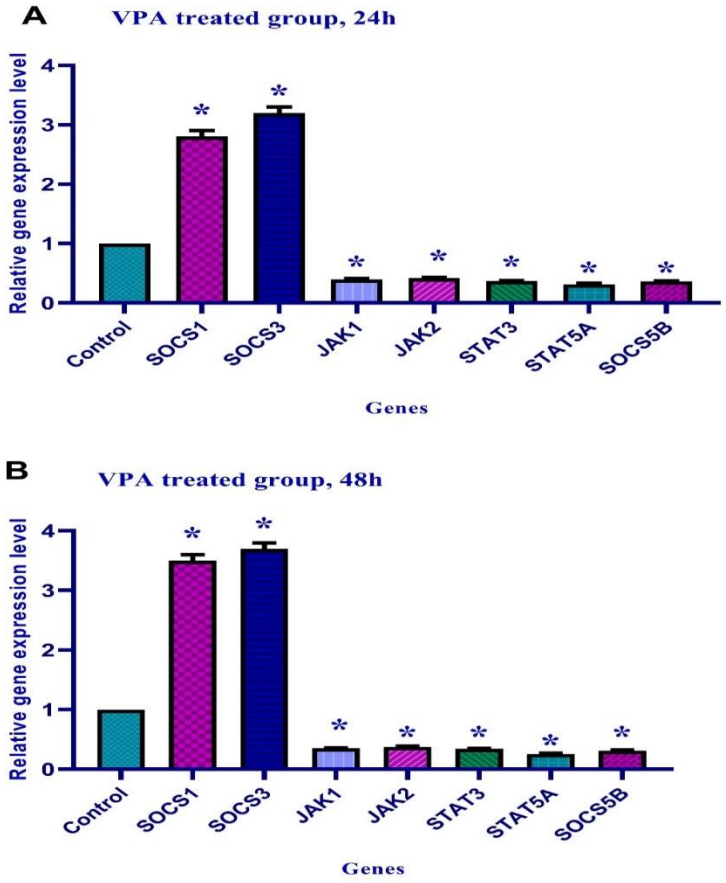


شکل ۲: نتیجه تعیین سلول‌های آپوپتوتیک در سرطان کبد رده HepG2 که با داروی والپروئیک اسید تریت شدند.

*علامت ستاره تفاوت معنی دار گروه های تریت شده با دارو در مقایسه با گروه کنترل نشان می دهد(**p<۰/۰۰۱**)



شکل ۳: نمودار مقایسه میزان آپوپتوز سلول‌های سرطان کبد رده HepG2 در زمان‌های مختلف



شکل ٤: نتیجه تعیین بیان ژن‌های SOCS1, SOCS3, JAK1, JAK2, STAT3, STAT5A و STAT5B **در سرطان کبد رده** HepG2 **که با داروی والپروئیک اسید تریت شدند**

***علامت ستاره تفاوت معنی‌دار گروه‌های تریت شده با دارو در مقایسه با گروه کنترل نشان می‌دهد(p<۰/۰۰۱)**

جدول ۳ : نتیجه تعیین بیان ژن‌های SOCS1, SOCS3, JAK1, JAK2, STAT3, STAT5A و SOCS5B در سرطان کبد رده HepG2.

Cell line	Gene	Drug	مدت تریتمنت	میزان بیان ژن	سطح معنی‌داری
HepG2	SOCS1	VPA	٢٤	٢/٨	٠/٠٠٠١
HepG2	SOCS1	VPA	٤٨	٣/٥	٠/٠٠٠١
HepG2	SOCS3	VPA	٢٤	٣/٢	٠/٠٠٠١
HepG2	SOCS3	VPA	٤٨	٣/٧	٠/٠٠٠١
HepG2	JAK1	VPA	٢٤	٠/٣٩	٠/٠٠٠١
HepG2	JAK1	VPA	٤٨	٠/٣٥	٠/٠٠٠١
HepG2	JAK2	VPA	٢٤	٠/٤١	٠/٠٠٠١
HepG2	JAK2	VPA	٤٨	٠/٣٧	٠/٠٠٠١
HepG2	STAT3	VPA	٢٤	٠/٣٧	٠/٠٠٠١
HepG2	STAT3	VPA	٤٨	٠/٣٤	٠/٠٠٠١
HepG2	STAT5A	VPA	٢٤	٠/٣١	٠/٠٠٠١
HepG2	STAT5A	VPA	٤٨	٠/٢٧	٠/٠٠٠١
HepG2	STAT5B	VPA	٢٤	٠/٣٦	٠/٠٠٠١
HepG2	STAT5B	VPA	٤٨	٠/٣١	٠/٠٠٠١

بحث

تغییرات اپی‌ژنتیک، می‌توانند باعث مهار بیان ژن‌ها و خاموش شدن ژن‌ها شوند. تغییراتی از قبیل؛ متیلاسیون DNA و هیستون دِاستیلاسیون می‌توانند باعث فشرده شدن کروماتین و عدم امکان نسخه‌برداری شوند. چنین تغییراتی در ژن‌های مهار کننده سرطان، باعث عدم بیان این ژن‌ها شده و در نتیجه تکثیر سلول‌هایی رویه ادامه یافته و منجر به سرطان می‌شود. داروهای مهار کننده آنزیم‌های DNA متیل ترانس فراز و هیستو دِاستیلاز می‌توانند از طریق مهار آنزیم‌های مزبور باعث بیان مجدد ژن‌های خاموش شده و در نتیجه القاء آپوپتوز شوند. لذا هدف از تحقیق تعیین و تأثیر داروی والپروئیک اسید بر بیان ژن‌های SOCS1, SOCS3, JAK1, JAK2, STAT3, STAT5A و STAT5B در سرطان کبد رده سلولی HepG2 بود.

اختلال در مسیرJAK/STAT، عامل ایجاد بسیاری از سرطان‌هاست. گزارش شده است که ژن‌های سرکوب‌گر مسیر سیتوکین(SOCS) که تنظیم کننده منفی مسیر JAK/STAT هستند نقش سرکوب کننده سرطان دارند. پژوهش‌های اخیر نشان داده است که داروهای مهارکننده آنزیم‌های هیستون دِاستیلاز از قبیل تریکواستاین آ (trichostatin A) و والپروئیک اسید باعث استیلاسیون ناحیه پروموتر (Promoter) ژن های سرکوبگر مسیر سیتوکین($SOCS_1$ و $SOCS_3$) شده و در نتیجه باعث بیان مجدد این ژن‌ها می‌گردد. بیان مجدد این ژن‌ها که به عنوان ژن‌های سرکوب کننده سرطان محسوب می‌شوند باعث مهار مسیر JAK/STAT و کاهش بیان ژن‌های متعلق به این مسیر شده و در نتیجه باعث ایجاد آپوپتوز در سلول‌های سرطانی می گردد (۲۱). نتیجه پژوهش‌های حاضر نشان داد که داروی والپروئیک اسید قادر است باعث افزایش بیان ژن‌های $SOCS_1$ و $SOCS_3$ و کاهش بیان ژن‌های JAK1, JAK2, STAT3, STAT5A و STAT5B، مهار رشد سلولی و ایجاد آپوپتوز در سلول‌های سرطانی کبد رده $HepG_2$ گردد.

مشابه نتایج حاضر، دیگر پژوهش‌ها گزارش کرده‌اند که داروی مهار کننده آنزیم هیستون دِاستیلاز از قبیل تریکواستاتینآ با افزایش بیان ژن‌های $SOCS_1$ و $SOCS_3$ باعث مهار مسیر $JAK_2/STAT_3$ می‌شوند(۲۲). هم‌چنین گزارش شده است که داروهای مهارکننده آنزیم‌های هیستون دِاستیلاز با افزایش بیان ژن $SOCS_3$ باعث مهار مسیر JAK/STAT و ایجاد آپوپتوز در سلول‌های سرطانی خون رده MV4-11 می‌شود(۲۳).

نتیجه پژوهش‌های قبلی ما نشان داد که داروی والپروئیک اسید با کاهش بیان ژن هیستون دِاستیلاز ۱، باعث افزایش بیان ژن $SOCS_1$ و در نتیجه القاء آپوپتوز در سلول‌های سرطانی کبد رده LCL-PI11 می‌شود(۲٤).

ترکیبات مهارکننده آنزیم‌های هیستون دِاستیلاز از قبیل؛ ساها (suberoylanilidehydroxamic acid,SAHA) و ITF2357 باعث افزایش بیان ژن‌های $SOCS_1$ و $SOCS_3$ در سلول‌های گلیال می‌گردد(۲۵). پژوهش‌های آزمایشگاهی نشان

داده است که ترکیباتی از قبیل تریکواستاتین آ و ITF2357 (به عنوان داروهای مهارکننده آنزیم‌های هیستون دِاستیلاز) باعث افزایش بیان ژن‌های $SOCS_1$ و $SOCS_3$ و القاء آپوپتوز در سلول‌های سرطانی کولورکتال می‌شوند(۲۶). شایان ذکر است که مسیر JAK/STAT تنها مسیری نیست که والپروئیک اسید به واسطه آن باعث القاء آپوپتوز می‌گردد. علاوه بر این مسیر، پژوهش‌های اخیر نشان داده است که این دارو از طریق مهار آنزیم هیستون دِاستیلاز(HDAC4) و کاهش بیان $Notch_1$ باعث مهار مسیر Notch (Notch signaling) و افزایش بیان ژن‌های سرکوب کننده توموری P_{21} و P_{63} و در نتیجه ایجاد آپوپتوز در سلول‌های سرطانی کبد می‌گردد(۲۷). دیگر مسیرهایی که داروی والپروئیک اسید به واسطه آنها باعث القاء آپوپتوز می گردد شامل؛ histone deacetylases, GSK3 α and β, Akt, the ERK pathway, the phosphoinositol pathway, the tricarboxylic acid cycle, GABA, and the OXPHOS system.(۲۴۲۸). پژوهش‌های قبلی ما نشان داد که داروهای والپروئیک اسید و تریکواستاتین آ با مهار آنزیم‌های DNA متیل ترانس فراز باعث افزایش بیان ژن‌های تنظیم کننده چرخه سلولی(شامل P_{21}، P_{27} و P_{57}) و ایجاد آپوپتوز در سلول های سرطانی کولون رده SW480 می‌شود(۲۹). هم‌چنین گزارش شده است که داروی والپروئیک اسید از طریق فعال کردن آنزیم‌های کاسپاز باعث القاء آپوپتوز در سلول‌های سرطانی کبد می‌شود(۳۰). در مجموع می‌توان نتیجه‌گیری کرد که مسیر JAK/STAT تنها مسیر آپوپتوزی داروی والپروئیک اسید در سرطان کبد نیست. بنابراین بررسی مسیرهای آپوپتوزی دیگر که در بالا ذکر شد در سلول‌های سرطانی کبد پیشنهاد می گردد.

با توجه به محدودیت‌های بودجه و محدودیت‌های تکنیکی، ما نتوانستیم میزان پروتئین‌های ژن‌های مورد مطالعه مورد بررسی قرار دهیم.

با توجه به اثر داروی والپروئیک اسید بر بیان ژن‌های SOCS1, SOCS3, JAK1, JAK2, STAT3, STAT5A و STAT5B در سرطان کبد رده HepG2 پیشنهاد می‌شود اثر این دارو بر دیگر رده‌های سلولی سرطان کبد مورد بررسی قرار گیرد.

نتیجه‌گیری

داروی والپروئیک اسید قادر است از طریق افزایش بیان ژن‌های SOCS1 و SOCS3 و کاهش بیان ژن‌های JAK1, JAK2, STAT3 و STAT5B باعث مهار رشد سلولی و ایجاد آپوپتوز در سرطان کبد، رده سلولی HepG2 شود.

تقدیر و تشکر

این مقاله برگرفته از طرح تحقیقاتی مصوب شورای پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی جهرم با کد IR.JUMS.REC.1394.131 می‌باشد و با حمایت مالی این دانشگاه انجام شد.

REFERENCES

1.Chen C, Wang G. Mechanisms of hepatocellular carcinoma and challenges and opportunities for molecular targeted therapy. World Journal of Hepatology 2015; 7(15): 1964.

2.Alqahtani A, Khan Z, Alloghbi A, S Said Ahmed T, Ashraf M, M Hammouda D. Hepatocellular carcinoma: molecular mechanisms and targeted therapies. Medicina 2019; 55(9): 526.

3.Thomas S, Snowden J, Zeidler M, Danson S. The role of JAK/STAT signalling in the pathogenesis, prognosis and treatment of solid tumours. British Journal of Cancer 2015; 113(3): 365-71.

4.Rosmorduc O, Desbois-Mouthon C. Targeting STAT3 in hepatocellular carcinoma: Sorafenib again. Journal of Hepatology 2011; 55(5): 957-9.

5.Seif F, Khoshmirsafa M, Aazami H, Mohsenzadegan M, Sedighi G, Bahar M. The role of JAK-STAT signaling pathway and its regulators in the fate of T helper cells. Cell Communication and Signaling 2017; 15(1): 1-13.

6.Zhang X, Wang J, Cheng J, Ding S, Li M, Sun S, et al. An integrated analysis of SOCS 1 down-regulation in HBV infection-related hepatocellular carcinoma. Journal of Viral Hepatitis 2014; 21(4): 264-71.

7.Kim JH, Jee BC, Lee JM, Suh CS, Kim SH. Histone acetylation level and histone acetyltransferase/deacetylase activity in ejaculated sperm from normozoospermic men. Yonsei Med J 55(5):1333-1340.

8.Freese K, Seitz T, Dietrich P, Lee SM, Thasler WE, Bosserhoff A, et al. Histone deacetylase expressions in hepatocellular carcinoma and functional effects of histone deacetylase inhibitors on liver cancer cells in vitro. Cancers 2019; 11(10): 1587.

9.Eckschlager T, Plch J, Stiborova M, Hrabeta J. Histone deacetylase inhibitors as anticancer drugs. International Journal of Molecular Sciences 2017; 18(7): 1414.

10.Sanaei M, Kavoosi F. Investigation of the effect of zebularine in comparison to and in combination with trichostatin A on p21Cip1/Waf1/Sdi1, p27Kip1, p57Kip2, DNA methyltransferases and histone deacetylases in colon cancer LS 180 cell line. Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP. 2020;21(6):1819.

11.Sanaei M, Kavoosi F. Effect of zebularine in comparison to and in combination with trichostatin A on CIP/KIP family (p21Cip1/Waf1/Sdi1, p27Kip1, and p57Kip2), DNMTs (DNMT1, DNMT3a, and DNMT3b), class I HDACs (HDACs 1, 2, 3) and class II HDACs (HDACs 4, 5, 6) gene expression, cell growth inhibition and apoptosis induction in colon cancer LS 174T cell line. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP. 2020;21(7):2131.Cell Line.

12.Sanaei M, Kavoosi F. Effects of 5-aza-2'-deoxycytidine and Valproic Acid on Epigenetic-modifying DNMT1 Gene Expression, Apoptosis Induction and Cell Viability in Hepatocellular Carcinoma WCH-17 cell line. Iranian Journal of Pediatric Hematology & Oncology. 2019;9(2): 83-90.

13.Kavoosi F, Sanaei M. Comparative analysis of the effects of valproic acid and tamoxifen on proliferation, and apoptosis of human hepatocellular carcinoma WCH 17 celllin. Iranian Journal of Pediatric Hematology and Oncology 2018; 8(1): 12-20.

14.Sanaei M, Kavoosi F. Effect of valproic acid on the class i histone deacetylase 1, 2 and 3, tumor suppressor genes p21WAF1/CIP1 and p53, and intrinsic mitochondrial apoptotic pathway, Pro-(Bax, Bak, and Bim) and anti-(Bcl-2, Bcl-xL, and Mcl-1) apoptotic genes expression, cell viability, and apoptosis induction in hepatocellular carcinoma hepg2 cell line. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP 2021; 22(S1): 89-95.

15.Sanaei M, Kavoosi F, Behjoo H. Effect of valproic acid and zebularine on SOCS-1 and SOCS-3 gene expression in colon carcinoma SW48 cell line. Experimental Oncology 2020; 42(3): 183-7.

16.Tang JJH, Thng DKH, Lim JJ, Toh TB. JAK/STAT signaling in hepatocellular carcinoma. Hepatic Oncology 2020; 7(1): 1-15.

17.Park EJ, Park SY, Joe E-h, Jou I. 15d-PGJ2 and rosiglitazone suppress janus kinase-STAT inflammatory signaling through induction of suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS1) and SOCS3 in glia. Journal of Biological Chemistry 2003; 278(17): 14747-52.

18.Chen B, Lai J, Dai D, Chen R, Li X, Liao N. JAK1 as a prognostic marker and its correlation with immune infiltrates in breast cancer. Aging(Albany NY) 2019; 11(23): 11124.

19.Xiong H, Chen ZF, Liang QC, Du W, Chen HM, Su WY, et al. Inhibition of DNA methyltransferase induces G2 cell cycle arrest and apoptosis in human colorectal cancer cells via inhibition of JAK2/STAT3/STAT5 signalling. Journal of Cellular and Molecular Medicine 2009; 13(9b): 3668-79.

20.Zhao S, Guo J, Zhao Y, Fei C, Zheng Q, Li X, et al. Chidamide, a novel histone deacetylase inhibitor, inhibits the viability of MDS and AML cells by suppressing JAK2/STAT3 signaling. American Journal of Translational Research 2016; 8(7): 3169.
21. Xiong H, Du W, Zhang YJ, Hong J, Su WY, Tang JT, et al. Trichostatin A, a histone deacetylase inhibitor, suppresses JAK2/STAT3 signaling via inducing the promoter-associated histone acetylation of SOCS1 and SOCS3 in human colorectal cancer cells. Molecular Carcinogenesis 2012; 51(2): 174-84.
22.Jiang M, Zhang WW, Liu P, Yu W, Liu T, Yu J. Dysregulation of SOCS-mediated negative feedback of cytokine signaling in carcinogenesis and its significance in cancer treatment. Frontiers in Immunology 2017; 8: 70.
23.Johan MF, Jusoh SAM. AB119. Induction of suppressor of cytokine signaling-3 in FLT3-ITD positive MV4-11 acute myeloid leukemia cells in response to 5-Azacytidine and Trichostatin A. Annals of Translational Medicine 2015; 3: 1-12
24.Sanaei M, Kavoosi F, Esmi Z. The effect of 5-aza-2′-deoxycytidine in combination to and in comparison with vorinostat on DNA methyltransferases, histone deacetylase 1, glutathione S-transferase 1 and suppressor of cytokine signaling 1 genes expression, cell growth inhibition and apoptotic induction in hepatocellular LCL-PI 11 cell line. International Journal of Hematology-Oncology and Stem Cell Research 2020; 14(1): 45.
25.Faraco G, Pittelli M, Cavone L, Fossati S, Porcu M, Mascagni P, et al. Histone deacetylase (HDAC) inhibitors reduce the glial inflammatory response in vitro and in vivo. Neurobiology of Disease 2009; 36(2): 269-79.
26.Sachan M, Kaur M. Epigenetic modifications: therapeutic potential in cancer. Brazilian Archives of Biology and Technology 2015; 58(4): 526-39.
27.Sun G, Mackey LV, Coy DH, Yu C-Y, Sun L. The histone deacetylase inhibitor vaproic acid induces cell growth arrest in hepatocellular carcinoma cells via suppressing notch signaling. Journal of Cancer 2015; 6(10): 996.
28.Kostrouchova M, Kostrouch Z, Kostrouchova M. Valproic acid, a molecular lead to multiple regulatory pathways. Folia biologica-praha 2007; 53(2): 37.
29.Sanaei M, Kavoosi F. Effect of 5-aza-2'-deoxycytidine in comparison to valproic acid and trichostatin A on histone deacetylase 1, DNA methyltransferase 1, and CIP/KIP family (p21, p27, and p57) genes expression, cell growth inhibition, and apoptosis induction in colon cancer SW480 cell line. Advanced Biomedical Research 2019; 8: 52-59.
30.Sanaei M, Kavoosi F. Profound inhibitory and apoptotic effects of histone deacetylase inhibitor valproic acid on different cancers. Crescent Journal of Medical and Biological Sciences 2019; 6(4): 441-8.

Armaghane-danesh, Yasuj University of Medical Sciences Journal (YUMSJ)

Original Article

The Effect of Valproic Acid Drug on the Expression of SOCS1, SOCS3, JAK1, JAK2, STAT3, STAT5A and STAT5B Genes in HepG2 Cell Line Liver Cancer

Sanai Jahormi M, Kaousi F*

Non-communicable Diseases Research Center, Jahrom University of Medical Sciences, Jahrom, Iran

Received: 09 Nov 2021 Accepted: 17 Jan 2022

Abstract:

Background & aim: Aberrant activation of various intracellular pathways is involved in differentiation, growth, apoptosis and cell survival. Different known intracellular pathways such as JAK/STAT cause tumor genesis and cancer development. This pathway plays an important role in various cellular functions and is activated by cytokines. Suppressors of cytokine signaling (SOCSs) genes play a pivotal role in regulating the immune system. Therefore, the aim of the research was to determine the effect of valproic acid drug on the expression of SOCS1, SOCS3, JAK1, JAK2, STAT3, STAT5A and STAT5B genes in HepG2 cell line liver cancer.

Methods: In the present experimental study conducted in 2019, HepG2 liver cancer cells were purchased from Pasteur Institute and the overlapping of the cells reached about 80%. Using trypsin, the cells were collected and after washing, they were cultured in 96-well plates. After 24 hours of cell culture, the culture medium was drained and the medium containing valproic acid drug with different concentrations (0, 1, 5, 7.5, 10, 15, 20 and 25 µmol) was replaced (solvent only control group). They received the drug, DMSO). After 24 and 48 hours, the cells were washed with PBS solution. MTT technique was used to determine cell viability. To determine the amount of apoptotic cells and gene expression, the cells were treated with valproic acid with a concentration of 6.643 µmol for 24 hours and 5.401 µmol for 48 hours, and after 24 and 48 hours, flow cytometry and real-time techniques were used for Determination of apoptotic cells and expression of SOCS1, SOCS3, JAK1, JAK2, STAT3, STAT5A and STAT5B genes were used. The collected data were analyzed using one-way analysis of variance and Turkey's test.

Results: Valproic acid significantly increased the expression of SOCS1 and SOCS3 genes, decreased the expression of JAK1, JAK2, STAT3, STAT5A and STAT5B genes and inhibited cell growth. This combination significantly caused apoptosis ($p<0.001$). The percentage of apoptotic cells after 24 and 48 hours was 22.38 and 50.3, respectively. The maximum amount of apoptosis was observed after 48 hours.

Conclusion: Valproic acid can induce apoptosis in HepG2 liver cancer through JAK/STAT pathway. Valproic acid seems to exert its apoptotic effect by decreasing the expression of JAK1, JAK2, STAT3, STAT5B genes and increasing SOCS1 and SOCS3 genes.

Keywords: Valproic acid, JAK/STAT pathway, Liver cancer, Apoptosis

*Corresponding author: **Kaousi F,** Non-communicable Diseases Research Center, Jahrom University of Medical Sciences, Jahrom, Iran

Email: kavoosifraidoon@gmail.com

Please cite this article as follows: Sanai Jahormi M, Kaousi F. The Effect of Valproic Acid Drug on the Expression of SOCS1, SOCS3, JAK1, JAK2, STAT3, STAT5A and STAT5B Genes in HepG2 Cell Line Liver Cancer. Armaghane-danesh 2022; 27(3): 336-348.