

بررسی اثر داروی والپروئیک اسید بر مسیر JAK/STAT و بیان ژن‌های SOCS1, SOCS3, Bcl-xL, c-Myc و Mcl-1، مهار رشد سلولی و القاء آپوپتوز در سرطان کولون رده سلولی HT 29

معصومه سنائی جهرمی، فریدون کاوسی*

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

تاریخ وصول: ۱۴۰۰/۰۱/۰۷ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۲/۱۵

چکیده

زمینه و هدف: سیتوکین‌ها، خانواده بزرگی از پروتئین‌های پیامبر هستند، این پروتئین‌ها، سرطان‌های مختلف را القاء می‌کنند. واسطه سیتوکین‌ها، جانوس کینازها (Janus kinases, JAKs) هستند. این کینازها، پس از فعال شدن باعث فسفوریله شدن پروتئین STAT (Signal Transducers and Activators of Transcription) شده و STAT باعث تنظیم بیان ژن‌های دخیل در تمایز، تکثیر و آپوپتوز سلولی می‌شود. اشکال و اختلال در روند مسیر JAK/STAT باعث تومور زایی و ایجاد سرطان می‌شود. بیان نا به جای ژن‌های STAT باعث اختلال در بیان و افزایش بیان ژن‌های Bcl-xL, c-Myc, Mcl-1, CCND1 و VEGF شده و در نتیجه باعث تکثیر غیرقابل کنترل سلول و ایجاد سرطان می‌شود. هدف از این تحقیق تعیین و بررسی اثر داروی والپروئیک اسید بر روی بیان ژن‌های Mcl-1, JAK1, JAK2, STAT3, STAT5A, STAT5B, SOCS1, SOCS3, Bcl-xL, c-Myc، میزان زنده بودن سلول و القاء آپوپتوز در سرطان کولون رده سلولی HT29 بود.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی که در سال ۱۳۹۸ انجام شد، سلول‌های سرطانی کولون رده HT 29 با والپروئیک اسید تیمار شدند. برای تعیین میزان زنده بودن سلول، سلول‌های آپوپتوتیک و بیان ژن به ترتیب از تکنیک‌های MTT، فلوسیتومتری و ریل تایم استفاده شد. داده‌های حاصله با استفاده از نرم‌افزار گراف پد پریسم ۸ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

یافته‌ها: داروی والپروئیک اسید به طور معنی‌داری باعث مهار رشد سلولی، القاء آپوپتوز، کاهش بیان ژن‌های JAK1, JAK2, STAT3, Mcl-1 و STAT5A, STAT5B, Bcl-xL, c-Myc و افزایش بیان ژن‌های SOCS1 و SOCS3 گردید. تغییر در بیان ژن‌های فوق باعث مهار تکثیر سلولی و القاء آپوپتوز در سلول‌های سرطانی مورد مطالعه شد.

نتیجه‌گیری: داروی والپروئیک اسید می‌تواند از طریق مسیر JAK/STAT باعث القاء آپوپتوز در سرطان کولون رده سلولی HT29 شود. این مسیر شامل ژن‌های سرطان‌زا و ژن‌های سرکوب‌کننده سرطان است. داروی مورد استفاده توانست با کاهش بیان ژن‌های سرطان‌زا (ژن‌های Bcl-xL, c-Myc, STAT3, STAT5A, STAT5B, JAK1, JAK2, Mcl-1) و افزایش بیان ژن‌های سرکوب‌کننده سرطان (ژن‌های SOCS1 و SOCS3) رشد سلولی را مهار کرده و آپوپتوز سلولی را افزایش دهد.

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

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

Email: kavooisfraidoon@gmail.com

مقدمه

سیتوکین‌ها، خانواده بزرگی از پروتئین‌های پیامبر هستند. این پروتئین‌ها، سرطان‌های مختلف را القاء می‌کنند. بر اساس ساختمان، این خانواده به چهار گروه تقسیم می‌شود که شامل؛ اینترفرون (Interferon)، هماتوپوئیتین‌ها (Hematopoietins)، کموکین (Chemokine) و تومور نکروتیک فاکتور (Tumor Necrosis Factor) است. این پروتئین‌ها پس از اتصال به گیرنده غشائی سطح سلول هدف باعث ایجاد پاسخ‌های مختلف سلولی می‌شوند (۱). واسطه سیتوکین‌ها، جانوس کینازها (Janus Kinases) هستند. این کینازها، پس از فعال شدن باعث فسفوریله شدن پروتئین STAT (Signal Transducers and Activators of Transcription) شده و STAT باعث تنظیم بیان ژن‌های دخیل در تمایز، تکثیر و آپوپتوز سلولی می‌شود (۲). اشکال و اختلال در روند مسیر JAK/STAT باعث تومورزایی و ایجاد سرطان می‌شود. بیان نا به جای ژن‌های STAT باعث اختلال در بیان و افزایش بیان ژن‌های Bcl-xL, c-Myc, Mcl-1, CCND1 و VEGF شده و در نتیجه باعث تکثیر غیرقابل کنترل سلول و ایجاد سرطان می‌گردد (۳). ژن‌های سرکوبگر مسیر سیتوکین (Suppressors of Cytokine Signaling) و پروتئین SH2-Containing Protein Tyrosine HSP₁ (Phosphatase 1) فاکتورهای تنظیمی منفی هستند که نقش مهم آنها در تنظیم منفی پاسخ سیتوکین‌ها و خاتمه دادن به فعالیت و مسیر JAK/STAT است (۴). پروتئین‌های STAT از طریق تنظیم نسخه‌برداری

SOCS، یک فیدبک کنترل منفی ایجاد می‌کنند. در انسان چهار نوع JAK و شش نوع STAT وجود دارد. خانواده جک شامل؛ JAK1, JAK2, JAK3 و TYK2 است. پروتئین جک به علت حضور دو نوع کیناز شامل JH₁ و JH₂ بدین نام نامگذاری شده‌اند. JH₁ کار فسفوریله کردن را انجام می‌دهد و JH₂، عملکرد JH₁ را تنظیم می‌کند (۵).

بیان نا به جای ژن‌ها یک نقش مهم و تعیین کننده در بیولوژی سرطان دارد. این اختلال بیان در سطح اپی ژنتیک، بدون تغییر در توالی DNA انجام می‌شود. خاموش شدن ژن به روش اپی ژنتیک اهمیت ویژه‌ای در میکروارگانسیم‌های یوکاریوت دارد. پروسه کلیدی که مسئول خاموش شدن ژن به روش اپی ژنتیک است شامل؛ داستیلاسیون هیستون (Histone Deacetylation) و متیلاسیون DNA (DNA Methylation) است. استیلاسیون و داستیلاسیون هیستون‌ها، فاکتور مهم و قوی برای تنظیم اپی ژنتیک بیان ژن‌ها هستند. آنزیم‌های هیستون داستیلاز (Histone Deacetylases) و هیستون استیلاز (Histone Acetyltransferases) آنزیم‌های کلیدی برای تعدیلات هیستونی (استیلاسیون و داستیلاسیون) هستند (۶). فعالیت آنزیم‌های هیستون داستیلاز منجر به خاموش شدن ژن‌های سرکوب کننده سرطان (Tumor Suppressor Genes) و در نتیجه ایجاد سرطان می‌گردد. کاهش بیان ژن‌های SOCS به روش اپی ژنتیک باعث فعال شدن مسیر JAK/STAT و القاء سرطان می‌گردد (۷). گزارش شده است که ترکیبات

مهارکننده آنزیم‌های هیستون داستیلاز از قبیل تریکواستاتین آ (Trichostatin A) باعث افزایش استیلاسیون ژن‌های SOCS₁ و SOCS₃ در سرطان کولون می‌شود که خود باعث تنظیم بیان این ژن‌ها می‌شود. به علاوه افزایش بیان این ژن‌ها باعث کاهش بیان ژن‌های JAK و STAT در سرطان کولون شده و در نتیجه باعث مهار رشد سلولی و ایجاد آپوپتوز از طریق کاهش بیان ژن‌های هدف مسیر JAK/STAT شامل ژن‌های خانواده Bcl-2 می‌شود (۸). به طور مشابهی، پژوهش‌های دیگر گزارش کرده‌اند که مسدود کردن مسیر JAK₃/STAT₃ به طور قابل توجهی باعث کاهش سلول‌های زنده، از طریق کاهش بیان ژن‌های Bcl-XL, Bcl-2, Mcl-1 و cyclin D2 و افزایش بیان ژن‌های p21waf1/cip1 و p27kip1 در سرطان کولون می‌شود (۹).

همچنین نشان داده شده است که داروی والپروئیک اسید (Valproic Acid) به عنوان یکی از داروهای مهارکننده آنزیم هیستون داستیلار باعث کاهش بیان ژن‌های VEGF و STAT3, STAT5, Bcl-xL, c-Myc, Mcl-1, CCND1 می‌شود. پژوهش‌های قبلی ما نشان داد که این دارو می‌تواند باعث افزایش بیان ژن‌های SOCS₁ و SOCS₃ در سرطان کولون رده سلولی SW₄₈ شود (۱۰ و ۱۱). به علاوه، در پژوهش‌های قبلی، ما اثر داروهای والپروئیک اسید و تریکواستاتین آ را بر روی سرطان کولون انسانی رده SW48, SW480, LS 180 و LS 174T مورد بررسی قرار دادیم (۱۵-۱۲). هدف از

این تحقیق تعیین و بررسی اثر داروی والپروئیک اسید بر روی بیان ژن‌های JAK1, JAK2, STAT3, STAT5A, STAT5B, SOCS1, SOCS3, Bcl-xL, c-Myc, Mcl-1، میزان زنده بودن سلول و القاء آپوپتوز در سرطان کولون رده سلولی HT₂₉ بود.

روش بررسی

در این مطالعه تجربی که در سال ۱۳۹۸ انجام شد، سلول‌های سرطانی کولون رده HT₂₉ از بانک سلولی انسیتیتو پاستور کشور جمهوری اسلامی ایران (Cell Bank of Iran-Pasteur Institute) خریداری گردید. محلول Dulbecco's Modified Eagle Medium، آنتی بیوتیک شامل استرپتومایسین (Streptomycin)، پنی سیلین (Penicillin G) و آمفوتریپسین (Amphotericin B)، داروی والپروئیک اسید، کیت بیان ژن Total RNA Extraction Kit (TRIZOL reagent) and real-time polymerase chain reaction (PCR) kits، آنکسین Annexin-V-(FITC) و پروپییدیوم آیودیید (Propidium Iodide, PI) از سیگما (Sigma) خریداری شد. ابتدا سلول‌های سرطانی کولون رده HT₂₉ محیط کشت سلولی DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (DMEM) که با سرم جنین گاوی (3) (FBS) غنی شده و حاوی آنتی بیوتیک پنی سیلین و استرپتومایسین بود، در دمای ۳۷ درج سانتی‌گراد کشت داده شدند و پس از این که همپوشانی

جمع‌آوری و با محلول PBS شستشو داده شدند و سپس با آنکسین و پروپیدیوم آیویدید رنگ‌آمیزی انجام و سلول‌های آپوتوتک با دستگاه FACScan™ flow cytometer مورد شمارش قرار گرفت.

ابتدا سلول‌های سرطانی کولون رده HT29 در پلیت‌های ۲۴ خانه کشت داده شدند. پس از گذشت ۲۴ ساعت با داروی والپروئیک اسید با غلظت مشخص شده در جدول ۱ برای مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت تیمار شدند. پس از گذشت زمان تریمنت، 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 تیمار شد. غلظت RNA با استفاده از دستگاه بیوفتومتر (BioPhotometer) تعیین شد. 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.

مراحل واکنش زنجیره‌ای پلی‌مران (PCR) با تکرارپذیری ۴۰ سیکل به صورت ذیل انجام شد؛ مرحله واسرشته‌سازی (Denaturation): شامل گرم کردن به میزان ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه مرحله اتصال (Annealing): این واکنش در دمای ۵۸ درجه سانتی‌گراد برای مدت ۱۵ ثانیه انجام شد. مرحله گسترش (Extension) این مرحله در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه انجام شد. از ژن GAPDH به عنوان کنترل استفاده شد. توالی پرایمرهای استفاده شده در جدول ۲ مشخص

سلول‌های سرطانی کولون به حدود ۸۰ درصد رسید، با استفاده از تریپسین (۰/۲۵ درصد) سلول‌ها جمع‌آوری و پس از شستشو، در پلیت‌های ۹۶ خانه به ازای هر خانه ۳۰۰۰۰۰ سلول در دمای ۳۷ درج سانتی‌گراد کشت داده شدند. پس از گذشت مدت زمان ۲۴ ساعت از کشت سلول‌ها، محیط کشت با محیط حاوی داروی والپروئیک اسید با غلظت‌های مختلف (۰، ۱، ۵، ۷/۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ میکرومول) تعویض شد (به جز گروه کنترل که فقط DMSO دریافت کردند). لازم به ذکر است که از محلول DMSO به عنوان حلال دارو استفاده شد و برای رقیق کردن محلول حاوی دارو از محیط کشت استفاده گردید. پس از گذشت مدت زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت از تیمار سلول‌ها، سلول‌ها با استفاده از تریپسین جمع‌آوری، با PBS شستشو و سپس محلول MTT برای مدت ۴ ساعت به آن‌ها اضافه شد. پس از ۴ ساعت، کریستال‌های رنگی ایجاد شده با DMSO حل کرده و میزان رنگ ایجاد شده با طول موج ۵۷۰ مورد بررسی قرار گرفت. برای اطمینان بیشتر هر آزمایش ۳ بار تکرار شد.

برای تعیین آپوتوز سلولی، سلول‌های سرطانی کولون رده HT29 در پلیت‌های ۲۴ خانه (به ازای هر خانه ۳۰۰۰۰۰ سلول) کشت داده و با داروی والپروئیک اسید با غلظت مشخص شده در جدول ۱ کشت داده شدند (به جز گروه کنترل که DMSO دریافت کردند). برای رقیق کردن محلول حاوی دارو از محیط کشت استفاده شد. پس از گذشت مدت زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت، تمام سلول‌ها با استفاده از تریپسین

شده است. در این آزمایش هر پرایمر با غلظت ۳۰۰ نانومول استفاده شد که شامل ۱۵۰ نانومول برای Reverse Primer و forward Primer و ۱۵۰ نانومول برای بود.

جدول ۱: دوز موثر دارو (IC50) که از طریق تکنیک MTT بدست آمده و برای بررسی بیان ژن و آپوپتوز سلولی استفاده شده است.

Cell line	Drug/ μ M	Duration/Hour	IC50	LogIC50	R squared
HT 29	VPA	۲۴	۷/۸۱۴	۱/۰۸۴ الی ۰/۷۰۳۷	۰/۹۷۸۵
HT 29	VPA	۴۸	۶/۷۷۴	۱/۰۶۷ الی ۰/۵۸۸۰	۰/۹۷۰۵

جدول ۲: توالی پرایمرهای استفاده شده و رفرنس های مربوطه.

Primer	Primer sequences (5' to 3')	Product length	Reference
SOCS1 Forward	AGCAGCTCGAAAAGGCAGTC	۲۹۸	۱۶
Reverse	ACACTCACTTCCGCACCTTC		
SOCS3 Forward	ACCAGCGCCACTTCTTCACG	۳۸۷	۱۶
Reverse	GTGGAGCATCATACTGATCC		
JAK1 Forward	CCACTACCGGATGAGGTTCTA	۲۱۳	۱۷
Reverse	GGGTCTCGAATAGGAGCCAG		
JAK2 Forward	GATGAGAATAGCCAAAGAAAACG	۱۶۰	۱۸
Reverse	TTGCTGAATAAATCTGCGAAAT		
STAT3 Forward	GCTTTTGTGACGGATGGAGT	۱۷۴	۱۸
Reverse	ATTTGTTGACGGGTCTGAAGTT		
STAT5A Forward	AATGAGAACACCCGCAACG	۱۰۱	۱۸
Reverse	TTCCTGAAGTGGGCACTGAG		
STAT5B Forward	ACTGCTAAAGCTGTTGATGGATAC	۱۷۴	۱۸
Reverse	TGAGTCAGGGTTCTGTGGGTA		
Bcl-xL Forward	GAGCTGGTGGTTGACTTTCTC	۱۱۹	۱۹
Reverse	TCCATCTCCGATTGATCCCT		
c-Myc Forward	GGCTCCTGGCAAAGGTCA	۱۱۹	۱۹
Reverse	CTGCGTAGTTGTGCTGATGT		
Mcl-1 Forward	TGCTTCGGAAACTGGACATCA	۱۳۵	۱۹
Reverse	TAGCCACAAAGGCACCAAAG		
GAPDH Forward	TGTGGGCATCAATGGATTTGG	۱۱۶	۱۹
Reverse	ACACCATGTATTCCGGGTCAAT		

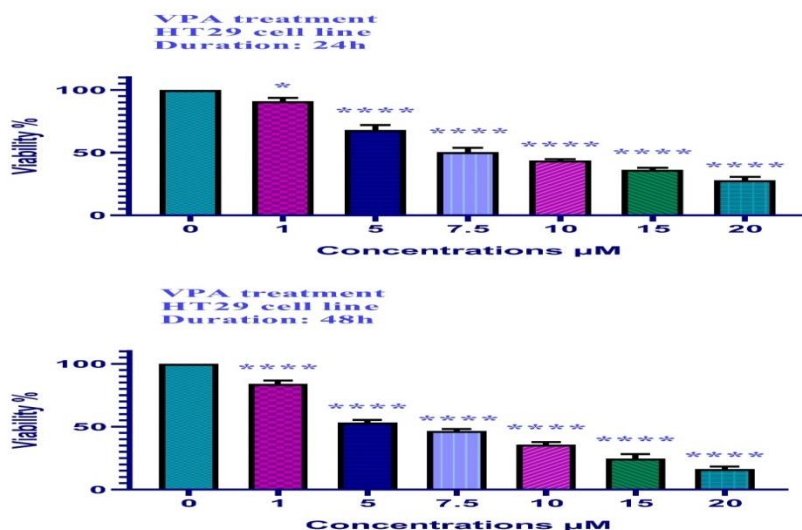
یافته‌ها

سلول‌های سرطانی کولون رده HT29 با داروی والپروئیک اسید با غلظت‌های مختلف (۰، ۱، ۵، ۷/۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ میکرومول) برای مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت تیمار شدند و سپس به وسیله تکنیک MTT میزان سلول‌های زنده مشخص شد. همچنان که در شکل ۱ مشخص شده است داروی والپروئیک اسید با تمام غلظت‌های استفاده شده به صورت وابسته به دوز توانست رشد سلولی را به صورت معنی‌داری مهار کند ($p < 0.001$). دوز مؤثر این دارو که توانست رشد ۵۰ درصد سلول‌ها را متوقف کند در جدول ۱ مشخص شده است.

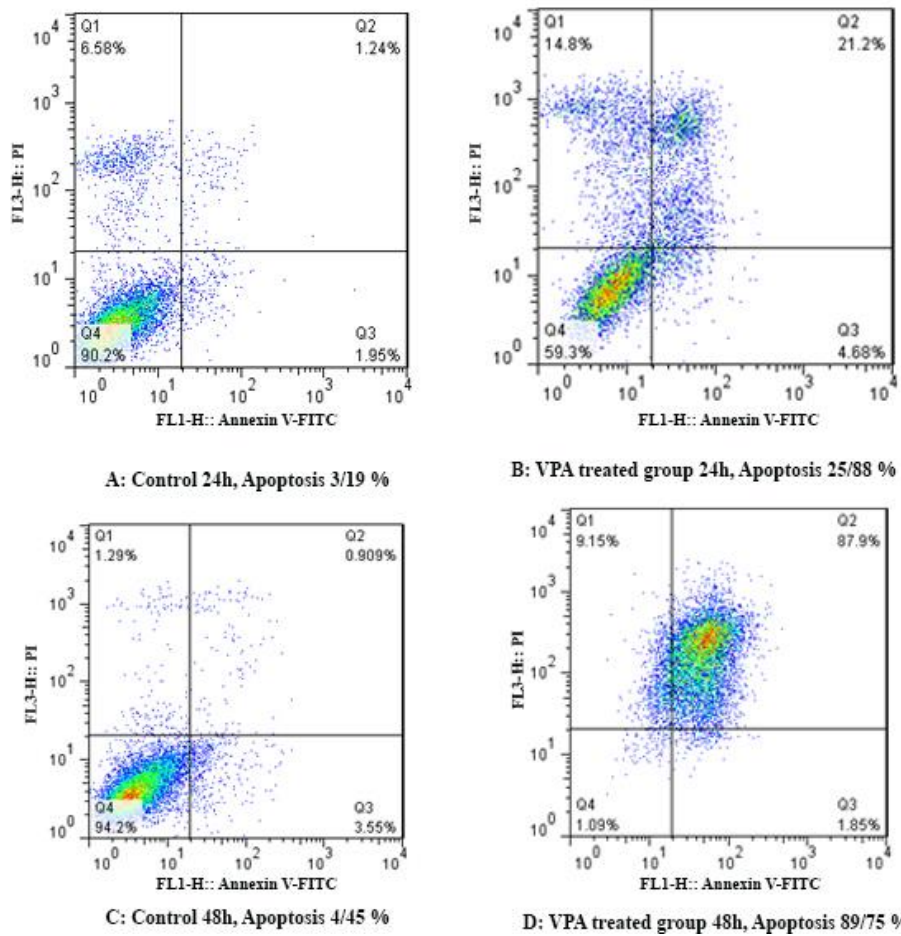
برای تعیین سلول‌های آپوپتوتیک کولون، سلول‌ها با داروی والپروئیک اسید (با غلظت مشخص شده در جدول ۱) برای مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت تیمار شدند. پس از تریتمنت با استفاده از رنگ‌آمیزی آنکسین و پروپیدیوم آیدید میزان سلول‌های

آپوپتوتیک مشخص شد. همچنان که در شکل ۲ و ۳ نشان داده شده است این ترکیب به طور معنی‌داری باعث ایجاد آپوپتوز گردید ($p < 0.001$). درصد سلول‌های آپوپتوتیک پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت به ترتیب ۲۵/۶۸ و ۸۹/۷۵ درصد بود ($p < 0.001$). حداکثر میزان آپوپتوز پس از ۴۸ ساعت مشاهده شد.

نتیجه تعیین بیان ژن نشان داد که داروی والپروئیک اسید (با غلظت مشخص شده در جدول ۱) می‌تواند به صورت معنی‌داری باعث کاهش بیان ژن‌های JAK1, JAK2, STAT3, STAT5A, STAT5B, c-Myc, Bcl-xL و Mcl-1 و افزایش ژن‌های SOCS1 و SOCS3 شود (شکل ۴). درصد نسبی بیان ژن با استفاده از نرم‌افزار گراف پد پرسم ۸ و به کارگیری تست آنالیز واریانس یک طرفه محاسبه شد و برای مقادیر $p < 0.05$ معنی دار گزارش شده است. میزان بیان ژن‌های مزبور در جدول ۳ مشخص شده است.

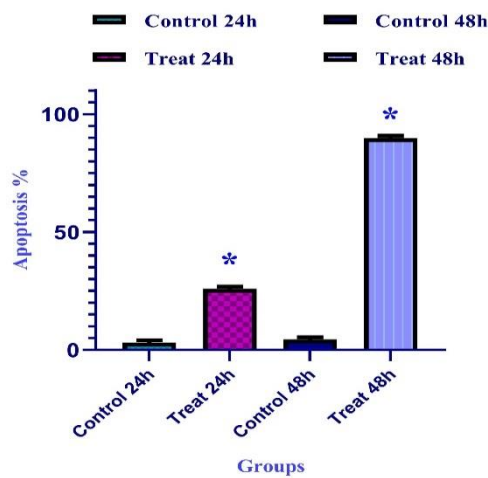


شکل ۱: نتیجه تعیین سلول‌های زنده در سرطان کولون رده HT29 که با داروی والپروئیک اسید با غلظت‌های مختلف (۰، ۱، ۵، ۷/۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ میکرومول) برای مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت تیمار شده بودند * تفاوت معنی‌دار گروه‌های تیمار شده با دارو در مقایسه با گروه کنترل نشان می‌دهد ($p < 0.001$).

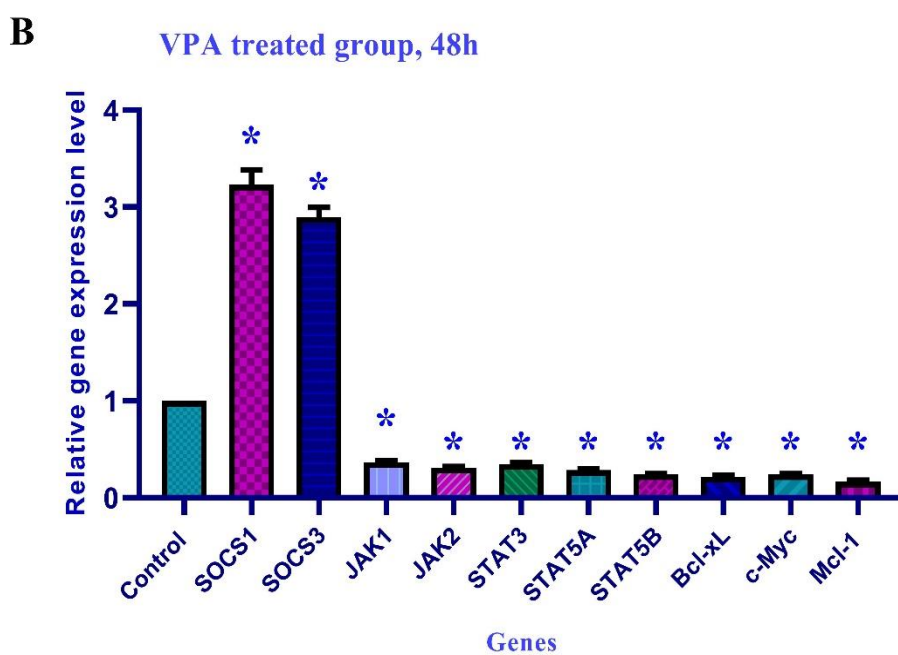
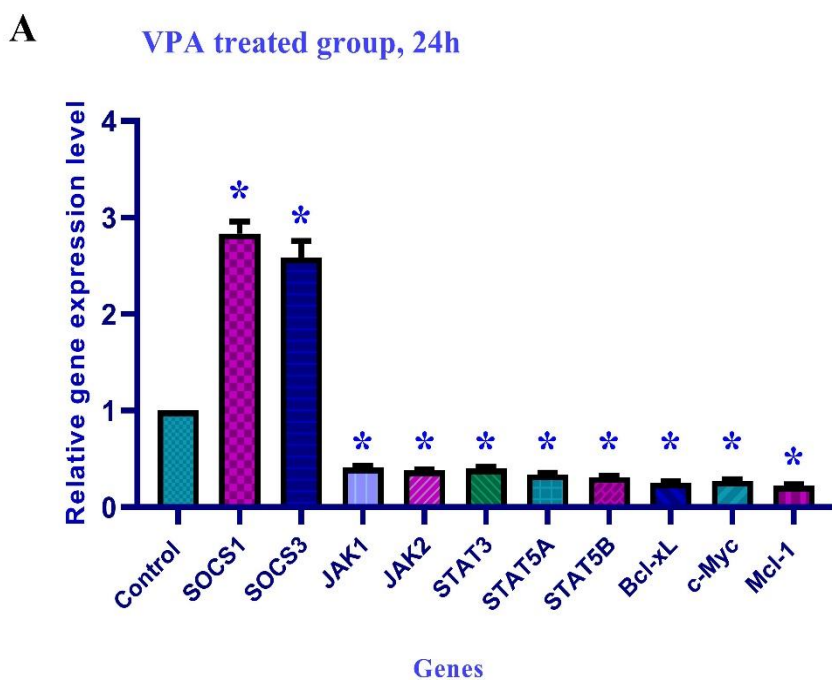


شکل ۲: نتیجه تعیین سلول‌های آپپتوتیک در سرطان کولون رده HT29 که با داروی والپروئیک اسید تیمار شدند* تفاوت معنی‌دار گروه‌های تیمار شده با دارو در مقایسه با گروه کنترل نشان می‌دهد ($p < 0.001$)

VPA treated cell lines



شکل ۳: نمودار مقایسه میزان آپپتوز سلول‌های سرطانی کولون در زمان‌های مختلف



شکل ۴: نتیجه تعیین بیان ژن های JAK1, JAK2, STAT3, STAT5A, STAT5B, SOCS1, SOCS3, Bcl-xL, c-Myc و Mcl-1 در سرطان کولون رده HT29 که با داروی والپروئیک اسید تیمار شدند. *علامت ستاره تفاوت معنی دار گروه های تیمار شده با دارو در مقایسه با گروه کنترل نشان می دهد ($p < 0.0001$). محور عمودی بیانگر میزان نسبی بیان ژن و نمودار افقی نشان دهنده نام ژن های مورد مطالعه می باشد.

جدول ۳: نتیجه تعیین بیان ژن‌های JAK1, JAK2, STAT3, STAT5A, STAT5B, SOCS1, SOCS3, Bcl-xL, c-Myc و Mcl-1 در سرطان کولون رده HT29

رده سلولی	ژن	دارو	غلظت (میکرومول)	زمان (ساعت)	میزان بیان ژن	سطح معنی‌داری
HT29	SOCS1	VPA	۷/۸	۲۴	۲/۸	۰/۰۰۰۱
HT29	SOCS1	VPA	۶/۷	۴۸	۳/۲	۰/۰۰۰۱
HT29	SOCS3	VPA	۷/۸	۲۴	۲/۵	۰/۰۰۰۱
HT29	SOCS3	VPA	۶/۷	۴۸	۲/۹	۰/۰۰۰۱
HT29	JAK1	VPA	۷/۸	۲۴	۰/۴۱	۰/۰۰۰۱
HT29	JAK1	VPA	۶/۷	۴۸	۰/۳۶	۰/۰۰۰۱
HT29	JAK2	VPA	۷/۸	۲۴	۰/۳۷	۰/۰۰۰۱
HT29	JAK2	VPA	۶/۷	۴۸	۰/۳۱	۰/۰۰۰۱
HT29	STAT3	VPA	۷/۸	۲۴	۰/۴۰	۰/۰۰۰۱
HT29	STAT3	VPA	۶/۷	۴۸	۰/۳۴	۰/۰۰۰۱
HT29	STAT5A	VPA	۷/۸	۲۴	۰/۳۴	۰/۰۰۰۱
HT29	STAT5A	VPA	۶/۷	۴۸	۰/۲۸	۰/۰۰۰۱
HT29	STAT5B	VPA	۷/۸	۲۴	۰/۳۱	۰/۰۰۰۱
HT29	STAT5B	VPA	۶/۷	۴۸	۰/۲۴	۰/۰۰۰۱
HT29	Mcl-1	VPA	۷/۸	۲۴	۰/۲۷	۰/۰۰۰۱
HT29	Mcl-1	VPA	۶/۷	۴۸	۰/۱۶	۰/۰۰۰۱
HT29	Bcl-xL	VPA	۷/۸	۲۴	۰/۲۵	۰/۰۰۰۱
HT29	Bcl-xL	VPA	۶/۷	۴۸	۰/۲۱	۰/۰۰۰۱
HT29	c-Myc	VPA	۷/۸	۲۴	۰/۲۷	۰/۰۰۰۱
HT29	c-Myc	VPA	۶/۷	۴۸	۰/۲۴	۰/۰۰۰۱

بحث

هیستون داستیلاز ۳-۱ و ۸، کلاس دو شامل هیستون داستیلاز ۷-۴ و ۱۰-۹، کلاس سه شامل sirt1 و sirt 7 و کلاس چهار شامل هیستون داستیلاز ۱۱ می‌باشد(۶). هدف از این تحقیق تعیین و بررسی اثر داروی والپروئیک اسید بر روی بیان ژن‌های JAK1, JAK2, STAT3, STAT5A, STAT5B, SOCS1, SOCS3, Bcl-xL, c-Myc و Mcl-1، میزان زنده بودن سلول و القاء آپوپتوز در سرطان کولون رده سلولی HT29 بود.

ایجاد و توسعه سرطان، حاصل مجموعه‌ای از تغییرات در عملکرد ژن‌هاست. اساساً این ژن‌های

نقش متیلاسیون در خاموش شدن ژن‌ها و در نتیجه ایجاد سرطان به اثبات رسیده است. به علاوه، ثابت شده است که متیلاسیون ناحیه پرموتر ژن باعث خاموش شدن ژن می‌گردد. هم‌چنین تعدیلات هیستونی به ویژه استیلاسیون و داستیلاسیون از عوامل اصلی تنظیم بیان ژن به روش اپی‌ژنتیک هستند. این آنزیم‌ها عامل اصلی داستیلاسیون هیستون پروتئین‌ها هستند. در پستانداران ۱۸ نوع آنزیم هیستون داستیلاز شناخته شده است که به کلاس یک الی چهار تقسیم می‌شوند. کلاس یک شامل

شده و از طریق مسیر JAK/STAT باعث مهار این مسیر شده و از طریق این مسیر باعث ایجاد آپوپتوز در سلول‌های سرطانی می‌شود (۲۴).

نتیجه این تحقیق نشان داد که داروی والپروئیک اسید با افزایش بیان ژن‌های SOCS₁ و SOCS₃ و کاهش بیان ژن‌های JAK1, JAK2, STAT3, STAT5A, STAT5B, Bcl-xL, c-Myc می‌تواند باعث مهار رشد سلولی و القاء آپوپتوز در سلول‌های سرطانی کولون رده HT₂₉ شود. نتیجه پژوهش‌های دیگر نشان می‌دهد که داروهای مهارکننده آنزیم‌های هیستون داستیلاز از قبیل بوتیرات سدیم (Sodium Butyrate) با افزایش بیان ژن‌های SOCS₁ و SOCS₃ و سرکوب مسیر JAK₂/STAT باعث ایجاد آپوپتوز در سلول‌های سرطانی خون (رده K562 و HEL) می‌شود (۲۵). پژوهش‌های آزمایشگاهی نشان می‌دهد که داروی والپروئیک اسید با افزایش بیان ژن SOCS₅ (SOCS₅) و کاهش بیان ژن‌های JAK و STAT باعث ایجاد آپوپتوز در سلول‌های عصبی می‌شود (۲۶). همچنین نشان داده شده است که ترکیبات مهارکننده آنزیم‌های هیستون داستیلاز با افزایش بیان ژن‌های JAK₂, STAT₃, c-Myc, MCL-1 و BCL-X_L باعث مهار رشد سلولی و ایجاد آپوپتوز در سلول‌های سرطانی سرطان خون می‌شود (۲۷).

مشابه گزارش حاضر، دیگر محققین نشان داده‌اند که داروی والپروئیک اسید با کاهش بیان ژن C-Myc باعث القاء آپوپتوز در سرطان معده رده سلولی BGC823, HGC27 و SGC7901 می‌شود (۲۸).

دخیل در ایجاد سرطان شامل؛ دو گروه متفاوت از ژن می‌باشد که عبارتند از؛ ژن‌های سرکوب کننده سرطان که رشد سلولی را مهار می‌کنند، ژن‌های سرطان‌زا (oncogene) که رشد و تکثیر سلول‌ها را تحریک و القاء می‌کنند، بنابراین ایجاد و توسعه سرطان حاصل تغییر وضعیت در بیان این دو گروه از ژن‌هاست (۲۰). پدیده‌های مختلف بر روی بیان این دو گروه از ژن‌ها تأثیرگذار هستند که مهم‌ترین آن‌ها خاموش شدن ژن‌های سرکوب کننده سرطان به روش اپی ژنتیک است (۲۱). پژوهش‌های مختلف نشان داده‌اند که از جمله عوامل مؤثر بر خاموش شدن ژن‌ها، تغییرات متیلاسیون و استیلاسیون است (۲۲). پروتئین‌های سرکوب‌گر مسیر سیگنالینگ (Suppressor of Cytokine Signaling) تنظیم کننده‌های منفی مسیر سیگنالینگ (Cytokine Signaling) هستند که به واسطه کینازهای جانوس (Janus Kinase) کار می‌کنند. SOCS₁ و SOCS₃ مهار کننده‌های قوی جک هستند که نقش محوری در تکامل سرطان بازی می‌کنند. بیان نامناسب این ژن‌ها باعث اختلال رشد و مهاجرت سلولی و ایجاد سرطان می‌شود (۲۳). یکی از علت‌های خاموشی و عدم بیان ژن‌های SOCS₁، داستیلاسیون هیستون است که به وسیله آنزیم‌های هیستون داستیلاز انجام می‌شود، لذا داروهای مهارکننده این آنزیم‌ها قادرند با مهار فعالیت این آنزیم‌ها باعث بیان مجدد ژن‌های SOCS₁ شوند. پژوهش‌ها نشان داده است که ترکیبات مهار کننده آنزیم‌های هیستون داستیلاز باعث بیان مجدد ژن‌های SOCS₁ و SOCS₃

این ژن‌ها نبود بنابراین بررسی پروتئین این ژن‌ها پیشنهاد می‌گردد.

نتیجه‌گیری

داروی والپروئیک اسید قادر است با بیان مجدد ژن‌های SOCS₁ و SOCS₃ و کاهش بیان ژن‌های JAK1, JAK2, STAT3, STAT5A, STAT5B, Bcl-xL, c-Myc و Mcl-1 باعث مهار رشد سلولی و ایجاد آپوپتوز در سرطان کولون، رده سلولی HT₂₉ شود.

تقدیر و تشکر

این مقاله برگرفته از طرح تحقیقاتی مصوب شورای پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی جهرم با کد IR.JUMS.REC.1395.016 می‌باشد و با حمایت مالی این دانشگاه انجام شد.

در سرطان کولون رده سلولی HT116 و HT29 گزارش شده است که داروی تریکواستاتین آ باعث کاهش بیان ژن‌های BCL2 و BCL-XL، مهار رشد سلولی و القاء آپوپتوز می‌شود (۲۹). در سرطان پانکراس، رده سلولی Paca، نیز این ترکیب باعث کاهش بیان ژن‌های BCL-XL و BCL-W و در نتیجه القاء آپوپتوز می‌شود (۳۰).

پژوهش‌های قبلی ما نشان داد که داروی والپروئیک اسید با کاهش بیان ژن‌های BCL-XL و BCL-2 باعث القاء آپوپتوز در سلول‌های سرطانی کبد رده PLC/PRF5 می‌شود (۳۱). شایان ذکر است که مسیر JAK/STAT تنها مسیر اثر داروی والپروئیک اسید نیست. مسیرهای دیگری برای این داور گزارش شده است. گزارش شده است که این ترکیب از طریق مسیرهای GSK3 α , Akt, ERK pathway, phosphoinositol OXPHOS و pathway, tricarboxylic acid cycle, GABA می‌تواند باعث القاء آپوپتوز شود (۳۲).

علاوه بر این، والپروئیک می‌تواند با فعال کردن مسیر آپوپتوز خارجی (extrinsic apoptotic pathway) و فعال کردن کاسپازها باعث القاء آپوپتوز در سرطان کولون شود (۳۳). در این تحقیق ما به بررسی تأثیر داروی والپروئیک اسید بر بیان ژن‌های JAK1, JAK2, STAT3, STAT5A, STAT5B, SOCS1, SOCS3, Bcl-xL, c-Myc و Mcl-1 پرداختیم و به علت محدودیت بودجه و تکنیک، امکان بررسی سطح پروتئین‌های تولید شده به وسیله

REFERENCES

1. Murphy JM, Tannahill GM, Hilton DJ, Greenhalgh CJ. The negative regulation of JAK/STAT signaling. *Handbook of cell signaling*: Elsevier; 2010; 467-80.
2. Hosford SR, Miller TW. Clinical potential of novel therapeutic targets in breast cancer: CDK4/6, Src, JAK/STAT, PARP, HDAC, and PI3K/AKT/mTOR pathways. *Pharmacogenomics and Personalized Medicine* 2014; 7: 203–15.
3. Turkson J. STAT proteins as novel targets for cancer drug discovery. *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 2004; 8(5): 409-22.
4. Liu C, Liu H, Chen J. The Role of SOCS in the Development of Tumors. *Zhongguo fei ai za zhi= Chinese Journal of Lung Cancer*. 2016; 19(9): 620-25.
5. 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.
6. Abbas A, Gupta S. The role of histone deacetylases in prostate cancer. *Epigenetics* 2008; 3(6): 300-9.
7. Sharma ND, Nickl CK, Kang H, Ornatowski W, Brown R, Ness SA, et al. Epigenetic silencing of SOCS5 potentiates JAK-STAT signaling and progression of T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer science* 2019; 110(6): 1931-46.
8. 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.
9. Lin Q, Lai R, Chirieac LR, Li C, Thomazy VA, Grammatikakis I, et al. Constitutive activation of JAK3/STAT3 in colon carcinoma tumors and cell lines: inhibition of JAK3/STAT3 signaling induces apoptosis and cell cycle arrest of colon carcinoma cells. *The American Journal of Pathology* 2005; 167(4): 969-80.
10. Ma Y, Zhou S, Ge H, Cai F, Zhang Y, Yu K. Effects of sodium valproate on RPMI8226 and U266 cell proliferation and IL-6/JAK/STAT signaling pathway [J]. *Chinese Journal of Pathophysiology* 2013; 5: 18-25
11. Sanaei M, Kavooosi 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): 183-87.
12. Sanaei M, Kavooosi F, Mansoori O. Effect of valproic acid in comparison with vorinostat on cell growth inhibition and apoptosis induction in the human colon cancer SW48 cells in vitro. *Experimental Oncology* 2018; 40, 2, 95–100
13. Sanaei M, Kavooosi 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
14. Sanaei M, Kavooosi 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): 1819–28.
15. Sanaei M, Kavooosi 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): 2131–39.
16. Park EJ, Park SY, Joe EH, 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.
17. 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): 11124–35.
18. 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.

19. 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): 3169–3178.
20. Grønbaek K, Hother C, Jones PA. Epigenetic changes in cancer. *Apmis* 2007; 115(10): 1039-59.
21. Kazanets A, Shorstova T, Hilmi K, Marques M, Witcher M. Epigenetic silencing of tumor suppressor genes: Paradigms, puzzles, and potential. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer* 2016; 1865(2): 275-88
22. Perri F, Longo F, Giuliano M, Sabbatino F, Favia G, Ionna F, et al. Epigenetic control of gene expression: Potential implications for cancer treatment. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 2017; 111: 166-72.
23. 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: 70-78.
24. Chen CQ, Yu K, Yan QX, Xing CY, Chen Y, Yan Z, et al. Pure curcumin increases the expression of SOCS1 and SOCS3 in myeloproliferative neoplasms through suppressing class I histone deacetylases. *Carcinogenesis* 2013; 34(7): 1442-49.
25. Gao SM, Chen CQ, Wang LY, Hong LL, WU JB, Dong PH, et al. Histone deacetylases inhibitor sodium butyrate inhibits JAK2/STAT signaling through upregulation of SOCS1 and SOCS3 mediated by HDAC8 inhibition in myeloproliferative neoplasms. *Experimental Hematology* 2013; 41(3) :261-70.
26. Santos J, Hubert T, Milthorpe BK. Valproic acid promotes early neural differentiation in adult mesenchymal stem cells through protein signalling pathways. *Cells* 2020; 9(3): 619-45.
27. 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): 3169–78.
28. Zhao X, Yang W, Shi C, Ma W, Liu J, Wang Y, et al. The G1 phase arrest and apoptosis by intrinsic pathway induced by valproic acid inhibit proliferation of BGC-823 gastric carcinoma cells. *Tumor Biology* 2011; 32(2): 335-46.
29. Meng J, Zhang HH, Zhou CX, Li C, Zhang F, Mei QB. The histone deacetylase inhibitor trichostatin A induces cell cycle arrest and apoptosis in colorectal cancer cells via p53-dependent and-independent pathways. *Oncology Reports* 2012; 28(1): 384-88.
30. Moore PS, Barbi S, Donadelli M, Costanzo C, Bassi C, Palmieri M, et al. Gene expression profiling after treatment with the histone deacetylase inhibitor trichostatin A reveals altered expression of both pro-and anti-apoptotic genes in pancreatic adenocarcinoma cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research* 2004; 1693(3): 167-76.
31. Sanaei M, Kavosi F. Effect of valproic acid on extrinsic (DR4, DR5, FAS, FAS-L, TRAIL) and intrinsic (BAX, BAK and APAF1, Bcl-2, and Bcl-xL) apoptotic pathways, cell viability and apoptosis in hepatocellular carcinoma PLC/PRF5 cell line. *Fez, Journal of Kashan University of Medical Sciences* 2021; 24(6): 601-9.
32. Kostrouchova M, Kostrouch Z. Valproic acid, a molecular lead to multiple regulatory pathways. *Folia Biologica-Praha* 2007; 53(2): 37-49.
33. Chateauvieux S, Morceau F, Dicato M, Diederich M. Molecular and therapeutic potential and toxicity of valproic acid. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2010; 6: 1-18.

Evaluation of the Effect of Valproic Acid on JAK/STAT Pathway, SOCS1, SOCS3, Bcl-xL, c-Myc, and Mcl-1 Gene Expression, Cell Growth Inhibition and Apoptosis Induction in Human Colon Cancer HT29 Cell Line

Sanaei Jahromi M, Kavousi F*

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

Received: 23 Feb 2021

Accepted: 01 Jan 2021

Abstract:

Background & aim: Cytokines are a large family of messenger proteins, which induce various cancers. Cytokines are mediated by Janus kinases (JAKs). Once activated, these kinases phosphorylate the STAT protein (signal transducers and activators of transcription, STAT), and STAT regulates the expression of genes involved in cell differentiation, proliferation, and apoptosis. Defects in the JAK / STAT pathway cause tumorigenesis and cancer. Improper expression of STAT genes impairs the expression and expression of Bcl-xL, c-Myc, Mcl-1, CCND1 and VEGF genes, resulting in uncontrolled cell proliferation and cancer. The aim of the present study was to determine the effect of valproic acid on the expression of JAK1, JAK2, STAT3, STAT5A, STAT5B, SOCS1, SOCS3, Bcl-xL, c-Myc and Mcl-1 genes, cell viability and induction of apoptosis in colon cancer. Cell line was HT29.

Methods: In the present experimental-laboratory study conducted in 2019, the HT 29 colorectal cancer cells were treated with valproic acid. MTT, flow cytometry and real-time techniques were used to determine cell viability, apoptotic cells and gene expression, respectively. The obtained data were analyzed using Prism Graph Pad 8 software.

Results: Valproic acid significantly inhibited cell growth, induced apoptosis, decreased expression of JAK1, JAK2, STAT3, STAT5A, STAT5B, Bcl-xL, c-Myc and Mcl-1 genes and increased the expression of SOCS1 and SOCS3 genes. Alteration in the expression of the above genes inhibited cell proliferation and induced apoptosis in the studied cancer cells.

Conclusion: VPA can induce apoptosis in colon cancer HT29 cell line through JAK/STAT pathway.

Keywords: VPA, JAK/STAT, Colon Cancer, Apoptosis

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

Email: kavoosifraidoon@gmail.com

Please cite this article as follows:

Sanaei Jahromi M, Kavousi F. Evaluation of the Effect of Valproic Acid on JAK/STAT Pathway, SOCS1, SOCS3, Bcl-xL, c-Myc, and Mcl-1 Gene Expression, Cell Growth Inhibition and Apoptosis Induction in Human Colon Cancer HT29 Cell Line. *Armaghane-danesh* 2021; 26(3): 324-337.