magiran.com

توقف تکثیر در رده سلولی *MCF-7* به‌دنبال استفاده از داروی سیس‌پلاتین

علی قنبری*، دکتر بهروز نیک‌نفس§، دکتر تقی تقی‌الطریحی♭

چکیده

مقدمه: یکی از شیوه‌هائی که در درمان سرطان مطرح است، استفاده از داروهای شیمی‌درمانی می‌باشد. سرطان پستان، بیماری شایعی است که هنوز داروی شیمی درمانی نتوانسته آن‌را به‌طور کامل درمان کند.
در این تحقیق، توقف تکثیر سلول‌های MCF-7 که یک رده سلولی سرطان پستان انسانی است به‌دنبال استفاده از داروی ضدسرطان سیس‌پلاتین بررسی می‌شود.

مواد و روشها: در ابتداء پس از انجام شمارش سلولی با رنگ تریپان‌بلو تعداد یکسانی سلول به فلاسک‌ها ریخته شده و فلاسک‌ها به دو گروه شاهد و مورد تقسیم شدند. در گروه مورد یک میکرومول داروی سیس‌پلاتین به مدت یک‌ساعت و در گروه شاهد محلول سالین نرمال اثر داده شدند. سپس فلاسک‌ها به مدت ۴۸ ساعت دیگر انکوبه شدند. پس از این مدت، در سلول‌های چسبیده دو گروه شاهد و آزمایشی به‌طور جداگانه با رنگ تریپان‌بلو شمارش سلولی انجام گرفت. همچنین سلول‌های چسبیده دو گروه شاهد و آزمایشی به‌طور جداگانه با تولوئیدن‌بلو رنگ‌آمیزی شده و با میکروسکوپ نوری مطالعه شدند.

یافته‌ها: نتایج به‌دست آمده به دو گروه تقسیم شد، شمارش سلولی و میکروسکوپ نوری. در شمارش سلولی نتایج به‌دست آمده به دو گروه تقسیم شد،شمارش سلولی و میکروسکوپ نوری. در شمارش سلولی نتایج به‌دست آمده توسط آزمون آماری Mann-Withney ارزیابی شد.
نتایج نشان داد که تعداد سلول‌های چسبیده گروه آزمایشی نسبت به گروه شاهد کاهش معنی‌داری پیدا کرده است. در قسمت میکروسکوپ نوری، مشاهده شد که مورفولوژی سلول‌های چسبیده دو گروه شاهد و آزمایشی یکسان است.

نتیجه‌گیری: از آنجا که سلول‌های MCF-7 چسبیده در حقیقت سلول‌های در حال تکثیر هستند، بنابراین می‌توان گفت که داروی سیس‌پلاتین بدون تغییر در مورفولوژی سلول‌ها موجب توقف تکثیر سلول‌های MCF-7 می‌گردد.

گل واژگان: MCF-7، سیس پلاتین، میکروسکوپ نوری

مقدمه:

بیماری سرطان یکی از بیماری‌هایی است که تاکنون به‌طور کامل درمان نشده و تحقیقات گسترده‌ای که امروزه در تمام نقاط دنیا انجام می‌گیرد، در جهت دستیابی به بهترین شیوه درمان این بیماری می‌باشد.

در سرطان، سلول‌ها چرخهٔ طبیعی خود را از دست داده و به‌صورت غیرطبیعی تقسیم می‌شوند. روش‌هایی مثل پرتو درمانی و شیمی درمانی که امروزه به‌کار می‌روند، هرکدام با مکانیسم‌های خاص خود موجب مهار تکثیر سلول‌های سرطانی می‌شوند (۳و۲و۱).

سرطان پستان، بیماری شایعی در بین زنان بوده که هنوز روش‌های شیمی درمانی نتوانسته آن را به‌طور

* عضو هئیت علمی دانشگاه علوم‌پزشکی اراک.
§ عضو هئیت علمی دانشگاه علوم پزشکی تبریز.
♭ عضو هئیت علمی دانشگاه تربیت مدرس تهران.

magiran.com

کامل درمان کند، لذا برای به‌دست آوردن شیوه‌های درمانی مناسب، روش‌ها و عوامل دیگر درمان کننده سرطان پستان مورد تحقیق و بررسی قرار می‌گیرند (۴).

یکی از اشکالات استفاده از داروهای ضدسرطان، این است که این داروها بر سایر بافت‌های طبیعی بدن نیز اثر می‌گذارند. لذا در تحقیقات، ابتدا داروها بر سلول‌ها در شرایط in vitro و به صورت آزمایشگاهی تأثیر داده می‌شوند تا پس از دستیابی به نتیجه، به صورت in vivo نیز در بدن موجودات زنده مطالعه شوند (۵و۴).

در این تحقیق، از رده سلولی MCF-7 استفاده شده است که یک ردهٔ سلول سرطان پستان انسانی بوده و از بافت سرطان پستان جدا شده است. این رده سلولی به علت هتروژنی کروماتین و حساسیت به هورمون، مدل مناسبی جهت بررسی داروهای ضدسرطان محسوب می‌شود و تاکنون داروهای ضدسرطان مختلفی برآن اثر داده شده که نتایج متفاوتی نیز به‌دست آمده است. (۹و۸و۷و۶و۵).

سیس پلاتین[1] به عنوان داوری ضدسرطان، در درمان سرطان‌های تخمدان، بیضه، مری، مثانه و سر و گردن استفاده می‌شود (۷). این دارو جزء عوامل آلکیله کننده[2] بوده که با ایجاد صدمه به DNA و قطعه قطعه کردن[3] رشته‌های آن، موجب مهار تکثیر سلول‌های سرطانی می‌شود (۱۱و۱۰و۹).

در مورد استفاده از سیس‌پلاتین در سلول‌های مختلف، نتایج متفاوتی به‌دست آمده، به‌طوری که بعضی سلول‌ها نسبت به آن بسیار حساس بوده و بعضی به سیس‌پلاتین از خود مقاومت نشان می‌دهند (۷و۳).

در مورد استفاده از سیس‌پلاتین بر سلول‌های سرطان پستان انسانی ردهٔ MCF-7 نیز نتایج متفاوتی گزارش شده است (۹).

به‌طوری‌که دوز 1μm از داروی سیس‌پلاتین می‌تواند مرگ سلولی آپوپتوزیس را در سلول‌های MCF-7 ایجاد کند (۹و۵).

همچنین همین دوز داروی سیس‌پلاتین می‌تواند باعث افزایش تعداد سلول‌های MCF-7 در فاز G2/m گردیده که نشان‌دهنده رشد این سلول‌ها است (۷).

لذا جهت تکمیل این گزارش‌ها، توقف رشد سلول‌های MCF-7 در اثر این دوز از داروی سیس‌پلاتین مورد مطالعه قرار می‌گیرد.

مواد و روش کار

این تحقیق از نوع بنیادی و شیوه مطالعه نتایج، توصیفی است.

کشت سلول رده سلولی سرطان پستان انسانی MCF-7 از انستیتو پاستور ایران تهیه شده و در فلاسک‌های T-25 ساخت شرکت Nuncolon کشت داده شد.

محیط کشت سلول‌ها، RPMI-1640 حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر ال ـ گلوتامین، ساخت شرکت Gibco بود و به آن ۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر مکعب پنی‌سیلین، ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر استرپتومایسین و ۲ گرم در لیتر بی‌کربنات سدیم اضافه شد. این مواد در آب دیونیزه حل و سپس از فیلتر ۰/۲۲ میکرون عبور داده شد. همچنین جهت غنی‌سازی محیط از ۱۰٪ سرم جنین

1. Cisplatin.
2. Alkilating.
3. DNA Fragmentation.

magiran.com

گوساله که قبلاً در حمام آب گرم ۵۶ درجه سانتیگراد به‌مدت ۳۰ دقیقه غیرفعال شده بود، استفاده گردید. فلاسک‌های کشت در انکوباتور با شرایط ۵ درصد Co_2، دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و رطوبت ۹۵ درصد انکوبه شدند.

جهت شستشوی سلول‌ها، از محلول بافر فسفات دالبکو[1] استفاده شد که به‌صورت زیر تهیه گردید.

مقدار ۸ گرم (Nacl)، ۰/۲ گرم (Kcl)، ۱/۴۴ گرم Na_2H_{po4} $(2H_{2o})$ و ۰/۲ گرم (KH_{2po4}) را در یک لیتر آب مقطر دوبار تقطیر حل کرده، سپس توسط اتوکلاو با فشار ۱۵ پوند و دمای ۱۲۰ درجه سانتیگراد به‌مدت ۱۵ دقیقه استریل شده و تا زمان مصرف در دمای ۴درجه سانتیگراد در یخچال نگهداری شد.

جهت جداکردن سلول‌ها از کف فلاسک‌ها از آنزیم تریپسین استفاده شد که بدین منظور ابتدا ۵ گرم تریپسین را در ۱۰۰ میلی‌لیتر مکعب PBS حل کرده در زیر هود از فیلتر ۰/۲۲ میکرون عبور داده شد. تریپسین مصرفی با غلظت ۰/۲۵ توسط PBS رقیق شد و تا زمان مصرف در فریزر ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد.

پس از دریافت فلاسک حاوی سلول‌ها، محیط کشت تخلیه شد و با استفاده از محلول تریپسین سلول‌ها کنده شده سپس با استفاده از محیط کشت در فلاسک معلق شدند. از سلول‌های معلق در محیط کشت، حجم معلومی برداشته و جهت شمارش سلولی به پلیت ۹۶ خانه‌ای منتقل شد.

جهت شمارش تعداد سلول‌ها از خاصیت نفوذپذیری غشاء به رنگ تریپان‌بلو استفاده شد، بدین‌ترتیب که به میزان همان حجم از سلول، رنگ تریپان‌بلو ۵٪ به پلیت حاوی سلول اضافه شد. سپس در محلول حاوی سلول و رنگ، توسط لام‌نئوبار، شمارش سلولی انجام گرفت.

با انجام شمارش، تعداد یکسانی سلول به فلاسک‌ها اضافه شدند و زمانی‌که ۹۰٪ سطح کشت مملو از سلول شده بود، داروی سیس‌پلاتین اثر داده شد.

داروی سیس‌پلاتین ساخت شرکت Lemarry کشور مکزیک از داروخانه سیزده آبان تهران خریداری شد. جهت استفاده در تحقیق، غلظت یک میکرومول دارو توسط محلول نرمال سالین تهیه گردید و به‌صورت تازه مورد استفاده قرار گرفت.

زمانی‌که ۹۰٪ سطح کشت مملو از سلول شد، فلاسک‌ها به دو گروه شاهد و آزمایشی تقسیم شدند، به‌طوری‌که هرگروه شامل ۹ عدد فلاسک بود. در گروه آزمایشی، ابتدا محیط کشت خارج شد و پس از شستشو با PBS، سیس‌پلاتین با غلظت ۱ میکرومول به محیط کشت بدون سرم فلاسک‌ها اضافه شد و فلاسک‌ها به مدت یک‌ساعت انکوبه گردیدند. پس از یک‌ساعت، محیط کشت خارج شده و سلول‌ها با محلول سالین نرمال شستشو داده شدند، سپس محیط کشت کامل به فلاسک‌ها ریخته شد و سلول‌ها به مدت ۴۸ ساعت انکوبه گردیدند. پس از اتمام زمان انکوباسیون، سلول‌های چسبیده، تریپسینه شده و شمارش شدند. در گروه شاهد نیز همین کارها صورت گرفت، با این تفاوت که به‌جای سیس‌پلاتین از محلول سالین نرمال استفاده شد. سپس نتایج حاصله از شمارش سلولی در دو گروه شاهد و آزمایشی توسط آزمون آماری Mann-Withney ارزیابی شد.

همچنین سلول‌های دو گروه شاهد و آزمایش به‌طور

1. Dulbeco's Phosphate buffer solution.

magiran.com

جداگانه توسط تولوئیدن بلو رنگ‌آمیزی شدند و با میکروسکوپ نوری مورد مطالعه قرار گرفتند.

نتایج

نتایج به‌دست آمده از این تحقیق به دو بخش آماری و مشاهده مورفولوژیک با میکروسکوپ نوری تقسیم می‌شود. اعدادی که در شمارش سلولی به‌دست آمد، توسط آزمون آماری Mann-Withney ارزیابی شد که در جدول و نمودار زیر خلاصه شده است.

همانگونه که در جدول ۱ مشخص است، تعداد سلول‌های جسبیده در گروه آزمایشی با دوز $1\mu M$ داروی سیس‌پلاتین در سطح معنی‌داری $P</001$ کاهش یافته است.

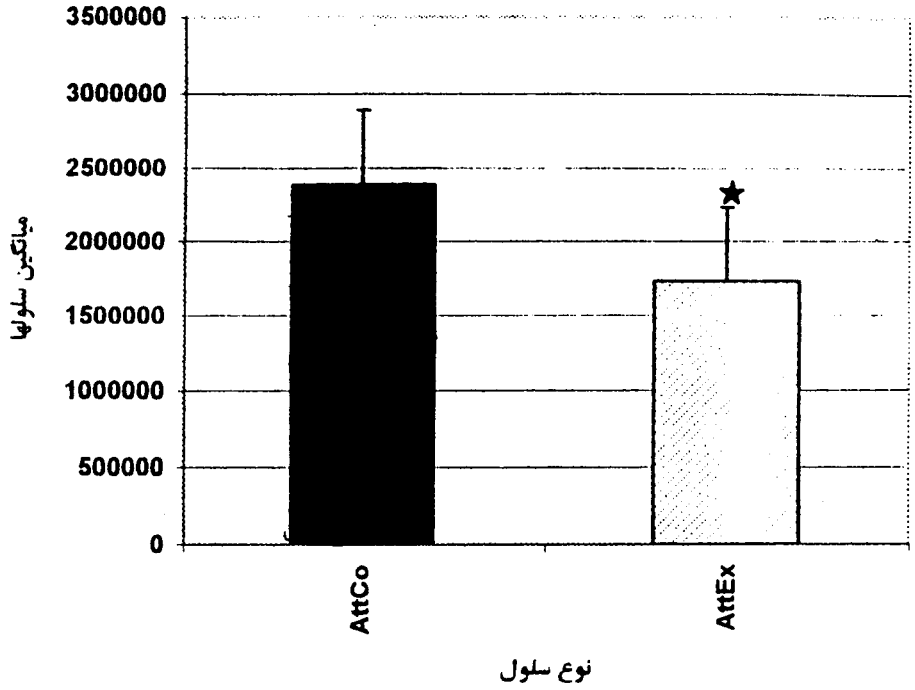
نمودار ۱ نیز نشان‌دهنده کاهش معنی‌دار در تعداد سلول‌های چسبیده گروه آزمایشی می‌باشد.

جدول ۱: مقایسه سلول‌های چسبیده در گروه‌های شاهد و آزمایشی

	درجه آزادی[1]	میانه[2]	انحراف معیار ± میانگین	سطح معنی‌دار
شاهد	۸	۱۷۰۰۰۰۰	۱۷۳۳۳۳ ± ۸۶۶۰۲/۵	۰/۰۰۰۳
آزمایشی	۸	۲۳۰۰۰۰۰	۲۳۸۸۸۸۸ ± ۷۸۱۷۳/۶	

۱ـ درجه آزادی: تعداد فلاسک‌های موجود در هر گروه منهای عدد یک

۲ـ میانه: میانه تعداد سلول‌های موجود در فلاسک‌ها



نمودار ۱: مقایسه میانگین سلول‌های چسبیده در دو گروه شاهد و آزمایشی

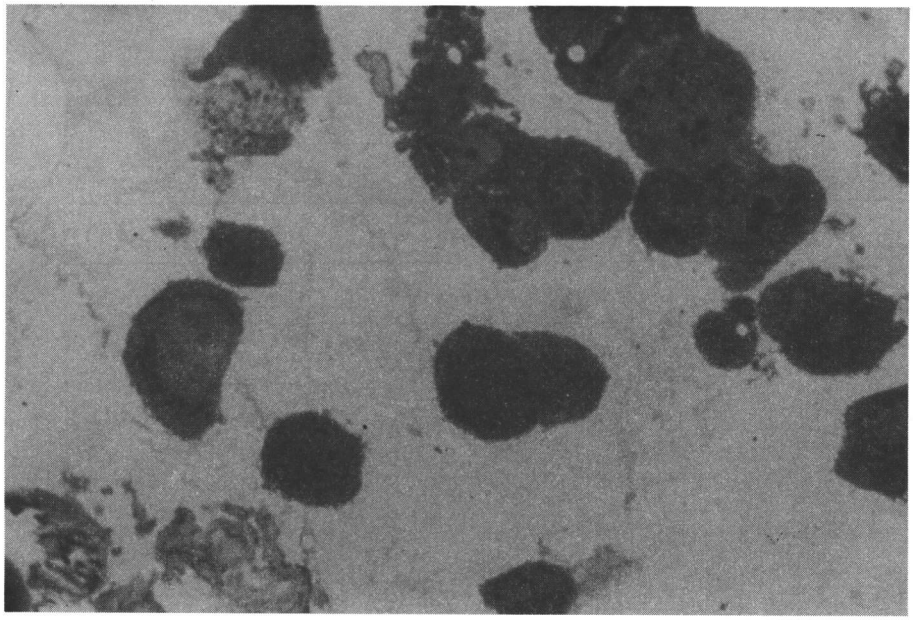
magiran.com

بحث:

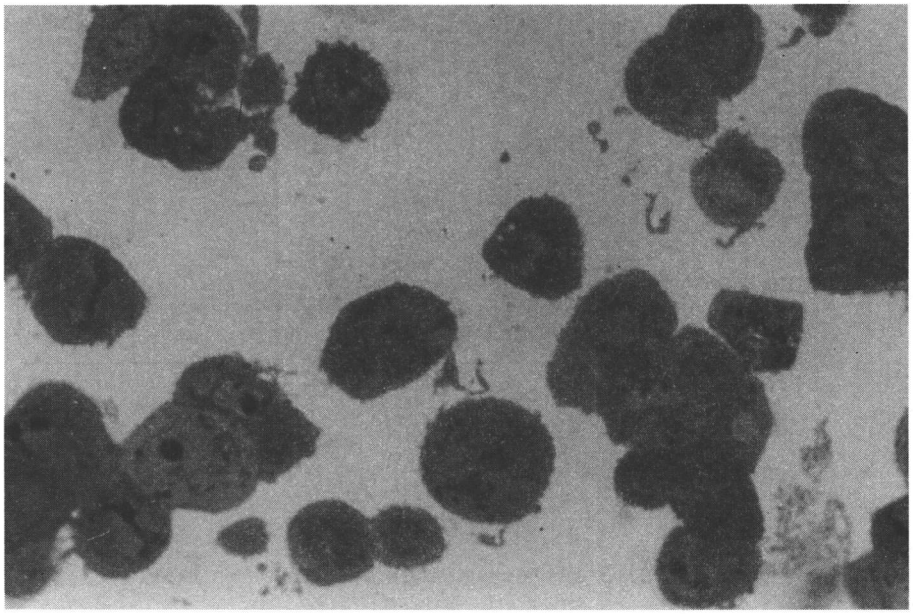
سلول‌های MCF-7، از نوع سلول‌های آدنوکار - سینومای پستان انسانی هستند که با چسبیدن به کف فلاسک‌ها رشد و تکثیر می‌نمایند. سلول‌های چسبیده MCF-7 در میکروسکوپ نوری با هسته روشن دیده می‌شوند که با توجه به سطح برش می‌توان هستک را نیز در داخل هسته تشخیص داد (۱۳و۱۲و۵).

در این تحقیق نیز، بررسی سلول‌های چسبیده گروه شاهد در بزرگنمائی‌های مختلف با هسته‌های یوکروماتین و سیتوپلاسم دست نخورده دیده می‌شوند (شکل ۱).

مورفولوژی سلول‌های چسبیده درگروه و آزمایشی نیز ظاهری طبیعی داشته که مشابه شکل سلول‌های چسبیده گروه شاهد بود (شکل ۲).



شکل ۱: تصویر سلول‌های MCF-7 گروه شاهد در میکروسکوپ نوری ۱۰۰X = بزرگنمائی



شکل ۲: تصویر سلول‌های MCF-7 گروه آزمایشی در میکروسکوپ نوری ۱۰۰X = بزرگنمائی

magiran.com

بنابراین می‌توان گفت که داروی سیس‌پلاتین، تغییری در مرفولوژی سلول‌های چسبیده MCF-7 ایجاد نکرده است و این مطلب در تأیید سایر محققین می‌باشد (۱۴و۱۳و۵).

از آنجا که سلول‌های چسبیده MCF-7، سلول‌های در حال رشد محسوب می‌شوند و در گروه آزمایشی تعداد آنها کاهش یافته، می‌توان گفت که داروی سیس‌پلاتین موجب مهار رشد سلول‌های MCF-7 شده است. این مطلب با گزارش Otto در سال ۱۹۹۶ مطابقت دارد، به‌طوری که در این گزارش، تعداد سلول‌های MCF-7 در فاز G2/M به دنبال استفاده از سیس‌پلاتین افزایش یافته و بدین‌ترتیب نتیجه گرفته شده که سلول‌ها در مرحله تقسیم سلولی متوقف شده‌اند (۵). بنابراین می‌توان گفت این دوز داروی سیس‌پلاتین می‌تواند موجب توقف رشد سلول‌های MCF-7 گردد که این مسئله در سایر رده‌های سرطانی نظیر رده سلولی لنفومای موش به نام EL-u، سلول‌های اوستئوسارکومای انسانی، رده سلولی هپاتومای انسانی JBI و رده سلولی سرطان تخمدان انسانی OV-2008 نیز قبلاً به اثبات رسیده است (۱۵و۱۴و۱۳و۱۱).

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از گروههای آناتومی، همانولوژی و ایمنی‌شناسی دانشگاه تربیت مدرس کمال تشکر و سپاسگزاری را داریم.

magiran.com

References:

۱ـ نیک‌نفس بهروز. مطالعه in vivo ,in vitro سلول‌های آپوپتوتیک در تیموس، بخش پایان‌نامه‌ها، کتابخان مرکزی دانشگاه تربیت مدرس، پایان‌نامه دکتری تخصصی، ۱۳۷۴.

2. Buja. IM, Eigenbrodt M, Eigenbrodt. 1. Apoptosis and necrosis, Arch. Pathol. Med, 1995; 117: 1208-1214.

3. Barrym, Behnke CA, Eastman. A. Activation of programmed cell death (Apoptosis) by cisplatin, other anti cancer drugs, toxins and hyperthermia, Biochem. Pharmacol, 1990; 2353-2362.

4. Elstner E et al. 20 Epi vitamin D3 analogues: A novel class of pottent inhibitors of prolifration and inducers of differentiation of human breast cancer cell lines, Cancer Research, 1995; 11: 2822-2829.

5. Otto M A, Paddenberg SB, Mannherz HC. Cell cycle arrest, Micronucleues Formation and cell by tamoxifen and cisplatin, J. clin. oncol, 1996; 122: 603-612.

6. Shinomiya N, Takenmora IK, Rakutanda M. Caffeine induces S phase apoptosis incis diaminedichloro platinium treated cells cisdiaminedichloro platinium induces a block in G2/M. cytometry, 1997; 27: 365-373.

7. Saunders DE., et al, Paclitaxel induced apoptosis in MCF-7 breast cancer cells, Int. J. Cancer, 1997; 70: 214-220.

8. Otto Am, Muller CS, Hufft, Hannapel E. Chemotherapeutic drugs change Skeleton orgnization and expression of beta-thymosins in human breast cancer cells. J Cancer Res clin oncol, 2002; 128(5): 247-256.

9. Otto A M, Schubert S, Netzker R. Changes in the expression and binding properties of the estrogen in MCF-7 breast cancer cells during growhth inhibition by tamoxifen and Cisplatin. cancer phemother harmacol, 2001; 48(4): 305-11.

10. Dibas A, Haward J, Anwars, Stewart D, Kham A, boratol 1, 2 diaminocyclohexane platinum (II), a novel tumor dtug. Biochem Biophys Res Commun, 2000; 270(2): 382-6.

11. Bernhardt G, Beekenlehner K, spruss T, Schlemmer R, Reile Schonenberger H. Establishment and characterization of new murine cancer cell Lines. Arch pharm, Establishment and characterization of new murine cancer cell Lines. Arch pharm, 2002; 335(2-3): 55-68.

12. Kerr J F, Gobe, Winter ford GM, Haman BB. Anatomical Methods in cell death, Methods in Cell Biology, 1992; 461-27.

13. Yasutake H and et al. Inhibitory Effect of Caffeine of potentially lethal damage repair in cisplatin treated human osteo sarcoma cells, Anti Cancer Research, 1995; 15, 831-8398.

14. Isonishi S et al. Modulation of cisplatin and sensivity growth rate of an ovarian carcinoma cell line by Bombesin and tumor necrosis factor, J. chem. Invest, 1992; 90: 1436-1442.

15. Dyfed I E, Dive. C. Effect of Cisplatin on the induction of apoptosis in prolifrating hepatoma cells and nonprolifrating mature thymucytes, Cancer Research, 1993; 53: 2133-2139.