Journal of Ardabil University of Medical Sciences

Vol. 17, No. 2, Summer 2017, Pages 154-163

Study of Cell Viability and JNK / SAPK Level Following Abiotic Stresses (Heat & Radiation) in Breast Cancer Cells

Hasanpour F [1], Hamidi K*[1], Zahri S [1], Latifi Navid S [1]

1. Department of Biology, Faculty of Sciences, Mohaghegh Ardabili University, Ardabil, Iran
**** Corresponding author.*** Tel: +984533514702, Fax: +984533514701, E-mail: Ka_Hamidi2003@yahoo.com

Received: Mar 15, 2017 Accepted: May 31, 2017

ABSTRACT

Background & Objectives: Breast cancer is one of the most common cancers of women in the world. Apoptotic pathway is one of the most important pathways to deal with cell damage, especially cancer, which is usually blocked in this disease. One of the main enzymes to set up this pathway is JNK (1,2,3α,3β), which is activated by cellular stress.

Methods: In this study, breast cancer cells with the origin of MCF-7 cell lines were cultured in RPMI medium using 10%fetal bovine serum.Then , they were subjected to heat (42 & 45˚ C) for 1,2,4,6 and 8 hours under X-ray and γ-ray radiations for 1,2,3 and 4 hours as well. Their viability and enzyme level were evaluated by MTT and ELISA tests, respectively.

Results: The obtained results showed that abiotic stresses including heat and radiations resulted in JNK level increase and recovery of apoptosis pathway function in breast cancer cells. In addition, they led to decreased of cell viability and increase of JNK level depending on the duration and kind of stress.

Conclusion: The results in this study showed abiotic stress directly affected the JNK level. Increase of this enzyme in the cell resulted in activity of JNK apoptosis pathway. We hope to find methods to help to cancer treatment by means of more studies on JNK enzyme and relevant pathways.

Keywords: JNK Enzyme; Breast Cancer; Radiation Stress; Heat Stress; Abiotic Stress.

[Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-04-13]

بررسی بقاء سلولی و میزان آنزیم JNK/SAPK پس از تنش‌های غیرزیستی (گرما و اشعه) در سلول‌های سرطان پستان

فرانک حسن پور [۱]، کمال الدین حمیدی [۱*]، صابر زهری [۱]، سعید لطیفی نوید [۱]

۱. گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

* نویسنده مسئول. تلفن: ۰۴۵۳۳۵۱۴۷۰۲ فکس: ۰۴۵۳۳۵۱۴۷۰۱ پست الکترونیک: Ka_Hamidi2003@yahoo.com

چکیده

زمینه و هدف: سرطان پستان، یکی از شایع‌ترین بدخیمی‌های زنان در جهان است. مسیر آپوپتوز یکی از مهمترین مسیرهای مقابله با آسیب‌های سلولی به ویژه سرطان است که معمولاً در این بیماری مسدود می‌شود. از آنزیم‌های اصلیِ به راه اندازنده این مسیر آنزیم‌های JNK (۳،۱،۲α،۳β) هستند که بر اثر استرس‌های سلولی فعال می‌شوند.

روش کار: در این مطالعه آزمایشگاهی، سلول‌های سرطان پستان با منشأ رده سلولی MCF-7 در محیط کشت RPMI با ۱۰٪ سرم جنین گاوی کشت داده شدند. سپس تحت تنش‌های گرما (۴۵ و ۴۲ درجه سانتیگراد) به مدت ۱، ۲، ٤، ۶ و ۸ ساعت و تنش‌های اشعه X و γ به مدت ۱، ۲، ۳ و ٤ ساعت قرار گرفتند و میزان زیستایی آنها با روش MTT و میزان آنزیم JNK با تست الایزا مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها: یافته‌ها نشان داد که تنش‌های غیرزیستی همانند گرما و اشعه باعث افزایش میزان آنزیم JNK و همچنین بازیابی مسیر عملکردی آپوپتوزی آن در سلول‌های سرطان پستان می‌شود. همچنین کاهش زیستایی و افزایش میزان JNK در سلول‌های تحت تنش وابسته به مدت زمان و نوع تنش متفاوت است.

نتیجه‌گیری: نتایج این تحقیقات نشان داد که استرس‌های غیرزیستی تاثیر مستقیمی بر میزان آنزیم JNK دارند. افزایش میزان این آنزیم در سلول باعث فعالیت مسیر آپوپتوز سلولی شده و مرگ برنامه ریزی شده سلول را به همراه دارد. امید است با ادامه روند شناخت بیشتر آنزیم JNK و مسیرهای مربوطه بتوان راهکارهایی برای کمک به درمان این سرطان را به کار برد.

واژه های کلیدی: آنزیم JNK، سرطان پستان، تنش اشعه (X,γ)، تنش گرما، تنش آبیوتیک

دریافت: ۱۳۹۵/۱۲/۲۵ **پذیرش:** ۱۳۹۶/۰۳/۱۰

مقدمه

سرطان پستان یکی از متداول ترین بدخیمی های شناخته شده و دومین عامل مرگ و میر ناشی از سرطان در بین زنان است [۱]. یکی از عوامل مهم بروز سرطان پستان تغییرات ژنتیکی است. سرطان پستان در نتیجه تجمع آسیب‌های ژنتیکی و اپی ژنتیکی در سلول‌های اپی تلیال بافت سازنده شیر و کسب فنوتیپ های بدخیمی (تکثیر خارج از کنترل، جلوگیری از مرگ سلولی و متاستاز و...) توسط این سلول‌ها بروز می‌کند [۲]. بر اساس آمار جهانی سرطان پستان یک مشکل بهداشت جهانی است و شایع ترین بدخیمی زنان در سراسر دنیا است [۳]. طبق تحقیقات انجام شده در انستیتو کانسر بیمارستان امام خمینی تهران سرطان پستان با حدود ۲۳ درصد فراوانی بیشترین میزان بدخیمی را در بین زنان داشت. میزان خام بروز سرطان پستان در ایران معادل ۲۲/٤ در هر ۱۰۰۰۰۰ زن برآورد شده است و این اعداد حکایت از روند رو به افزایش این بیماری دارد [٤]. تقریباً ۷۰ درصد از زنان ایرانی در زمان مراجعه در مراحل پیشرفته بیماری می‌باشند که در این شرایط کاری از عوامل درمان ساخته نیست [۵]. درمان سرطان پستان شامل درمان دارویی و جراحی و یا ترکیبی از

[Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-04-13]

هر دو است، اما به صورت عمده جراحی به همراه شیمی درمانی و پرتو درمانی راه اصلی درمان بیماری است. این نوع سرطان همانند تمام انواع سرطان‌ها احتمال بازگشت و همچنین احتمال باقی‌ماندن بخش‌هایی از قسمت‌های درگیر پس از جراحی را دارد، در نتیجه روش‌های درمانی دیگر همانند سلول درمانی و یا استفاده از مسیرهای ژنی آپوپتوزی مورد بررسی قرار گرفته اند تا بتوان با راه‌اندازی این مسیرها راهی سریعتر و با خطر کمتر را ایجاد کرد.

Mitogen-Activated Protein Kinase ها با عنوان MAPK شناخته شده هستند. MAPK ها متنوع هستند اما در همه حیوانات، قارچ‌ها، گیاهان و حتی در یوکاریوت‌های تک سلولی یافت می‌شوند. عملکرد و قواعد حاکم بر آنها در طی تکامل از موجودات تک سلولی مانند مخمر آبجو تا موجودات پیچیده همانند انسان حفظ شده است و در تمام پستانداران بیان می‌شوند [۶]. این نکته به اثبات رسیده است که این خانواده بزرگ[1] نقش قابل توجهی در تنظیم سوخت و ساز داخلی، بیان ژن و فعالیت های تصحیحی و از همه مهمتر مدیریت و تنظیم پاسخ‌های سلولی در برابر تحریکات و تنش‌ها (استرس‌های) فیزیکی و شیمیایی خارج سلولی همانند: میتوژن‌ها، انواع تنش‌ها مانند تنش‌های زیستی و غیرزیستی، سیتوکین‌های پیش‌التهابی، فاکتورهای رشد، اکسیداسیون، آسیب DNA و عفونت‌ها بازی می کند.این قبیل سیگنال‌ها با راه اندازی فسفریلاسیون آبشاری این خانواده باعث فسفریله شدن پروتئین‌های هدفی همچون فاکتورهای رونویسی می‌شوند و در انتها عکس‌العمل‌های متفاوتی همچون مهاجرت، تکثیر، تمایز، بیان ژن، آپوپتوز و بقای سلولی را ایجاد می‌کنند. بررسی‌های زیادی بر روی خانواده MAPK انجام شده است و نقش آنها در تعداد زیادی از بیماری‌ها و مسیرها همانند کم خونی، بازسازی کبد، هیپوتروفی قلب، رماتیسم مفاصل، پاسخ ایمنی، حافظه، سرطان، پاسخ اسمزی، تعاملات میزبانی انگلی، آپوپتوز، هومئوستازی بافت های بزرگسالان، نمو جنینی و غیره به اثبات رسیده است [۸،۷]. در پرسلولی‌ها به ویژه پستانداران، ۳ زیر خانواده اصلی ERK(1/2)، JNK/SAPK(1,2,3α,3β) و p38(α,β,γ)، برای MAPKها شناخته شده اند [۹]. فعال سازی این خانواده بزرگ به وسیله فسفریله شدن دو ریشه آمینو اسیدی Tyr و Thr در ساختار فرا دوم Thr-X-Tyr[2] رخ می‌دهد [۱۰].

c-Jun N-termination Kinase/ Stress-activated protein kinase که به عنوان کیناز فعال شونده با استرس یا (SAPK) نامیده می‌شود گروه سوم از MAPKها هستند. JNKها توسط ۳ ژن کد می‌شوند: MAPK 8، MAPK9 و MAPK10 که به ترتیب کد کننده JNK1 , JNK2 وJNK3 هستند. JNK1 و JNK2 در اغلب سلول‌ها بیان می شوند، این در حالی است که JNK3 عمدتاً در مغز، قلب و بیضه دیده می‌شود. یک گروه شناخته شده از سوبستراهای JNK فاکتور رونویسی AP1 است که اعضای خانواده آن شامل Fos و Jun است. عملکرد اونکوژنیک JNKها اغلب بر پایه توانایی آنها برای فسفریله کردن JUN و فعال‌سازی AP1 است، در حالی که آنها دارای عملکرد سرکوبگری تومور نیز هستند که به احتمال زیاد در ارتباط با فعالیت آپوپتوزی آنها است. مسیر های تنظیمی JNK/JUN یک مجموعه از ژن‌های هدف دارای محل اتصال به AP1 هستند که شامل ژن‌های کنترل سیکل سلولی همانند بقا، آپوپتوز، متالو پروتئازها و گیرنده‌های هورمونی هسته همانند گیرنده‌های رتینوئید و... هستند. JNKها به سیگنال های استرس متنوعی از جمله تنش های دمایی، اسمز، سیتوکین‌های پیش التهابی و قرار گرفتن در معرض اشعه UV پاسخ می‌دهند و آبشار پیام رسانی را راه اندازی می کنند که معمولاً

[1] Superfamily

[2] Threonine -X- Tyrosine

[Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-04-13]

منجر به آپوپتوز و گاهی نیز منجر به افـزایش بقـای سلولی در شرایط خاص می‌شوند. این عمل نقش مهم و ویـژه ای در تعیـین سرنوشـت سـلول در طـی توسـعه‌ی تومـوری شـدن (تومـورزایی) و همچنـین آماس و التهـاب و رگ زایـی تومـوری دارد [۱۲،۱۱]. شیوع بیماری سرطان پستان در زنان جهان بـه ویـژه در ایـــران و همچنـــین تـــاثیر ژن‌هـــای JNK و پروتئین‌های حاصـل از ایـن ژن در بقـای سـلول‌هـای سرطانی و پیشبرد این سلول‌ها به سـوی آپوپتـوز در شرایط محیطی خاص همچـون انـواع تـنش‌هـا دلیـل انجام این مطالعات بوده است. هـدف از ایـن مطالعـه فعال‌سازی مسیر آپوپتوز مـرتبط بـا آنـزیم JNK در اثر تنش‌های آبیوتیک بوده اسـت. بـر همـین اسـاس ابتدا، سلول‌ها تهیـه شـده و پـس از قـرار گـرفتن در شرایط تنش به وسیله‌ی تنش‌های غیـر زیسـتی اشـعه (X,γ) و گرمـا بـا تکنیـک‌هـای MTT و ELISA، بـه ترتیب میزان زیستایی و میزان آنزیم JNK تام مورد بررسـی قـرار گرفـت. نتیجـه بدسـت آمـده نشـان می‌دهد که مسیر آپوپتوز القایی توسط JNK با تـاثیر تنش‌های غیر زیستی فعال می‌شود.

روش کار

کشت سلول

سـلول سـرطان پسـتان رده (MCF-7) (Pasteur Institute) در داخل فلاسک ۲۵ سانتیمتر مربـع و در محـیط کشـت کامـل RPMI- 1640 (Gibco BRL) و۲۰ درصـد سـرم جنـین گـاوی FBS (Biowest) و پنیسیلین- استرپتومایسین (Biowest) بـا غلظـت۱۰۰ میکروگـــرم در میلـــی لیتـــر و آمفوتریســـین B (Biowest) با غلظت ۱۸ واحـد در ۱۰۰ میلـی لیتـر و در پـنج درصـد CO_2 و دمـای ۳۷ درجـه سـانتیگراد کشت داده شد. این سلول‌ها به صـورت تـک لایـه در فلاسک رشد می‌کنند. محیط کشت در هر هفتـه سـه مرتبه تعویض و بـرای برداشـت کـردن سـلول‌هـا از محلـول سـترون EDTA- تریپسـین (Gibco BRL) استفاده شد.

تنش غیر زیستی (آبیوتیک)

تـنش گرمـا: انکوبـاتور CO_2 دار در دمـای ۴۲ و ۴۵ درجه سانتیگراد تنظیم و سلول‌ها در این دو دما تحت تنش ۴،۲،۱، ۶ و۸ ساعت قرار گرفتند.

اشعه γ نرم

اشـعه γ بـه وسـیله چشـمه ^{125}I (padtangostar) بـا میـــزان پرتـــو دهـــی 200kBq< تـــامین شـــد و در انکوباتوری جدا و در محیطی کاملاً اسـتریل شـده بـا دیواره های سربی، فلاسک حاوی سلول‌هـای MCF-7 تحت تنش۳،۲،۱و۴ ساعت اشعه گاما قرار گرفتند.

تنش اشعه X

سلول‌ها به مدت ۳،۲،۱و۴ سـاعت تحـت پرتـو دهـی اشـعه X در دسـتگاه X-ray(X.ray Leybold) و در ولتـاژ ۳۵Kv و شـدت جریـان ۱A در نتیجـه در دوز ۴۵۰ msv/h قرار داده شدند.

تست MTT

آزمایش MTT که یک روش رنگ سنجی است که بر اساس احیا شدن و شکسته شـدن کریسـتال‌هـای زرد رنـــگ تترازولیـــوم بوســـیله آنـــزیم سوکســـینات دهیـــدروژناز و تشـــکیل کریســـتال‌هـــای آبـــی رنـــگ نامحلول می‌باشد. برای این منظور صـد هـزار عـدد سلول شمارش شده و به پلیـت ۲۴ خانـه انتقـال داده شده و به مدت ۱ روز انکوبه می‌شود و سپس تحـت تنش‌های غیر زیستی (گرما و اشعه) قرار گرفته (برای هر تنش سه تکرار انجام شـد) و پـس از انجـام انـواع تنش‌ها، ۴۰ µl محلـول پـودر MTT (Atocel) را بـه همراه ۳۶۰ میکرولیتر محیط آماده به سلول‌ها اضافه کـرده و بـه مـدت ۴-۳ سـاعت درون انکوبـاتور ۳۷ درجه سانتیگراد قـرار داده و سـپس محـیط را خـارج کـرده و ۱۰۰ میکرولیتـر DMSO (Atocel) اضـافه کرده و برای ۱۵-۱۰ دقیقه مجدداً در انکوباتور قرار داده شد و پس از آن به پلیت ۹۶ خانه منتقـل شـد و میـــزان جـــذب آن را در طـــول مـــوج ۶۵۰ nm

[Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-04-13]

اندازه‌گیری شد (مراحل استفاده از DMSO و MTT در تاریکی انجام می‌گیرد). برای محاسبه میزان زیستایی و IC50 سلول‌ها از رابطه زیر و نرم افزار Excel 2010 استفاده شد:

درصد زیستایی سلول = OD exp(جذب دیده شده)/OD cont(جذب شاهد) ×۱۰۰

تست ELISA

در این روش از کیت الایزای اختصاصی پروتئین JNK/SAPK (Bioassay technology laboratory) استفاده گردید. قبل از انجام آزمایش نیاز به آماده سازی سوسپانسیون حاوی عصاره سلولی است.

الف) آماده سازی سوسپانسیون سلول قبل و بعد از انجام تنش‌ها: سلول‌ها را با ۱ میلی لیتر تریپسین جدا شده و سپس با ۱ میلی لیتر PBS مخلوط گردید و در سانتریفیوژ ٤ درجه سانتیگراد و در RPM ۳۰۰۰-۲۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه قرار داده و پس از جداسازی سلول، یک میلیون سلول شمارش شده و با PBS به حجم ۱ میلی لیتر رسانده و سپس به روش انجماد و ذوب کردن متوالی سلول‌ها لیز شده و عصاره‌ای از سلول به دست آمد. بر اثر دناتوره‌شدن سلول‌ها، رنگ محلول از سفید به شیری تغییر کرد.

ب) روش انجام آزمایش الایزا: ابتدا کیت کامل، ۳۰ دقیقه قبل از استفاده از یخچال خارج گردید، استانداردهای آماده شده با غلظت‌های مختلف از آنزیم مورد مطالعه با اندازه ۵۰ میکرولیتر و سوسپانسیون آماده شده از نمونه را به مقدار ٤۰ میکرولیتر به داخل چاهک‌های الایزا پوشیده شده با آنتی پروتئین کیناز JNK/SAPK وارد کرده، سپس ۱۰ میکرولیتر از JNK/SAPK Antibodies (آنتی‌بادی JNK/SAPK نشاندار شده با بیوتین)[1] را اضافه کرده و در انتها ۵۰ میکرولیتر Streptavidin-HRP، افزوده و به وسیله برچسب روی چاهک‌ها را پوشانده و پس از کمی مخلوط کردن آنها (با حرکت آرام دست) به مدت یک ساعت در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده شد و پس از یک ساعت چاهک‌ها از داخل انکوباتور خارج شده، محیط روی چاهک‌ها را خارج کرده و به وسیله محلول شستشو برای ۵ بار شستشو داده شد که در هر مرتبه ۳۰ ثانیه محلول در چاهک‌ها نگه داشته شد. نکته قابل توجه در این قسمت آن است که محلول شستشو باید به صورت کامل از چاهک خارج شود و به نوعی تقریباً چاهک خشک باشد. مرحله بعدی، بخش وابسته به رنگ نامیده می‌شود و بهتر است در تاریکی انجام گیرد. Chromogen Solution A را به میزان ۵۰ میکرولیتر به چاهک اضافه کرده و پس از آن ۵۰ میکرولیتر از Chromogen Solution B به چاهک اضافه کرده و سر آن را پوشش داده و پس از کمی مخلوط نمودن به مدت ۱۰ دقیقه در انکوباتور قرار داده شد. پس از ۱۰ دقیقه رنگ محلول به آبی تغییر می‌کند. بعد از خارج کردن از انکوباتور ۵۰ میکرولیتر Stop Solution به هر چاهک اضافه شده و تغییر رنگ از آبی به زرد مشاهده می‌گردید. این چاهک‌ها برای اندازه‌گیری میزان جذب در طول موج ٤۵۰nm در دستگاه الایزا ریدر قرار گرفت. نکته مهم آنجا است که مدت زمان میان اضافه کردن Stop Solution و اندازه گیری جذب بیش از ۱۰ دقیقه نباید باشد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

برای بدست آوردن میزان آنزیم از طریق الایزا از منحنی استاندارد و معادله مربوطه استفاده شد. جهت انجام محاسبات آماری SPSS-19 و Excel-2010 بکار گرفته شد. سنجش‌ها سه بار تکرار شد و از میانگین نتایج در محاسبات آماری استفاده گردید. اختلاف در سطح زیر ۵ درصد معنی‌دار تلقی شد.

[1] Anti JNK/SAPK Antibody Labeled with Biotin

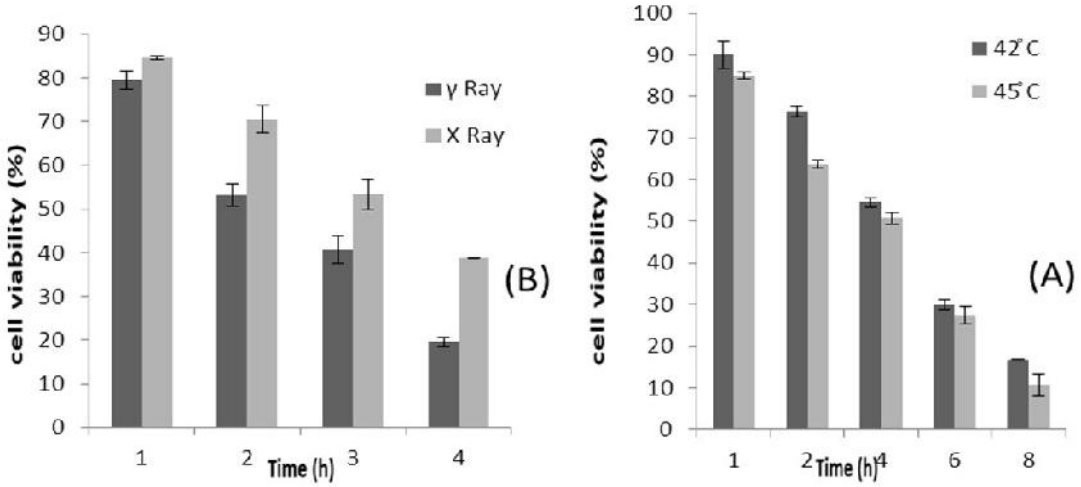
[Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-04-13]

یافته‌ها

برای بررسی صحیح ابتدا سلول‌ها بـه مـدت دوهفتـه کشت طبیعی داشتند تا تعـداد و شـکل مورفولـوژیکی آن‌ها کاملاً طبیعـی باشـد. بـرای انجـام هـر کـدام از تست‌های انجام شده به تعداد زیـادی سـلول احتیـاج اسـت و بـه دلیـل اسـتفاده از سـلول‌هـای سـرطانی محدودیتی در تعداد پاساژ وجود نداشته است. بـرای تست MTT از $۱۰^{۵}$ و برای تست الایـزا از $۱۰^{۶}$ سـلول سـرطان پسـتان رده MCF-7 اسـتفاده شـد. تعیـین زمان‌های مناسب برای تنش‌های انجام شـده، همـراه با انجام آزمایش‌های متعدد بود و پاسخ در زمان‌های بالاتر به دلیل مرگ تعداد زیـادی از سـلول‌هـا قابـل بررسی نبود (به عنوان مثال در زمان‌های ۱۲ و ۱۶ و ۲٤ ساعت).

سنجش میزان زیستایی سلول‌ها به روش MTT

مشاهدات و محاسبات میـزان زیسـتایی سـلول‌هـا در مدت زمان‌های مختلف و همچنین تنش‌های مختلـف بسـیار قابـل تامـل اسـت. بـا محاسـبات انجـام شـده مشخص شد که تفاوت میانگین درصد حیات سلول‌هـا در طی انواع تنش‌هـای گرمـا (٤٥ و٤٢ سـانتیگراد) و اشعه γ و X نسبت به نمونه کنترل (شاهد) در سـطح $p\leq ۰/۰۵$ معنی‌دار بوده است. در نتایج تنش گرمـا ٤٢ درجه سانتیگراد میزان زیسـتایی بـر اسـاس افـزایش مدت زمان کاهش پیدا کرده است که ایـن نتـایج در مورد دمای ٤٥ درجه سانتیگراد تکرار شد و از طرفی مقایسـه بـین میـزان زیسـتایی بـین ایـن دو دمـا نشان‌دهنده کاهش زیستایی سلول‌ها در دمای بـالاتر است. تاثیر دما بر روی سلول‌های MCF-7 در دمای ٤٢ درجه سانتیگراد به گونه‌ای است کـه IC50 (نیمـه زیستایی) آن تقریباً در پنجمین ساعت (مـابین مـدت زمان‌های ٤ و ۶ ساعت) پس از تنش رخ داده است و کمترین میزان زیستایی مربـوط بـه ۸ سـاعت تیمـار است که تنها ۱۶/۷۶درصد از سلول‌ها زنده مانده‌اند، در مقابل در دمای ٤٥ درجه سانتیگراد IC50 برابر ٤ ساعت بود و پس از ۸ ساعت تیمار تنها ۱۰/۶۱ درصد سلول‌ها زنده ماندند (نمودار ۱، شکل A).



نمودار ۱ (بقای سلولی). در این نمودار میزان زیستایی سلول‌های سرطان پستان با رده‌ی MCF-7 پس از انواع تنش‌ها نشان داده شده است. شکل (A)میزان زیستایی سلول‌ها در تنش گرما دمای ٤٢ و ٤٥ درجه سانتیگراد و در طی زمان‌های ۱،۲،٤،۶و ۸ را نشان می‌دهد. شکل (B) میزان زیستایی سلول در تنش اشعه γو X را در طی زمان‌های ۱،۲،۳و٤ ساعت را نشان می‌دهد (میزان زیستایی نسبت به نمونه‌ی شاهد سنجش شده است).

در تنش‌های اشعه X و γ با افزایش مدت زمان تـنش روند رو به کاهش زیسـتایی سـلولی نیـز ادامـه پیـدا کرده است، اما در تنش‌های اشعه بـر اسـاس قـدرت نوع اشعه استفاده شـده، تغییـر چشـمگیری در زمـان رسیدن به نیمه زیستایی سلول‌های تحت تنش دیـده می‌شود به صورتی کـه زیسـتایی سـلول‌هـا در تـنش

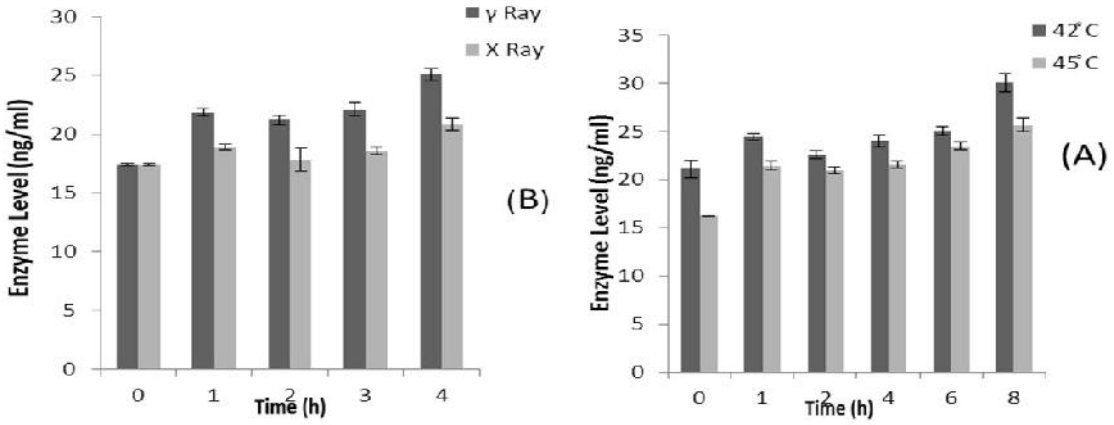
[Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-04-13]

اشعه X بصورت وابسته به زمان کاهش یافته و IC50 آن برابر ۳ ساعت بود و پس از ٤ ساعت تیمار تنها ۳۸/۸۸ درصد سلول‌ها زنده ماندند و در مقابل زیستایی سلول‌ها در تنش اشعه γ وابسته به زمان کاهش یافته است، بطوری که IC50 آن برای این تنش برابر ۲ ساعت بود و پس از ٤ ساعت تیمار تنها ۱۹/۶۲ درصد سلول‌ها زنده ماندند (نمودار ۱، شکلB).

سنجش میزان آنزیم تام JNK/SAPK به روش ELISA

در تنش غیر زیستی گرما (هم در دمای ٤۲ و هم در دمای ٤۵ درجه سانتیگراد) و همچنین تنش غیرزیستی اشعه (X وγ) با افزایش مدت زمان تنش افزایش میزان JNK/SAPK دیده می‌شود. نکته قابل توجه افزایش ناگهانی مقدار آنزیم در ساعت اول انجام آزمایش است که این افزایش ناگهانی در نتایج تمام تنش‌های غیرزیستی مشاهده می‌شود (نمودار ۲).

در دومین زمان تنش، کاهش میزان آنزیم نسبت به ساعت اول مشاهده می‌شود اما نسبت به شاهد افزایش قابل درک است. در ادامه با افزایش مدت زمان تحت تنش بودن سلول‌ها میزان آنزیم نیز افزایش می‌یابد به گونه‌ای که در آخرین زمان تنش (برای تنش‌های گرما ۸ ساعت و برای تنش‌های اشعه ٤ ساعت) بالاترین میزان دیده می‌شود (نمودار ۲).



نمودار ۲ (میزان آنزیم JNK). در این تصاویر تغییر در میزان آنزیم JNK/SAPK موجود در سلول‌ها قبل و بعد از تنش‌های غیر زیستی بر حسب ng/ml مشاهده می‌شود. شکل (A) تغییر میزان آنزیم JNK در زمان‌های مختلف تنش گرما دمای ٤۲ و ٤۵ درجه سانتیگراد در مقایسه با میزان آنزیم قبل از تنش. شکل (B) تغییر میزان آنزیم JNK در طی ٤ ساعت تنش اشعه γ و X در مقایسه با میزان آنزیم قبل از تنش. (عدد صفر نشان دهنده‌ی نمونه شاهد است).

بحث

سرطان پستان با حدود یک میلیون بیمار جدید در هر سال شایع ترین بدخیمی در بین زنان است. این سرطان در کشورهای توسعه یافته حدود ۱۰ درصد کل سرطان‌ها و ۲۳ درصد سرطان زنان را تشکیل می‌دهد [۱۳]. درمان‌های متداول مشکلات متعددی از قبیل بازگشت سرطان، هزینه سنگین و مشکلات جسمی را به همراه دارد، در نتیجه یافتن راهکاری سلولی برای اجبار سلول‌های سرطانی به آپوپتوز، زمینه انجام پژوهش‌های متعددی را به وجود آورده است که یکی از ژن‌های درگیر در مسیر آپوپتوز ژن JNK است.

این مطالعات نشان داد که با القای تنش‌های غیرزیستی که سلول را برای مقابله با خود وادار به ایجاد پاسخ می‌کند، می‌توان راه مسدود شده آپوپتوز سلولی را دوباره راه اندازی کرد. از آنجایی که فسفریلاسیون JNK به صورت عمده به عنوان یک محرک آپوپتوز مطالعه شده است و مسیر پیام رسانی هر سه JNK

[Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-04-13]

نشان می‌دهد که در مسیر آپوپتوز نقش دارند. با استفاده از مطالعاتی که بر روی فیبروبلاست جنینی موش فاقد JNK1 و JNK2 انجام شد شواهد روشنی از نقش JNK1 و JNK در مسیر پیام رسانی آپوپتوز مشاهده شده است [۱٤]. در بررسی‌ها نشان داده شد که وارد کردن پلاسمید Notch1 باعث افزایش فسفریلاسیون JNK و در نتیجه فعالسازی آن در رده‌های سلولی سرطان کبد (HepG2,Hep3B) می‌شود و در انتهای این مسیر، آپوپتوز سلول‌های سرطانی قرار دارد اما از طرفی با مهار فسفریلاسیون JNK، مسیر آپوپتوز فعال شونده توسط JNK مسدود شده و تاثیر Notch1 برروی سلول باعث آپوپتوز نمی‌شود [۱۵]. اثبات شده است که تنش‌زاها یکی از عوامل القای آپوپتوز به وسیله JNK هستند که این تاثیر به وسیله فعالسازی خانواده BCL2 انجام می‌شود [۱۸-۱۶]. در این مطالعه با انجام تنش گرما در دماهای ٤۲ و ٤۵ درجه سانتیگراد در مدت زمان‌های ۱،۲،٤،۶،۸ و تنش اشعه (Xو۷) در مدت زمان‌های ۱،۲،۳،٤ مشخص شد که با افزایش مدت زمان تنش‌های مختلف در رده سرطانی MCF-7 کاهش زیستایی و همچنین افزایش میزان آنزیم JNK تام دیده می‌شود یا به بیان دیگر با افزایش مدت زمان تنش‌ها، مسیر آنزیم JNK از سمت بقای سلول سرطانی به سمت بازیابی مسیر آپوپتوزی تغییر پیدا می‌کند که این امر با یافته‌های موجود و همچنین با کاهش میزان زیستایی در طی انواع تنش‌ها همخوانی دارد. مسیر پیام رسانی JNK و عملکرد آن رابطه مستقیم با مدت زمان فعالسازی و فسفریلاسیون آن دارد. فعالیت JNK می‌تواند همسوی بقای سلولی و مسیر ضد آپوپتوزی باشد و یا در مسیر قدرتمند پیام‌رسانی آپوپتوزی قرار گیرد. فعالیت مداوم و ممتد JNK منجر به آپوپتوز می‌شود، در حالی که فعال شدن زودگذر و کوتاه مدت JNK در تکثیر سلولی و مسیر بقای سلولی درگیر است [۱۹،۲۰]. البته در اولین ساعت تمام تنش‌های واردشده، جهشی چشمگیر نسبت به نمونه شاهد دیده می‌شود که می‌توان اینگونه توضیح داد که سیستم سرطانی برای از بین بردن بهم ریختگی حاصل از تنش‌ها و جلوگیری از بازشدن مسیر آپوپتوز ابتدا میزان JNK را افزایش می‌دهد تا بقا را بالا ببرد ولی به دلیل زیاد بودن مدت زمان تنش‌ها و همچنین به دلیل سرکوبی مسیر بقا و تکثیر، مسیر آپوپتوز باز می‌شود و در ساعت‌های بعدی انجام تنش، آثار مقابله سیستم‌ها از بین می‌رود، در نتیجه میزان JNK متفاوت می‌شود و در مسیر آپوپتوز افزایش می‌یابد. بررسی فعالیت مسیرهای MAPK بوسیله شوک حرارتی برای اولین بار در فیبروبلاست پوست انسان بررسی شد. در این تست میزان آنزیم و ژن های خانواده MAPK به ویژه JNK پس از ۳۰ دقیقه تنش گرما در دمای ٤۳ درجه سانتیگراد به وسیله آزمون‌های وسترن بلات و آنتی‌بادی علیه اشکال فسفریله مورد بررسی قرار گرفت و نتایج حاصل افزایش میزان و فعال‌سازی قوی و سریع این خانواده به ویژه JNK را نشان داد. در تستی دیگر که بر روی سلول‌های U_{937} پس از ٤۰ دقیقه تنش در گرمای ٤٤ درجه سانتیگراد انجام شد، یک جهش در میزان غلظت JNK1 در سلول به وسیله روش وسترن بلات به دست آمده است. نتایج حاصل از تست های انجام شده بر روی سلول‌های MCF-7 مصداقی بر صحت آزمایش‌های انجام شده است [۲۱].

نتیجه گیری

در انتها با استناد بر نتایج به دست آمده از این آزمایش‌ها و همچنین یافته‌های قبلی می‌توان اینگونه بیان کرد که میزان آنزیم JNK در سلول‌های سرطانی در ابتدا به دلیل وجود میزان مشخصی از این پروتئین در سلول است که بر اثر افزایش تنش‌های واردشده بر سلول‌های MCF-7 و افزایش مدت زمان‌های انجام تنش‌ها میزان آنزیم افزایش یافته و راه اندازی مسیر آپوپتوزی را به دنبال دارد. پس

[Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-04-13]

شاید به توان با انجام آزمایش‌های بیشتر و استفاده از روش‌های سلولی مشابه، درمانی زود هنگام و درون سلولی را برای این بیماری یافت. اگرچه در بیوشیمی آنزیم ها، ملاک فعالیت آنزیم است نه غلظت آنزیم ولی با توجه به روش سنجش بکار رفته در این تحقیق که غلظت آنزیم بر اساس ng/ml اندازه‌گیری می شود و در اکثر مواقع حضور غلظت آنزیم مؤید فعالیت آن می‌باشد، مگر در شرایط خاصی که همسویی بین این دو پارامتر وجود ندارد و با عنایت به یافته های حاصله از کشت سلولی می توان به نتیجه کلی بدست آمده از این تحقیق استناد کرد و بیان نمود که میزان آنزیم در سلول‌های MCF-7 تحت تنش های آبیوتیک با افزایش زمان افزایش یافته و همراه با افزایش آپوپتوز بوده است.

تشکر و قدردانی

این مقاله تحقیقاتی حاصل بخشی از نتایج پایان نامه دوره کارشناسی ارشد زیست شناسی- سلولی و مولکولی خانم فرانک حسن پور در دانشگاه محقق اردبیلی می‌باشد. از حمایت دانشگاه محقق اردبیلی در انجام این پژوهش تشکر و قدردانی می‌شود.

References

1-Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2009. CA Cancer J Clin. 2009 Jul-Aug;59(4):225-49.

2-Melville S, Heycock L. Breast cancer: an overview. Pharmaceutical J. 2007 Sep;279:299-302.

3-Sakorafas GH, Krespis E, Pavlakis G. Risk estimation for breast cancer development;a clinical perspective. Surg Oncol.2002 May;10(4):183-92.

4-Mousavi SM, Montazeri A, Mohagheghi MA, Jarrahi A, Harirchi I, Najafi M, et al. Breast cancer in Iran:an epidemiological review. Breast J. 2007 Jul-Aug; 13(4): 383-91.

5-Behjati F, Atri M, Najmabadi H, Nouri K, Zamani M, Mehdipour P. Prognostic value of chromosome 1 and 8 copy number in invasive ductal breast carcinoma among Iranian women: an interphase FISH analysis. Pathol Oncolo Res. 2005 Sep;11(3): 157-63.

6-Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S. The protein kinase complement of the human genome. Science. 2002 Dec;298(5600):1912-34.

7-Nebreda AR, Porras A. p38 MAP kinases beyond the stress response. Trends Biochem Sci. 2000 Jun; 25(6): 257-60.

8-Rincón M , Davis RJ. Regulation of the immune response by stress-activated protein kinases. Immunol Rev. 2009 Mar; 228(1): 212-24.

9-Davis RJ. MAPKs: new JNK expands the group. Trends Biochem Sci. 1994 Nov;19(11), 470-73.

10-Theodosiou A, Ashworth A. MAP kinase phosphatases. Genome Biol. 2002 Jun; 3(7): Reviews3009.1-3009.10.

11-Cowan KJ, Storey KB. Mitogen-activated protein kinases: new signaling pathways functioning in cellular responses to environmental stress. J of Exp Biol. 2003 Apr; 206(pt7): 1107-15.

12-Davis RJ. Signal Transduction by the JNK group of MAP kinases. Cell. 2000 Oct; 103(2): 239-52.

13-Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics for Hispanics/Latinos, 2012. CA Cancer J Clin. 2012 Sep-Oct; 62(5): 283-98.

14-Dhanasekaran DN, Reddy EP. JNK signaling in apoptosis. Oncogene. 2008; 27(48): 6245-51.

15-Sui C, Zhuang C, Sun D, Yang L, Zhang L, Song L. Notch1 regulates the JNK signalin pathway and increases apoptosis in hepatocellular carcinoma. Oncotarget. 2017 Apr 26. doi: 10.18632/oncotarget.17434. [Epub ahead of print]

16-Cheng CY, Tang NY, Kao ST, Hsieh CL. Ferulic acid administered at various time points protects against cerebral infarction by activating p38 MAPK/p90 RSK/CREB/Bcl-2 anti apoptotic signaling in the subacute phase of cerebral ischemia/ reperfusion injury in Rats. Plos One. 2016 May; 11(5):e0155748.

[Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-04-13]

17-Guo C,Yang M, Jing LI,Wang J,Yu Y, Li Y, et al. Amorphous silica nanoparticles trigger vascular endothelial cell injury through apoptosis and autophagy via reactive oxygen species–mediated MAPK/Bcl2 and PI3K/AKt/mTOR signaling. Int J Nanomedicine. 2016 Oct; 11:5257-76.

18-Hui K, Yang Y, Shi K, Luo H, Duan J, An J, et al. The p38 MAPK– regulated PKP1/CREB/Bcl2 pathway contributes to selenite– induced colorectal cancer cell apoptosis in vitro and in vivo. Cancer Lett. 2014 Nov; 354(1):189-99

19-Sánchez I, Hughes RT, Mayer BJ, Yee K, Woodgett JR, Avruch J, et al. Role of SAPK/ERK kinase-1 in the stress-activated pathway regulating transcription factor c-Jun. Nature. 1994 Dec 22-29;372(6508):794-8.

20-Yang X, Khosravi-Far R, Chang HY, Baltimore D. A novel Fas-binding protein that activates JNK and apoptosis. Cell. 1997 June; 89(7): 1067-76.

21-Adler V, Schaffer A, Kim J, Dolan L, Ronai Z. UV Irradiation and heat shock mediate JNK activation via alternate pathways. J Bio Chem. 1995 Nov; 270(44): 26071–7.

[Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-04-13]