Research Article

Nova Biologica Reperta 10(1): 1-10 (2023)

Print ISSN: 2423-6330/Online ISSN: 2476-7115

https://nbr.khu.ac.ir; Kharazmi University Press; DOI: 10.29252/nbr.10.1.1

مقاله پژوهشی

یافته‌های نوین در علوم زیستی

جلد ۱۰، شماره ۱، صفحات ۱ الی ۱۰ (۱۴۰۲)

انتشارات دانشگاه خوارزمی

تاثیر دی‌کلرواستات به عنوان مهارکننده گلیکولیز روی القای آپوپتوز و تغییر بیان ژن و miRNA های مربوط به آن در سلول‌های سرطانی پستان MDA-MB-231

لیلا غلامی[۱]، فرنوش عطاری[۱]، محمود تلخابی[۲] و فاطمه سعادت‌پور[۳]

[۱] گروه علوم جانوری، دانشکده زیست شناسی، دانشکدگان علوم، دانشگاه تهران، تهران، ایران؛[۲] گروه علوم جانوری و زیست شناسی دریا، دانشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران؛[۳] گروه میکروبیولوژی، دانشکده زیست شناسی، دانشکدگان علوم، دانشگاه تهران، تهران، ایران

مسئول مکاتبات: فرنوش عطاری، attari@ut.ac.ir

چکیده. سرطان پستان شایع ترین سرطان و از مهم‌ترین دلایل مرگ و میر برای زنان در سراسر جهان است. نوع سه‌گانه منفی، تهاجمی‌ترین نوع سرطان پستان بوده و شیمی‌درمانی تنها گزینه درمانی برای آن است. سلول‌های سرطانی حتی درصورت برخورداری کافی از اکسیژن مسیر گلیکولیز را انتخاب می‌کنند و فعالیت این مسیر نقش مهمی در ایجاد سرطان ایفا می‌کند. درنتیجه هدف قرار دادن گلیکولیز می‌تواند استراتژی موثری برای از بین بردن سلول‌های سرطانی باشد. در مطالعه حاضر اثر مهارکننده گلیکولیز به نام دی‌کلرواستات (DCA) روی القای آپوپتوز در سلول‌های سرطان پستان سه‌گانه منفی به نام MDA-MB-231 سنجیده شده و بیان ژن‌های ضدآپوپتوزی و miRNAهای انکوژن نیز بررسی شده است. نتایج آزمون MTT نشان داد که این دارو به صورت وابسته به غلظت موجب کاهش بقای سلولی می‌شود به‌طوری‌که غلظت ۵۰ میلی‌مولار از این دارو بقای سلولی را تا ٪۵۰ کاهش می‌دهد. نتایج آزمون انکسین/PI نشان داد که تیمار سلول‌ها با DCA موجب افزایش ٪۳۲ سلول‌های آپوپتوزی نسبت به گروه کنترل می‌شود. نتایج آزمون چرخه سلولی نیز افزایش دوبرابری سلول‌ها در مرحله Sub-G1 در گروه تیمار نسبت به گروه کنترل را نشان داد. درنهایت کاهش بیان ژن‌های ضدآپوپتوزی Bcl2l1 و Mcl1 و همچنین کاهش بیان miR21 و miR27a به عنوان microRNAهای مهارکننده آپوپتوز در اثر تیمار با DCA مشاهده شد. نتایج ما نشان داد که DCA به عنوان مهارکننده گلیکولیز باعث کاهش تکثیر و القای آپوپتوز در سلول‌های سرطان پستان سه گانه منفی می‌شود که القای آپوپتوز از طریق کاهش بیان ژن‌های بقای سلولی و miRNAهای انکوژن صورت می‌گیرد.

واژه‌های کلیدی. انکوژن، بقای سلولی، چرخه سلول، سرطان سه گانه منفی، متاستاز

The effect of glycolysis inhibitor dichloroacetate on the apoptosis rate and alteration of gene and miRNA expression of breast cancer cells MDA-MB-231

Leila Gholami[1], Farnoosh Attari[1], Mahmood Talkhabi[2] & Fatemeh Saadatpour[3]

[1]Department of Animal Biology, School of Biology, College of Science, University of Tehran, Tehran, Iran; [2]Faculty of Biological Sciences and Technology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran; [3]Molecular Virology Lab, Department of Microbiology, School of Biology, College of Science, University of Tehran, Tehran, Iran

Correspondent author: Farnoosh Attari, attari@ut.ac.ir

Abstract. Breast cancer is the most common cause of death from cancer among women. The triple-negative breast cancer (TNBC) is the most invasive subtype, and chemotherapy is the only therapy option. Cancer cells preferably utilize the glycolysis pathway even with proper oxygen availability, and this activation plays a great role in tumorigenesis. Therefore, glycolysis targeting can be an effective strategy for cancer treatment. Here, the apoptotic effect of a glycolysis inhibitor named dichloroacetate (DCA) on TNBC cells MDA-MB-231 was assessed, and the expression of anti-apoptotic genes and oncogenic miRNAs was evaluated. MTT assay showed that DCA reduces cell viability in a dose-dependent manner with the IC50 concentration of 50 mM. Annexin/PI assay demonstrated that DCA

Received 08.02.2022/ Revised 07.01.2023/ Accepted 21.01.2023/ Published 20.06.2023

دریافت: ۱۴۰۱/۰۹/۱۷/ اصلاح: ۱۴۰۱/۱۰/۱۷/ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۱/۰۱/ انتشار: ۱۴۰۲/۰۳/۳۰

[Downloaded from isharat.khu.ac.ir on 2026-10-29]

[DOR: 20.1001.1.24236330.1402.10.1.1.4]

due to DCA treatment. Finally, the expression of anti-apoptotic genes Bcl2l1 and Mcl1 and oncogenic miRNAs miR21 and miR27a decreased due to DCA treatment. Our results confirmed that DCA, as a glycolysis inhibitor, leads to apoptosis induction in TNBC cells because of reducing expression of viability genes and miRNAs.

Key words. Cell cycle, Cell viability, Metastasis, Oncogene, Triple-negative cancer

مقدمه

سرطان پستان شایع ترین سرطان در میان زنان و از مهم‌ترین دلایل مرگ و میر برای زنان در سراسر جهان است (Hanachi et al., 2021; Kaboudan et al., 2021) از لحاظ بیان مولکولی حداقل سه زیررده سرطان پستان قابل شناسایی است. در نوع اول سلول‌های سرطانی واجد گیرنده‌های هورمونی مثل رسپتور استروژن (ER) و رسپتور پروژسترون (PR) هستند که این نوع حدود ٪۷۰ از سرطان‌های مربوط به پستان را شامل می‌شود. هورمون درمانی برای این نوع از سرطان پستان بسیار موثر خواهد بود. نوع دوم با عدم بیان ER و PR و افزایش بیان رسپتور EGF به نام HER2 شناخته می‌شود که درواقع سرطان $HER2^+$ است و درمان معمول آن با کمک آنتی‌بادی‌هایی بر علیه HER2 مثل هرسپتین صورت می‌گیرد. در نوع سوم به نام سرطان پستان سه‌گانه منفی سلول‌های سرطانی فاقد هر سه نوع رسپتور ER، PR و HER2 هستند و درنتیجه درمان‌هایی بر اساس هورمون و آنتی‌بادی برای این نوع سرطان کارساز نخواهد بود. نوع سه‌گانه منفی سرطان پستان درحدود ٪۲۰ سرطان‌های پستان را تشکیل داده که تهاجمی‌ترین نوع سرطان پستان و با پیش‌آگهی بسیار ضعیف می‌باشد. درحال حاضر شیمی‌درمانی تنها گزینه درمانی برای این نوع سرطان بوده که تنها در ٪۲۰ موارد موثر واقع می‌شود (Polyak, 2011). میدانیم که انرژی اصلی مورد نیاز سلولی از طریق فرایندی به نام فسفوریلاسیون اکسیداتیو به وجود می‌آید که در میتوکندری انجام گرفته و نیاز به اکسیژن دارد. راه دیگر تامین انرژی گلیکولیز است که بدون نیاز به اکسیژن صورت می‌گیرد. درواقع سلول‌های طبیعی وقتی در معرض اکسیژن کافی قرار بگیرند برای تولید ATP از مسیر فسفریلاسیون اکسیداتیو استفاده می‌کنند. اما مشخص شده که سلول‌های سرطانی حتی درصورت برخورداری کافی از اکسیژن مسیر گلیکولیز را انتخاب می‌کنند و فعالیت مداوم این مسیر نقش مهمی در ایجاد سرطان ایفا می‌کند (Jiang, 2017; Heiden et al., 2009). پس درواقع سلول‌های سرطانی برای تولید انرژی نیاز مبرمی به گلوکز خارج سلولی دارند. درنتیجه هدف قرار دادن گلیکولیز می‌تواند استراتژی موثری برای از بین بردن سلول‌های سرطانی باشد (Kruyt, 2008; Xintaropoulou et al., 2015). دی کلرواستات (DCA) یک کوچک مولکول است که در گذشته برای درمان اسیدوز و همچنین دیابت استفاده می‌شده است اما مطالعه‌ای در سال ۲۰۰۷ مشخص کرد که این ماده قادر به مهار گلیکولیز و القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی است (Bonnet et al., 2007). درواقع DCA با مهار آنزیم پیروات دهیدروژناز کیناز (PDK) باعث افزایش فعالیت پیروات دهیدروژناز (PDH) می‌شود که درنتیجه آن تحویل پیرووات به میتوکندری افزایش یافته و در ادامه کاهش پتانسیل غشای میتوکندری و رها شدن فاکتورهای پیش برنده آپوپتوز و القای آپوپتوز در سلول سرطانی دیده می‌شود. نکته جالب اینکه تاثیر این ماده روی سلول‌های غیرسرطانی بسیار کم می‌باشد (Skeberdytė et al., 2018; Tataranni & Piccoli, 2019). از سوی دیگر DCA با تحویل پیروات به سمت میتوکندری تولید لاکتات در سلول را کاهش داده که درنتیجه نرخ اسیدیته محیط تومور کم می‌شود که نقش مهمی در القای آپوپتوز و افزایش پاسخ به شیمی‌درمانی خواهد داشت (Tataranni & Piccoli, 2019). به‌طور مثال مطالعات پیشین نشان داده‌اند که DCA باعث فعال شدن کاسپاز ۳ و القای آپوپتوز در سلول‌های سرطان تخمدان می‌شود (Saed et al., 2011). همچنین تیمار سلول‌های سرطان پانکراس با DCA موجب کاهش تکثیر و مهاجرت سلولی و مهار تشکیل اسفروئیدهای سه بعدی شد (Tataranni et al., 2019). مطالعات دیگری اثر ترکیبی DCA با دیگر داروهای ضدسرطانی را روی سلول‌های سرطانی مختلف از جمله سرطان پستان مورد بررسی قرار داده‌اند. در مطالعه حاضر اثر DCA روی القای آپوپتوز در سلول‌های سه‌گانه منفی سرطان پستان انسان به نام MDA-MB-231 سنجیده شده است و بیان ژن‌های ضدآپوپتوزی مثل Bcl2l1 و Mcl1 و miRNAهای انکوژن مثل miR21 و miR27a مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

کشت سلول‌های سرطانی پستان رده MDA-MB-231

سلول‌های MDA-MB-231 به عنوان سلول‌های سرطان پستان انسان از نوع سه‌گانه منفی در محیط کشت RPMI-1640 غنی‌شده با ٪۱۰ سرم جنین گاو (FBS) و آنتی‌بیوتیک ٪۱ کشت شدند و برای رشد و تکثیر در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه و دی‌اکسید کربن ٪۵ نگهداری شدند.

[Downloaded from isharat.khu.ac.ir on 2026-10-29]

[DOR: 20.1001.1.24236330.1402.10.1.1.4]

بررسی بقای سلولی با استفاده از آزمون MTT

برای بررسی بقای سلولی در تیمارهای مختلف دارو، ابتدا تعداد $۵×۱۰^۳$ سلول در هر یک از چاهک‌های ظروف کشت ۹۶ خانه‌ای کشت شدند. پس از گذشت ۲۴ ساعت محیط رویی سلول‌ها خارج شده و محیط جدید حاوی غلظت‌های مختلف DCA به سلول‌ها اضافه شد به‌طوری‌که برای هر غلظت حداقل چهار تکرار درنظر گرفته شد. بعد از ۲۴ ساعت به محیط هر چاهک ۱۰ میکرولیتر از محلول MTT با غلظت میلی‌گرم در میلی‌لیتر افزوده شد و به مدت ۴ ساعت در انکوباتور و در شرایط تاریکی نگهداری شد. سپس محیط رویی چاهک‌ها خارج شده و از ۱۰۰ میکرولیتر DMSO برای حل شدن کریستال‌های نامحلول فورمازان استفاده شد. در نهایت خوانش میزان جذب توسط دستگاه الیزا در طول موج ۴۹۰ نانومتر انجام شد. برای تعیین درصد زنده‌مانی سلول‌ها از این فرمول استفاده شد:

درصد بقای سلولی= میزان جذب سلول‌های تیمارشده/میزان جذب سلول‌های کنترل× ۱۰۰

بررسی میزان آپوپتوز سلولی توسط آزمون انکسین/PI

برای بررسی میزان آپوپتوز تعداد $۳×۱۰^۵$ سلول MDA-MB-231 در ظرف کشت ۳ سانت کشت داده شدند. پس از ۲۴ ساعت با خارج کردن محیط قدیمی، محیط جدید حاوی DCA به سلول‌ها اضافه شد و برای ۲۴ ساعت تیمار صورت گرفت. سپس سلول‌ها از ظروف کشت توسط تریپسین جدا شده و در ۱۰۰ میکرولیتر محلول حاوی ۹۰ میکرولیتر بافر اتصال، ۵ میکرولیتر انکسین و ۵ میکرولیتر PI به مدت ۱۵ دقیقه قرار گرفتند و درنهایت خوانش توسط دستگاه فلوسایتومتری انجام شد.

بررسی محتوای DNA توسط آزمون چرخه سلولی

برای بررسی چرخه سلولی تعداد $۳×۱۰^۵$ سلول MDA-MB-231 در ظرف کشت ۳ سانت کشت داده شدند. پس از ۲۴ ساعت، با خارج کردن محیط قدیمی، محیط جدید حاوی DCA به سلول‌ها اضافه شد و برای ۲۴ ساعت تیمار صورت گرفت. سپس سلول‌ها از ظروف کشت جدا شده و پس از اضافه کردن ۵۰ میکرولیتر PBS سرد به رسوب سلولی، جهت تثبیت سلولی مقدار ۱ میلی‌لیتر اتانول ٪۷۰ به نمونه اضافه شد. سلول‌ها در محلول تثبیت بمدت ۲۴ ساعت در یخچال نگهداری شدند. رسوب سلولی پس از سانتریفیوژ با کمک PBS شستشو داده شد و با ۱ میلی‌لیتر از محلول اصلی PI که شامل ۴۰ میکرولیتر PI، ۱۰ میکرولیتر RNAse، و ۹۵۰ میکرولیتر PBS به مدت ۳۰ دقیقه تیمار شده و در نهایت خوانش توسط فلوسایتومتری انجام شد.

استخراج RNA، ساخت cDNA و واکنش Real-time PCR جهت سنجش بیان ژن و miRNA

برای استخراج RNA، رسوب سلولی با ۱ میلی‌لیتر از محلول RNX-Plus مخلوط شد سپس به آن ۲۵۰ میکرولیتر کلروفرم اضافه و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفت. سپس سانتریفیوژ با دور rpm ۱۲۰۰۰ در دمای ۴ درجه و به مدت ۲۰ دقیقه انجام شد. پس از آن محلول رویی جدا شده و هم حجم آن ایزوپروپانول سرد اضافه و به آرامی مخلوط شد (در این مرحله برای استخراج miRNA دو برابر حجم محلول جداشده اتانول ۱۰۰٪ به جای ایزوپروپانول اضافه شد) و یک شبانه روز در دمای۲۰- درجه قرار گرفت. بعد از سانتریفیوژ با دور rpm ۱۲۰۰۰ در دمای ۴ درجه و به مدت ۲۰ دقیقه، محلول رویی دور ریخته شد (برای استخراج miRNA سانتریفیوژ به مدت ۶۰ دقیقه انجام شد). شستشوی رسوب حاصل با ۱ میلی‌لیتر اتانول ۷۰٪ سرد و با کمک سانتریفیوژ در دمای ۴ درجه و دور rpm ۱۲۰۰۰ برای ۱۵ دقیقه انجام شد. پس از خشک شدن، رسوب در مقدار ۲۰ میکرولیتر آب RNAse-DNase free حل شد. برای ساخت cDNA مربوط به miRNAها، حدود ۱-۰/۱ میکروگرم از RNA تلخیص شده ، و ۱ میکرولیتر پرایمر snord و ۱ میکرولیتر پرایمر مربوط به miRNA استفاده شد و برای ساخت total cDNA، حدود ۵-۱ میکروگرم از RNA، ۱ میکرولیتر پرایمر و ۱۰ پیکومول رندوم هگزامر استفاده شد و حجم هر لوله توسط آب به ۱۰ میکرولیتر رسید. سپس واکنش به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۵ درجه درون ترموسایکر انجام گرفت (هنگام ساخت cDNA مربوط به miRNAها نیازی به انجام این مرحله نیست). سپس ۳ میکرولیتر بافر ۵X، ۱/۵ میکرولیتر dNTP و ۰/۵ میکرولیتر آنزیم RT اضافه و در ترموسایکلر طبق برنامه دمایی مندرج در کیت انجام شد. برای بررسی کمی بیان ژن‌ها و miRNAها از Real-time PCR استفاده شد. از ژن‌های Hprt و Snord به عنوان کنترل و برای نرمال کردن نتایج استفاده شد. جهت انجام واکنش از ۶/۵ میکرولیتر سایبر گرین، ۰/۵ میکرولیتر پرایمر مستقیم، ۰/۵ میکرولیتر پرایمر معکوس، ۱ میکرولیتر نمونه، و ۴/۵ میکرولیتر آب دیونیزه با حجم نهایی ۱۳ میکرولیتر استفاده شد و برنامه دمایی مربوط به سایبر گرین در دستگاه اعمال شد. در جدول ۱ توالی پرایمرهای سنجش ژن و در جدول ۲ توالی پرایمرهای سنجش miRNA آمده است.

آنالیز آماری

آنالیز آماری توسط نرم افزار Prism، با آزمون ANOVA یک طرفه و t-test انجام شد. $p<۰/۰۵$ به عنوان اختلاف معنی دار درنظرگرفته شده است و نتایج حاصل به صورت میانگین ± خطای استاندارد ارائه شدند.

[Downloaded from isharat.khu.ac.ir on 2026-10-29]

[DOR: 20.1001.1.24236330.1402.10.1.1.4]

جدول ۱- توالی پرایمرهای miRNA.
Table 1. Primer sequences of miRNAs.

Has-miR-27a	RT primer	GTC GTA TGC AGA GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CTG CAT ACG ACG CGG AA
	Forward primer	CCG TTC ACA GTG GCT AAG
Has-miR-21	RT primer	GTC GTA TGC AGA GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CTG CAT ACG ACT CAA CA
	Forward primer	CGC CGT AGC TTA TCA GAC T
Snord	RT primer	GTC GTA TGC AGA GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CTG CAT ACG ACA ACC TC
	Forward primer	ATC ACT GTA AAA CCG TTC CA
Common Reverse primer	GAG CAG GGT CCG AGG T	

جدول ۲- توالی پرایمرهای ژن‌های ضدآپوپتوزی.
Table 2. Primer sequences of anti-apoptotic genes.

Bcl2l1	Forward	TAA GGC GGA TTT GAA TCT C
	Reverse	ATA ATA GGG ATG GGC TCA AC
Mcl-1	Forward	AAC AAA GAG GCT GGG ATG
	Reverse	ATT GCA CTT ACA GTA AGG CTA TC
Hprt	Forward	CCT GGC GTC GTG ATT AGT G
	Reverse	TCA GTC CTG TCC ATA ATT ATG C

نتایج

بررسی بقای سلول‌های MDA-MB-231 در تیمار با DCA

به‌منظور بررسی اثر سمیت دارو روی سلول‌های سرطانی از آزمون MTT استفاده شد. این رنگ در سلول‌های زنده توسط آنزیم دهیدروژناز موجود در میتوکندری تبدیل به فورمازان بنفش رنگ می‌شود. درنتیجه میزان ایجاد رنگ بنفش نماینده درصد سلول‌های زنده خواهد بود. سلول‌های MDA-MB-231 با غلظت‌های مختلف DCA (۵۰۰، ۲۰۰، ۱۰۰ میکرومولار و ۱۰۰، ۷۵، ۵۰، ۲۵، ۱۰، ۵، ۱ میلی‌مولار) به مدت ۲۴ ساعت تیمار شدند. نتایج آزمون MTT نشان داد که این دارو به صورت وابسته به غلظت موجب کاهش بقای سلولی می‌شود به‌طوری‌که غلظت ۵۰ میلی‌مولار از این دارو بقای سلولی را تا ۵۰ درصد کاهش می‌دهد و در نتیجه این غلظت دارو به عنوان غلظت موثر IC50 درنظرگرفته شد (شکل A۱). همچنین سلول‌های تیمار شده در مقایسه با سلول‌های گروه کنترل ظاهری کوچک‌تر و جمع‌تر پیدا کرده‌اند (شکل B۱).

بررسی بقای سلول‌های MDA-MB-231 در تیمار با ترکیب DCA و پاکلیتاکسل

در این مرحله اثر داروی پاکلیتاکسل به عنوان یک داروی شیمی‌درمانی و همچنین اثر غلظت غیرموثر DCA در ترکیب با پاکلیتاکسل در غلظت‌های مختلف روی سلول‌ها بررسی شد. نتایج نشان دادکه سلول‌های MDA-MB-231 نسبت به داروی پاکلیتاکسل مقاومت نشان می‌دهند و همچنین در طی ۲۴ ساعت تیمار، ترکیب غلظت‌های غیرموثر DCA به همراه پاکلیتاکسل قادر به کاهش بقای سلولی تا ٪۵۰ نبود (شکل ۲).

سنجش میزان آپوپتوز در سلول‌های MDA-MB-231 تیمارشده با DCA توسط آزمون انکسین/PI

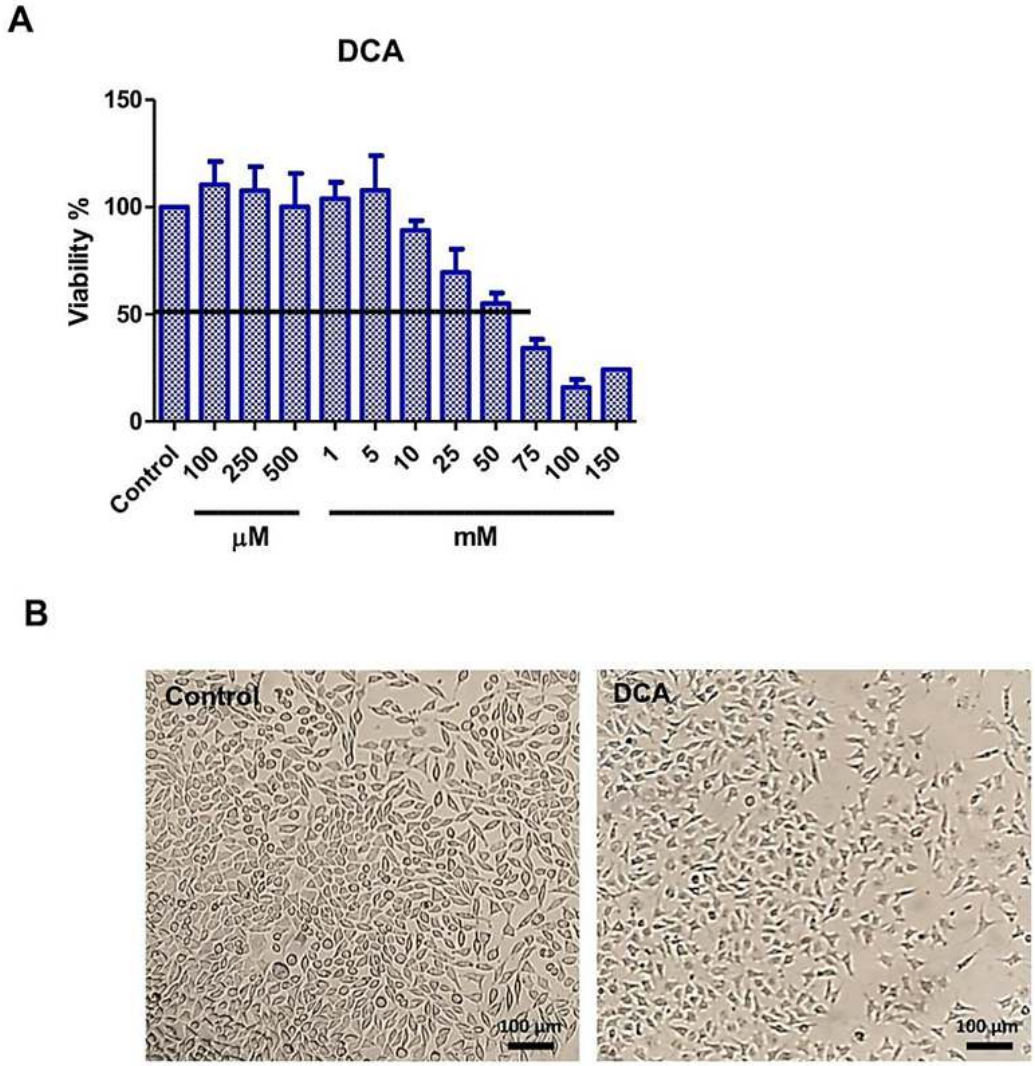
برای اینکه مشخص شود علت کاهش بقای سلولی که در اثر تیمار با DCA دیده شد به علت مهار تکثیر سلولی بوده و یا به خاطر القای آپوپتوز، از کیت سنجش انکسین/PI استفاده شد. در این آزمون سلول‌هایی که در مراحل اولیه آپوپتوز هستند انکسین مثبت، سلول‌های مراحل انتهایی آپوپتوز انکسین مثبت/PI مثبت، و سلول‌های نکروزی PI مثبت خواهند بود. نتایج این آزمون نشان داد که تیمار سلول‌ها با غلظت ۵۰ میلی‌مولار از DCA موجب افزایش ٪۳۲ سلول‌های آپوپتوزی نسبت به گروه کنترل می‌شود (شکل ۳).

[Downloaded from isharat.khu.ac.ir on 2026-10-29]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1402.10.1.1.4]

درنتیجه داروی DCA با القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی MDA-MB-231 اثر خود را اعمال می‌کند.

اثر DCA روی چرخه سلولی سلول‌های MDA-MB-231

به‌منظور تعیین اثر دارو روی مهار چرخه سلولی، محتوای DNA سلولی توسط رنگ‌آمیزی با رنگ فلورسنت PI و با کمک دستگاه فلوسایتومتری مورد بررسی قرار گرفت. همانطور که در شکل مشخص است درصد سلول‌های مرحله G1 در گروه تیمار افزایش معنی‌داری نسبت به گروه کنترل نشان نمی‌دهد و این مساله نشان می‌دهد که DCA در توقف چرخه سلولی نقشی ندارد. اما افزایش دوبرابری و معنی‌دار سلول‌ها در مرحله Sub-G1 در گروه تیمار نسبت به گروه کنترل قابل مشاهده است (شکل۴). هنگامی که آپوپتوز اتفاق می‌افتد DNA قطعه قطعه شده و این قطعات در وزیکول‌های کوچکی از سلول جدا می‌شوند. در نتیجه محتوای کروموزومی سلول‌های آپوپتوزی کمتر از سلول‌های عادی خواهد بود که در بررسی چرخه سلولی به صورت افزایش سلول‌ها در مرحله پیش از G1 نمود پیدا می‌کند. درواقع داده بررسی چرخه سلولی نتایج حاصل از آزمون انکسین/PI را تایید کرد و نشان داد که DCA موجب القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی می‌شود.

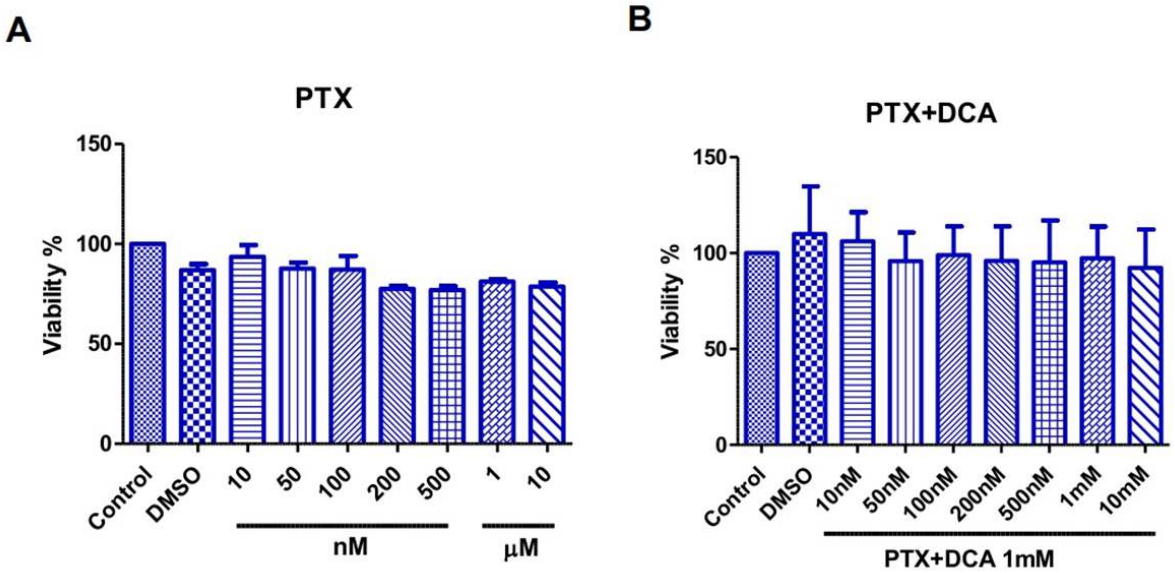


شکل ۱- A. درصد زنده‌مانی سلول‌های MDA-MB-231 پس از تیمار با غلظت‌های مختلف DCA. مقادیر ارائه شده در این آزمون معادل میانگین ± خطای استاندارد می‌باشند. **B**. ظاهر سلول‌های کنترل و سلول‌های تیمار شده با غلظت ۵۰ میلی‌مولار از DCA پس از ۲۴ ساعت. DCA: Dichloroacetate.

Figure 1. A. Viability of MDA-MB-231 cells treated with different concentrations of DCA. Data are presented as mean±SEM. **B.** Cell Morphology after 24 hours treatment with 50 mM of DCA. DCA: Dichloroacetate.

[Downloaded from isharat.khu.ac.ir on 2026-10-29]

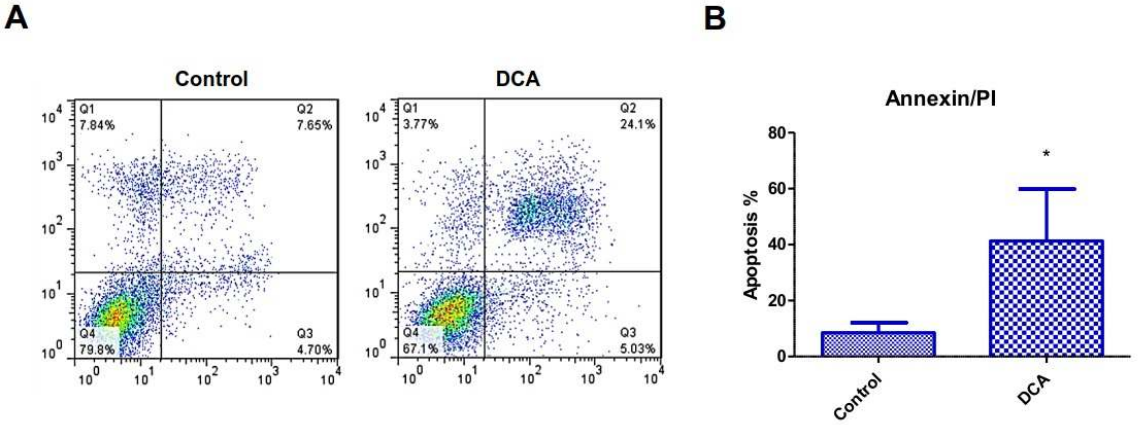
[DOR: 20.1001.1.24236330.1402.10.1.1.4]



شکل ۲- A. درصد زنده‌مانی سلول‌های MDA-MB-231 پس از تیمار با غلظت‌های مختلف پاکلیتاکسل. **B.** درصد زنده‌مانی سلول‌های MDA-MB-231 پس از تیمار با ترکیب غلظت غیرموثر DCA با پاکلیتاکسل. مقادیر ارائه شده در این آزمون معادل میانگین ± خطای استاندارد هستند. DCA: Dichloroacetate.

Figure 2. A. Viability of MDA-MB-231 cells treated with different concentrations of PTX. **B.** Viability of MDA-MB-231 cells treated with combination of PTX and ineffective concentration of DCA. Data are presented as mean±SEM. DCA: Dichloroacetate.

شکل ۳- A. هیستوگرام بدست آمده از آزمون انکسین/PI در سلول‌های کنترل و سلول‌های تیمارشده با غلظت ۵۰ میلی‌مولار از DCA. **B.** افزایش درصد

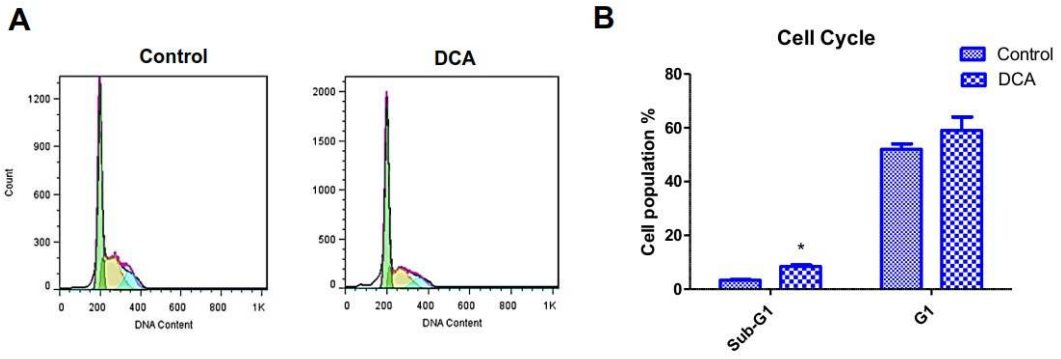


آپوپتوز در سلول‌های MDA-MB-231 تحت تیمار با DCA با غلظت ۵۰ میلی‌مولار نسبت به گروه کنترل. مقادیر ارائه شده در این آزمون معادل میانگین ± خطای استاندارد هستند (* P<۰/۰۵). DCA: Dichloroacetate.

Figure 3. A. Annexin/PI histogram of control cells and cells treated with 50 mM concentration of DCA. **B.** Apoptosis increase in DCA-treated cells compared to control cells. Data are presented as mean±SEM (*P<0.05). DCA: Dichloroacetate.

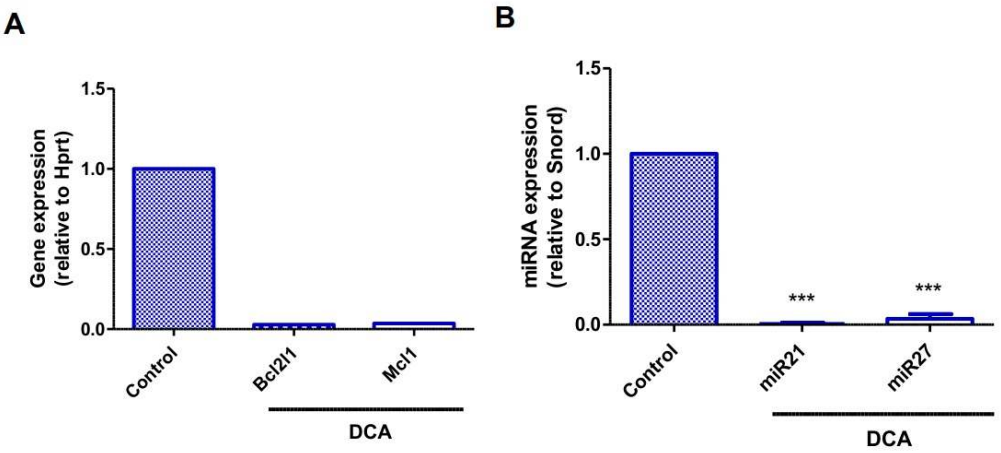
[Downloaded from isharat.khu.ac.ir on 2026-10-29]

[DOR: 20.1001.1.24236330.1402.10.1.1.4]



شکل ۴- A. هیستوگرام به‌دست آمده از بررسی چرخه سلولی در سلول‌های کنترل و سلول‌های تیمارشده با غلظت ۵۰ میلی‌مولار از DCA. **B**. افزایش درصد جمعیت Sub-G1 در سلول‌های MDA-MB-231 تحت تیمار با DCA با غلظت ۵۰ میلی‌مولار نسبت به گروه کنترل. مقادیر ارائه شده در این آزمون معادل mean±SEM هستند. (* P<۰/۰۵). DCA: Dichloroacetate.

Figure 4. A. Cell cycle histogram of control cells and cells treated with 50 mM concentration of DCA. **B.** increase of Sub-G1 phase in DCA-treated cells compared to control cells. Data are presented as mean±SEM (*P<0.05). DCA: Dichloroacetate.



شکل ۵- A. بررسی بیان ژن‌های مهارکننده آپوپتوز در سلول‌های کنترل و در سلول‌های تحت تیمار با DCA با غلظت ۵۰ میلی‌مولار. **B**. بررسی بیان miRNAهای مهارکننده آپوپتوز در سلول‌های کنترل و در سلول‌های تحت تیمار با DCA با غلظت ۵۰ میلی‌مولار. مقادیر ارائه شده در این آزمون معادل mean±SEM هستند (*** P<۰/۰۰۱). DCA: Dichloroacetate.

Figure 5. A. Expression analysis of anti-apoptotic genes in control and DCA-treated cells. **B.** Expression analysis of anti-apoptotic miRNAs in control and DCA-treated cells. Data are presented as mean±SEM (***P<0.001). DCA: Dichloroacetate.

تغییر بیان ژن‌ها و microRNAهای مهارکننده آپوپتوز توسط DCA

به‌منظور بررسی اثر DCA روی بیان ژن‌ها و microRNAهای مهارکننده آپوپتوز از روش ریل تایم PCR استفاده شد. در این آزمون میزان بیان ژن‌های Bcl2l1 و Mcl1 بررسی شد که هر دو ژن‌های مهارکننده آپوپتوز هستند و بیان آنها در سلول‌های سرطانی افزایش می‌یابد (شکل۵A). نتایج نشان داد که بیان هر دو ژن مهارکننده آپوپتوز در گروه تیمار نسبت به گروه کنترل کاهش یافته است. همچنین بیان miR21 و miR27a به عنوان microRNAهای مهارکننده آپوپتوز در اثر

[Downloaded from isharat.khu.ac.ir on 2026-10-29]

[DOR: 20.1001.1.24236330.1402.10.1.1.4]

تیمار با DCA کاهش معنی‌دار ٪۹۰ نسبت به گروه کنترل را نشان داد (شکل B۵).

بحث

سلول‌های سرطانی وابسته به فرایند گلیکولیز هستند و نسبت به دیگر سلول‌ها به میزان کمتری از فسفریلاسیون اکسیداتیو استفاده می‌کنند. درنتیجه هدف قرار دادن آنزیم‌های مسیرگلیکولیز می‌تواند روش موثری در جهت مهار تکثیر و گسترش سرطان بشمار رود. از این رو در این مطالعه به تاثیر دی کلرواستات (DCA) به عنوان مهارکننده آنزیم پیروات دهیدروژناز کیناز (PDK) روی سلول‌های سرطان پستان MDA-MB-231 پرداخته شده است. مطالعات قبلی نشان داده‌اند که DCA موجب کاهش پتانسیل و القای دپولاریزاسیون در غشای میتوکندری شده و میزان آپوپتوز در سلول‌های سرطانی را افزایش می‌دهد (Tataranni & Piccoli, 2019). درواقع DCA با فعال کردن غیرمستقیم آنزیم پیروات دهیدروژناز (PDH) و ورود پیروات به میتوکندری باعث تغییر مسیر گلیکولیز به سمت فسفریلاسیون اکسیداتیو در سلول‌های سرطانی می‌شود (Saed et al., 2011). در مطالعه حاضر نتایج سنجش بقای سلولی نشان داد که DCA بصورت وابسته به غلظت موجب کاهش زنده‌مانی سلول‌های MDA-MB-231 می‌شود، به‌طوری‌که غلظت ۵۰ میلی‌مولار از این ماده بقای سلولی را تا ۵۰ درصد کاهش می‌دهد. مطالعات قبلی نشان داده بود که DCA در ترکیب با تاموکسیفن قادر به کاهش معنی‌دار بقای سلول‌های سرطانی پستان به نام MCF7 (که واجد بیان رسپتور استروژن هستند) می‌شود و مقاومت دارویی در این سلول‌ها را کاهش می‌دهد. بنظر میرسد که تاثیر DCA روی این سلول‌ها به‌دلیل افزایش تجزیه پروتئوزئومی و کاهش بیان EGFR بوده است زیرا افزایش این رسپتور مقاومت دارویی را القا می‌کند. البته این ترکیب دارویی در سلول‌های MDA-MB-231 موثر واقع نشد (Woo et al., 2016). از آنجاییکه در برخی مطالعات اثر DCA در از بین بردن مقاومت دارویی اثبات شده بود برآن شدیم تا تاثیر این دارو در سلول‌های MDA-MB-231 که به داروی پاکلیتاکسل مقاومت نشان می‌دادند مورد سنجش قرار دهیم. در سال ۲۰۱۶ مشخص شد که DCA با اثر هم‌افزایی موجب افزایش حساسیت سلول‌های MDA-MB-231 به داروی دوکسوروبیسین و افزایش آپوپتوز در این سلول‌ها می‌شود (Wang et al., 2017). همچنین مطالعات نشان داده‌اند که مقاومت به داروی پاکلیتاکسل در سلول‌های سرطانی ریه به‌دلیل آسیب میتوکندری بوجود می‌آید و تیمار با DCA قادر است با مهار برداشت گلوکز به رفع این مقاومت دارویی کمک شایانی بکند (Zhou et al., 2015). هرچند که در مطالعه ما نتایج حاکی از آن بود که ترکیب غلظت غیرموثر DCA با داروی پاکلیتاکسل قادر به رفع مقاومت دارویی این سلول‌ها نسبت به داروی پاکلیتاکسل نیست. در مرحله بعد برای بررسی مکانیسم کاهش بقای سلولی در اثر تیمار با DCA از تست انکسین/PI و آنالیز چرخه سلولی کمک گرفته شد. نتایج بررسی چرخه سلولی نشان داد تیمار با DCA اثری بر القای توقف چرخه سلولی ندارد ولی میزان جمعیت سلول‌های مرحله Sub-G1 بطرز معنی‌داری نسبت به گروه کنترل افزایش نشان داد. افزایش جمعیت سلولی در مرحله Sub-G1 نشان دهنده شکسته شدن DNA و القای آپوپتوز سلولی است که آزمون انکسین/PI نیز افزایش ۳۲ درصدی سلول‌های آپوپتوزی در گروه تیمارشده با DCA را تایید کرد. در همین راستا مطالعات پیشین افزایش ۲۰ درصدی میزان آپوپتوز در سلول‌های گلیوبلاستومای تیمار شده با DCA را نشان داده است که مشخص شد این القای آپوپتوز از طریق فعالیت مسیر میتوکندریایی، توقف چرخه سلولی در مرحله S و کاهش بیان پروتئین HSP70 صورت گرفته است (Duan et al., 2013). همچنین مطالعه روی سلول‌های سرطانی کولون مشخص کرد که DCA با مهار عملکرد آنزیم PDK و فعال کردن PDH باعث تحریک تنفس میتوکندریایی می‌شود که درنتیجه غشای داخلی میتوکندری دپولاریزه شده و نهایتا القای آپوپتوز از طریق مسیر میتوکندریایی اتفاق می‌افتد (Madhok et al., 2010). در مطالعه حاضر بعد از مشخص شدن اثر آپوپتوزی DCA روی سلول‌های MDA-MB-231، بیان ژن‌ها و microRNA های دخیل در آپوپتوز مورد بررسی قرار گرفت. در این راستا کاهش بیان ژنBcl2l1 به عنوان ژن مهارکننده آپوپتوز بعد از تیمار با DCA مشاهده شد. در تایید این مطلب در مطالعات قبلی کاهش بیان این ژن در چهار رده سلولی سرطان میلوئید پس از تیمار با DCA به اثبات رسیده است (Abrameket al., 2019). همچنین در مطالعه ما مشخص شد که تیمار با DCA باعث کاهش بیان فاکتور ضدآپوپتوزی دیگری مثل Mcl1 می‌شود که در همین راستا قبلا مشخص شده است که استفاده از DCA باعث افزایش تجزیه پروتئوزومی Mcl1 و درنتیجه کاهش میزان Mcl1 در سلول‌های سرطان کولورکتال می‌شود (Delaney et al., 2015). همچنین دیده شده که ترکیب DCA و داروی متفورمین باعث کاهش بیان ژن Mcl1 و درنتیجه القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی لوکمیا می‌شود (Voltan et al., 2016). داروهایی که قادر به مهار پروتئین‌های Bcl2l1 و Mcl1 هستند کارایی بالایی برای القای آپوپتوز و درمان سرطان دارند. نتایج این مطالعه مشخص کرده بود که تیمار سلول‌های سرطانی با DCA کاهش بیان سریع ژن Mcl1 و Akt و درنتیجه شروع آپوپتوز را به دنبال دارد. در واقع سلول‌های سرطانی با ایجاد اختلال در مسیر داخلی آپوپتوز و با افزایش بیان Bcl2 و Mcl1 از آپوپتوز فرار می‌کنند و درنتیجه هدف

[Downloaded from isharat.khu.ac.ir on 2026-10-29]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1402.10.1.1.4]

قرار دادن پروتئین‌های خانواده Bcl2 با مهارکننده‌هایی از جمله navitoclax و venetoclax که با تمایل بالا به Bcl2 و Bcl2l1 متصل می‌شوند در کارآزمایی‌های بالینی موثر بوده است. البته هیچ کدام از این دو ترکیب توانایی ومهار Mcl1 را ندارند که همین موضوع منجر به ایجاد مقاومت دارویی در بسیاری از سرطان‌ها می‌شود. درنتیجه مهار بیان Mcl1 در القای مرگ سلولی و مهار پیشرفت تومور بسیار کمک کننده است (Voltan et al., 2016). از سوی دیگر در مطالعه ما سنجش بیان micRNAهای انکوژن مثل miR21 و miR27a در سلول‌های تیمار شده با DCA حاکی از کاهش معنی‌دار بیان این miRNAها در مقایسه با گروه کنترل بود. در مطالعه‌ای نشان داده شده بود که سلول‌های هپاتوسیت بیان بالای miR21 را دارند و DCA با مهار بیان این miRNA به همراه مهار ژن NFkB منجر به القای مرگ سلولی و آپوپتوز در این سلول‌ها می‌شود (Rodrigues et al., 2015). همچنین مشخص شده که در سلول‌های سرطان پستان انسان مانند MDA-MB-231 متفورمین به عنوان مهارکننده گلیکولیز باعث کاهش بیان miR21 و مهارتکثیر سلولی می‌شود (Sharma & Kumar, 2018). همچنین تیمار سلول‌های سرطانی پستان MCF7 با متفورمین باعث کاهش بیان miR27a و کاسپاز ۳ و القای آپوپتوز و مهار رشد این سلول‌ها شد (Zhao et al., 2016). نکته اینکه miR21 و miR27a به عنوان عوامل اصلی در ویژگی متاستازی سلول‌های MDA-MB-231 به حساب می‌روند و هدفگیری این miRNAها استراتژی مناسبی جهت درمان این نوع از سرطان پستان که قدرت تهاجمی بالایی دارد به حساب می‌رود. به عنوان نتیجه‌گیری نتایج ما نشان داد که DCA به عنوان مهارکننده گلیکولیز باعث کاهش تکثیر سلول‌های سرطان پستان سه گانه منفی می‌شود که این کاهش تکثیر بیشتر متاثر از القای آپوپتوز در این سلول‌ها بوده و توقف چرخه سلولی نقشی در آن ندارد. همچنین کاهش بیان ژن‌های بقای سلولی مثل Bcl2l1 و Mcl1 و کاهش بیان miRNAهای انکوژن مثل miR21 و miR27a در القای آپوپتوز و کاهش تکثیر این نوع سرطان نقش بسزایی داشته و استراتژی مناسبی جهت درمان سرطان سه گانه منفی با قدرت متاستازی بالا به حساب خواهد رفت.

سپاسگزاری

بدینوسیله از حمایت مالی دانشگاه تهران در انجام این تحقیق قدردانی می‌نماییم.

REFERENCES

Abramek, J., Bogucki, J., Ziaja-Soltys, M., Stepniewski, A. & Bogucka-Kocka, A. 2019. Effect of sodium dichloroacetate on apoptotic gene expression in human leukemia cell lines. Pharmacological Reports 71: 248-256.

Bonnet, S., Archer, S.L., Allalunis-Turner, J., Haromy, A., Beaulieu, C., Thompson, R., Lee, C. T., Lopaschuk, G. D., Puttagunta, L. & Bonnet, S. 2007. A mitochondria-K+ channel axis is suppressed in cancer and its normalization promotes apoptosis and inhibits cancer growth. Cancer Cell 11: 37-51.

Delaney, L. M., Ho, N., Morrison, J., Farias, N.R., Mosser, D.D. & Coomber, B.L. 2015. Dichloroacetate affects proliferation but not survival of human colorectal cancer cells. Apoptosis 20: 63-74.

Duan, Y., Zhao, X., Ren, W., Wang, X., Yu, K.F., Li, D., Zhang, X. & Zhang, Q. 2013. Antitumor activity of dichloroacetate on C6 glioma cell: in vitro and in vivo evaluation. OncoTargets and Therapy 6: 189-198.

Hanachi, P., Ghorbani, N., Sadeghi Ali Abadi, H. & Zarringhalami, R. 2021. Evaluation of antioxidant and anticancer effects of Lavandula angustifolia and Melissa officinalis on HeLa, OVCAR-3 and MCF-7 cancer cell lines. Nova Bioloica Reperta 8: 20-30. (In Persian).

Jiang, B. 2017. Aerobic glycolysis and high level of lactate in cancer metabolism and microenvironment. Genes & Diseases 4: 25-27.

Kaboudan, F., Talesh Sasani,S. & Asghari, S.A. 2021. The effect of a VEGFB antagonist peptide on miR-210 expression level in breast cancer in a mouse model. Nova Biologica Reperta 8: 13-19. (In Persian).

Kruyt, F. A. 2008 .TRAIL and cancer therapy. Cancer Letters 263: 14-25.

Madhok, B.M., Yeluri, S., Perry, S.L., Hughes, T.A., & Jayne, D.G. 2010. Dichloroacetate induces apoptosis and cell-cycle arrest in colorectal cancer cells. British Journal of Cancer 102: 1746-1752.

Polyak, K. 2011. Heterogeneity in breast cancer. Journal of Clinical Investigation 121: 3786-3788.

Rodrigues, P.M., Afonso, M.B., Simao, A.L., Borralho, P.M., Rodrigues, C.M.P. & Castro, R.E. 2015. Inhibition of NF-kappaB by deoxycholic acid induces miR-21/PDCD4-dependent hepatocellular apoptosis. Scientific Reports 5: 17528.

Saed, G.M., Fletcher, N.M., Jiang, Z.L., Abu-Soud, H.M., & Diamond, M.P. 2011. Dichloroacetate induces apoptosis of epithelial ovarian cancer cells through a mechanism involving modulation of oxidative stress. Reproductive Sciences 18: 1253-1261.

Sharma, P. & Kumar, S. 2018. Metformin inhibits human breast cancer cell growth by promoting apoptosis via a ROS-independent pathway involving mitochondrial dysfunction: pivotal role of superoxide dismutase (SOD). Cellular Oncology 41: 637-650.

Skeberdytė, A., Sarapinienė, I., Aleksander-Krasko, J., Stankevičius, V., Sužiedėlis, K. & Jarmalaitė, S. 2018. Dichloroacetate and salinomycin exert a synergistic cytotoxic effect in colorectal cancer cell lines. Scientific Reports 8: 1-13.

[Downloaded from isharat.khu.ac.ir on 2026-10-29]

[DOR: 20.1001.1.24236330.1402.10.1.1.4]

Tataranni, T., Agriesti, F., Pacelli, C., Ruggieri, V., Laurenzana, I., Mazzoccoli, C., Sala, G. D., Panebianco, C., Pazienza, V., Capitanio, N. & Piccoli, C. 2019. Dichloroacetate Affects Mitochondrial Function and Stemness-Associated Properties in Pancreatic Cancer Cell Lines. Cells 8: 1-23.

Tataranni, T. & Piccoli, C. 2019. Dichloroacetate (DCA) and cancer: an overview towards clinical applications. Oxidative Medicine and Cellular Longevity 14: 1-14.

Vander Heiden, M.G., Cantley, L.C. & Thompson, C.B. 2009. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. Science 324: 1029-1033.

Voltan, R., Rimondi, E., Melloni, E., Gilli, P., Bertolasi, V., Casciano, F., Rigolin, G. M., Zauli, G. & Secchiero, P. 2016. Metformin combined with sodium dichloroacetate promotes B leukemic cell death by suppressing anti-apoptotic protein Mcl-1. Oncotarget 7: 18965-18977.

Wang, M., Liao, C., Hu, Y., Qinwen, P. & Jiang, J. 2017. Sensitization of breast cancer cells to paclitaxel by dichloroacetate through inhibiting autophagy. Biochemical and Biophysical Research Communications 489: 103-108.

Woo, S. H., Seo, S. K., Park, Y., Kim, E. K., Seong, M.K., Kim, H.A., Song, J. Y., Hwang, S. G., Lee, J. K., Noh, W. C., & Park, I. C. 2016. Dichloroacetate potentiates tamoxifen-induced cell death in breast cancer cells via downregulation of the epidermal growth factor receptor. Oncotarget 7: 59809-59819.

Xintaropoulou, C., Ward, C., Wise, A., Marston, H., Turnbull, A. & Langdon, S.P. 2015. A comparative analysis of inhibitors of the glycolysis pathway in breast and ovarian cancer cell line models. Oncotarget 6: 25677-25695.

Zhao, W., Zhang, X., Liu, J., Sun, B., Tang, H. & Zhang, H. 2016. miR-27a-mediated antiproliferative effects of metformin on the breast cancer cell line MCF-7. Oncology Reports 36: 3691-3699.

Zhou, X., Chen, R., Yu, Z., Li, R., Li, J., Zhao, X., Song, S., Liu, J. & Huang, G. 2015. Dichloroacetate restores drug sensitivity in paclitaxel-resistant cells by inducing citric acid accumulation. Molecular Cancer 14: 1-12.

*****

How to cite this article:

Gholami, L., Attari, F., Mahmood, T. & Saadatpour, F. 2023. The effect of glycolysis inhibitor dichloroacetate on the apoptosis rate and alteration of gene and miRNA expression of breast cancer cells MDA-MB-231. Nova Biologica Reperta 10: 1-10. (In Persian).

غلامی، ل.، عطاری، ف.، تلخابی، م. و سعادت‌پور، ف. ۱۴۰۲. تاثیر دی‌کلرواستات به عنوان مهارکننده گلیکولیز روی القای آپوپتوز و تغییر بیان ژن و miRNA های مربوط به آن در سلول‌های سرطانی پستان MDA-MB-231. یافته‌های نوین در علوم زیستی ۱۰: ۱۰-۱.

[Downloaded from isharat.khu.ac.ir on 2026-10-29]

[DOR: 20.1001.1.24236330.1402.10.1.1.4]