

مهار رشد و تکثیر سلول‌های سرطانی معده توسط جنیستین از طریق مطالعه p38MAPK

دکتر ایرج خدادادی^۱، ندا قاسم خانی^۲، دکتر غلامرضا شفیعی^۳

نویسنده‌ی مسئول: دکتر ایرج خدادادی، گروه بیوشیمی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران khodadadi@umsha.ac.ir
دریافت: ۹۶/۴/۱۷ پذیرش: ۹۶/۷/۱۱

چکیده

زمینه و هدف: شواهد قابل قبولی از اثربخشی ترکیبات مشتق از گیاهان دارویی در درمان سرطان‌ها در دست است اما مکانیسم عمل این ترکیبات چندان مشخص نیست و افزایش سطح آنزیم‌های MAPKs (Mitogen activated protein kinases) در سرطان‌های مختلفی نیز گزارش شده است، هدف از این مطالعه بررسی اثرات جنیستین به عنوان ایزوفلاون مهم سویا بر مهار بقا و تکثیر سلولی بر روی رده سلولی AGS سرطان معده از طریق سنجش میزان بیان ژن و پروتئین p38MAPK بود.

روش بررسی: میزان بقای سلولی با روش MTT در غلظت‌های مختلف صفر، ۵۰، ۷۰ و ۹۰ میکرومولار جنیستین و زمان ۲۴ ساعت بر روی رده‌ی سلولی AGS مورد ارزیابی قرار گرفت. میزان بیان ژن p38MAPK با استفاده از تکنیک qRT-PCR و میزان پروتئین فرم فسفریله آن (p-p38MAPK) به روش فلوسیتومتری سنجیده شد.

یافته‌ها: جنیستین به‌طور معناداری بقای سلولی را به صورت وابسته به غلظت و زمان کاهش داد. پس از ۲۴ ساعت تیمار سلول‌ها با غلظت‌های ۵۰، ۷۰ و ۹۰ میکرومولار جنیستین، بیان ژن p38MAPK به ترتیب ۸۳، ۵۶ و ۵۷ درصد و تکثیر سلولی به ترتیب ۳۵، ۵۲ و ۶۷ درصد در مقایسه با کنترل کاهش یافت. همچنین کاهش معناداری در میزان پروتئین p-p38MAPK در سلول‌های تیمار شده نسبت به گروه کنترل مشاهده گردید.

نتیجه‌گیری: از آنجا که جنیستین در غلظت‌های مختلف سبب کاهش بیان p38MAPK و کاهش تکثیر سلول‌های AGS سرطان معده می‌شود، شاید بتوان جنیستین را به عنوان ترکیب گیاهی مناسبی برای روش‌های درمانی تکمیلی سرطان معده پیشنهاد نمود.

واژگان کلیدی: آپوپتوز، بیان ژن، پروليفراسیون، جنیستین، نئوپلاسم معده، p38 mitogen-activated protein kinase

مقدمه

سرطان اصطلاحی است که در مورد بیماری‌های بدخیم به کار رفته و توسط تکثیر سریع و کنترل نشده و غیرطبیعی سلول‌ها مشخص می‌گردد. علت بروز سرطان، جهش‌های ژنی و اختلالات مسیرها و چرخه‌های بیوشیمیایی است که اغلب رشد و تکثیر سلول‌ها را کنترل می‌کنند (۱). سرطان معده چهارمین سرطان شایع و دومین علت مرگ ناشی از سرطان

۱- دکترای تخصصی بیوشیمی، دانشیار گروه بیوشیمی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان

۲- کارشناس ارشد گروه بیوشیمی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان

۳- دکترای تخصصی بیوشیمی، استادیار گروه بیوشیمی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان

فیتوکمیکال‌های غذایی است که ممکن است اثرات پیشگیرانه یا قابلیت درمانی داشته باشند (۱۲). علاوه بر این به دلیل مقاومت سلول‌های سرطانی به داروهای شیمیایی رایج از یک سو و عدم رغبت بیماران به شیمی درمانی از سوی دیگر، امروزه محققین به دنبال یافتن روش‌های درمانی جدیدی می‌باشند که جزئی از جیره غذایی روزانه بوده و مصرف آن از سوی بیماران مورد پذیرش بیشتری واقع شود و بتواند در مراحل اولیه‌ی سرطان از رشد و پیشرفت آن جلوگیری نماید تا بتوان از طریق به کارگیری روش‌های درمانی ترکیبی (شیمیایی و فیتوکمیکال‌های غذایی) کمک شایانی در جهت درمان موثرتر انجام داد. امروزه ترکیبات گیاهی فراوانی با اثرات بیولوژیک مختلف جداسازی شده‌اند که در درمان سرطان‌های مختلف موثرند. یکی از مهم‌ترین ترکیبات حاصل از گیاهان دارویی، جنیستین است که از جمله ایزوفلاون‌های مهم موجود در خانواده‌ی سویا می‌باشد. برخی از مطالعات نشان داده‌اند که جنیستین منجر به مهار مولکول‌های مسیر MAPK می‌شود. به‌عنوان مثال جنیستین منجر به مهار فسفریلاسیون p38MAPK می‌گردد که از این طریق منجر به غیرفعال شدن مسیر سیگنالینگ MAPK می‌شود (۱۳). با وجود اینکه این مسیر اغلب در وقوع و پیشرفت سرطان درگیر می‌شود و خیلی از مطالعات نیز در پی یافتن ارتباط بین مسیر MAPK و مهاجرت و تمایز بوده‌اند، اما مطالعات کمی در مورد نقش این مسیر در سرطان معده انجام شده است. بنابراین توسعه‌ی روش‌های درمانی جدید نیازمند درک بهتر از هدف‌های درمانی درگیر در عملکردهای مختلف p38MAPK و تعیین نقش آنها در فرایندهای توموری است (۹). بر این اساس و با توجه به نقش احتمالی مسیر MAPK، در مطالعه‌ی حاضر تاثیر جنیستین به عنوان یکی از اصلی‌ترین ترکیبات سویا بر روی رشد و بقای سلول‌های سرطانی AGS معده مورد بررسی قرار گرفته و میزان بیان ژن p38MAPK و همچنین میزان بیان پروتئین فسفریله فعال آن

در جهان است (۲). این نوع سرطان در ایران اولین سرطان شایع در مردان بوده و در زنان بعد از سرطان سینه دومین سرطان شایع است و میزان مرگ‌ومیر آن به طور قابل توجهی بالاتر از سایر سرطان‌ها است (۳). یکی از مسیرهای درگیر در سرطان‌ها مسیرهای سیگنالینگ پروتئین کینازهای میتوژنی MAPKs است. ژن‌های MAPK در تمامی سلول‌ها بیان می‌شوند و مسئول تنظیم فرآیندهای متنوعی نظیر رشد و تکثیر سلولی، متابولیسم، تمایز و مرگ سلولی و التهاب هستند. مسیر MAPK که عمدتاً در پاسخ به محرک‌های خارج سلولی تحریک می‌شود شامل سه کیناز است که در نهایت باعث فعال شدن MAPK می‌گردند (۴). پروتئین‌های MAPK در جانوران شامل چهارگروه اصلی یعنی ERK1/2، ERK5، JNK1/2/3 و p38MAPKs ($\alpha/\beta/\gamma/\delta$) می‌باشد (۵). خانواده‌ی MAPKs از کینازهای سرین-ترئونین می‌باشند که به واسطه‌ی استرس و یا اتصال فاکتورهای خارج سلولی مختلف سبب ایجاد مسیرهای سیگنالی متعددی می‌گردند (۶). مسیر p38MAPK در بسیاری از سرطان‌ها فعال است. مطابق با گزارش‌های موجود از بین رفتن تنظیم p38MAPK در بیماران با تومورهای جامد از جمله پروستات، سینه، مثانه، کبد، ریه با پیشرفت بیماری در مراحل پیشرفته و کاهش میزان بقا مرتبط است (۷). بسیاری از مطالعات افزایش سطح p38MAPK فسفریله در سلول‌های توموری از جمله در سلول‌های ریه و سینه را نشان داده‌اند (۸)، علاوه بر این مطالعات اخیر به طور قوی نشان داده‌اند که مسیرهای p38MAPK در مقاومت به درمان‌های شیمیایی نقش دارد (۹). با وجود اینکه مدت زیادی از شناسایی سرطان معده می‌گذرد اما این نوع سرطان هنوز پاسخ مناسبی به روش‌های شیمی درمانی نشان نداده (۱۰) و بیشتر پاسخ‌ها به شیمی درمانی نیز جزئی و کوتاه مدت بوده است (۱۱). از این رو مطالعات اخیر بر روی درمان‌هایی با حداقل سمیت تمرکز کرده‌اند که شامل تمرکز بر

(p-p38MAPK) در سلول‌هایی که تحت تیمار با جنیستین بودند نیز مورد سنجش قرار گرفت.

روش بررسی

این مطالعه از نوع مطالعات تجربی (Experimental) است که با استفاده از رده‌ی سلولی انسانی سرطان معده (AGS) انجام گرفت. به‌منظور کاهش خطای تجربی، کلیه‌ی آزمایش‌ها به‌صورت سه بار تکرار (Experimental Triplicate) انجام شد. همچنین با توجه به نوع مطالعه، امکان در نظر گرفتن معیارهای ورود و خروج خاصی برای مطالعه میسر نبود. جنیستین از شرکت سیگما (Sigma Aldrich Ltd., UK) خریداری و در یک میلی‌لیتر دی‌متیل سولفوکسید (DMSO) حل شد و با توجه به غلظت‌های مورد استفاده در مطالعه کوی و همکاران (۱۴) و مطالعه‌ی چوی و همکاران (۱۵) در این مطالعه نیز غلظت‌های صفر تا ۱۰۰ میکرومولار مورد بررسی اولیه واقع و غلظت مطلوب با مناسب‌ترین اثربخشی و سمیت کمتر برای ادامه‌ی آزمون‌ها انتخاب گردید. کشت سلولی: رده‌ی سلولی انسانی سرطان معده (AGS) از انستیتو پاستور ایران (ایران، تهران) خریداری و در محیط کشت RPMI-1640 حاوی ۱۰ درصد FBS و ۱۰۰ واحد بر میلی‌لیتر پنی‌سیلین و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر استروپتومایسین در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد در انکوباتور تحت فشار گاز ۵٪ CO₂ درصد کشت داده شد. سلول‌های کشت داده با غلظت‌های مختلفی (۰ تا ۱۰۰ میکرومولار) از جنیستین (Sigma Aldrich Ltd., UK) و طی زمان‌های متفاوت تیمار شدند تا میزان تکثیر سلولی و مقدار IC₅₀ با تکنیک MTT تعیین گردد. سپس سلول‌های AGS برای تعیین اثر جنیستین بر میزان بیان ژن p38MAPK با استفاده از روش qRT-PCR و تعیین میزان پروتئین p-p38MAPK با استفاده از فلوسیتومتری با سه غلظت تحت تیمار قرار گرفتند.

بررسی اثر جنیستین بر بقای سلولی با تکنیک MTT:

این تست که به دلیل استفاده از ترکیب دی‌متیل تیازول-۲ و ۵ دی‌فنیل تترازولیوم برومید به MTT معروف است، روش رنگ سنجی بر اساس احیا شدن و شکسته شدن کریستال‌های زرد رنگ تترازولیوم است. به‌طور خلاصه تعداد ۵۰۰۰ سلول AGS با غلظت‌های صفر (کنترل)، ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۶۰، ۷۰، ۸۰، ۹۰ و ۱۰۰ میکرومولار جنیستین کشت داده شده و به مدت ۱۲، ۲۴، و ۴۸ ساعت انکوبه شدند. بعد از اتمام زمان انکوباسیون مقدار ۱۰ میکرولیتر از محلول MTT (۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) به سلول‌ها اضافه شد و پس از افزودن ۱۰۰ میکرولیتر DMSO جذب نوری در طول موج ۵۷۰ نانومتر توسط دستگاه الایزا ریدر مدل Sunrise (Sunrise, Tecan Switzerland) قرائت شد. میزان سیتوتوکسیکیتی و بقای سلول‌ها در هر نمونه با نمونه کنترل مقایسه شد و غلظتی که در آن جنیستین منجر به کاهش ۵۰ درصدی بقای سلولی شد به عنوان IC₅₀ انتخاب گردید. درصد سلول‌های زنده از فرمول زیر محاسبه شد:

$$\text{درصد سلول های زنده} = \frac{100 \times OD_{\text{Test}}}{OD_{\text{Control}}}$$

و IC₅₀ از رسم نمودار درصد سلول‌های زنده بر حسب غلظت جنیستین و محاسبه شیب نمودار به‌دست آمد.

بررسی اثر جنیستین بر میزان بیان ژن p38MAPK با تکنیک Real-time PCR: برای تعیین تاثیر جنیستین بر تکثیر و رشد سلولی تغییرات بیان ژن p38MAPK توسط تکنیک Real time PCR اندازه‌گیری شد. به‌طور خلاصه ابتدا سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت با غلظت‌های صفر (کنترل)، ۵۰، ۷۰ و ۹۰ میکرومولار جنیستین به مدت ۲۴ ساعت تحت تیمار قرار گرفتند. سپس توتال RNA طبق پروتکل کیت سیناژن (سیناژن-تهران، ایران) استخراج شد و خلوص و غلظت آن توسط نانودراپ (Biotech Tak3 Eptothec, Winooski-USA) تعیین گردید. پرایمرهای Forward و

موجود در سایت www.ncbi.nlm.nih.gov طراحی شد (جدول ۱).

Reverse توسط نرم افزار Allele ID6 برای ژن p38MAPK و ژن 18S-rRNA به عنوان ژن رفرنس بر اساس توالی ژنی

جدول ۱: ویژگی های پرایمرهای مورد استفاده

Gene	Accession number	Primer sequences	طول پرایمر (nt)	Tm (°C)	Product size (bp)
p38MAPK	total	F GCTGTGAATGAAGACTGTGAG	۲۱	۵۴	bp۱۵۶
		R GCATCCCACTGACCAAATATC			
18S-rRNA	X03205	F GTAACCCGTTGAACCCCAT	۲۰	۵۳/۲	bp۱۵۱
		R CCATCCAATCGGTAGTAGCG			

F: forward primer; R: reverse primer; Tm: annealing temperature

شد. سطح سلولی پروتئین p38MAPK فسفریله (p-p38MAPK) که فرم فعال p38MAPK می باشد در این مطالعه مورد سنجش قرار گرفت. بدین منظور، سلول ها به مدت ۲۴ ساعت با غلظت های صفر (کنترل)، ۵۰، ۷۰ و ۹۰ میکرومولار جنیستین تحت تیمار قرار گرفتند و پس از فیکس شدن با پارافرمالدهید آنتی بادی های اولیه و ثانویه به سلول ها اضافه شدند. در انتها سلول ها با استفاده از دستگاه فلوسیتومتری BD-FACScalibur (BD Biosciences, California-USA) آنالیز شدند و درصد سلول های حاوی پروتئین p-p38MAPK سنجیده شد. آزمون های آماری: به منظور تجزیه و تحلیل آماری یافته ها نرم افزار آماری SPSS 16 (SPSS Inc., Chicago-USA) مورد استفاده قرار گرفت. نتایج RT-PCR با استفاده از قانون لیواک یا $2^{-\Delta\Delta Ct}$ محاسبه گردید بدین ترتیب که اختلاف Ct همه نمونه های کنترل و تیمار شده با Ct ژن رفرنس به دست آمد و سپس اختلاف نمونه های تیمار شده با کنترل به صورت $\Delta\Delta Ct$ محاسبه گردید و در نهایت بیان نسبی هر نمونه با فرمول $Fold\ Change = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ به دست آمد (۱۶).

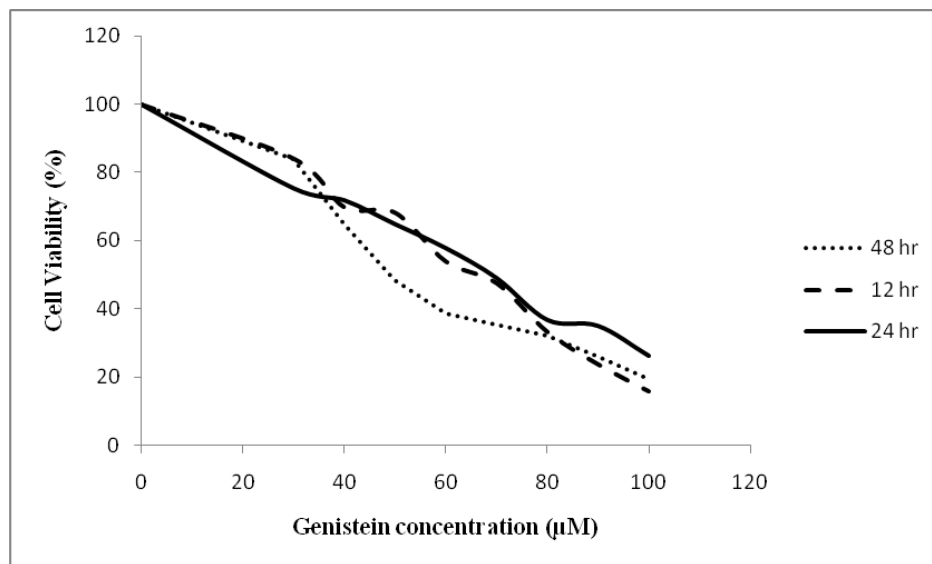
یافته ها

اثر مهارتی جنیستین بر رشد سلول های AGS سرطان

به منظور سنتز cDNA از کیت فرمتاز (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts-USA) استفاده شد. برای انجام Real time PCR یک میکرولیتر از cDNA ساخته شده همراه با ۱۰ میکرولیتر Syber Green Master Mix و ۷ میکرولیتر آب دیونیزه به همراه پرایمرهای اختصاصی (۱۰ پیکومول در میکرولیتر) مخلوط گردید. شرایط PCR شامل یک چرخه به مدت ۳۰ ثانیه در ۹۵ درجه سانتی گراد برای فعال سازی اولیه، ۴۰ چرخه به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد برای دناتوره کردن cDNA، ۳۰ ثانیه برای annealing در دمای ۵۴ درجه سانتی گراد برای ژن p38MAPK و دمای ۵۳/۲ درجه سانتی گراد برای 18S-rRNA به عنوان ژن رفرنس و ۳۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد برای elongation نهایی بود. بررسی صحت ساین محصولات PCR از الکتروفورز ژل آگارز ۱/۵ درصد استفاده شد و باندها توسط دستگاه Gel-Documentation (Uvitech, Cambridge, UK) مشاهده شد. بررسی اثر جنیستین بر میزان پروتئین p-p38MAPK به روش فلوسیتومتری: برای تعیین اثر ضد پرولیفراسیونی جنیستین بر روی رده سلولی سرطانی AGS معده در سطح پروتئین های داخل سلولی، از تکنیک فلوسیتومتری استفاده

۶۰ میکرومولار بین زمان ۲۴ با ۴۸ ساعت اختلاف معنادار مشاهده شد ($P \leq 0/05$)، در حالی که در غلظت‌های بالاتر از ۶۰ میکرومولار بین زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت با یکدیگر تفاوت معناداری مشاهده نشد ($P = 0/11$). مطابق فرمولی که در بخش مواد و روش‌ها بیان شد IC_{50} محاسبه شد و میزان آن برای زمان ۲۴ ساعت ۶۸ میکرومولار بود، بر همین اساس برای سایر آزمایش‌ها از سه غلظت ۵۰، ۷۰ و ۹۰ میکرومولار استفاده شد.

معهده: نتایج داده‌های حاصل از سنجش MTT نشان دهنده کاهش رشد سلول‌های سرطانی به صورت وابسته به غلظت و زمان بود (شکل ۱ و جدول ۲). اگرچه بعد از ۱۲ ساعت تیمار سلول‌ها با غلظت ۳۰ میکرومولار جنیستین تفاوت معناداری در رشد سلول گروه‌های تست و کنترل دیده نشد اما در غلظت‌های ۴۰ و ۵۰ میکرومولار ($P \leq 0/05$) و غلظت‌های ۶۰ تا ۱۰۰ میکرومولار ($P \leq 0/001$) تفاوت معناداری با گروه کنترل مشاهده گردید. در سایر زمان‌ها بین گروه کنترل با همه‌ی غلظت‌ها تفاوت معنادار مشاهده شد. در غلظت ۳۰ تا



شکل ۱: مقایسه درصد زنده ماندن سلول‌ها در زمان‌های مختلف و غلظت‌های مختلف جنیستین. اندازه‌گیری پرولیفراسیون سلولی با استفاده از تکنیک MTT انجام شد. جذب رنگ تولید شده در طول موج ۵۷۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. تیمار سلول‌ها با جنیستین در زمان‌های ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت منجر به کاهش بقای سلول به طور وابسته به غلظت و زمان گردید و شیب نمودار حاصل برای محاسبه IC_{50} مورد استفاده قرار گرفت.

اثر مهار جنیستین بر کاهش میزان پروتئین p-p38MAPK
نتایج فلوسیتومتری نشان داد که جنیستین منجر به کاهش درصد سلول‌های سرطانی حاوی p38MAPK فسفریله نسبت به کنترل می‌شود. همان‌گونه که در شکل ۳ دیده می‌شود، درصد سلول‌های حاوی p38MAPK فسفریله در غلظت‌های ۵۰، ۷۰ و ۹۰ میکرومولار جنیستین در سلول‌های تیمار شده نسبت به گروه کنترل کاهش می‌یابند. نتایج نشان می‌دهد که بین درصد سلول‌های حاوی پروتئین p38MAPK

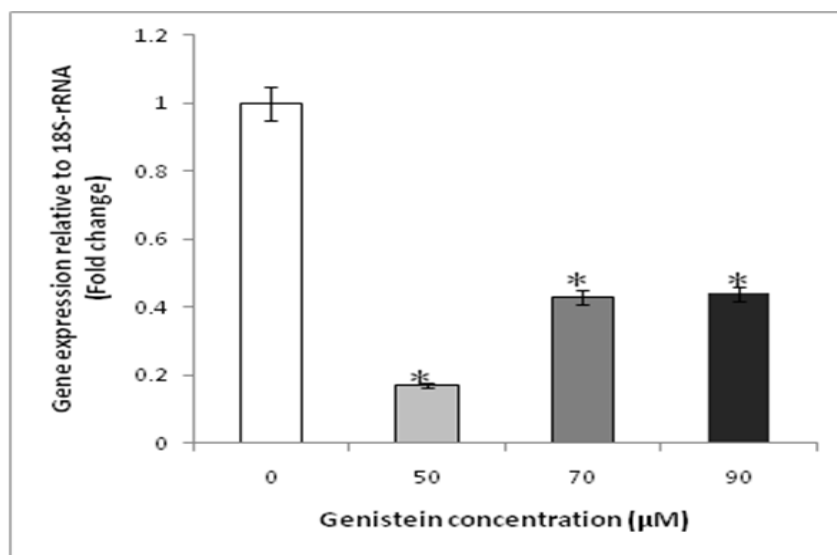
اثر مهار جنیستین بر کاهش بیان ژن p38MAPK
اندازه‌گیری میزان بیان ژن p38MAPK، حاکی از کاهش میزان بیان ژن یاد شده در سلول‌های تیمار شده با جنیستین بود. تیمار سلول‌ها با غلظت‌های ۵۰، ۷۰ و ۹۰ میکرومولار به ترتیب منجر به کاهش معنادار ۸۳، ۵۶ و ۵۷ درصدی در بیان ژن p38MAPK نسبت به گروه کنترل گردید (شکل ۲) که نشانگر وجود تفاوت معناداری در مقایسه با گروه کنترل است ($P < 0/001$).

فسفریله در بین گروه‌های تیمار شده و گروه کنترل اختلاف معناداری وجود دارد و بیشترین میزان کاهش در غلظت ۵۰ میکرومولار مشاهده می‌شود که با نتیجه‌ی حاصل از اندازه‌گیری بیان ژن مطابقت دارد.

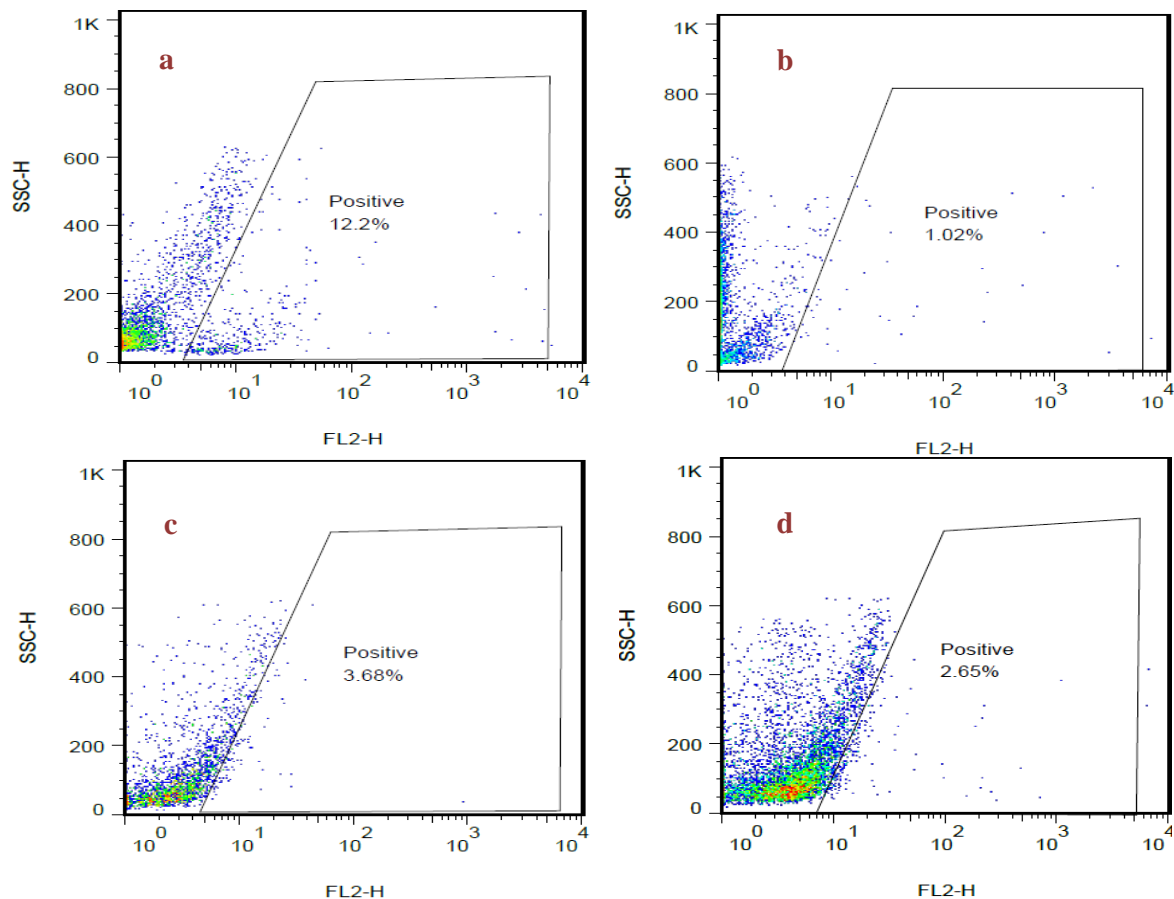
جدول ۲: نتایج حاصل از میزان درصد زنده ماندن سلول‌ها در غلظت‌ها و زمان‌های مختلف

زمان/غلظت	۱۲ ساعت	۲۴ ساعت	۳۶ ساعت	۴۸ ساعت
صفر میکرومولار	۰/۶۳±۰/۰۰۲	۰/۵۷±۰/۰۰۳	۰/۵۵±۰/۰۱۶	۰/۳۲±۰/۰۰۱
۳۰ میکرومولار	۰/۵۳±۰/۰۰۷ ^{**} ,a	۰/۴۳±۰/۰۰۲ ^{**} ,a,b	۰/۳۷±۰/۰۰۳ [*] ,a,c	۰/۲۵±۰/۰۰۱ [*] ,a,b,c
۴۰ میکرومولار	۰/۴۴±۰/۰۰۸ ^{***} ,a,b	۰/۴۲±۰/۰۰۲ ^{**} ,c,d	۰/۳۵±۰/۰۰۲ [*] ,a,c,e	۰/۲۰±۰/۰۰۳ ^{***} ,b,d,e
۵۰ میکرومولار	۰/۴۲±۰/۰۰۶ ^{***} ,a	۰/۳۷±۰/۰۰۳ ^{***} ,b	۰/۳۱±۰/۰۰۸ ^{**} ,c	۰/۱۵±۰/۰۰۲ ^{***} ,a,b,c
۶۰ میکرومولار	۰/۳۵±۰/۰۰۲ ^{***} ,a	۰/۳۳±۰/۰۰۵ ^{***} ,b	۰/۲۹±۰/۰۰۵ ^{**} ,c	۰/۱۱±۰/۰۰۱ ^{***} ,a,b,c
۷۰ میکرومولار	۰/۳۴±۰/۰۰۵ ^{***} ,a	۰/۲۷±۰/۰۰۳ ^{***} ,b	۰/۲۵±۰/۰۰۶ ^{***} ,c	۰/۱۰±۰/۰۰۱ ^{***} ,a,b,c
۸۰ میکرومولار	۰/۲۰±۰/۰۰۲ ^{***} ,a	۰/۲۲±۰/۰۰۲ ^{***} ,b	۰/۲۲±۰/۰۰۴ ^{***} ,c	۰/۰۹±۰/۰۰۸ ^{***} ,a,b,c
۹۰ میکرومولار	۰/۱۹±۰/۰۰۴ ^{***} ,a	۰/۱۹±۰/۰۰۲ ^{***} ,b	۰/۱۷±۰/۰۰۳ ^{***} ,c	۰/۰۷±۰/۰۰۰۷ ^{***} ,a,b,c
۱۰۰ میکرومولار	۰/۱۵±۰/۰۰۱ ^{***} ,a	۰/۱۵±۰/۰۰۳ ^{***} ,b	۰/۱۵±۰/۰۰۲ ^{***} ,c	۰/۰۶±۰/۰۰۰۳ ^{***} ,a,b,c

در هر غلظت اعداد به صورت OD نمونه‌ها در طول موج ۵۷۰ نانومتر نشان داده شده است. نتایج به صورت انحراف معیار غمی‌نگین گزارش شده است. در هر ستون از جدول علامت (*) نشان دهنده اختلاف معنادار $P \leq 0.05$ ، علامت (**) نشان دهنده اختلاف معنادار $P \leq 0.01$ و علامت (***) نشان دهنده اختلاف معنادار $P \leq 0.001$ است. همچنین در هر ردیف و برای مقایسه‌ی اثر جنیستین در زمان‌های انکوباسیون مختلف، گروه‌های دارای حروف مشابه *a b c d e* با یکدیگر اختلاف معنادار دارند.



شکل ۲: میزان تغییرات بیان ژن در مقایسه با گروه کنترل نسبت به تغییرات غلظت جنیستین. تغییرات بیان ژن نسبت به ژن رفرنس *18S-rRNA* در مواجهه با غلظت‌های ۵۰، ۷۰ و ۹۰ میکرومولار جنیستین نشان داده شده است. علامت (*) نشان دهنده *p38MAPK* اختلاف معنادار بین گروه‌های تیمار شده و گروه کنترل است ($P \leq 0.001$).



شکل ۳: تاثیر جنیستین بر میزان فسفریلاسیون *p38MAPK* در سلول‌های *AGS* اشکال *a* تا *d* به ترتیب نشان دهنده‌ی غلظت‌های ۰، ۵۰، ۷۰ و ۹۰ میکرومولار جنیستین است. همان گونه که از شکل *a* تا *d* دیده می شود، نقاط آبی که همان سلول‌های حاوی آنتی‌بادی *p38MAPK* فسفریله می‌باشند و در سمت راست خط مرزی واقع شده اند نسبت به گروه کنترل (شکل *c*) کاهش می‌یابند.

FL2-H: intensity (height) in the FL2 channel
SSC-H: intensity in side scatter height channel

بحث

پیشین است که اثرات جنیستین را بر روی سلول‌های سرطانی معده مورد بررسی قرار داده‌اند که از این جمله می‌توان به مطالعه‌ی هونگ بین کویی و همکارانش بر روی رده‌ی سلولی SGC7901 سرطان معده اشاره نمود که نشان داد جنیستین قادر است به صورت وابسته به دوز و وابسته به زمان رشد سلول‌های سرطانی معده را مهار کند (۱۴). علاوه بر این اثر مهارتی جنیستین بر رشد دیگر سلول‌های سرطانی نیز به اثبات رسیده است. ما در مطالعه‌ی پیشین خود نشان

در مطالعه‌ی حاضر تاثیر جنیستین که یکی از اصلی‌ترین ترکیبات سویا است بر روی رشد و تکثیر سلول‌های سرطانی معده (رده‌ی سلولی *AGS*) مورد بررسی قرار گرفت. این مطالعه نشان داد که جنیستین قادر است رشد سلول‌های سرطانی را به صورت وابسته به غلظت و وابسته به زمان به طور معناداری کاهش داده و موجب توقف رشد سلول‌های سرطانی گردد. یافته‌های این مطالعه مشابه با نتایج مطالعات

دادیم که جنیستین قادر است رشد سلول‌های سرطان کولورکتال را مهار نماید (۱۷). به طور مشابهی اثر مهاری جنیستین بر فرایند رشد، در سلول‌های سرطانی پروستات (۱۸)، سرطان سینه (۱۵)، لوسمی (۱۹) و کبد (۲۰) نیز گزارش شده است.

همان طور که پیش‌تر اشاره شد خانواده‌ی میتوژن پروتئین کینازها (MAPK) خانواده‌ای از پروتئین‌های درگیر در تنظیم رشد، تکثیر، آپوپتوز، التهاب، تمایز و پیشرفت چرخه سلولی هستند (۲۱) و مسیر p38MAPK یکی از مسیرهای سیگنالینگ تنظیم کننده‌ی رشد و پرولیفراسیون سلولی به شمار می‌رود. بنابراین ممکن است اثر مهاری مشاهده شده بر روی رشد سلول‌های سرطانی AGS توسط جنیستین از طریق تنظیم مسیر p38MAPK و با مهار فسفریلاسیون و غیرفعال کردن آن باشد. نتایج ما نشان داد که میزان بیان ژن در گروه‌های تیمار شده نسبت به گروه کنترل کاهش می‌یابد و کاهش بیان ژن p38MAPK در سلول‌های تیمار شده نسبت به گروه کنترل کاهش معناداری را نشان می‌دهند. همچنین نتایج فلوسیتومتری مربوط به اندازه‌گیری فرم فسفریله p38MAPK (p-p38MAPK) نیز نشان داد که جنیستین قادر است درصد سلول‌های حاوی پروتئین p38MAPK فسفریله در سلول‌های تیمار شده نسبت به کنترل را به طور معنی داری کاهش دهد. برخی از مطالعات نشان داده اند که فرم فعال p38MAPK در سرطان معده افزایش داشته است (۲۲). لذا تصور می‌شود فلاونوئیدها از جمله جنیستین بر مسیر MAPK و پروتئین‌های فعال آن اثر گذاشته و به دلیل ارتباط مسیر MAPK با مسیرهای دیگری نظیر مسیر سیگنالینگ NF-κB (۲۳) باعث فعال شدن NF-κB و ورود آن به هسته و بیان ژن‌های نظیر Notch1 و Notch2 می‌گردند، لذا جنیستین با مهار و کاهش میزان MAPK به طور غیرمستقیم سبب مهار مسیر سیگنالینگ بقا و تکثیر سلولی می‌شود (۲۴).

جنیستین می‌تواند به القای آپوپتوز از طریق مهار فعال‌سازی p38MAPK منجر گردد. مطالعات نشان داده اند که JNK1 و JNK2 منجر به افزایش حساسیت سلول‌های سرطانی به سیس پلاتین و در نتیجه منجر به القای مرگ سلولی از طریق مهار p38MAPK می‌شوند (۱۳). لذا پروتئین‌های p38MAPK و JNK که به نظر می‌رسد که در سرطان‌های مختلف نقش متفاوتی دارند در حساسیت تومورها به داروهای درمانی از اهمیت بالایی برخوردارند (۲۵). علاوه بر آپوپتوز، p38MAPK می‌تواند به عنوان واسطه‌ی اتوفازی در پاسخ به ترکیبات شیمی درمانی عمل نماید (۲۶) هرچند که مکانیسم مولکولی بین تنظیم p38MAPK و اتوفازی همچنان مبهم باقی مانده است (۲۷). بنابراین می‌توان گفت که مسیر سیگنالینگ p38MAPK از طریق دخالت در تنظیم مسیرهای آپوپتوز و اتوفازی به عنوان مسیرهای مرگ سلولی در کاهش قدرت تکثیر سلول‌ها نقش دارد. حتی در مطالعه‌ای که بر روی سلول‌های سرطانی کبدی صورت گرفت مشخص شد که درمان ترکیبی جنیستین منجر به افزایش اثر القایی TRAIL بر آپوپتوز سلولی می‌شود که این عملکرد را از طریق مهار فعال سازی p38MAPK انجام می‌دهد. به عبارتی می‌توان گفت که افزایش بیان p38MAPK منجر به حفاظت از آپوپتوز در سلول‌های سرطانی می‌گردد. بنابراین از آنجا که افزایش بیان ژن p38MAPK به‌طور معناداری منجر به کاهش القای آپوپتوز می‌گردد، بنابراین مهار p38MAPK نقش مهمی را در برنامه ریزی آپوپتوز میتوکندریایی ایفا می‌کند (۲۰). یکی دیگر از مسائلی که در ارتباط با مسیر MAPK و سرطان مطرح می‌شود مقاومت شیمیایی و دارویی است. براساس نتایج حاصل از مطالعات (۲۸ و ۲۹) می‌توان نتیجه گرفت که افزایش فسفریلاسیون p38MAPK در سلول‌های مقاوم به درمان مشاهده می‌شود و مهار فسفریلاسیون p38MAPK توسط مهار کننده‌ها، منجر به افزایش حساسیت سلول‌های سرطانی به درمان می‌شود. تصور می‌گردد که مهار فسفریلاسیون

و یا ایزوفرمی است که فعال شده است (۳۴).

نتیجه گیری

یافته‌های این مطالعه در مورد اثرات ضد رشد و ضد پرولیفراسیونی جنیستین بر روی سلول‌های AGS سرطان معده نشان داد که جنیستین قادر است با کاهش میزان p38MAPK در سطوح ژنی و پروتئینی سبب کاهش تکثیر سلولی گردد. به نظر می‌رسد که در صورت شناسایی مکانیسم‌های موثر دیگر این ترکیب و مطالعات تکمیلی اثرات آن می‌توان در آینده از این ترکیب در مهار گسترش و توسعه سرطان استفاده نمود. با توجه به نتایج حاصل، ترکیب جنیستین به عنوان یک ایزوفلاون سویا حاوی اثرات آنتی پرولیفراسیون قابل ملاحظه‌ای بوده و با توجه به روند رو به افزایش سرطان و عدم وجود روش‌های درمانی قطعی، سویا و مشتقات آن و سایر ایزوفلاون‌های رژیم غذایی را می‌توان به عنوان ترکیبات پیشگیری کننده و کاهش دهنده‌ی خطر ابتلا به سرطان معرفی نمود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله مراتب تشکر و قدردانی خود را از دانشگاه علوم پزشکی همدان به دلیل تامین اعتبار مورد نیاز و از مرکز پژوهش دانشجویان به خاطر حمایت‌های ارزشمند خود اعلام می‌دارند.

p38MAPK منجر به کاهش بیان ژن MDR1 می‌شود. این در حالی است که افزایش بیان این ژن ارتباط نزدیکی با مقاومت سلول‌ها به داروهای شیمیایی دارد (۳۰). از آنجا که تیمار سلول‌ها با سیس پلاتین نشان داده است که سیس پلاتین منجر به القای فسفریلاسیون p38MAPK می‌شود، بنابراین مطالعات گذشته پیشنهاد کرده‌اند که مسیر سیگنالینگ p38MAPK در تنظیم بیان ژن MDR1 درگیر بوده و با مقاومت سلولی به درمان‌های دارویی در ارتباط است (۱). با این همه علیرغم وجود مطالعاتی که افزایش بیان ژن p38MAPK را با کاهش آپوپتوز (۲۰)، اتوفاژی (۲۷)، ویژگی‌های تهاجم و مهاجرت سلول‌ها (۳۱) و مقاومت به درمان (۳۰) مرتبط دانسته‌اند، مطالعاتی نیز وجود دارند که ارتباط افزایش بیان ژن p38MAPK را با آپوپتوز و فعال شدن کاسپازها نشان داده‌اند که از این جمله می‌توان به بررسی اثر ترکیب ایزوفلاونوئید Glabridin در مطالعه هوانگ و همکارانش اشاره نمود که به‌طور معنی‌داری با افزایش القای آپوپتوز و مرگ سلولی در سلول‌های MV4-11 لوسمی همراه بوده است (۳۲). همچنین اثر آلسین (Allicin) که منجر به القای آپوپتوز در سلول‌های سرطان معده از طریق فعال کردن p38MAPK و کاسپاز-۳ می‌شود به اثبات رسیده است (۳۳). این تفاوت‌ها می‌تواند به دلیل نقش دوگانه p38MAPK در سلول‌ها باشد بنابراین به نظر می‌رسد نقش ویژه p38MAPK نه تنها وابسته به نوع سلول‌ها، بلکه وابسته به نوع القاگر

References

- 1- Hernandez LJ, Parada CC, Guinea VJ, et al. Role of the p38 MAPK pathway in cisplatin-based therapy. *Oncogene*. 2003; 22: 3998-4006.
- 2- Bornschein J, Malferttheiner P. Gastric carcinogenesis. *Langenbecks Arch Surg*. 2011; 396: 729-42.

- 3- Emadi-Baygi M, Nikpour P, Mohammad-Hashem F, et al. MSI2 expression is decreased in grade II of gastric carcinoma. *Pathol Res Pract*. 2013; 209: 689-91.
- 4- Kyriakis JM, Avruch J. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and

- inflammation. *Physiol Rev.* 2001; 81: 807-69.
- 5- Glatz G, Gogl G, Alexa A, et al. Structural mechanism for the specific assembly and activation of the extracellular signal regulated kinase 5 (ERK5) module. *J Biol Chem.* 2013; 288: 8596-8609.
- 6- Burotto M, Chiou VL, Lee JM, et al. The MAPK pathway across different malignancies: a new perspective. *Cancer.* 2014; 120: 3446-56.
- 7- Koul HK, Pal M, Koul S. Role of p38 MAP kinase signal transduction in solid tumors. *Genes Cancer.* 2013; 4: 342-59.
- 8- Wagner EF, Nebreda AR. Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. *Nat Rev Cancer.* 2009; 9: 537-49.
- 9- Thornton TM, Pedraza-Alva G, Deng B, et al. Phosphorylation by p38 MAPK as an alternative pathway for GSK3beta inactivation. *Science.* 2008; 320: 667-70.
- 10- Florou D, Patsis C, Ardavanis A, et al. Effect of doxorubicin, oxaliplatin, and methotrexate administration on the transcriptional activity of BCL-2 family gene members in stomach cancer cells. *Cancer Biol Ther.* 2013; 14: 587-96.
- 11- Kim JG. Molecular targeted therapy for advanced gastric cancer. *Korean J Intern Med.* 2013; 28: 149-55.
- 12- Merchant K, Kumi-Diaka J, Rathinavelu A, et al. Genistein modulation of immune-associated genes in LNCaP prostate cancer cell line. *The Open Prostate Cancer J.* 2012; 5: 1-7.
- 13- Li Y, Kong D, Bao B, et al. Induction of cancer cell death by isoflavone: the role of multiple signaling pathways. *Nutrients.* 2011; 3: 877-96.
- 14- Cui HB, Na XL, Song DF, et al. Blocking effects of genistein on cell proliferation and possible mechanism in human gastric carcinoma. *World J Gastroenterol.* 2005; 11: 69-72.
- 15- Choi EJ, Jung JY, Kim GH. Genistein inhibits the proliferation and differentiation of MCF-7 and 3T3-L1 cells via the regulation of ERalpha expression and induction of apoptosis. *Exp Ther Med.* 2014; 8: 454-58.
- 16- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001; 25: 402-8.
- 17- Shafiee G, Saidijam M, Tavailani H, et al. Genistein induces apoptosis and inhibits proliferation of HT29 colon cancer cells. *Int J Mol Cell Med.* 2016; 5: 178-91.
- 18- Touny LH, Banerjee PP. Identification of both Myt-1 and Wee-1 as necessary mediators of the p21-independent inactivation of the cdc-2/cyclin B1 complex and growth inhibition of TRAMP cancer cells by genistein. *Prostate.* 2006; 66: 1542-55.
- 19- Shen J, Tai YC, Zhou J, et al. Synergistic antileukemia effect of genistein and chemotherapy in mouse xenograft model and potential mechanism through MAPK signaling. *Exp Hematol.* 2007; 35: 75-83.
- 20- Jin CY, Park C, Kim GY, et al. Genistein enhances TRAIL-induced apoptosis through inhibition of p38 MAPK signaling in human

- hepatocellular carcinoma Hep3B cells. *Chem Biol Interact.* 2009; 180: 143-50.
- 21- Wang X, Clubbs EA, Bomser JA. Genistein modulates prostate epithelial cell proliferation via estrogen- and extracellular signal-regulated kinase-dependent pathways. *J Nutr Biochem.* 2006; 17: 204-10.
- 22- Tan W, Yu HG, Luo HS. Inhibition of the p38 MAPK pathway sensitizes human gastric cells to doxorubicin treatment in vitro and in vivo. *Mol Med Rep.* 2014; 10: 3275-81.
- 23- Amado NG, Fonseca BF, Cerqueira DM, et al. Flavonoids: potential Wnt/beta-catenin signaling modulators in cancer. *Life Sci.* 2011; 89: 545-54.
- 24- Wang Z, Zhang Y, Banerjee S, et al. Inhibition of nuclear factor kappa activity by genistein is mediated via Notch-1 signaling pathway in pancreatic cancer cells. *Int J Cancer.* 2006; 118: 1930-36.
- 25- Sui X, Kong N, Ye L, et al. p38 and JNK MAPK pathways control the balance of apoptosis and autophagy in response to chemotherapeutic agents. *Cancer Lett.* 2014; 344: 174-79.
- 26- Cui Q, Tashiro S, Onodera S, et al. Oridonin induced autophagy in human cervical carcinoma HeLa cells through Ras, JNK, and P38 regulation. *J Pharmacol Sci.* 2007; 105: 317-25.
- 27- Zhou C, Zhou J, Sheng F, et al. The heme oxygenase-1 inhibitor ZnPPiX induces non-canonical, Beclin 1-independent, autophagy through p38 MAPK pathway. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 2012; 44: 815-22.
- 28- Igea A, Nebreda AR. The stress kinase p38 as a target for cancer therapy. *Cancer research.* 2015; 75: 3997-4002.
- 29- Grossi V, Peserico A, Tezil T, et al. p38alpha MAPK pathway: a key factor in colorectal cancer therapy and chemoresistance. *World J Gastroenterol.* 2014; 20: 9744-58.
- 30- Guo X, Ma N, Wang J, et al. Increased p38-MAPK is responsible for chemotherapy resistance in human gastric cancer cells. *BMC Cancer.* 2008; 8: 375.
- 31- del Barco Barrantes I, Nebreda AR. Roles of p38 MAPKs in invasion and metastasis. *Biochem Soc Trans.* 2012; 40: 79-84.
- 32- Huang HL, Hsieh MJ, Chien MH, et al. Glabridin mediate caspases activation and induces apoptosis through JNK1/2 and p38 MAPK pathway in human promyelocytic leukemia cells. *PLoS One.* 2014; 9: e98943.
- 33- Zhang X, Zhu Y, Duan W, et al. Allicin induces apoptosis of the MGC-803 human gastric carcinoma cell line through the p38 mitogen-activated protein kinase/caspase-3 signaling pathway. *Mol Med Rep.* 2015; 11: 2755-60.
- 34- Yang M, Huang CZ. Mitogen-activated protein kinase signaling pathway and invasion and metastasis of gastric cancer. *World J Gastroenterol.* 2015; 21: 11673-79.

Inhibition of Gastric Cancer Cell Growth and Proliferation by Genistein

Khodadadi I¹, Ghasemkhani N¹, Shafiee G¹

¹Dept. of Biochemistry, Faculty of Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan-Iran

Corresponding Author: Khodadadi I, Dept. of Biochemistry, Faculty of Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan-Iran

E-mail: khodadadi@umsha.ac.ir

Received: 8 Jul 2017 **Accepted:** 3 Oct 2017

Background and Objective: Compelling evidence exists in favor of the effectiveness of herbal plant-derived components in cancer treatment; however their exact mechanisms of action are not well understood. Since the alteration of mitogen-activated protein kinase enzymes (MAPKs) has been reported in different cancer types, the present study aimed to investigate the effects of soy isoflavonoid genistein on the inhibition of cell viability and proliferation of AGS gastric cancer cell line by determining p38MAPK gene expression and also protein levels.

Materials and Methods: Cell viability was determined by MTT assay at different genistein concentrations (0, 50, 70, and 90 μ M) after 24 hours of incubation. Quantitative Real-time PCR was carried out to obtain p38MAPK gene expression levels and its active phosphorylated protein (p-p38MAPK) was measured by flow cytometry.

Results: Genistein significantly reduced cell viability in a concentration and time-dependent manner. Exposure of gastric cancer cells to 0, 50, 70, and 90 μ M genistein down-regulated p38MAPK gene expression by 83, 56, and 57%, and reduced cell proliferation by 35, 52, and 67%, respectively. In addition, a great reduction was observed in p-p38MAPK protein levels in treated cells compared to untreated control cells.

Conclusion: Since different concentrations of genistein reduced p38MAPK gene expression and lowered proliferation of AGS gastric cancer cells, it might be a potent candidate for a therapeutic plant-derived agent for combination therapy in gastric cancer.

Keywords: Apoptosis; Gastric neoplasms; Gene expression; Genistein; p38 mitogen-activated protein kinase; Proliferation