Journal of Ardabil University of Medical Sciences

Vol. 23, No. 4, Winter 2024, Pages: 365-376

Original article

Effect of Menthol on SFRP1 Expression Level and HIF-1α/VEGF Signaling in Diethylnitrosamine-induced Kidney Damage in Male Mice

Alijanian S[1], Asle-Rousta M*[2], Asaadi Tehrani G[1,3]

1. Department of Genetics, Zanjan Branch, Islamic Azad University, Zanjan, Iran
2. Department of Physiology, Zanjan Branch, Islamic Azad University, Zanjan, Iran
3. Aerospace and Mechanical Engineering Department, Notre Dame University, Indiana, USA.
*__Corresponding author__. Tel: +98 9125606327, Fax: +98 2433460463, E-mail: mrousta@iauz.ac.ir

Article info

Article history:
Received: Jan 01, 2024
Accepted: Mar 05, 2024

Keywords:
Menthol
Diethylnitrosamine
SFRP1
HIF-1α
VEGF
Kidney

ABSTRACT

Background: Many scientific Researches have shown that diethylnitrosamine, which is used to induce liver carcinoma, has destructive effects on the kidney. Menthol is a monoterpene type with antioxidant, anti-inflammatory, and anti-cancer effects. In the current study, we investigated the effect of menthol on the expression of tumor-related factors and HIF-1α/VEGF signaling in the kidney cells of mice receiving diethylnitrosamine.

Methods: In this research, 16 male mice at the age of 14 days were divided into four groups including Control, Menthol, Nitrosamine, and Nitrosamine-Menthol groups. Nitrosamine and Nitrosamine-Menthol groups received diethyl-nitrosamine intraperitoneally (25 mg/kg) at the age of 14 days. Menthol and Nitrosamine-Menthol groups also received menthol by gavage (50 mg/kg) three times a week for 6 consecutive months. At the end of this period, the expression level of SFRP1, VHL, CTNNB1, HIF-1α, and VEGF in the kidney cells was measured using real-time PCR method.

Results: Menthol treatment caused a significant increase in the expression level of SFRP1 (p=0.021) and VHL (p=0.013) and a significant decrease in the expression level of CTNNB1 (p=0.001), HIF-1α (p=0.000) and VEGF (p=0.000) in the kidney cells of Nitrosamine-Menthol treated group compared to the Nitrosamine group.

Conclusion: The results of this study showed that menthol prevents the decrease in the expression of tumor suppressor factors and the increase in the expression of tumor stimulating factors and factors effective in angiogenesis in the kidney of mice treated with diethyl-nitrosamine, so menthol is probably useful in prevention and treatment of renal cancer.

How to cite this article: Alijanian S, Asle-Rousta M, Asaadi Tehrani G. Effect of Menthol on SFRP1 Expression Level and HIF-1α/VEGF Signaling in Diethylnitrosamine-induced Kidney Damage in Male Mice. J Ardabil Univ Med Sci. 2024;23(4):365-376.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-Non Commercial 4.0 International License.

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2024-06-30]

[DOI: 10.61186/jarums.23.4.365]

Extended Abstract

Background: Renal epithelial cell carcinoma accounts for over 90% of kidney cancers and has doubled in prevalence in developed countries over the last half-century. A diet rich in meat, fat, and dairy increases the risk of developing this cancer. Smoking, obesity, high blood pressure, and exposure to certain chemicals also play a role. Treatment includes drugs such as Sorafenib, Sunitinib, Axitinib, and Everolimus, as well as surgery and immunotherapy. Natural compounds from plants have also shown promise in treating kidney cancer.

Diethylnitrosamine (DEN) is a compound found abundantly in various food items such as meat products containing nitrites, tobacco smoke, cheese, and even vegetables like spinach. Studies have found that DEN is a carcinogenic compound. Therefore, it is commonly used to induce hepatocarcinoma in animal models. DEN is activated by cytochrome P450, which produces reactive oxygen species and ethylates the N7 atom in nucleic acid guanines, causing DNA damage. Tumor formation by DEN depends on various factors such as age and gender. Injecting DEN into 14-day-old male mice is considered one of the best ways to induce hepatocarcinoma. After 25 weeks, it creates tumor masses in the liver. Research has also shown that DEN can induce renal carcinoma due to its ability to cause oxidative stress and inflammation. Even a small amount of this substance (in the dose range of 1.25-160 mg/kg) can induce renal carcinoma in male and female rats through intravenous injection. Higher doses lead to an increase in the number of cancer masses and an increase in mortality. It has been suggested that compounds that strengthen the antioxidant system can play a significant role in inhibiting the carcinogenic effect of DEN in the kidney.

Menthol is a natural compound found in mint and eucalyptus. It is used widely in different industries. Studies suggest that it may protect against skin, prostate, and bladder cancer. This has led to a hypothesis that menthol may also protect against kidney carcinoma. The current study was conducted on male mice given DEN at 10 days old to explore this hypothesis. The study aimed to investigate the effect of menthol on tumor-related factors and genes related to angiogenesis in the kidney.

Methods: In this experimental study, 16 male BALB/c mice, 10 days old, were used. All animal procedures were conducted by ethical principles and approved by the ethics committee of Islamic Azad University, Zanjan branch (code of ethics: IR.IAU.Z.REC.1401.037). During infancy, the mice were kept in a cage with their mother, and after that, they had access to water and food. The animals were divided into four groups, including (1) control (no treatment), (2) menthol, (3) nitrosamine, and (4) nitrosamine-menthol groups. Groups 3 and 4 received DEN for 14 days at a dose of 25 mg/kg as an intraperitoneal injection. Groups 2 and 4 also received menthol at a dose of 50 mg/kg three times a week for 6 consecutive months by gavage. Menthol treatment began one day after an intraperitoneal injection of DEN. At the end of the period, the expression levels of SFRP1, VHL, CTNNB1, HIF-1α, and VEGF in the kidneys were measured using real-time PCR. Data were analyzed using SPSS and comparison between groups was done using one-way ANOVA and Tukey tests. The results were shown as mean±standard error and $p<0.05$ was considered as significant level.

Results: After six months, intraperitoneal injection of DEN led to a significant decrease in the expression of VHL in the kidney ($p=0.034$). However, the mRNA expression of VHL was significantly higher in the nitrosamine-menthol group compared to the nitrosamine group ($p=0.013$).

The expression of SFRP1 was significantly lower in the nitrosamine group compared to the control group ($p=0.005$), but this phenomenon was prevented by menthol treatment. The expression of SFRP1 was significantly higher in the nitrosamine-

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2024-06-30]

[DOI: 10.61186/jarums.23.4.365]

menthol group compared to the nitrosamine group (p=0.021).

Intraperitoneal injection of nitrosamine significantly increased the expression of CTNNB1 in the kidney (p=0.001). However, its expression was significantly lower in the nitrosamine-menthol group compared to the nitrosamine group (p=0.001).

The expression of HIF-1α was significantly higher in the nitrosamine group compared to the control group (p=0.000). After six months of menthol treatment, its expression was significantly lower in the nitrosamine-menthol group compared to the nitrosamine group (p=0.000).

Moreover, the results revealed that the expression of VEGF was significantly higher in the nitrosamine group compared to the control group (p=0.001). However, the expression of this growth factor was significantly lower in the nitrosamine-menthol group compared to the nitrosamine group (p=0.000).

Conclusion: SFRP1 is a tumor suppressor gene that inhibits the Wnt/CTNNB1 signaling pathway. Methylation of the promoter region of SFRP1 and the reduction of its expression plays an important role in the development and progression of renal cell carcinoma. CTNNB1 is also abundantly expressed in various tumors, which is related to the reduction of SFRP1 expression. Therefore, the decrease in the expression of SFRP1 and the increase in the expression of CTNNB1 indicate molecular changes associated with tumor formation in the kidney. Suppressing CTNNB1 is a therapeutic strategy for renal carcinoma. We showed that menthol prevented the decrease in SFRP1 expression and the increase in CTNNB1 expression in mice injected with DEN, indicating its antitumor effect. However, further studies are required.

VHL is a tumor suppressor gene. Its deactivation or reduction leads to the proliferation of clear cells in the kidney and causes renal cell carcinoma. Angiogenesis plays a crucial role in this disease, and HIF-1α is a transcription factor that regulates genes involved in angiogenesis, tumor cell proliferation, and survival. The VHL/HIF-α/VEGF signaling pathway is a therapeutic target for renal clear cell carcinoma. Our research suggests that menthol plays an important role in inhibiting angiogenesis in rats receiving DEN by suppressing HIF-α/VEGF signaling. However, one of the study's limitations is the lack of histological studies to investigate tissue changes and immunohistochemistry to determine the protein expression of the factors studied.

We concluded that menthol can prevent the molecular changes that lead to kidney cancer in mice that have been given DEN. Specifically, menthol prevents the decrease in the expression of VHL and SFRP1 and prevents the increase in the expression of CTNNB1, HIF-1α, and VEGF that typically occur during the initiation and progression of kidney cancer.

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2024-06-30]

[DOI: 10.61186/jarums.23.4.365]

مجله دانشگاه علوم پزشکی اردبیل

دوره بیست و سوم، شماره چهارم، زمستان ۱۴۰۲

مقاله اصیل

اثر منتول بر بیان SFRP1 و سیگنالینگ HIF-1α/VEGF در آسیب کلیوی ناشی از دی‌اتیل‌نیتروزامین در موش سوری نر

سمانه علیجانیان[1]، معصومه اصل‌روستا[2*]، گلناز اسعدی تهرانی[3,1]

۱. گروه ژنتیک، واحد زنجان، دانشگاه آزاد اسلامی، زنجان، ایران

۲. گروه فیزیولوژی، واحد زنجان، دانشگاه آزاد اسلامی، زنجان، ایران

۳. گروه هوافضا و مهندسی مکانیک، دانشگاه نوتردام، ایندیانا، امریکا.

* نویسنده مسئول. تلفن: ۰۹۱۲۵۶۰۶۳۲۷ فاکس: ۰۲۴۳۳۴۶۰۴۶۳ پست الکترونیک: mrousta@iauz.ac.ir

چکیده

زمینه و هدف: تحقیقات نشان داده است دی اتیل‌نیتروزامین که برای القای کارسینوم کبدی به کار می‌رود اثرات مخربی بر کلیه نیز دارد. منتول نوعی مونوترپن است که واجد اثرات آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی و ضدسرطانی است. در این مطالعه، اثر منتول بر بیان فاکتورهای وابسته به تومور و سیگنالینگ HIF-1α/VEGF در کلیه موش‌های سوری دریافت‌کننده دی‌اتیل نیتروزامین بررسی شد.

روش کار: در این تحقیق، ۱۶ موش سوری نر در سن ۱۴ روزگی به چهار گروه کنترل، منتول، نیتروزامین و نیتروزامین- منتول تقسیم شدند. گروه‌های نیتروزامین و نیتروزامین- منتول در سن ۱۴ روزگی، دی‌اتیل‌نیتروزامین را به صورت درون صفاقی (۲۵ mg/kg) دریافت نمودند. گروه‌های منتول و نیتروزامین- منتول نیز منتول را سه بار در هفته به مدت ۶ ماه متوالی به صورت گاواژ (۵۰ mg/kg) دریافت کردند. در پایان این دوره، بیان SFRP1، VHL، CTNNB1، HIF-1α و VEGF در کلیه با روش real time PCR سنجیده شد.

یافته‌ها: تیمار منتول باعث افزایش معنی‌دار بیان SFRP1 ($p= ۰/۰۲۱$) و VHL ($p =۰/۰۱۳$) و کاهش معنی‌دار بیان CTNNB1 ($p=۰/۰۰۱$)، HIF-1α ($p=۰/۰۰۰$) و VEGF ($p=۰/۰۰۰$) در کلیه موش‌های گروه نیتروزامین- منتول در مقایسه با گروه نیتروزامین شد.

نتیجه‌گیری: نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که منتول از کاهش بیان فاکتورهای سرکوبگر توموری و افزایش بیان فاکتورهای محرک تومور و عوامل موثر در آنژیوژنز در کلیه موش‌های تیمار شده با دی‌اتیل‌نیتروزامین ممانعت می‌کند، بنابراین احتمالاً در پیشگیری و درمان سرطان کلیه موثر است.

واژه های کلیدی: منتول، دی‌اتیل‌نیتروزامین، SFRP1، HIF-1α، VEGF، کلیه

دریافت: ۱۴۰۲/۱۰/۱۱ **پذیرش:** ۱۴۰۲/۱۲/۱۵

مقدمه

کارسینوم سلول‌های اپی‌تلیوم کلیه، بیش از ۹۰ درصد سرطان‌های کلیه را به خود اختصاص داده است. این نوع از سرطان در حدود ۲ درصد از تشخیص‌ها و مرگ و میرهای سرطان را در دنیا شامل می‌شود، اما گسترش آن در کشورهای توسعه یافته در نیم قرن

این مقاله تحت شرایط Creative Commons Attribution-Non Commercial 4.0 International License قابل بازنشر است.

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2024-06-30]

[DOI: 10.61186/jarums.23.4.365]

اخیر، بیش از دو برابر شده است. بیشترین شیوع بیماری در امریکای شمالی و اروپای غربی گزارش شده است اما به نظر می‌رسد شیوع آن در کشورهای آمریکای لاتین، آسیا و آفریقا نیز با تغییر سبک زندگی به شیوه غربی، در حال افزایش است. تحقیقات نشان داده است که رژیم غذایی سرشار از گوشت، چربی و لبنیات، خطر ابتلا به این نوع از سرطان را افزایش می دهد. عوامل دیگری نظیر سیگار، چاقی، فشار خون بالا و مواجهه با برخی از مواد شیمیایی نیز در پیدایش آن نقش دارد [۱]. از مهمترین تغییرات مولکولی که در پیدایش سرطان کلیه دخالت دارند می‌توان به سرکوب بیان VHL[1] و تحریک سیگنالینگ VEGF[2] و mTOR[3] اشاره نمود. بنابراین درمان دارویی این نوع از سرطان با هدف‌گذاری بر این عوامل، طراحی شده است. امروزه داروهایی نظیر سورافنیب، سونیتینیب، آکسیتینیب و اورولیموس با تأثیر بر همین مسیرهای سیگنالینگ برای درمان سرطان کلیه تجویز می‌شوند، هر چند که جراحی و ایمنوتراپی نیز کاربرد دارد [۲]. علاوه بر این، تحقیقات نشان داده است که ترکیبات طبیعی مشتق از گیاهان نیز می‌توانند در درمان سرطان کلیه تأثیرگذار باشند [۳].

دی‌اتیل‌نیتروزامین به فراوانی در فراورده‌های گوشتی حاوی نیتریت، دود تنباکو، پنیر و حتی سبزیجاتی نظیر اسفناج وجود دارد [٤، ٥]. تحقیقات نشان داده است که دی‌اتیل‌نیتروزامین یک ترکیب کارسینوژن است و بنابراین برای القای هپاتوکارسینوم در مدل‌های حیوانی به کار می‌رود. دی‌اتیل‌نیتروزامین توسط سیتوکروم P450 فعال می‌شود و در نتیجه، علاوه بر تولید گونه‌های واکنش‌پذیر اکسیژن، موجب اتیلاسیون اتم N^7 در گوانین‌های اسیدنوکلئیک شده و به DNA آسیب می‌زند [۶،۷]. تومورزایی توسط دی‌اتیل‌نیتروزامین به عوامل مختلفی نظیر سن و جنسیت بستگی دارد [۶]، به طوری که تزریق دی‌اتیل‌نیتروزامین به موش‌های نر در ١٤ روزگی، یکی از بهترین راه‌های القای هپاتوکارسینوم محسوب می‌شود که پس از ۲۵ هفته، توده‌های توموری را در کبد ایجاد می‌کند [۸]. از سوی دیگر، تحقیقات ثابت کرده است که دی‌اتیل‌نیتروزامین با توجه به قابلیت ایجاد استرس اکسیداتیو و ایجاد التهاب، می‌تواند کارسینوم کلیوی را نیز القا نماید. حتی یک تزریق داخل وریدی این ماده (در محدوده دوز mg/kg ۱۶۰-۱/۲۵) می‌تواند کارسینوم کلیوی را در رت‌های نر و ماده القا کند. دوزهای بالاتر به افزایش تعداد توده‌های سرطانی و افزایش مرگ و میر منجر می‌شود. پیشنهاد شده است ترکیباتی که سیستم آنتی‌اکسیدانی را تقویت می‌کنند، احتمالاً نقش مهمی در مهار اثر کارسینوژنیک دی‌اتیل‌نیتروزامین در کلیه ایفا می‌کنند [۱۱-۹].

منتول یک مونوترپن حلقوی طبیعی است که از خانواده نعنا استخراج می‌شود و در گیاهان دیگری نظیر اکالیپتوس و بادرنجبویه نیز یافت می‌شود [۱۲]. در حال حاضر، منتول به فراوانی در تهیه محصولات دهان و دندان، محصولات دارویی، آرایشی و بهداشتی، خنک‌کننده‌ها و آفت‌کش‌ها استفاده می‌شود [۱۳]. اثر محافظتی منتول علیه کارسینوم پوستی را به قابلیت این مونوترپن در مهار استرس اکسیداتیو و التهاب نسبت داده‌اند [١٤]. علاوه بر این، ثابت شده است که منتول می‌تواند موجب مهار تکثیر و تحرک سلول‌های DU145 سرطان پروستات [۱۵] و مرگ سلولی در رده سلولی T24 سرطان مثانه انسان [۱۶] شود. بنابر شواهدی که ذکر شد فرضیه اثر محافظتی منتول علیه کارسینوم کلیه نیز مطرح می‌شود. از این رو، تحقیق حاضر با هدف بررسی اثر منتول بر بیان فاکتورهای وابسته به تومور و ژن‌های مربوط به آنژیوژنز در کلیه موش‌های سوری نر که در دوره نوزادی، دی‌اتیل نیتروزامین را دریافت کردند طراحی شد.

[1] Von Hippel-Lindau
[2] Vascular Endothelial Growth Factor
[3] Mammalian Target for Rapamycin

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2024-06-30]
[DOI: 10.61186/jarums.23.4.365]

روش کار

در این مطالعه تجربی، ۱۶ سر موش سوری نر نژاد Balb/c در سن ۱۰ روزگی از مرکز تحقیقات علوم اعصاب دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی خریداری و در شرایط استاندارد آزمایشگاه (دمای ۲۵-۲۳ درجه سانتی‌گراد، دوره نور/ تاریکی ۱۲/۱۲ ساعت) در مرکز تحقیقات نانوبیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان نگهداری شدند. تمام مراحل کار با حیوانات بر طبق اصول اخلاقی انجام گرفت و توسط کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان تایید شد (کد اخلاق IR.IAU.Z.REC.1401.037). موش‌ها در دوره شیرخوارگی در داخل قفس در کنار مادر بودند و پس از آن نیز دسترسی آسان به آب و غذا داشتند. حیوانات به ٤ گروه (٤ موش در هر گروه) شامل گروه‌های ۱. کنترل (بدون تیمار)، ۲. منتول، ۳. نیتروزامین و ٤. نیتروزامین- منتول تقسیم شدند. گروه‌های ۳ و ٤، دی‌اتیل‌نیتروزامین را در ١٤ روزگی با دوز ۲۵ mg/kg به صورت تزریق درون صفاقی دریافت کردند [۶]. گروه‌های ۲ و ٤ نیز منتول را با دوز ۵۰ mg/kg سه بار در هفته به مدت ۶ ماه متوالی به صورت گاواژ دریافت کردند [۱۷]. تیمار منتول یک روز پس از تزریق درون صفاقی دی‌اتیل‌نیتروزامین شروع شد. منتول و دی اتیل نیتروزامین از سیگما (امریکا) خریداری شد.

در پایان دوره، به دنبال بیهوشی توسط تزریق درون صفاقی کتامین (۱۰۰ mg/kg) و زایلزین (۱۰ mg/kg)، کلیه ها به سرعت برداشته شد و بیان Secreted Frizzled-related Protein 1 (SFRP1)، VHL، Catenin Beta 1 (CTNNB1)، Hypoxia Inducible Factor 1 (HIF-1) α و VEGF توسط Real Time PCR مورد سنجش قرار گرفت.

ابتدا RNA موجود در کلیه با استفاده از کیت استخراج RNA پارس طوس (ایران) استخراج شد. غلظت و کیفیت RNA استخراج شده توسط اسپکتروفتومتری در طول موج ۲۶۰ نانومتر و با نسبت A260/A280 تعیین شد. سپس cDNA مطابق دستورالعمل کیت سنتز cDNA Easy (پارس طوس، ایران) تولید شد. در نهایت، سطح mRNAی ژن‌های مربوطه توسط Real-time PCR و با استفاده از کیت مربوطه ساخت آرین ژن (ایران) ارزیابی شد. شرایط چرخه حرارتی شامل یک چرخه دناتوراسیون اولیه (۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۲ دقیقه)، ٤٠ چرخه دناتوراسیون (۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه)، ٤٠ چرخه اتصال (۵۲ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه) و ٤٠ چرخه بسط (۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۲۰ ثانیه) بود. پرایمرها توسط ژن فن‌آوران (ایران) سنتز شدند و توالی آن‌ها در جدول ۱ نشان داده شده است. گلیسرآلدئید-۳-فسفات دهیدروژناز (GAPDH) به عنوان کنترل داخلی استفاده شد و بیان هر ژن با استفاده از $2^{-\Delta\Delta CT}$ محاسبه شد [۱۸].

جدول ۱. توالی پرایمرهای مورد استفاده در تحقیق

ژن	F/R	توالی
GAPDH	F	5'-GTTGTCTCCTGCGACTTCA-3'
	R	5'-GGTGGTCCAGGGTTTCTTA-3'
VHL	F	5'-TCAGCCCTACCCGATCTTACC-3'
	R	5'-ATCCCTGAAGAGCCAAAGATG-3'
CTNNB1	F	5'-ATCCAAAGAGTAGCTGCAGG-3'
	R	5'-TCATCCTGGCGATATCCAAG-3'
SFRP1	F	5'-GCAAGCGAGTTTGCACTGAG-3'
	R	5'-CCGCTTCAGCTCCTTCTTCT-3'
VEGF	F	5'-AAAGGCTTCAGTGTGGTCTGAGAG-3'
	R	5'-GGTTGGAACCGGCATCTTTATC-3'
HIF-1α	F	5'-TGCTTGGTGCTGATTTGTGA-3'
	R	5'-GGTCAGATGATCAGAGTCCA-3'

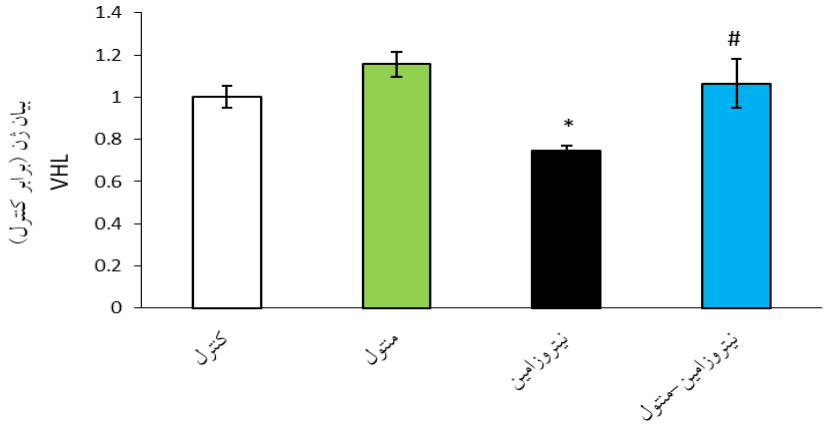
[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2024-06-30]

[DOI: 10.61186/jarums.23.4.365]

در نهایت، داده‌ها با استفاده از SPSS تجزیه و تحلیل شدند و مقایسه بین گروه ها با استفاده از ANOVA یکطرفه و توکی انجام گرفت. نتایج به صورت میانگین±خطای معیار نشان داده و $p<۰/۰۵$ به عنوان سطح معنی‌دار در نظر گرفته شد.

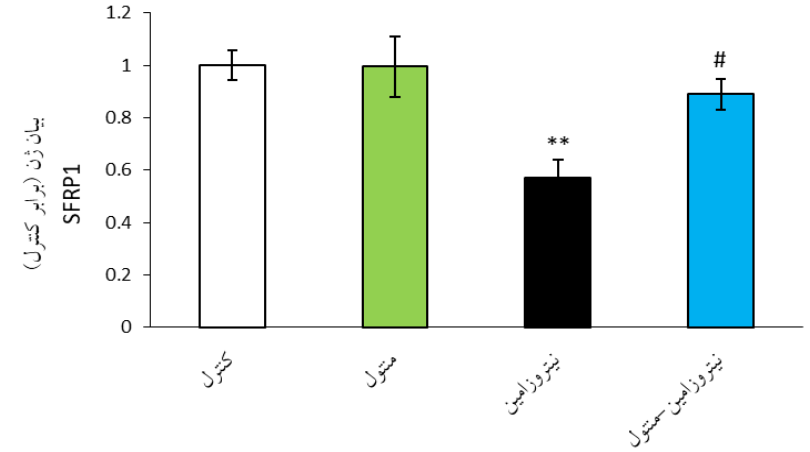
یافته‌ها

تزریق درون صفاقی دی‌اتیل‌نیتروزامین باعث شد بیان VHL پس از شش ماه به طور معنی‌داری کاهش یابد ($p= ۰/۰۳٤$) اما بیان این ژن در گروه نیتروزامین-منتول در مقایسه با گروه نیتروزامین به طور معنی‌داری بیشتر بود ($p=۰/۰۱۳$) (شکل ۱).



شکل ۱. اثر منتول بر بیان VHL در کلیه موش‌های دریافت‌کننده دی‌اتیل‌نیتروزامین. نتایج به صورت میانگین ± خطای معیار ارایه شده است.
P < 0.05 * در مقایسه با گروه کنترل و P < 0.05 # در مقایسه با گروه نیتروزامین

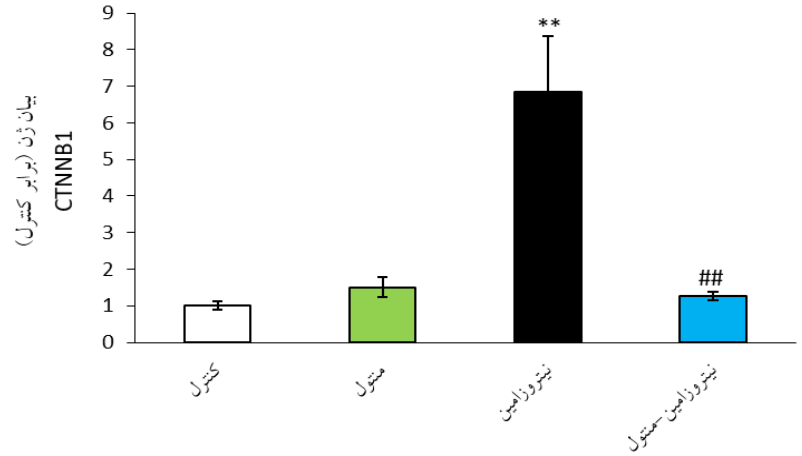
بیان SFRP1 در گروه نیتروزامین در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی‌داری کمتر بود ($p=۰/۰۰۵$) و تیمار منتول از وقوع این پدیده جلوگیری کرد به‌طوری که بیان SFRP1 در گروه نیتروزامین-منتول در مقایسه با گروه نیتروزامین به طور معنی‌داری بیشتر بود ($p= ۰/۰۲۱$) (شکل ۲).



شکل ۲. اثر منتول بر بیان SFRP1 در کلیه موش‌های دریافت‌کننده دی‌اتیل‌نیتروزامین. نتایج به صورت میانگین ± خطای معیار ارایه شده است.
P < 0.01 ** در مقایسه با گروه کنترل و P < 0.05 # در مقایسه با گروه نیتروزامین

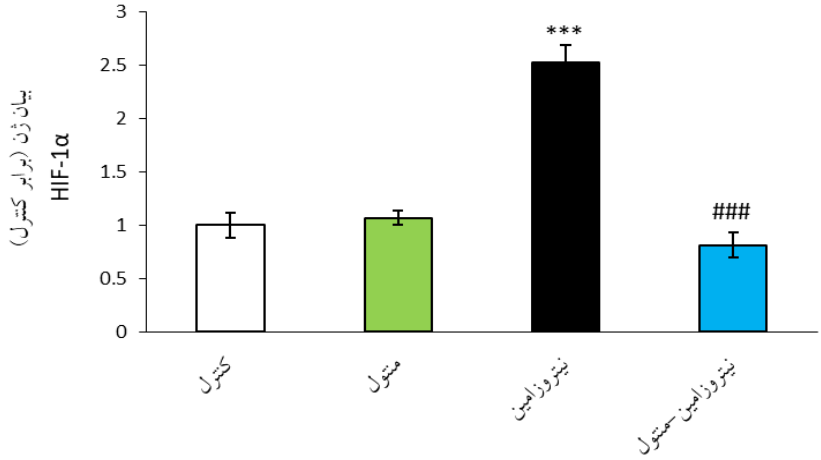
علاوه بر این، تزریق درون صفاقی نیتروزامین موجب افزایش معنی‌دار بیان CTNNB1 در کلیه موش‌ها شد ($p=۰/۰۰۱$). در حالی که بیان آن در گروه نیتروزامین- منتول در مقایسه با گروه نیتروزامین به‌طور معنی‌داری کمتر بود ($p=۰/۰۰۱$) (شکل ۳).

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2024-06-30]
[DOI: 10.61186/jarums.23.4.365]



شکل ۳. اثر منتول بر بیان CTNNB1 در کلیه موش‌های دریافت‌کننده دی‌اتیل‌نیتروزامین. نتایج به صورت میانگین ± خطای معیار ارایه شده است.
P < 0.01 ** در مقایسه با گروه کنترل و P < 0.01 ## در مقایسه با گروه نیتروزامین

بیان HIF-1α در گروه نیتروزامین در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی‌داری بالاتر بود (p=۰/۰۰۰) و تیمار شش ماهه منتول باعث شد بیان آن در گروه نیتروزامین- منتول در مقایسه با گروه نیتروزامین به طور معنی‌داری پایین‌تر باشد (p=۰/۰۰۰) (شکل ٤).

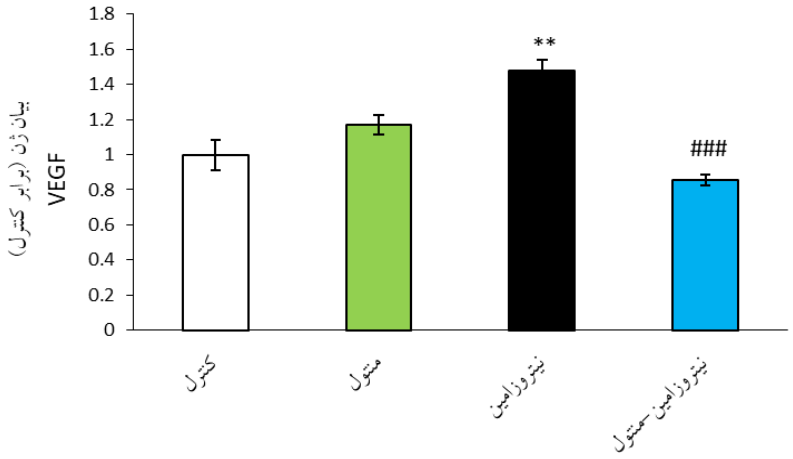


شکل ٤. اثر منتول بر بیان HIF-1α در کلیه موش‌های دریافت کننده دی‌اتیل‌نیتروزامین. نتایج به صورت میانگین ± خطای معیار ارایه شده است.
P < 0.001 * در مقایسه با گروه کنترل و P < 0.001 ### در مقایسه با گروه نیتروزامین**

علاوه بر این نتایج نشان داد که بیان VEGF در گروه نیتروزامین در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی‌داری بیشتر بود (p=۰/۰۰۱)، در حالی که بیان این فاکتور رشد در گروه نیتروزامین- منتول در مقایسه با گروه نیتروزامین به طور معنی‌داری کمتر بود (p=۰/۰۰۰) (شکل ۵).

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2024-06-30]

[DOI: 10.61186/jarums.23.4.365]



شکل ۵. اثر منتول بر بیان VEGF در کلیه موش‌های دریافت‌کننده دی‌اتیل‌نیتروزامین. نتایج به صورت میانگین ± خطای معیار ارایه شده است.
$P < 0.01$ ** در مقایسه با گروه کنترل و $P < 0.001$ ### در مقایسه با گروه نیتروزامین

بحث

تزریق درون صفاقی دی‌اتیل‌نیتروزامین در سن چهارده روزگی موش‌های سوری نر باعث شد بیان ژن‌های ضد تومـوری VHL و SFRP1 پس از شش ماه در کلیه کاهش یابد و بیان ژن کارسینوژنیک CTNNB1 و ژن‌های مربوط به آنژیوژنز HIF-1α و VEGF افزایش یابد.

SFRP1 یک ژن سرکوبگر تومـوری است که سیگنالینگ Wnt/CTNNB1 را مهار می‌کند. متیلاسیون ناحیه پروموتر SFRP1 و کاهش بیان آن، نقش مهمی در پیدایش و پیشرفت کارسینوم سلول‌های کلیوی دارد [۲۰،۱۹]. CTNNB1 نیز در تومورهای مختلف به فراوانی بیان می‌شود که در ارتباط با کاهش بیان SFRP1 می‌باشد [۲۱]. بنابراین کاهش بیان SFRP1 و افزایش بیان CTNNB1 در کلیه حیوانات گروه نیتروزامین، بیانگر تغییرات مولکولی مرتبط با پیدایش تومور در این اندام است. با توجه به نقش انکوژنی CTNNB1 در کلیه، سرکوب این ژن را به عنوان یک استراتژی درمانی برای کارسینوم کلیوی معرفی نموده‌اند [۲۲]. نتایج تحقیق حاضر نشان داد که تیمار شش ماهه منتول از کاهش بیانSFRP1 و افزایش بیان CTNNB1 در کلیه موش‌هایی که در ۱۴ روزگی، تحت تزریق دی‌اتیل‌نیتروزامین قرار گرفتند جلوگیری کرد که احتمال اثر ضدتوموری منتول را تقویت می‌کند و به مطالعات بیشتری از جمله بررسی پاتولوژیکی نیازمند است. تاکنون گزارشی مبنی بر اثر منتول بر بیان این ژن‌ها موجود نیست اما بخشی از اثر ضدتوموری ترکیبات طبیعی متعدد نظیر لیکوپن، رزوراترول، کورکومین و جنیستئین را به قابلیت آنها در سرکوب بیان CTNNB1 نسبت داده‌اند [۲۳].

VHL یک ژن سرکوبگر تومور است. غیرفعال شدن یا کاهش بیان VHL موجب تکثیر سلول‌های شفاف در توبول دیستال می‌شود و کارسینوم سلول‌های کلیوی را به دنبال دارد [۲۴،۲۵]. بنابراین کاهش بیان VHL در کلیه موش‌های دریافت‌کننده دی‌اتیل‌نیتروزامین احتمالاً حاکی از شروع تومورزایی در این اندام است. وجود رگ‌های خونی زیاد در تومورهای کلیه نشان می‌دهد که رگ‌زایی، نقش مهمی در پاتوژنز این بیماری دارد. در اینجا، نقش HIF-1α مطرح می‌شود که یک فاکتور رونویسی برای ژن‌های دخیل در رگ‌زایی، تکثیر سلول‌های تومـوری، بقا و تکثیر توده‌های تومـوری است [۲۶]. در شرایط عادی، غلظت HIF-1α در کلیه کم است زیرا علی‌رغم رونویسی بالا، تجزیه می‌شود. اما اگر بیان VHL کاهش یابد از تجزیه HIF-1α ممانعت نموده و

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2024-06-30]
[DOI: 10.61186/jarums.23.4.365]

موجب تجمع این فاکتور در کلیه می‌شود [۲۷]. دو مسیر پایین دست HIF-1α که در بیولوژی تومور کلیه دخالت دارند عبارتند از مسیر VEGF و مسیر mTOR [۲۶]. VEGF در طول پیشرفت و متاستاز تومور به عنوان یک القاکننده رگ‌زایی عمل نموده و بیان آن در تومورهای کلیوی به شدت بالا است [۲۸]. افزایش بیان HIF-1α و VEGF که با کاهش بیان VHL در کلیه موش‌های دریافت‌کننده دی‌اتیل‌نیتروزامین همراه است نشان می‌دهد رگ‌زایی که از شاخصه‌های کارسینوم کلیوی است [۲۶] در این حیوانات به شدت فعال شده است. سیگنالینگ VHL/HIF-α/VEGF به عنوان یک هدف درمانی برای کارسینوم سلول های شفاف کلیوی معرفی شده است [۲۷] و نتایج حاصل از تحقیق حاضر نشان داد که تیمار شش ماهه منتول از کاهش بیان VHL و افزایش بیان HIF-1α و VEGF در کلیه موش‌های دریافت کننده دی‌اتیل‌نیتروزامین ممانعت نمود. تاکنون گزارشی مبنی بر اثر منتول بر بیان VHL و HIF-1α وجود ندارد اما اثر مهاری ترپنوئیدهای دیگر و مشتقات آنها بر HIF-1α به اثبات رسیده است [۲۹]. تائو[1] و همکاران [۳۰] نیز دریافتند که منتول موجب کاهش mRNA و پروتئین VEGF در سلول‌های هپاتوما HepG2 شده و از تکثیر و مهاجرت این سلول‌ها ممانعت می‌کند. با توجه به نتایج تحقیق حاضر، پیشنهاد می‌شود که منتول با سرکوب سیگنالینگ HIF-α/VEGF نقش مهمی در مهار آنژیوژنز در کلیه موش‌های دریافت‌کننده دی‌اتیل‌نیتروزامین ایفا کرده است. از محدودیت‌های پژوهش حاضر می‌توان به فقدان مطالعات هیستولوژیکی (برای بررسی تغییرات بافتی) و ایمنوهیستوشیمی (جهت تعیین بیان پروتئین فاکتورهای مورد مطالعه در این تحقیق) اشاره نمود.

نتایج حاصل از یک تحقیق نشان داده است که بیان بالای TRPM8[2] (که گیرنده منتول است) موجب افزایش اتوفاژی شده و از تکثیر و مهاجرت سلول‌های سرطان پستان جلوگیری می‌کند [۳۱]. منتول به صورت مستقل از TRPM8 نیز زنده‌مانی سلول‌های Du 145 سرطان پروستات را کاهش می‌دهد [۳۲]. امروزه منتول را به علت اثرات محافظتی آن در سرطان‌های مثانه، پروستات، کولون، کبد و لوکمی به عنوان یک عامل ضدسرطانی معرفی نموده‌اند [۳۳]. نتایج تحقیق حاضر، شواهدی مبنی بر سودمندی این مونوترپن در درمان سرطان کلیه فراهم می‌کند که به مطالعات بافتی نیز نیازمند است.

نتیجه‌گیری

در مجموع نتیجه‌گیری می‌شود که منتول با جلوگیری از کاهش بیان VHL و SFRP1 و ممانعت از افزایش بیان CTNNB1، HIF-1α و VEGF از تغییرات مولکولی ناشی از آغاز و پیشرفت سرطان کلیه در موش‌های دریافت‌کننده دی‌اتیل نیتروزامین جلوگیری می‌کند.

حامی مالی

این تحقیق، حامی مالی ندارد.

تعارض منافع

تضاد منافعی در این پژوهش وجود ندارد.

تشکر و قدردانی

مقاله حاضر از نتایج حاصل از پایان نامه کارشناسی ارشد نویسنده اول، با عنوان «بررسی اثر منتول بر مسیرهای سیگنالینگ Wnt، EMT و آنژیوژنز در کلیه موش‌های سوری نر دریافت‌کننده دی‌اتیل‌نیتروزامین» مصوب معاونت پژوهشی دانشگاه

[1] Tao

[2] Transient Receptor Potential Ion Channel Melastatin Subtype 8

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2024-06-30]

[DOI: 10.61186/jarums.23.4.365]

آزاد اسلامی واحد زنجان نگاشته شده است. ملایی، حامد عباسی و محنا کمری قدردانی می‌کنند.
نویسندگان از همکاری صمیمانه یاسمن پیروی، زهرا

References

1- Padala SA, Barsouk A, Thandra KC, Saginala K, Mohammed A, Vakiti A, et al. Epidemiology of renal cell carcinoma. World J Oncol. 2020; 11(3):79-87.
2- Hsieh JJ, Purdue MP, Signoretti S, Swanton C, Albiges L, Schmidinger M, et al. Renal cell carcinoma. Nat Rev Dis primers. 2017; 3:17009.
3- Feng C, Lyu Y, Gong L, Wang J. Therapeutic potential of natural products in the treatment of renal cell carcinoma: a review. Nutrients. 2022; 14(11):2274.
4- Sen NP, Smith DC, Schwinghamer L, Marleau JJ. Diethylnitrosamine and other N-nitrosamines in foods. J AOAC Int. 1969; 52(1):47-52.
5- Beigmohammadi F. Evaluation of the effect of boiling and deep frying as cooking method on the amounts of volatile nitrosamines and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) of smoked cocktailsof volatile nitrosamines and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) of smoked cocktails. J Food Sci Technol. 2022; 18(121): 117-29. (Full text in Persian)
6- Tolba R, Kraus T, Liedtke C, Schwarz M, Weiskirchen R. Diethylnitrosamine (DEN)-induced carcinogenic liver injury in mice. Lab Anim. 2015; 49(1_suppl):59-69.
7- Schulien I, Hasselblatt P. Diethylnitrosamine-induced liver tumorigenesis in mice. Methods Cell Biol. 2021; 163:137-52.
8- Connor F, Rayner TF, Aitken SJ, Feig C, Lukk M, Santoyo-Lopez J, et al. Mutational landscape of a chemically-induced mouse model of liver cancer. J Hepatol. 2018; 69(4):840-50.
9- Mohr U, Hilfrich J. Effect of a single dose of N-diethylnitrosamine on the rat kidney. J Natl Cancer Inst. 1972; 49(6):1729-31.
10- Hassanen NH, Fahmi A, Shams-Eldin E, Abdur-Rahman M. Protective effect of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) against diethylnitrosamine-induced renal injury in rats. Biomarkers. 2020; 25(3):281-9.
11- Mehany AB, Farrag IM, Diab M, Ghoneim MM, El-Sherbiny M, Al-Serwi RH, et al. Curcumin and vitamin C improve immunity of kidney via gene expression against diethyl nitrosamine induced nephrotoxicity in rats: In vivo and molecular docking studies. Heliyon. 2023; 9(3):e14126.
12- Oz M, El Nebrisi EG, Yang KH, Howarth FC, Al Kury LT. Cellular and molecular targets of menthol actions. Front Pharmacol. 2017; 8:472.
13- Kamatou GP, Vermaak I, Viljoen AM, Lawrence BM. Menthol: A simple monoterpene with remarkable biological properties. Phytochem. 2013; 96:15-25.
14- Liu Z, Shen C, Tao Y, Wang S, Wei Z, Cao Y, et al. Chemopreventive efficacy of menthol on carcinogen-induced cutaneous carcinoma through inhibition of inflammation and oxidative stress in mice. Food Chem Toxicol. 2015; 82:12-18.
15- Wang Y, Wang X, Yang Z, Zhu G, Chen D, Meng Z. Menthol inhibits the proliferation and motility of prostate cancer DU145 cells. Pathol Oncol Res. 2012; 18:903-10.
16- Li Q, Wang X, Yang Z, Wang B, Li S. Menthol induces cell death via the TRPM8 channel in the human bladder cancer cell line T24. Oncology. 2010; 77(6):335-41.
17- Santo SG, Romualdo GR, Santos LA, Grassi TF, Barbisan LF. Modifying effects of menthol against benzo (a) pyrene-induced forestomach carcinogenesis in female Swiss mice. Environ Toxicol. 2021; 36(11):2245-55.
18- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. Methods. 2001; 25(4):402-408.
19- Awakura Y, Nakamura E, Ito N, Kamoto T, Ogawa O. Methylation-associated silencing of SFRP1 in renal cell carcinoma. Oncol Rep. 2008; 20(5):1257-63.
20- Mo S, Su Z, Heng B, Chen W, Shi L, Du X, et al. SFRP1 promoter methylation and renal carcinoma risk: A systematic review and meta-analysis. J Nippon Med Sch. 2018; 85(2):78-86.

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2024-06-30]

[DOI: 10.61186/jarums.23.4.365]

21- Regel I, Eichenmüller M, Mahajan UM, Hagl B, Benitz S, Häberle B, et al. Downregulation of SFRP1 is a protumorigenic event in hepatoblastoma and correlates with beta-catenin mutations. J Cancer Res Clin Oncol. 2020; 146:1153-67.
22- Yang CM, Ji S, Li Y, Fu LY, Jiang T, Meng FD. β-Catenin promotes cell proliferation, migration, and invasion but induces apoptosis in renal cell carcinoma. Onco Targets Ther. 2017;10:711-24.
23- Moselhy J, Srinivasan S, Ankem MK, Damodaran C. Natural products that target cancer stem cells. Anticancer Res. 2015; 35(11):5773-88.
24- Kaelin Jr WG. The von Hippel-Lindau tumor suppressor gene and kidney cancer. Clin Cancer Res. 2004; 10: 6290S–6295S.
25- Temm CJ, Shively SB, Vortmeyer AO. Kidney in VHL disease: Early clear cell proliferation occurs in the distal tubular system. Oncol Rep. 2022; 48(6):1-8.
26- Baldewijns MM, van Vlodrop IJ, Vermeulen PB, Soetekouw PM, van Engeland M, de Bruïne AP. VHL and HIF signalling in renal cell carcinogenesis. J Pathol. 2010; 221(2):125-38.
27- Mazumder S, Higgins PJ, Samarakoon R. Downstream targets of VHL/HIF-α signaling in renal clear cell carcinoma progression: mechanisms and therapeutic relevance. Cancer. 2023; 15(4):1316.
28- Wan L, Huang J, Chen J, Wang R, Dong C, Lu S, et al. Expression and significance of FOXP1, HIF-1a and VEGF in renal clear cell carcinoma. J BUON. 2015; 20(1):188-95.
29- Manolescu B, Oprea E, Busu C, Cercasov C. Natural compounds and the hypoxia-inducible factor (HIF) signalling pathway. Biochim. 2009; 91(11-12):1347-58.
30- Tao XK, Zhang XT, Wang HC, Duan H, Cheng J. Effect of menthol on proliferation, migration and expressions of IL-8, CXCL-12 and VEGF in hepatoma HepG2 cells. Chinese J Experiment Trad Med Formul. 2019;24:60-5. [Full text in Chinese]
31- Huang Y, Li S, Jia Z, Zhao W, Zhou C, Zhang R, et al. Transient receptor potential melastatin 8 (TRPM8) channel regulates proliferation and migration of breast cancer cells by activating the AMPK-ULK1 pathway to enhance basal autophagy. Front Oncol. 2020; 10:573127.
32- Nazıroğlu M, Blum W, Jósvay K, Çiğ B, Henzi T, Oláh Z, et al. Menthol evokes Ca2+ signals and induces oxidative stress independently of the presence of TRPM8 (menthol) receptor in cancer cells. Redox Biol. 2018; 14:439-49.
33- Zhao Y, Pan H, Liu W, Liu E, Pang Y, Gao H, et al. Menthol: An underestimated anticancer agent. Front Pharmacol. 2023; 14:1148790.

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2024-06-30]

[DOI: 10.61186/jarums.23.4.365]