Journal of Ardabil University of Medical Sciences

Vol. 17, No. 4, Winter 2018, Pages 487-496

Inhibitory Effects of *Vaccinium arctostaphylos* Extract on Prostate Cancer Cells

Gorbanzadeh E[1], Zaefizadeh M*[2]

1. Department of Biology, School of Sciences, Ahar branch, Islamic Azad University, Ahar, Iran
2. Department of Biology, School of Sciences, Ardabil branch, Islamic Azad University, Ardabil, Iran
**** Corresponding author***. Tel: +984533722545, Fax: +984533722763, E-mail: mzaefi@gmail.com

Received: May 22, 2017 Accepted: Dec 21, 2017

ABSTRACT

Background & objectives: Prostate cancer is one of the most common cancers in the world, and its prevention is expected to increase in the future appreciably. Following the emergence of the new field of nutritional genetics and investigations about the effect of natural antioxidants on the hypermethylation of genes, this study was performed to measure the effect of *Vaccinium arctostaphylos* poly phenols and anthocyanins on PC-3 cell line as well as methylation and expression changes of GSTP1 gene.

***Methods*:** In order to evaluate the survival potency of PC-3 cell line in a completely randomized design, MTT test was used and these cells were treated with different concentrations of *Vaccinium arctostaphylos* extract (4500, 2250, 1125, 562.5, 140.62, 70.31, 35.15, 17.57, 8.78, 4.39 µg/ml) for 24, 48 and 72 hours. Expression level of GSTP1 gene was analyzed by Q-RT-PCR method in 2500, 1250, 625, 312 and 156 µg/ml concentrations of *Vaccinium*.

Results: Statistical results showed that *Vaccinium arctostaphylos* poly phenolic extract at 35-70 ppm concentration significantly reduced the survival rate of PC-3 cells. Moreover, compared to control cells, the expression level of GST gene significantly increased in PC-3 cells treated with 1250ppm extract.

Conclusion: Anthocyanin- polyphenolic extract from *Vaccinium arctostaphylos* can decrease the survival rate of cancerous cells and GST gene expression in human prostate cancer PC-3 cells. This may be explained by changes in cell carcinogenesis pathway or CpG demethylation process.

***Keywords*:** *Vaccinium arctostaphylos*; Antioxidant; Cancerous Cells; Prostate.

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2024-12-26]

تاثیر عصاره قره‌قات بر مهار سلول‌های سرطانی پروستات

*المیرا قربان زاده [۱] محمد ضعیفی زاده [۲]**

۱. گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، واحد اهر، دانشگاه آزاد اسلامی، اهر، ایران
۲. گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، واحد اردبیل، دانشگاه آزاد اسلامی، اردبیل، ایران
* نویسنده مسئول. تلفن: ۰٤٥۳۳۷۲۲٥٤٥ فاکس: ۰٤٥۳۳۷۲۲۷٦۳ پست الکترونیک: mzaefi@gmail.com

چکیده

زمینه و هدف: سرطان پروستات یکی از شایعترین سرطان‌های دنیا است و انتظار می‌رود نیاز به پیشگیری از این بیماری در آینده افزایش شگرفی یابد. در عرصه جدید ظهور علم ژنتیک تغذیه ای به دنبال بررسی اثرآنتی اکسیدان‌های طبیعی بر روی متیله شدن بیش از حد ژن‌ها، این پژوهش با هدف بررسی اثر پلی فنل و آنتو سیانین عصاره قره قات بر روی رده سلولی PC-3 سرطان پروستات و نیز بر روی متیلاسیون و تغییرات بیان ژن GSTP1 انجام شده است.

روش کار: جهت سنجش حیات سلولی توسط سنجش تترازولیوم (MTT) عصاره قره قات به ترتیب با غلظت‌های (٤٥۰۰، ۲۲٥۰، ۱۱۲٥، ٥٦۲/٥۰، ۱٤۰/٦۲، ۷۰/۳۱، ۳٥/۱٥، ۱۷/٥۷، ۸/۷۸ و ٤/۳۹ ppm) به مدت ۲٤، ٤۸ و ۷۲ ساعت بر روی PC-3 کشت شده در محیط کشت در قالب طرح کاملا تصادفی انجام شد. برای بررسی میزان بیان ژن GSTP1 با روش qRT-PCR از عصاره قره قات با دوزهای (۱٥٦، ۳۱۲، ٦۲٥، ۱۲٥۰ و ۲٥۰۰ ppm) استفاده شد.

یافته‌ها: عصاره قره قات با غلظت ۷۰ppm -۳٥ به طور معناداری زنده مانی سلول‌های PC-3 را کاهش داده است. در اثر تیمار با ۱۲٥۰ ppm، میزان بیان ژن گلوتاتیون اس- ترانسفراز نسبت به کنترل افزایش معناداری نشان داده است.

نتیجه گیری: عصاره قره قات می تواند در سلول‌های سرطان پروستات انسانی (PC-3) باعث کاهش زنده مانی این سلول‌ها و افزایش بیان ژن گلوتاتیون اس- ترانسفراز شود که آن نیز می‌تواند از طریق تغییر مسیر سرطانی بودن سلول‌ها یا متیل برداری از CpG قابل توجیه باشد.

واژه های کلیدی: قره قات، آنتی اکسیدان، سلول‌های سرطانی، پروستات

دریافت: ۱۳۹٦/۰۳/۰۱ **پذیرش:** ۱۳۹٦/۰۹/۳۰

مقدمه

سرطان پروستات پنجمین سرطان شایع در جهان و دومین سرطان شایع در مردان است. علیرغم پیشرفت‌های اخیر در درمان سرطان پروستات، پیشرفت کمی در معالجه مراحل نهایی این بیماری حاصل شده است و خاصیت تهاجمی بالای آن نرخ مرگ و میر را افزایش داده است [۱]. در کشور ایران به دلیل شیوع بالای سرطان پروستات از یک طرف و ناهمگونی آن از طرف، دیگر نیاز به توجه ویژه و شناسایی عوامل درمانی جدید احساس می شود [۲].

سرطان پروستات یک بیماری مزمن، تخریب کننده[1] و بدخیم پروستات است. وراثت خانوادگی، سن، نژاد، رژیم غذایی و عوامل محیطی از جمله مهمترین عواملی هستند که بر خطر ابتلا به سرطان پروستات موثرند [۱]. پیشگیری از این بیماری می‌تواند به صورت پیشگیری دارویی یا پیشگیری از طریق کنترل تغذیه مثل افزایش آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی [۳] یا ویتامین E و سلنیوم [٤،٥] در رژیم غذایی صورت گیرد. خانواده گلوتاتیون اس- ترانسفراز (GST[2])

[1] Degenerative
[2] Glutation S Transferase

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2024-12-26]

آنزیم‌های متابولیکی هستند که نقش مهمی را در متابولیسم و سم زدایی موتاژن‌ها و کارسینوژن‌ها با اتصال به گلوتاتیون ایفاءِ می‌کنند و از ترکیبات مهم سم‌زدای زنوبیوتیک‌های الکتروفیل می‌باشند [۱۰-۶]. گلوتاتیون اس- ترانسفرازها اضافه شدن گلوتاتیون کاهش یافته به سوبسترا را کاتالیز می‌کنند تا تیول اترها شکل بگیرند که به این ترتیب محصولات فعال با سمیت کمتر تشکیل شده و دفع شوند [۷]. حذف ژنی این آنزیم‌ها، منجر به نارسایی بیان پروتئین‌های GST می‌شود که می‌تواند باعث کاهش دتوکسی فیکاسیون کارسینوژن‌های بالقوه و حساسیت بیشتر در مقابل سرطان شود [۱، ۹، ۱۱]. در واقع، افزایش فعالیت GST پاسخی است به مواجهه با ترکیبات سمی و خارجی و می‌تواند اثرات جهش زایی این عوامل را کاهش دهد [۷]. منطقه ′۵ این ژن دارای یک جزیره CpG است. در بافت‌های نرمال معمولاً جزایر CpG صرفنظر از فعالیت نسخه برداری ژن در منطقه پروموتور غیرمتیله هستند [۱۲،۱۳]. متیلاسیون سیتوزین در توالی‌های تنظیمی این ژن باعث کاهش بیان آن می‌شودکه در عمده کارسینوماهای پروستات دیده می‌شود [۱۴]. هیپرمتیلاسیون توالی‌های تنظیمی در جایگاه ژنی GSTP1[1] در همه مطالعات و بررسی نمونه‌های بافت کارسینومای پروستاتیک انسانی کشف شده است [۷،۱۴،۱۳،۱۲،۹،۸]، در حالی که این حالت در بافت‌های نرمال پروستاتیک دیده نشده است [۱۵]. در بیشترسرطان‌های انسانی، ژن‌های GST افزایش بیان نشان می‌دهند، در صورتی که ژن‌های GST در سرطان پروستات انسانی، اغلب دچار کاهش بیان می‌شوند [۷]. بیان این ژن در سرطان پروستات به خاطر هیپرمتیلاسیون پروموتور بسیار کاهش می‌یابد که در ۹۰ درصد تومورها و تقریباً ۷۰ درصد نئوپلازی‌های درون اپی تلیالی پروستات یافت شده و این مسئله آن را تبدیل به یک رویداد زودهنگام و معمول در کارسینوژنز پروستات و یک مارکر تشخیصی برای سرطان پروستات نموده است [۷،۱۶]. تنظیم بیان ژن با متیلاسیون DNA از یک سری وقایع نشات می‌گیرد که شامل تغییرات کروماتین و افزایش چگالی متیلاسیون هیستون‌ها می‌شود [۱۶]. طبق مطالعات قبلی مشخص شده که کاهش چشمگیر در بیان ژن گلوتاتیون s-ترانسفراز در کارسینوژنز پروستتیک انسانی مشارکت می‌کند [۱۴،۹،۱۲،۱۳].

پیشگیری اولیه توسط داروهای گیاهی نیز در کنترل انواع سرطان روش‌های مناسبی هستند. این داروها به علت عدم وجود عوارض جانبی اهمیت بیشتری در پیشگیری و درمان انواع سرطان دارند [۱۷]. آنتی‌اکسیدان‌های پلی فنلی یک گروه ویژه از متابولیت‌های ثانویه را تشکیل می‌دهند که نقش مهمی در حفاظت بافت‌ها در مقابل اثرات اکسیدکنندگی رادیکال‌های آزاد اکسیژن و سایر گونه‌های فعال ایفا می‌کنند، به طوری که از بروز بیماری‌های متعددی از جمله بیماری‌های التهابی، سرطان، دیابت، سکته قلبی، آلزایمر و پارکینسون جلوگیری می‌نمایند. خاصیت آنتی‌اکسیدانی گیاهان به میزان هر یک از ترکیبات پلی فنلی بستگی دارد [۱۸]. آنتی‌اکسیدان‌ها به مقدار زیاد در میوه‌ها و سبزیجات و از جمله در گیاه قره‌قات یافت می‌شوند [۱۹]. بسیاری از این آنتی‌اکسیدان‌ها می‌توانند پیشرفت سرطان پروستات را کندتر نمایند که این نشان می‌دهد که استرس اکسیداتیو و نارسایی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی می‌توانند در تخریب ژنومی سرطان پروستات پیشرفته سهیم باشند [۳،۲۰].

گیاه قره‌قات[2] متعلق به خانواده اریکاسه[3] می‌باشد. برگ و میوه گیاه دارویی قره‌قات سرشار از ترکیبات فنلی و آنتوسیانین‌ها بوده و نیز خاصیت آنتی‌اکسیدانی دارد بنابراین می‌تواند به عنوان منبع گیاهی دارای ترکیبات آنتی‌اکسیدانی در صنایع غذا و دارو کاربرد داشته باشد و به عنوان یک آنتی‌اکسیدان طبیعی در پیشگیری و درمان سرطان‌ها و از جمله

[1] Glutathione S-Ttransferase P1

[2] *Vaccinium arctostaphylos L.*
[3] Ericaceae

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2024-12-26]

سرطان پروستات مدنظر قرار گیرد [۲۱]. این پژوهش با هدف بررسی اثر عصاره قره‌قات بر روی سل لاین PC-3 سرطان پروستات و نیز بر روی متیلاسیون ژن GST و تغییر بیان آن انجام شده است.

روش کار

این پروژه در سال ۱۳۹۵ در آزماشگاه ژنتیک مولکولی معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه آزاد اسلامی واحد اردبیل انجام شد.

روش استخراج عصاره میوه قره‌قات

پس از پودر کردن میوه قره‌قات و حل و یکنواخت‌کردن آن در آب، محلول سانتریفیوژ شد و محلول رویی (عصاره آبی) برداشت شد. عصاره آبی حاصل در ۸۰- درجه سانتی گراد منجمد و به کمک خشک‌کن انجمادی[1] پودر عصاره آبی تهیه گردید و در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد.

سل لاین و محلول‌ها

در این مطالعه از سل لاین سرطان پروستات انسانی (PC-3) استفاده شده است. این سل لاین خاصیت تهاجمی بالایی دارد و فاقد گیرنده‌های آندروژن، PSA و ۵-آلفا ردوکتاز بوده تومورهایی با تمایزیابی کم تولید می‌کند [۵].

سلول‌های سرطان پروستات انسانی PC-3، در محیط PRMI-1640 (ATOcell) نگهداری شد. برای رنگ‌آمیزی و شمارش سلول‌ها از محلول ۰/۴ درصد تریپان بلو و برای شستشوی سلول‌ها از بافر PBS[2] ($NaCl, KCl, Na_2HPO_4\text{-}7H_2, KH_2PO_4$) استفاده شد. محلول MTT با حل کردن در PBS تهیه و سپس فیلتر و استریل شده در ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. آزمایش‌ها سه بار تکرار شدند.

سنجش حیات سلولی توسط MTT

کشت سلول‌ها در پلیت به همراه محیط کشت کامل (RPMI 1640 به همراه ۱۰٪FBS) به مدت ۲۴ ساعت انجام شد، سپس با جایگزینی محیط کشت بدون FBS غلظت‌های مختلفی از عصاره قره‌قات (۴۵۰۰ppm و ۲۲۵۰، ۱۱۲۵، ۵۶۲/۵۰، ۱۴۰/۶۲، ۷۰/۳۱، ۳۵/۱۵، ۱۷/۵۷، ۸/۷۸، ۴/۳۹) اضافه شده و به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد. در گام بعدی محلول MTT اضافه شده پس از ۲-۳ ساعت محلول DMSO[9] اضافه گردید تا محصول متابولیک MTT یعنی فورمازون در آن حل شود. در گام آخر جذب نوری (OD) نمونه در ۵۴۰-۶۹۰ نانومتر قرائت گردید.

استخراج RNA و سنتز cDNA

استخراج RNA با استفاده از روش ترایزول[3] انجام شد. پس از همسان‌سازی RNAهای استخراج شده، سنتز cDNA با استفاده از دستورالعمل کیت (شرکت کیاژن) صورت گرفت.

پرایمرهای مورد استفاده

پرایمر مورد استفاده در سنتز cDNA در نمونه‌ها از نوع Oligo (dt) بوده و پرایمرهای Forward و Reverse برای ژن GSTP1 به ترتیب

GGAGACCTCACCCTGTACCA و

GGGCAGTGCCTTCACATAGT

و برای ژن خانگی GAPDH2 به ترتیب

GGAGACCTCACCCTGTACCA و

GGGCAGTGCCTTCACATAGT

بوده است.

Quantitative Real-Time PCR

میزان بیان ژن GSTP1 با روش کمی با استفاده از Real Time PCR (Corbet) و با استفاده از رنگ سایبرگرین[4] (شرکت سیناکلون) در حجم ۲۰ میکرولیتر با استفاده از دستورالعمل کیت اندازه گیری شد. با توجه به اینکه بیان ژن گلوتاتیون اس-ترانسفراز در دوزهای پایین قابل بررسی نبود، بنابراین آزمایش Real Time با دوزهای ۱۵۶، ۳۱۲، ۶۲۵، ۱۲۵۰ و ۲۵۰۰ ppm انجام گردید.

[1] Freeze dryer
[2] Phosphate-Buffered Saline
[3] Trizol
[4] Sybr Green

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2024-12-26]

با استفاده از دستگاه Thermal cycler و با الکتروفورز روی ژل آگارز ۱٪ در چندین مرحله دمایی و غلظتی برای قطعات مورد نظر شرایط بهینه غلظتی و دمایی مناسب برای تکثیر قطعه هدف از mRNAی GSTP1 و ژن خانگی GAPDH2 تعیین شد.CT داده‌ها در هر چرخه به دست آمده از دستگاه Real Time PCR در فرمت Excel به نرم افزار LinReg انتقال داده و ضریب کارایی متوسط (e)[1] چرخه‌ها محاسبه گردید. سپس با توجه به فرمولی که با ژن خانگی GAPDH2 به دست آمد میزان بیان نسبی ژن محاسبه گردید.

آنالیز آماری

از آزمون ANOVA و دانکن برای بررسی داده‌های MTT و ارجحیت غلظت‌ها از لحاظ جذب نوری استفاده شد. از معادله رگرسیون جهت تعیین درصد خطی بودن نمودار و میزان r^2 استفاده شد.

یافته‌ها

نتایج آنالیز مربوط به میزان مهار سلول‌های سرطانی PC-3 به وسیله عصاره آنتی‌اکسیدانی قره‌قات نشان داد که بین غلظت‌های عصاره قره‌قات تفاوت معناداری از نظر زنده مانی سلول‌ها وجود دارد به عبارت دیگر نتایج تجزیه واریانس برای غلظت‌های متفاوت قره‌قات (ppm ۴۵۰۰، ۲۲۵۰، ۱۱۲۵، ۵۶۲/۵۰، ۱۴۰/۶۲، ۷۰/۳۱، ۳۵/۱۵، ۱۷/۵۷، ۸/۷۸و ۴/۳۹) پس از ۲۴ ساعت از لحاظ مهار رشد[2] سلول‌های سرطانی PC-3 نشان داده است که بین غلظت‌های متفاوت قره‌قات اختلاف معنی‌داری وجود دارد ($p<۰/۰۰۱$) بدین معنی که غلظت‌های مختلف از لحاظ مهار رشد سلول‌های سرطانی PC-3 متفاوت عمل کردند. میزان ضریب تعیینات ۶/۲٪ نشان‌دهنده دقت بالا است.

تصاویر مربوط به کشت سلول‌های PC-3 در شکل ۱ نشان داده شده است. همانطوری که دیده می‌شود، با افزایش غلظت عصاره قره‌قات میزان بازدارندگی بیشتر می‌گردد که به شکل آپوپتوز و تغییر مسیر سرطانی (گرد شدگی) دیده می‌شود.

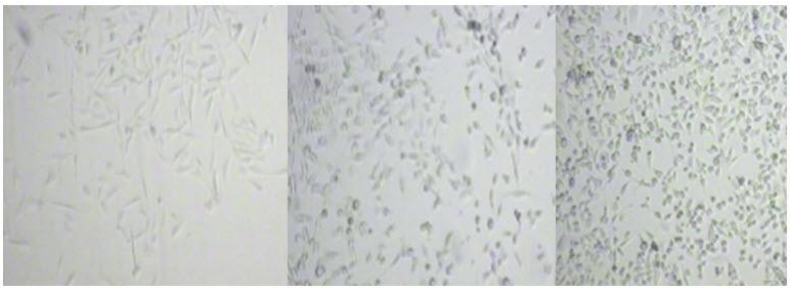
نتایج متفاوتی در رابطه با مهارکنندگی برای هرکدام از دوره‌های زمانی حاصل شده است اما در هر سه دوره زمانی غلظت‌های ppm ۴۵۰۰ و ۱۷/۵۷بیشترین اثر مهارکنندگی را داشته اند. از طرفی، حتی اعمال حداقل غلظت قره‌قات به میزان ۴/۳۹ppm اثر مهارکنندگی بالایی برای سلول سرطانی PC-3 داشته است (حدود ۹۹٪) که این کنترل بسیار حائز اهمیت است. CT کمتر نشان‌دهنده این است که نسخه الگوی اولیه cDNA بیشتر بوده است. به منظور بررسی تکثیر اختصاصی منحنی ذوب ترسیم شد که نتایج آن نشان‌دهنده تکثیر اختصاصی قطعه مورد نظر با استفاده از پرایمرهای اختصاصی بوده است.

نتایج تجزیه واریانس برای بیان نسبی بین غلظت‌های مختلف عصاره قره‌قات تفاوت معنی‌داری نشان می‌دهد ($p<۰/۰۰۱$). بدین معنی که غلظت‌های مختلف عصاره قره‌قات در بیان ژن GSTP1 عکس‌العمل‌های متفاوت داشته است. یعنی اینکه عصاره به نوعی در تغییر بیان ژن GSTP1 موثر بوده است.

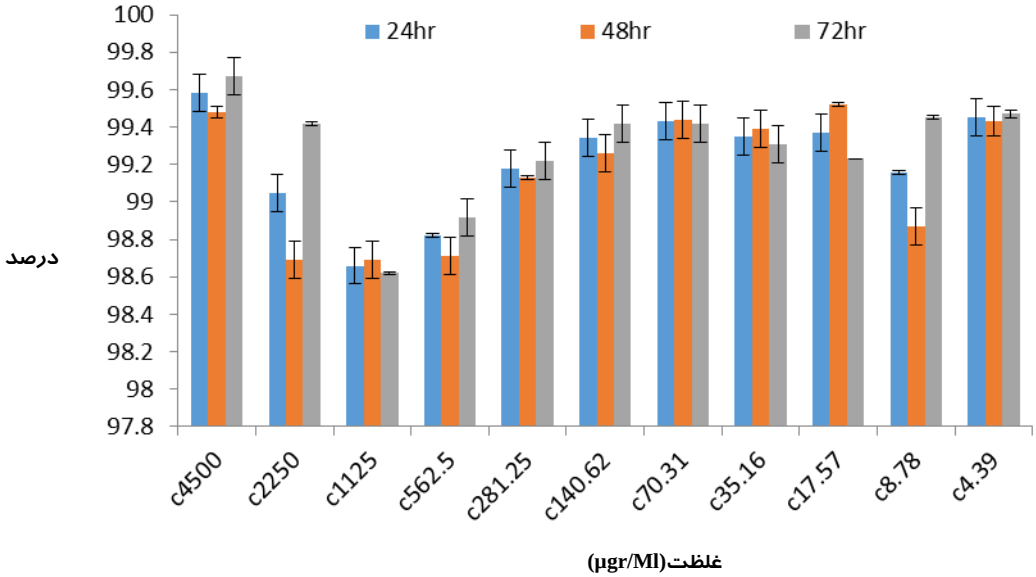
مقایسه میانگین بیان نسبی GST در سل لاین PC-3 به روش دانکن (در سطح اطمینان ۵٪) نشان داد که بیشترین بیان نسبی ژن در غلظت ۱۲۵۰ppm می‌باشد، اما غلظت‌های مورد مطالعه دیگر عملکرد بیان نسبی ژنی کمتری داشته اند (نمودار ۱).

[1] Efficiency
[2] Inhibition

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2024-12-26]



شکل ۱. تصاویر کشت MTT سل لاین PC_3 به ترتیب از چپ به راست: کنترل، 1ppmعصاره قره‌قات و 600 ppm عصاره قره‌قات



نمودار ۱. نمودار مقایسه بیان نسبی ژن GST در مقابل دوزهای مختلف عصاره قره‌قات

بحث

با توجه به نتایج مطالعه حاضر، آنتی‌اکسیدان‌ها و فلاوونوئیدهای طبیعی موجود در قره‌قات توانسته به میزان قابل توجهی رشد سلول‌های سرطانی را کنترل نماید. از طرفی طبق نتایج به دست آمده، کمترین دوز عصاره این گیاه قادر به ایجاد تغییرات معنادار در رشد سلول‌های سرطانی شده است.

مطالعات کمی در مورد آنتی‌اکسیدان‌های خاص در سرطان پروستات انجام شده و آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی معدودی در این مورد ارزیابی شده اند، از طرفی تمامی مطالعات در مورد تاثیر آنتی‌اکسیدان‌ها بر سرطان پروستات اتفاق نظر ندارند، اما مدارکی وجود دارد که بعضی آنتی‌اکسیدان‌های غذایی می‌توانند ریسک سرطان پروستات را تحت تاثیر قرار دهند [۲۳،۲۲]. در مطالعه حاضر در مقایسه با مطالعات گذشته بیشتر بر روی این موضوع تمرکز شد تا آنتی‌اکسیدان طبیعی موثری معرفی شود. آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی در پلاسما می‌توانند از طریق تعامل با ژن‌های التهابی ریسک سرطان پروستات را تحت تاثیر قرار دهند و بر روی ترمیم DNAی تغییر یافته و متیله شده اثر بگذارند. با اینکه مدارکی دال بر اثرگذاری بعضی آنتی‌اکسیدان‌ها بر خطر سرطان پروستات وجود دارد، اما عملکرد سایر آنتی‌اکسیدان‌ها در این مورد قطعی نیست و آنتی‌اکسیدان‌های مختلف

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2024-12-26]

اثرات متفاوتی روی ریسک ابتلا به سرطان پروستات دارند [۲۳]. بر اساس مطالعه مشابه دیگری، خاموشی اپی ژنتیک گلوتاتیون اس- ترانسفراز یک نشانه مولکولی برای سرطان پروستات انسانی است [۲٤] و در مطالعه حاضر، تاثیر آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی قره‌قات را روی بیان GST در سرطان پروستات بررسی گردید.

ساختار کروماتین و ژنوم برای تنظیم هومئوستازی سلول مهم است. استرس اکسیداتیو در فرآیند چند مرحله ای سرطان پروستات دخالت دارد. بررسی دخالت استرس اکسیداتیو در متیلاسیون DNA بسیار مورد توجه است. زیرا عواملی که از تولید و تجمع مزمن ROS پیشگیری کنند می‌توانند نقش مهمی در مداوای سرطان پروستات داشته باشند [۲۵]. آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و یا آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی استرس اکسیداتیو را در سلول‌ها از بین می‌برند. افزایش آسیب پذیری نسبت به استرس اکسیداتیو را که تخریب کننده ژنوم است می‌توان به نقص یا کمبود در آنزیمGST نسبت داد. این امر می‌تواند مشخصه بحرانی کارسینوژنز پروستات باشد و غیرفعال شدن GST باعث آسیب پذیری سلول به تخریب اکسیداتیو شود. هیپرمتیلاسیون پروموتور GST با کاهش سطح بیان در نئوپلازی‌های درون اپی تلیالی درجه بالا کشف و ردیابی شده است و بیان نشدن این آنزیم و هیپرمتیلاسیون آن در سرطان پروستات قطعی است [۲۶،۲۵]. الگوهای نابهنجار متیلاسیون DNA که در سلول‌های سرطانی دیده می‌شود شامل هیپومتیلاسیون کلی ژنوم و هیپرمتیلاسیون مناطق خاص مثل پروموتور ژن‌های سرکوبگر تومور از جمله ژن آنزیم گلوتاتیون اس- ترانسفراز می‌باشد. انحرافات متیلاسیون منطقه ای روی جزایر CpG این ژن منجر به غیرفعال شدن نسخه‌برداری از آن می‌شود. بنابراین توجه زیادی روی خاموش شدن ژن‌های سرکوبگر تومور در سرطان متمرکز شده است و توجه خاصی به فعال‌سازی مجدد و تحریک نسخه‌برداری این ژن‌ها از طریق جبران هیپرمتیلاسیون آنها می‌شود و بسیاری از مطالعات نشان داده اند که عوامل دمتیله کننده می‌توانند تومورزایی را کاهش دهند [۱٤].

بر طبق بسیاری از مطالعات آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی و گیاهی می‌توانند بیان GST را بازیابی نمایند. برای مثال وردی و همکاران نشان داده اند که فیتواستروژن‌های سویا متیلاسیون پروموتور DNAی GST و بعضی آنزیم‌های دیگر را در سلول‌های سرطان پروستات تغییر می‌دهند [۲۷]. در این مطالعه پس از تیمار سلول‌های سرطانی با آنتی‌اکسیدان طبیعی سطح بیان پروتئین GST افزایش یافته است که با نتایج مطالعه حاضر همسو است. همچنین نتایج هوانگ و همکاران مطابق با نتایج به دست آمده در مطالعه حاضر است [۲۸]. آنها گزارش کرده اند که ایزوتیوسیانات فنتیل که بیشتر در سبزیجات یافت می‌شود، بیان ژن خاموش شده GST را با مکانیسمی که دمتیلاسیون پروموتور را درگیر می‌کند بازیابی می‌کند.

در مطالعه دیگری هیچ رابطه ای بین حذف بیان ژن GST و سرطان پروستات مشاهده نشده است که این مورد با نتایج ما همخوانی ندارد و این ممکن است به علت تفاوت نوع رده سلولی مورد استفاده در دو آزمایش یا دخالت مکانیسم‌های اپی ژنتیکی دیگری باشد[۱].

با توجه به نتایج به دست آمده در مطالعه حاضر، می‌توان مشاهده کرد بیان ژن GST در سل لاین سرطانی پروستات (PC-3) که با غلظت‌های مختلف قره‌قات تیمار شده اند، نسبت به سلول‌های کنترل (بدون تیمار با قره‌قات) افزایش یافته و از حالت خاموشی نسبی در سلول‌های سرطانی کنترل به حالت فعال در سلول‌های تیمار شده با آنتی‌اکسیدان تغییر وضعیت داده است. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که با اثرگذاری آنتی‌اکسیدان‌های قره‌قات میزان متیلاسیون در ژن GST سلول‌های سرطانی پروستات

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2024-12-26]

کاهش یافته و ژن مزبور بازفعال شده است. هیپرمتیلاسیون پروموتر ژن‌های آنزیم سرکوبگر تومور گلوتاتیون S- ترانسفراز باعث خاموش شدن آن شده بیان این آنزیم را در سلول‌های سرطان پروستات انسانی کاهش می‌دهد. تیمارکردن سلول‌های سرطانی پروستات کشت داده شده (PC-3) با عصاره قره‌قات که حاوی آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی (مثل فلاوونوئیدها، آلکالوئیدها و آنتوسیانین‌ها) می‌باشد، باعث کاهش متیلاسیون پروموتر ژن گلوتاتیون s- ترانسفراز شده، آن را روشن می‌کند و بیان ژن مربوطه را افزایش می‌دهد. نتیجتاً mRNAی حاصل از نسخه برداری ژن GST افزایش بیان پیدا می‌کند [١٤].

افزایش آسیب پذیری نسبت به استرس اکسیداتیو را که تخریب کننده ژنوم است می‌توان به نقص یا کمبود در آنزیم GST نسبت داد. این امر می‌تواند مشخصه بحرانی کارسینوژنز پروستات باشد و غیرفعال شدن GST باعث آسیب پذیری سلول به تخریب اکسیداتیو شود. هیپرمتیلاسیون پروموتر GST با کاهش سطح بیان در نئوپلازی‌های درون اپی‌تلیالی درجه بالا کشف و ردیابی شده است و بیان‌نشدن این آنزیم و هیپرمتیلاسیون آن در سرطان پروستات قطعی است [۲۶،۲۵].

آنتی‌اکسیدان‌ها به طور گسترده ای به صورت مکمل‌های غذایی استفاده شده و با هدف پیشگیری از بیماری‌های مختلفی مثل سرطان مورد بررسی قرار گرفته اند [۲۹]. آنتوسیانین‌ها و فلاوونوئیدها ترکیبات اصلی و مهم قره‌قات هستند که اثرات خوبی به عنوان آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی از تخریب اکسیداتیو DNA توسط گونه‌های فعال اکسیژن جلوگیری می‌کنند [۳۰]. بنابراین آنتی‌اکسیدان‌های گیاه قره‌قات می‌توانند با کاهش متیلاسیون ژن GST بیان آنها را در سلول‌های سرطانی افزایش دهند.

شانکر و همکاران تاثیر بسزای متیلاسیون DNA را در بیان ژن‌های پیش برنده تومور تایید کرده اند [١٤].

همچنین پاندی و همکاران گزارش داده اند پلی فنل‌های گیاهی می‌توانند به هیپرمتیلاسیون پروموتور ژن GST کمک و بیان آن را افزایش دهند، که این دو نتیجه با نتایج مطالعه حاضر همخوانی دارد [٢٤].

در مطالعه دیگری که بر روی موش انجام شده نقص در آنتی‌اکسیدان‌ها سبب هیپومتیلاسیون کلی و هیپرمتیلاسیون در پروموتورهای TSG مثل پروموتور ژن GSTP شده است [۳۱]. لیکوپن‌ها نیز بیان ژن GST را از طریق کاهش متیلاسیون در سلول‌های سرطان سینه بازفعال می‌کند [۳۲] و در نهایت زیانگ نشان داده است که تیمار با سلنیت متیلاسیون کلی DNA را کاهش می‌دهد و باعث متیلاسیون نسبی پروموتور و بیان دوباره ژن‌های خاموش شده با متیلاسیون می‌شود [۳۳]. برای سرطال پروستات رده‌های سلولی کمی موجود است و این از محدودیت‌های مطالعه حاضر بود. همچنین مطالعات و پیشینه تحقیق کمی در این زمینه وجود داشت. برای مطالعات آینده پیشنهاد می‌شود اثر ترکیبات و آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی بیشتری بر روی رده سلولی سرطان‌های مختلف بررسی و معرفی گردد.

نتیجه گیری

با توجه به اینکه سرطان پروستات قابل پیشگیری‌ترین سرطان‌ها است، استراتژی پیشگیری نسبی از این بیماری باید شامل ترکیبی از پیشگیری‌های اولیه و دوری از عوامل آسیب زا باشد. تنظیم کاهشی حداقل یکی از خانواده ژن‌های GST در سرطان پروستات اتفاق می‌افتد و مکانیسم این سرکوب ژنی هیپرمتیلاسیون DNA است که در ناحیه پروموتور آن رخ می‌دهد و باعث خاموش شدن این ژن می‌گردد. استفاده بلند مدت آنتی‌اکسیدان‌ها می‌تواند قابلیت تقلیل دادن پاتوژنز سرطان پروستات را به ویژه در حالت پیشرفته داشته باشد. بر اساس یافته‌های این تحقیق میوه قره‌قات میزان بیان ژن GST را افزایش

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2024-12-26]

داده، اثر بازدارندگی بر روی رشد سلول‌های سرطان پروستات (سل لاین PC-3) دارد.

تشکر و قدردانی

از معاونت امور پژوهشی دانشگاه محقق اردبیلی به علت همکاری‌های علمی و فناوری مطالعه حاضر و از خانم مریم اسماعیل زاده به خاطر همکاری در اجرای این پژوهش در آزمایشگاه مولکولی دانشگاه آزاد اسلامی اردبیل سپاسگزاری می‌گردد. همچنین از خانم یاسمین پهلوان دانشجوی دکتری پزشکی مولکولی، جهت ویرایش علمی مقاله قدردانی می‌گردد. این مقاله حاصل پایان نامه دانشجوی کارشناسی ارشد گرایش ژنتیک می‌باشد که با کد ۲۲۰۳۰۵۰۳۹۴۱۰۰۹ در دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهر ثبت شده است.

References

1- Malik SS, Masood N, Yasmin A. Prostate cancer and glutathione S-transferase deletions. EXCLI. 2015 Sep;14:1049-54.

2- Feshani AM, Kouhsari SM, Mohammadi S. Vaccinium arctostaphylos, a common herbal medicine in Iran: Molecular and biochemical study of its antidiabetic effects on alloxan-diabetic Wistar rats. J Ethnopharmacol. 2011 Jan; 133(1):67-74.

3- Mousavi SM, Gouya MM, Ramazani R, Davanlou M, Hajsadeghi N, Seddighi Z. Cancer incidence and mortality in Iran. Ann Oncol. 2009 Mar; 20(3):556-63.

4- Fleshner N, Zlotta AR. Prostate cancer prevention: past, present, and future. Cancer. 2007 Nov; 110(9): 1889-99.

5- Kaighn ME, Narayan KS, Ohnuki Y, Lechner JF, Jones LW. Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3). Invest Urol. 1979 Jul;17(1):16-23.

6- Zhou TB, Drummen GP, Jiang ZP, Qin YH. GSTT1 Polymorphism and the Risk of Developing Prostate Cancer. Am J Epidemiol. 2014 Jun; 180 (1): 1-10.

7- Mavis CK, Kinney SR, Foster BA, Karpf AR. Expression level and DNA methylation status of glutathione-S-transferase genes in normal murine prostate and TRAMP tumors. Prostate. 2009 Sep ;69(12):1312-24.

8- Schnekenburger M, Karius T, Diederich M. Regulation of epigenetic traits of the glutathione S-transferase P1 gene: from detoxification toward cancer prevention and diagnosis. Front Pharmacol. 2014 Jul; 5(170): 1-7.

9- Qianling L, Jie J, Jianming Y, Mengkui S, Yun C, Lian Z, et al. Frequent Epigenetic Suppression of Tumor Suppressor Gene Glutathione Peroxidase 3 by Promoter Hypermethylation and Its Clinical Implication in Clear Cell Renal Cell Carcinoma. Int J Mol Sci. 2015 May; 16(5): 10636–10649.

10- Haghirasadat F, Nazari T, Omidi M, Azimzadeh M, Sheikhha MH. Investigating the rate of glutathione S-transferase T1 and M1 genes deletion in patients with lung cancer. HMJ. 2013 Nov;17(5):385-93.[full text in Persian]

11- Karagianni P, Rallis D, Fidani L, Porpodi M, Kalinderi K, Tsakalidis C, Nikolaidis N. Glutathion-S-Transferase P1 polymorphisms association with broncopulmonary dysplasia in preterm infants. Hippokratia. 2013 Oct; 17(4): 363–367.

12- Merlo A, Herman JG, Mao L, Lee DJ, Gabrielson E, Burger PC, et al. 5′ CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumor suppressor p16/CDKN2/MTS1 in human cancers. Nat Med. 1995 Jul; 1(7):686-92.

13- Singal R, van Wert J, Bashambu M. Cytosine methylation represses glutathione S-transferase P1 (GSTP1) gene expression in human prostate cancer cells. Cancer Res. 2001 Jun; 15;61(12): 4820-6.

14- Shukeir N, Pakneshan P, Chen G, Szyf, M, Rabbani, SA. Alteration of the methylation status of tumor-promoting genes decreases prostate cancer cell invasiveness and tumorigenesis in vitro and in vivo. Cancer Res. 2006 Sep;66(18): 9202-10.

15- Lee WH, Morton RA, Epstein JI, Brooks JD, Campbell PA, Bova GS, et al. Cytidine methylation of regulatory sequences near the pi-class glutathione S-transferase gene accompanies human prostatic carcinogenesis. Proc Natl Acad Sci USA. 1994 Nov ;91(24):11733-7.

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2024-12-26]

16- Re A, Aiello A, Nanni S, Grasselli A, Benvenuti V, Pantisano V, et al. Silencing of GSTP1, a prostate cancer prognostic gene, by the estrogen receptor-β and endothelial nitric oxide synthase complex. Mol Endocrinol. 2011 Dec; 25(12): 2003–2016.
17- Oyama T, Yasui Y, Sugie S, Tanaka T. Preclinical assays for identifying cancer chemopreventive phytochemicals. SJR. 2009 Apr;3814(2009):1-15
18- Khan N, Mukhtar H. Tea polyphenols for health promotion. Life Sci. 2007 Jul; 81(7): 519–533.
19- Emaad M. Identification the industrial- medical forest and pasture plants and their consumptions, 1st ed. Tehran: pooneh press, 1997: 45-51.[full text in Persian]
20- Singal R, Ginder GD. DNA methylation. Blood. 1999 Jun; 93(12): 4059-4070.
21- Ayaz FA, Hayirlioglu-Ayaz S, Gruz J, Novak O, Strand M. Separation, characterization, and quantitation of phenolic acids in a little-known blueberry (Vaccinium arctostaphylos L.) fruit by HPLC-MS. J Agric Food Chem. 2005 Oct;53(21):8116-22.
22- Emaad M, Gheybi F, Rasooli SM, Khanjanzadeh R, Jozani S. Industrial- medical plant: Ghareghat, 1st ed. Tehran: pooneh press, 2001:70-79.[full text in Persian]
23- Vance TM, Su J, Fontham ET, Koo SI, Chun OK. Dietary Antioxidants and Prostate Cancer: A Review. Nutr Cancer. 2013 Aug ;65(6):793-801.
24- Pandey M, Shukla S, Gupta S. Promoter Demethylation and Chromatin Remodeling by Green Tea Polyphenols Leads to Re-expression of GSTP1 in Human Prostate Cancer Cells. Int J Cancer. 2010 Jun;126(11): 2520–2533.
25- Vanaja DK, Ehrich M, Van Den Boom D, Cheville JC, Karnes RJ, Tindall DJ, et al. Hypermethylation of genes for diagnosis and risk stratification of prostate cancer. Cancer Invest. 2009 Jun; 27(5), 549–560.
26- Millar DS, Ow KK, Paul CL, Russell PJ, Molloy PL, Clark SJ. Detailed methylation analysis of the glutathione S-transferase π (GSTP1) gene in prostate cancer. Oncogene. 1999 Feb; 18(6): 1313–1324.
27- Vardi A, Bosviel R, Rabiau N, Adjakly M, Satih S, Dechelotte P. Soy phytoestrogens modify DNA methylation of GSTP1, RASSF1A, EPH2 and BRCA1 promoter in prostate cancer cells. In Vivo. 2010 Jul; 24(4): 393–400.
28- Huang J, Plass C, Gerhauser C. Cancer chemoprevention by targeting the epigenome. Curr Drug Targets. 2011 Dec; 12(13): 1925–56 .
29- Salim EI, Abd El-Magid AD, Farara KM, Maria DS. Antitumoral and antioxidant potential of egyptian propolis against the PC-3 prostate cancer cell line. Asian Pac J Cancer Prev. 2015 Jan; 16(17): ,7641-51.
30- Askari F, Edalati E, Kardoust Parizi M, Rashidkhani B. Effect of intake of red meat, processed meat, organ meat, fish, poultry on prostate cancer: A case control study. Iran J Nutr Sci Food Technol. 2013 Summer; 8(2): 183-170.[full text in Persian]
31- Zeisel SH. Dietary choline deficiency causes DNA strand breaks and alters epigenetic marks on DNA and histones. Mutat Res. 2012 May; 733(1-2): 34–38 .
32- King Batoon A, Leszczynska JM, Klein CB. Modulation of gene methylation by genistein or lycopene in breast cancer cells. Environ Mol Mutagen. 2008 Jan;49(1): 36–45.
33- Xiang N, Zhao R, Song G, Zhong W. Selenite reactivates silenced genes by modifying DNA methylation and histones in prostate cancer cells. Carcinogenesis. 2008 Nov; 29(11): 2175–81.

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2024-12-26]