Medical Journal
of
Tabriz University of Medical Sciences and Health Services

Original Article

The Impact of Natural Poly Phenols on Methyltransferase Gene Expression in Prostate Cancer Cells

Parisa Noktehsanj Avval[1], Mohammad Zaefizadeh[2*]

[1]Department of Biology, Faculty of Sciences, Ahar Branch, Islamic Azad University, Ahar, Iran
[2] Department of Biology, Faculty of Sciences, Ardabil Branch, Islamic Azad University, Ardabil, Iran
*Corresponding author; E-mail: mzaefi@aiuardabil.ac.ir, mzaefi@gmail.com

Received: 24 August 2017 Accepted: 21 September 2017 First Published online: 18 November 2019
Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2019 December-2020 January; 41(5):115-122

Abstract

Background: Transcriptionally silencing is related to abnormal methylation of tumor suppressor gene promoters by the enzyme of DNA methylase (DNMT1) in an alternate way in prostate cancer development. Ghareghate (acciniumarctostaphylos) have polyphenols and anthocyanins which may be investigated as natural antioxidants in prostate cancer cells treating.

Methods: In this study human invasive prostate cancer cell lines (PC3) were treated with various concentrations (156, 312, 625, 1250, 2500 µg/ml) of Ghareghate fruit extractions. DNMT1 expression levels and inhibition rates were assessed after 24, 48 hours by Q-RT-PCR and MTT test respectively.

Results: DNMT1 expression rates in pc3 cell line which treated with Ghareghate extractions, reduced significantly comparing to control cells ($p<0.001$). Moreover it has demonstrated that Ghareghate extractions can significantly increase inhibition of cancer cells grow ($p<0.001$). The highest relative decrease of gene expression observed in 625µg/ml.

Conclusion: Ghareghat extractions can be used as an antioxidant recourse for the purpose of cancer therapy and prevention.

Keyword: DNMT1, Methylation, Prostate Cancer

How to cite this article: Noktehsanj Avval P, Zaefizadeh M. [The Impact of Natural Poly Phenols on Methyltransferase Gene Expression in Prostate Cancer Cells]. Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2019 December-2020 January; 41(5):115-122. Persian.

© 2019 The Author(s). This is an Open Access article published by Tabriz University of Medical Sciences under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

مقاله پژوهشی

تاثیر پلی‌فنل‌های طبیعی در بیان نسبی ژن‌های متیل‌ترانسفراز در رده سرطانی پروستات

پریسا نکته سنج اول[۱]، محمد ضعیفی‌زاده[۲*]

[۱]گروه زیست‌شناسی (ژنتیک)، دانشکده علوم، واحد اهر،دانشگاه آزاد اسلامی، اهر، ایران
[۲]گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم،واحد اردبیل، دانشگاه آزاد اسلامی واحد، اردبیل، ایران
[*]نویسنده مسوول؛ ایمیل: mzaefi@aiuardabil.ac.ir

دریافت: ۱۳۹۶/۶/۲ پذیرش: ۱۳۹۶/۶/۳۰ انتشار برخط: ۱۳۹۸/۸/۲۷
مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی تبریز. آذر و دی ۱۳۹۸؛ ۴۱(۵):۱۱۵-۱۲۲

چکیده

زمینه: خاموش شدن نسخه‌برداری در ارتباط با متیلاسیون نابجای پروموتور ژن‌های سرکوبگر تومور توسط آنزیم متیله کننده DNA (*DNMT1*) راه دیگری برای ایجاد و توسعه سرطان پروستات می‌باشد. قره قاط با نام علمی *Vaccinium arctostaphylos* دارای ترکیبات پلی‌فنلی و آنتوسیانین است که می‌تواند به عنوان آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی در تیمار سرطان پروستات مورد بررسی قرار گیرد.

روش‌کار: سلول‌های تهاجمی رده سرطانی پروستات انسانی (PC3) با غلظت‌های مختلف از عصاره میوه قره قاط (۱۵۶، ۳۱۲، ۶۲۵،۱۲۵۰ و ۲۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) تیمار گردید. میزان بیان ژن *DNMT1* با روش Q-RT-PCR و میزان مهار رشد سلول‌های PC3 با آزمون MTT در دو فاصله زمانی ۲۴ و ۴۸ ساعته ارزیابی گردید.

یافته‌ها: نتایج به دست آمده نشان داد که میزان بیان ژن *DNMT1* در رده سلولی PC3 تیمار شده با عصاره قره قاط نسبت به حالت کنترل کاهش معناداری داشته است ($p<۰/۰۰۱$). از طرفی معلوم شد که عصاره قره قاط می‌تواند به طور معناداری باعث مهار رشد سلول‌های سرطانی شود ($p<۰/۰۰۱$)، در کل درصد مهار نسبی در هیچ‌کدام از غلظت‌ها به پایین‌تر از ۹۹ درصد نرسید. بیشترین میزان کاهش بیان نسبی مربوط به غلظت ۶۲۵ بود.

نتیجه‌گیری: گیاه قره قاط می‌توان به عنوان منبع آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی برای پیشگیری و حتی درمان سرطان پروستات انسانی مورد آزمایش و ارزیابی کلینیکی قرار داد تا شاید بتوان قدمی در راه پیشگیری و مبارزه با سرطان پروستات برداشت.

کلید واژه‌ها: DNMT1، Q-RT-PCR، سرطان پروستات

نحوه استناد به این مقاله: نکته‌سنج اول پ، ضعیفی‌زاده م. بررسی تاثیر پلی‌فنل‌های طبیعی در بیان نسبی ژن‌های متیل‌ترانسفراز در رده سرطانی پروستات. مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی تبریز. ۱۳۹۸؛ ۴۱(۵):۱۱۵-۱۲۲

حق تألیف برای مؤلفان محفوظ است.
این مقاله با دسترسی آزاد توسط دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی تبریز تحت مجوز کریتیو کامنز (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0) منتشر شده که طبق مفاد آن هرگونه استفاده تنها در صورتی مجاز است که به اثر اصلی به نحو مقتضی استناد و ارجاع داده شده باشد.

مقدمه

پروستات بزرگترین غده ضمیمه دستگاه تناسلی مردان است که مجرای ادرار را در گردن مثانه احاطه می‌کند. ترشح پروستات مایعی یکنواخت و کمی اسیدی (PH= ۶/۶) با محتوای پروتئین کم (کمتر از ۱ درصد) می‌باشد (۱). سرطان پروستات در اثر رشد بدخیم سلول‌های پروستات در داخل آن ایجاد می‌شود که در طی سال‌ها در درون پروستات رشد می‌کند. اما به مرور زمان به بیرون از پروستات گسترش یافته سایر بافت‌ها را هم تحت تاثیر قرار می‌دهد (۲). سرطان پروستات دومین سرطان شایع در مردان در دنیا می‌باشد (۳)، از طرفی هم مصرف گسترده داروهای رایج ضد سرطان از قبیل Taxan و Antrasyclin ها موجب ایجاد مقاومت‌های درمانی می‌شوند به‌طوری که سایر گزینه‌های درمانی را نیز محدود می‌کنند (۴). لذا لازم است که از یک روش تداوی تکمیلی یا جایگزین مثل روش‌های تغذیه‌ای استفاده کنیم. از آن‌جا که آنتی‌اکسیدان‌ها موثرترین مواد طبیعی جهت رسیدن به این هدف می‌باشند، پلی‌فنل‌های طبیعی به‌عنوان ترکیبات آنتی‌اکسیدانی می‌توانند با اعمال خاصیت ضدسرطانی در این مورد موثر واقع شوند (۳). در حال حاضر علاوه بر جراحی و داروها و مواد شیمیایی رایج، پیشگیری اولیه توسط مواد شیمیایی مختلف و داروهای گیاهی نیز در کنترل انواع سرطان روش‌های مناسبی هستند. اغلب داروهای گیاهی به علت عدم وجود عوارض جانبی اهمیت بیشتری در پیشگیری و درمان انواع سرطان دارند (۵). سرطان پروستات به خاطر میزان بروز، شیوع و مرگ ناشی از آن یک موضوع جالب و مناسب برای پیشگیری اولیه است. اولاً این بیماری یک نوع بدخیمی است که قبل از این‌که نشانه‌ها پدیدار شوند و نهایتاً تشخیص بیماری محرز شود، بسیار آهسته رشد می‌کند. ثانیاً به خاطر دوره نهفتگی بلند نوعاً در مردان بالای ۵۰ سال تشخیص داده می‌شود (۶). پیشگیری شیمیایی به کارگیری هدفمند مواد طبیعی یا مصنوعی برای متوقف کردن روند سرطان‌زایی قبل ازرسیدن آن به مرحله‌ای است که از لحاظ کلینیکی قابل ردیابی باشد. پیشگیری شیمیایی به معنای مهار یا به تاخیر انداختن شروع Neuplasia و هم‌چنین معکوس نمودن روند رشد و پیشروی سلول‌های تغییر شکل یافته قبل از پیدایش ضایعات بدخیم می‌باشد (۷). گیاه قره قاط متعلق به خانواده *Ericaceae* می‌باشد. آنتوسیانین‌ها و فنل‌ها از مهم‌ترین ترکیبات این گیاه می‌باشند تاکنون مطالعاتی درخصوص بررسی مواد موثر برگ و میوه این گیاه انجام شده است و بررسی متابولیت‌های آن نشان داده است میوه‌های رسیده قره قاط حاوی سه آنتوسیانین اصلی می‌باشد. برگ و میوه گیاه دارویی قره قاط سرشار از ترکیبات فنلی بوده و نیز خاصیت آنتی‌اکسیدانی داشته بنابراین می‌توان از آن به عنوان یک منبع گیاهی که دارای ترکیبات آنتی‌اکسیدانی است در صنایع غذا و دارو استفاده کرد (۸). میوه و برگ قره قاط بخش دارویی گیاه را تشکیل می‌دهد (۸). دانه ی قره قاط حاوی حدود ۸۸ درصد آب است. بقیه مواد شامل آنتوسیانین که در میوه‌های تازه ۱ تا ۲۵ درصد نوسان بوده ولی در عصاره غلیظ شده‌ی این میوه، ۲۵ درصد می‌باشد. اکثر این آنتوسیانین‌ها به شکل گلوکزید هستند و تنها مقدار کمی در طبیعت و در این گیاه به صورت آزاد می‌باشند (۹). متیلاسیون DNA موضوع جالبی در معالجه سرطان است که در سال‌های اخیر بسیار مورد توجه قرار گرفته است. از لحاظ نظری استفاده از یک مهار کننده متیلاسیون DNA مثل ۵- آزا- ´۵- داکسی سیتیدین (۵- آزا dc) و زبولارین می‌تواند روند متیلاسیون را برعکس کند و به کارگیری ۵- آزا dc می‌تواند پیشروی سرطان پروستات را در موش مهار کند (۱۰). انحراف از متیلاسیون طبیعی درCpG و هیپرمتیلاسیون پروموتر جزایر برخی از ژن‌ها، مکانیسم رایجی در بروز سرطان است. مکانیسمی که از آن به عنوان تغییرات اپی‌ژنتیک نام برده می‌شود (۱۱). اپی‌ژنتیک به ویژه تغییر در سیتوزین‌های واقع در دی‌نوکلئوتیدهای CpG به‌عنوان هدفی در مقابله با سرطان، توجه زیادی به خود جلب کرده است. یکی از تغییرات اصلی که در ارتباط با حلقه‌های سیتوزین در دی‌نوکلئوتیدهای CpG می‌باشد، متیلاسیون است. هم‌چنین بدخیمی‌ها عموماً تابع هیپومتیلاسیون گستردهٔ DNA در ژن‌های پیش برندهٔ تومور و نیز هیپرمتیلاسیون DNA در مکان‌های خاص مربوط به ژن‌های سرکوبگر تومور می‌باشد (۱۱و۱۲). متیلاسیون سیتوزین DNA توسط خانواده کوچکی از آنزیم‌های متیل‌ترانسفراز DNA (*Dnmt*) شامل *Dnmt*۱، a3*Dnmt* و b3*Dnmt* کاتالیز می‌شود. نشان داده شده است که سطح پروتئین *Dnmt*۱ و فعالیت آن در سرطان پروستات بالا می‌رود (۱۰و۱۳). آنزیم اصلی که مسئول اضافه کردن گروه‌های متیل به موقعیت ۵ سیتوزین در موتیف دی‌نوکلئوتید CG می‌باشد همان متیل‌ترانسفراز (سیتوزین-۵) DNA است. ژن مربوط به آن روی بازوی P کروموزوم شماره ۱۹ قرار گرفته است (۱۴). رده سلول سرطانی و بیوپسی تومور افزایش سطح پروتئین *Dnmt*۱ و فعالیت آن را نشان داده‌اند. هم‌چنین نشان داده شده است که هیپرمتیلاسیون منطقه پروموتور می‌تواند نسخه‌برداری از ژن هدف و ازجمله ژن سرکوبگر تومور $p16^{INK4a}$ *p14*^{ARF} و BRCA1 را مهار کند (۱۵). همانند سایر بدخیمی‌های انسانی، سرطان پروستات با تغییرات اپی‌ژنتیک مشخص می‌شود برای مثال ژن‌ها و پروتئین‌های*DNMT* در بافت‌ها و سل‌لاین سرطان پروستات بیش از حد بیان می‌شوند. به‌علاوه ژن‌های متعددی توسط هیپرمتیلاسیون DNA در سرطان پروستات خاموش می‌شوند که شامل ژن‌هایی هستند که در پاسخ هورمونی ترمیم خرابی DNA و کنترل چرخه سلولی درگیر هستند (۱۶). هیپرمتیلاسیون ژن‌های خاص ظاهراً در طول پیشروی سرطان پروستات نسبتاً زود اتفاق می‌افتد به‌طوری‌که

خیلی زود و همزمان با مرحله نئوپلازی بین‌اپی‌تلیالی پروستات ایجاد می‌شوند (۱۰). یک ویژگی کلیدی مراحل آخر سرطان پروستات تنظیم کاهشی ژن‌های سرکوبگر تومور و تنظیم افزایشی ژن‌های پیش برنده یا محرک تومور می‌باشد (۱۲). تغذیه می‌تواند فرآیند اپی‌ژنتیک را در نقاط متعدد در متیلاسیون DNA تحت تاثیر قرار دهد (۱۷). اولاً منابع غذایی مهم‌ترین منبع گروه‌های متیل هستند و نیز می‌توانند به عنوان کوآنزیم‌هایی برای متابولیسم تک‌کربنی عمل کنند که نقل و انتقال متیل را درسنتز DNA تنظیم می‌کنند. ثانیاً تعدادی از مواد شیمیای در مواد غذایی گیاهی با تاثیر بر روی فعالیت آنزیم‌هایی مثل DNA متیل‌ترانسفرازسیتوزین-۵ (*DNMT*) فرآیند اپی‌ژنتیک را دچار تحول می‌کنند. ثالثاً این ترکیبات می‌توانند به گیرنده‌های این آنزیم‌ها چسبیده بیان ژن را تغییر دهند و منجر به بیان کمتر آنزیم‌های متیله کننده شوند (۱۸). هدف از مطالعه حاضر، بررسی اثرات مهاری عصاره گیاه قره قاط بر مهار رشد رده سلولی سرطان پروستات می‌باشد.

روش‌کار

مطالعه حاضر یک مطالعه تجربی است. رده سلولی سرطان پروستات انسانی PC-3 تهیه شده از بانک سلولی انستیتوپاستور در محیط کشت (ATOCell) PRMI1640 همراه با ۱٪ آنتی‌بیوتیک Pen/Strep و ۱۰٪ حجمی FBS کشت داده شد. گیاه قره قاط استفاده شده برای این مطالعه بومی مناطق شمال غربی ایران می‌باشد. برای استخراج پلی‌فنل ازمیوه قره قاط، پودر میوه قره قاط در آب حل و همگن و سپس سانتریفیوژ شد. محلول رویی جمع‌آوری و در داخل فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد قرار داه شد تا منجمد شود. برای تهیه پودر این عصاره آبی از دستگاه freeze dryer استفاده شد. پودر حاصله را می‌توان در ظرف آزمایشگاهی به مدت طولانی در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری و در مراحل بعدی مورد استفاده قرار داد. در پلیت ۹۶ خانه، در هر چاهک ۸ هزار سلول PC3 همراه با 200 µl محیط کشت کامل (محیط RPMI 1640 به همراه FBS10 ٪) کشت داده شد. پس از ۲۴ ساعت محیط سلول‌ها تعویض شد و به هر چاهک 200 µl محیط RPMI 1640 همراه با غلظت‌های مختلفی از عصاره پلی‌فنلی (۱۵۶، ۳۱۲، ۶۲۵، ۱۲۵۰ و ۲۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) اضافه شد. غلظت‌ها بر اساس تجربه در مطالعات گذشته انتخاب شد (۱۹). سپس پلیت در فویل پیچیده و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور تحت شرایط $37^{\circ}C$، ۵٪ CO_2 و رطوبت ۹۵٪ قرار داده شد. برای ارزیابی میزان تکثیر از روش (۳-(۴,۵-Dimethylthiazol-2-Yl)-2,5-Diphenyltetrazolium MTT Bromide استفاده شد. پس از ۲۴ ساعت تیمار با عصاره، محیط داخل هر چاهک خالی و مجدداً به هر چاهک 180 µl محیط بدون FBS به همراه 20 µl محلول 5 (MTT میلی‌گرم MTT در یک میلی‌لیتر PBS با pH= ۷/۲) اضافه شده به مدت ۲-۳ ساعت انکوبه شد. سپس محیط داخل چاهک خالی شده و به هر چاهک ۱۰۰میکرولیتر DMSO اضافه شده به مدت ۱۰ دقیقه تکان داده شد تا فورمازون تولید شده توسط سلول‌های زنده در DMSO کاملاً حل شود. OD نمونه در ۵۴۰-۴۹۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. استخراج RNA از بافت کشت داده شده سل لاین PC-3 با استفاده از روش ترایزول انجام گرفت. پس از اضافه شدن محلول Trizol و کلروفرم به درون سلول‌های تریت شده و انکوباسیون وسانتریفیوژ سه فاز (به ترتیب از بالا به پایین RNA لایه سفید رنگ پروتئین Trizol و کلروفرم) تشکیل شد. پس از برداشت مقدار سه چهارم از محلول رویی و شفاف و اضافه کردن محلول ایزوپروپانول سرد، در یخچال انکوبه شده رسوب RNA به صورت نقطه سفید رنگ تشکیل شد. با استفاده از الکل رسوب جدا شده آب حاوی محلول DEPC جهت حل شدن RNA اضافه شد. بررسی کیفیت و کمیت mRNA پس از استخراج آن با روش اسپکتروفتومتری (نانودراپ) انجام شد (۲۰). برای بررسی مقایسه‌ای بیان ژن DNMT1 در غلظت‌های مختلف عصاره پلی‌فنلی قره قاط از تکنیک Q-Real-time PCR استفاده شد. در این تکنیک RNA کل استخراج شده، با استفاده از آنزیم کپی‌برداری معکوس و پرایمرهای کیت مربوطه، به‌cDNA تبدیل شد. خلوص cDNA سنتز شده با استفاده از تفکیک بارگذاری روی ژل آگاروز نیم درصد تعیین شد. تمامی پرایمرها در جدول ۱ طبقه‌بندی شده‌اند. واکنش PCR در حجم ۲۰ میکرولیتر (Sybergreen) و در ۴۰ چرخه انجام گردید. آنالیز نسبی در سطح mRNA با روش Pfaff و با استفاده از فرمول ((ΔCT نمونه هدف)- (ΔCTکالیبره کننده)) =ΔΔCT انجام شد. ΔCT عبارت است از CT ژن هدف (DNMT1) که از CT ژن خانه زاد (*GAPDH2*) کسر شده است. این عدد بازگو می‌کند که تیمار ما موجب افزایش چند برابری ساخت mRNA هدف شده است. تمامی آزمایش‌ها سه بار تکرار شد.

جدول ۱: توالی پرایمرهای مورد استفاده در Real-time PCR

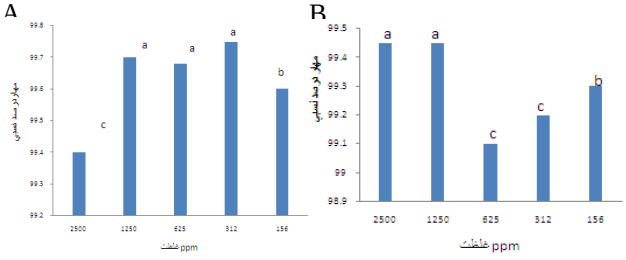
SEQUENCE	Direction	Gene
۵'-CCATCAGGCATTCTACCA-'۳	Forward	DNMT1
۵'-CGTTCTCCTTGTCTTCTCT-3'	Reverse	
۵'-AGG GCT GCT TTT AAC TCT GGT -3'	forward	GAPDH2
۵'-CCC CAC TTG ATT TTG GAG GGA -3'	reverse	

از نرم‌افزار SPSS برای مطالعه آماری داده‌های MTT برای مقایسه اختلاف معنی‌دار بین گروه‌ها (غلظت) از لحاظ OD در سطح احتمال کمتر از ۱٪ از آزمون *ANOVA* و دانکن استفاده شد. بررسی ارجحیت غلظت‌ها از لحاظ OD توسط آزمون *Duncan* مورد بررسی قرار گرفت و از معادله‌ی رگرسیون جهت تعیین

درصد خطی‌بودن نمودار و میزان R2 استفاده شد. برای تعیین متوسط کارآیی از *LinReg* استفاده شد.

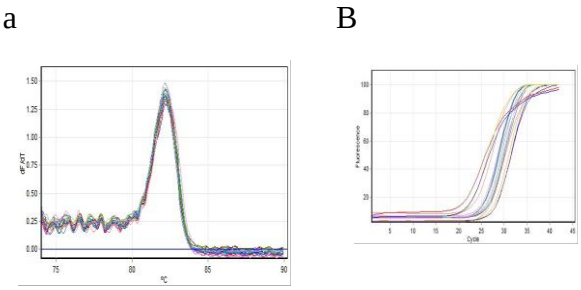
یافته‌ها

به منظور بررسی اثر غلظت‌های مختلف پلی‌فنل‌های قره قاط بر روی میزان مهار رده سلول‌های سرطانی PC3 از آزمون MTT استفاده شد. نتایج آزمون تجزیه واریانس فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی برای داده‌های مهار در MTT و نتایج آزمون F نشان می‌دهد که بین غلظت‌های مختلف پلی‌فنل‌های قره‌قاط از نظر میزان مهار رشد سلول‌های سرطانی PC3 تفاوت معناداری وجود دارد (P<۰/۰۰۱). بدین معنی که مهارشدگی سلول‌های سرطانی PC3 وابسته به غلظت پلی‌فنل‌های قره قاط بوده است. بین ساعت تیمار اختلاف معناداری وجود نداشت اما اثر متقابل زمان تیمار و غلظت تیمار معنی‌دار بود. آزمون تعقیبی دانکن در سطح احتمال ۰/۰۵ برای تعیین مناسب‌ترین غلظت انجام شد. این آزمون پس از تیمار ۲۴و ۴۸ ساعته سلول‌های PC3 با عصاره پلی‌فنلی قره قاط انجام شد که نتایج آن به ترتیب در شکل ۱ آمده است. همان‌طوری که می‌توان مشاهده کرد افزایش میزان مهار نسبی مستقل از افزایش غلظت عصاره تیمار شده است و در شکل ۱ پایین‌ترین درصد مهار در بالاترین غلظت مشاهده می‌گردد. همچنین غلظت ppm1250 از نظر میزان مهار رشد در هردو نمودار، در رتبه a (بالاترین) قرار گرفته است. در کل درصد مهار نسبی در هیچ‌کدام از غلظت‌ها به پایین‌تر از ۹۹ درصد نرسیده است که نتیجه قابل توجهی است. با توجه به نتایج سنجش MTT با افزایش غلظت عصاره پلی‌فنلی قره قاط، مهارکنندگی افزایش یافته است.



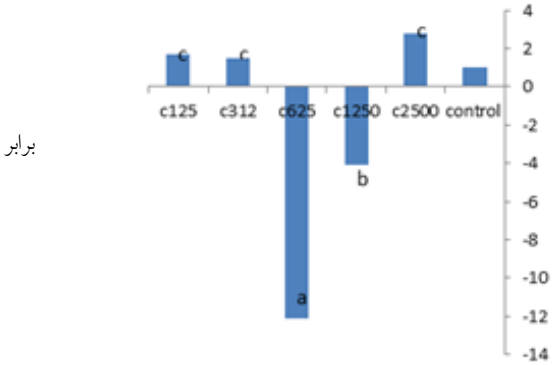
شکل۱: نتایج مقایسه میانگین میزان کنترل رشد سلول‌های سرطانی در غلظت‌های متفاوت عصاره قره قاط (a) پس از ۲۴ ساعت و (b) پس از ۴۸ ساعت اعمال تیمار به روش دانکن در سطح احتمال ۵٪ (حروفات نامشابه نشان دهنده معنی‌داری بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۵٪ می‌باشد).

برای محاسبه میزان کارآیی PCR از ضریب رگرسیون سریال دایلوشین غلظت cDNA در مرحله تکثیر استفاده شد. با توجه به نتایج به‌دست آمده کارآیی تکثیر بالا بوده برابر با ۰/۱۰۰ می‌باشد. آزمون آماری ANOVA برای غلظت‌های مختلف عصاره پلی‌فنلی قره قاط از نظر بیان نسبی ژن DNMT1 معنادار بود (P<۰/۰۰۱). یعنی ژن هدف در سلول‌های سرطان پروستات انسانی PC3 که با عصاره قره قاط تیمار شده‌اند نسبت به وضعیتی که این تیمار وجود ندارد (کنترل) افزایش بیان پیدا کرده است (شکل ۲).



شکل۲: نمودار لگاریتمی (a) بیان ژن و (b) تکثیر اختصاصی (MT) برای ژن *DNMT1* در Real Time PCR

شکل ۳ میزان بیان ژن DNMT1 را در نمونه سلول‌های سرطانی پروستات انسانی در دو سطح کنترل (بدون تیمار با عصاره پلی‌فنلی قره قاط) و تست (تیمار با غلظت‌های مختلف قره قاط) نشان می‌دهد. میزان بیان در سلول‌های سرطانی در مقایسه با غلظت پلی‌فنل‌های قره قاط به کار رفته برای تیمار آن‌ها کاهش معناداری نشان می‌دهد. همان‌طور که مشاهده می‌شود، در نمونه کنترل که با عصاره قره قاط تیمار نشده میزان بیان بسیار کمتر است و بیشترین میزان کاهش بیان نسبی مربوط به غلظت ۶۲۵ است که در گروه a قرار گرفته بود.



شکل۳: بیان نسبی ژن DNMT1 در غلظت‌های مختلف عصاره قره قاط در سل‌لاین پروستات PC3

بحث

نتایج این پژوهش نشان داد که عصاره آنتی‌اکسیدانی‌فنلی و آنتوسیانین قره قاط بر روی مهار ژن متیل‌ترانسفراز نقش موثر و معناداری داشته است. بنابراین فرضیه این‌که عصاره پلی‌فنلی و آنتوسیانینی قره قاط بر روی بیان و همچنین مهار ژن *DNMT1*

موثر است، از طریق این مطالعه به اثبات رسید. در سال‌های اخیر متیلاسیون DNA به عنوان موضوعی جالب در درمان سرطان مورد توجه است. از طرفی تغییرات اپی‌ژنومی در الگوی متیلاسیون DNA در سرطان پروستات محرز شده است (۲۱و۲۲). افزایش سطح و افزایش فعالیت آنزیم‌های *DNMT* (آنزیم متیلاسیون DNA) در سرطان پروستات انسانی دیده شده است. از طرفی نشان داده شده است که بعضی آنتی‌اکسیدان‌های غذایی دارای فعالیت پیشگیرانه و درمانی در مقابل سرطان هستند (۱۰). قره قاط و ترکیبات آن نیز می‌توانند با تکیه بر ترکیبات آنتی‌اکسیدانی خود (آنتوسیانین، فلاوونوئید و آلکانوئید) پتانسیل ضدتوموری داشته باشند (۹). با توجه به این موارد در این مطالعه سعی شده است تاثیر آنتی‌اکسیدان‌های گیاه قره قاط و دمتیلاسیون DNA بر سرطان پروستات به صورت دوجانبه در رده سلولی PC3 اندازه‌گیری شود. امروزه نقش آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی که قابلیت پاکسازی اکسیدان‌ها و رادیکال‌های آزاد را دارند برای حفظ سلامت انسان مورد توجه قرار گرفته است. اکسیدکننده‌ها مسئول شروع بیماری‌هایی مثل سرطان هستند. اثرات آنتی‌اکسیدانی می‌توانند نتیجه ترکیب پاکسازی رادیکال‌های آزاد و تعامل با عملکرد آنزیم‌هایی مثل *DNMT1* باشند. خواص آنتی‌اکسیدانی قره قاط قطعاً به ترکیب شیمیایی آن برمی‌گردد. بسیاری از مطالعات وجود آنتوسیانین‌ها، فلاوونوئیدها (شامل فلاوون، فلاوونول، فلاوونون و دی‌هیدروفلاوونول‌ها) و آلکالوئید را به عنوان ترکیبات اصلی و فعال قره قاط معرفی می‌کنند که فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی بالقوه دارند (۹). تحقیقات کلینیکی بسیار کمی در مورد تاثیر منابع آنتی‌اکسیدانی آنتوسیانین و فلاوونوئیدی مثل قره قاط بر متیلاسیون DNA وجود دارد. در یک مطالعه که توسط Yuasa و همکاران انجام شده است وضعیت متیلاسیون ۶ ژن در سرطان معده در رابطه با عادات غذایی انجام شده است و نشان داده شده که دیواره معده به اثرات مهارکنندگی *DNMT* توسط آنتی‌اکسیدان‌ها پاسخ می‌دهد (۲۲). همچنین بر اساس مطالعه‌ای که توسط Lim و Song انجام شده، ادعا شده است که سطح متیلاسیون کلی برخی ژن‌ها در لنفوسیت‌ها به خاطر رژیم غذایی فاقد آنتی‌اکسیدان افزایش می‌یابد (۲۳). فرآورده‌های طبیعی منبع ارزان، عالی و مطمئنی برای ایجاد و توسعه زمینه کشف داروهای ضدسرطان هستند. قره قاط و ترکیبات آن می‌توانند پتانسیل ضدتوموری داشته باشند. مطالعات بسیار کمی در این مورد صورت گرفته است (۲۴). در مطالعه حاضر، تاثیر آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی در قره قاط را بر کنترل رشد سلول‌های سرطانی پروستات در رده سلولی PC3 با استفاده از روش QRT-PCR بررسی کردیم. داده‌های مطالعات آزمایشگاهی نشان داد که تیمار با عصاره قره قاط منجر به تغییراتی در رشد سلول‌های سرطانی شده بیان ژن *DNMT* را در آن کاهش می‌دهد. جالب است که نتایج ما نشان داده‌اند حتی کمترین مقدار از این عصاره می‌تواند بر رشد رده سلول‌های سرطانی PC3 اثر بگذارند. این داده‌ها نشان دهنده اثربخشی قوی عصاره این گیاه در دوزهای مختلف می‌باشد. این نتایج با یافته‌های Ferguson و همکاران همسو است که آن‌ها اثر مهارکنندگی بخش فلاوونوئیدی قره قاط مربوط به کانادا و لندن را بر سلول‌های تومور انسانی تایید کرده‌اند (۱۹). همچنین Déziel و همکاران اثر قره قاط آمریکایی (*Vaccinium arctostaphylos*) را بر سرطان پروستات انسانی اثر مهارکنندگی گزارش کرده‌اند (۲۵). اثرات پیشگیرانه قره قاط می‌تواند به خاطر کاهش استرس اکسیداتیو و اثرات محافظتی آنتی‌اکسیدان‌های این میوه باشد اما از طرفی خواص ضدسرطانی این میوه می‌تواند به خاطر ترکیبات غذایی متعدد و بیواکتیو آن باشد که ممکن است در الگوهای متیلاسیون DNA دخالت داشته باشد. تغییرات کلی متیلاسیون DNA در سرطان با تغییرات سازگار در چند مسیر سیگنال‌دهی همبستگی دارد که می‌تواند از تغذیه و سبک زندگی تاثیر بپذیرد (۲۶). فاکتورهای غذایی می‌توانند در تامین گروه متیل که برای شکل‌گیری SAM (کوآنزیمی که در انتقال گروه متیل نقش دارد) لازم هستند، ایفای نقش کنند. به‌علاوه این عوامل می‌توانند استفاده از گروه‌های متیل با فرآیندهایی که فعالیت *DNMT* را درگیر می‌کنند، تغییر دهند و نهایتاً این‌که الگوهای متیلاسیون DNA می‌توانند پاسخ به ترکیبات بیواکتیو غذا را متاثر سازند (۲۶). مهار *DNMT* به ویژه *DNMT*۱ باعث بلوکه شدن هیپرمتیلاسیون DNAی تازه سنتز شده و بیان دوباره ژن‌های خاموش شده می‌شود. این موضوع توسط مطالعات گوناگونی که با مهار کننده‌های *DNMT* انجام داده‌اند ثابت شده است (۲۷و۲۸). بنابراین بازدارنده‌های این آنزیم می‌توانند دردرمان سرطان مورد توجه قرار گیرند و پتانسیل بالایی برای توسعه این گروه از مهار کننده‌ها برای درمان سرطان وجود دارد اما در مورد عوارض جانبی و سمیت آن‌ها باید دقت شود. در این مطالعه حاضر، مهار *DNMT1* توسط عصاره قره قاط و اثرات تیمار با آن روی کنترل رشد سلول‌های سرطانی در رده سلولی PC3 بررسی شد و نشان داده شد که کاهش بیان آنزیم *DNMT1* در غلظت ۶۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر و مهار رشد سلول‌های سرطانی با اعمال تیمار تقریباً در همه غلظت‌ها صورت گرفته است.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان می‌دهد آنتی‌اکسیدان‌های عصاره میوه قره قاط می‌توانند در دوزهای مختلف باعث مهارکنندگی آنزیم DNA متیل‌ترانسفراز و کاهش بیان ژن‌های متیله‌کننده ژن‌ها و نهایتاً دمتیلاسیون ژن‌های متیله شود و با روشن‌کردن بیان این ژن‌ها رشد سلول‌های سرطانی پروستات را در رده سلولی PC3 کنترل نماید. همین عامل می‌تواند یکی از مکانیسم‌های کنترل سلول‌های سرطانی PC3 باشد چرا که آزمون MTT هم این نتیجه را توجیه می‌کند.

قدردانی

از معاونت امور پژوهشی دانشگاه محقق اردبیلی و بابت همکاری‌های علمی و فناوری، خانم مریم اسماعیل‌زاده که در اجرای پروژه در آزمایشگاه ژنتیک مولکولی دانشگاه ازاد اسلامی اردبیل همکاری داشتند، سپاسگزاریم. این مقاله حاصل پایان‌نامه دوره کارشناسی‌ارشد خانم پریسا نکته‌سنج دانشجوی کارشناسی‌ارشد گرایش ژنتیک می‌باشد که با کد ۲۲۰۳۰۵۰۳۹۴۱۰۰۵ در دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهر ثبت شده است.

References

1. Haji babaie M. *Study GGC repeat polymorphism in exon 1 of eRF3/GSTP1 and its association with Risk of prostate cancer in Isfahan area*. Tavassoli M; Isfahan university: 2000.(Persian)
2. Http://niazemarkazi.com/papers free pdf articles
3. Alvaro M A, Edith A P. Treatment options for breast cancer resistant to anthracyciline and taxane. *Mayoclin Pro* 2009; **84**(6): 533-545.
4. Henning M S, Wang P, Carpenter C L, Heber D. Epigenetic effects of green tea polyphenols in cancer. *Epigenomes* 2013; **5**(6): 729-741. doi: 10.2217/epi.13.57
5. Takero O, Ymiko Y, Shigeyuki S, Takuji T. Preclinical assay for identifying cancer chemo preventive phytochemicals. *Scholary research exchange* 2009; **18**: 1-15.
6. Khan N, Adhami V M, Mukhtar H. Review: Green Tea Polyphenols in Chemoprevention of Prostate Cancer Preclinical and Clinical Studies. *Nutr Cancer* 2009; **61**(6): 836-841. doi: 10.1080/01635580903285056
7. Gupta S, Mukhtar H. Green tea and prostate cancer. *Urol Clin* 2002; **6**: 49-57.
8. Sedaghathoor Sh, Kashi A K, Talae A R, Khalighi A. Essential oils of Qare-Qat (Vacciniumarctostaphylos) shoots and chemical composition of berries. *Int J Agr Biol* 2006; **1**: 45-46.
9. Emaad M, Gheybi F, Rasooli S M, Khanjanzadeh R, Jozani S. Industrial- medical plant: Ghareghat, 1st ed. Tehran, Pooneh press, 2001. (In Persian)
10. 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; **126**(12): 2520-2533. doi: 10.1002/ijc.24988
11. Noori Daloii M R, Ebrahimzadeh Vesal E. Molecular genetics, diagnosis, prevention and gene therapy in prostatic cancer: review article. *Tehran university medical journal* 2009; **67**(1): 1-14. (In Persian).
12. Shukeir N, Pakneshan P, Chen G, Szyf M, Rabbani Sh. Alteration of the Methylation Status of Tumor-Promoting Genes Decreases Prostate Cancer Cell Invasiveness and Tumorigenesis In vitro and In vivo. *Cancer Res* 2006; **66**: 9202. doi: 10.1158/0008-5472.can-06-1954
13. Parkin D M, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global Cancer Statistics. *Cancer* 2005; **55**: 74-108. doi: 10.3322/canjclin.55.2.74
14. Campbell P M, Szyf M. Human DNA methyltransferase gene DNMT1 is regulated by the APC pathway. *Oxford Journals* 2003; **24**(1): 17-24. doi: 10.1093/carcin/24.1.17
15. Esteller M, Fraga M F, Guo M. DNA methylation patterns in hereditary human cancers mimics sporadic tumorigenesis. *Oxford Journals* 2001; **10**(26): 3001-3007. doi:10.1093/hmg/10.26.3001
16. Link A, Balaguer F, Goel A. Cancer chemoprevention by dietary polyphenols: promising role for epigenetics. *Biochem Pharmacology* 2010; **80**: 1771-1792. doi: 10.1016/j.bcp.2010.06.036
17. Collins N, Wooster R, Stratton M R. Absence of methylation of Cp Dinucleotides within the promoter of the breast cancer susceptibility gene BRCA2 in normal tissues and in breast and ovarian cancers. *Br J Cancer* 1997; **76**: 1150-1156. doi: 10.1038/bjc.1997.526
18. Bardia A, Platz E A, Yegnasubramanian S, De Marzo A M, Nelson W G. Anti-inflammatory drugs, antioxidants, and prostate cancer prevention. *Curr Opin Pharmacol* 2009; **9**(4): 419-426. doi: 10.1016/j.coph.2009.06.002
19. Meeran S M, Ahmed A, Tollefsbol T O. Epigenetic targets of bioactive dietary components for cancer prevention and therapy. *Clin Epigenetics* 2010; **1**: 101-116. doi: 10.1007/s13148-010-0011-5
20. Bigey P, Ramchandani S, Theberge J, Araujo F D, Szyf M. Transcriptional regulation of the human DNA methyltransferase (dnmt1) gene. *Gene* 2000; **242**: 407-418. doi: 10.1016/s0378-1119(99)00501-6
21. Yuasa Y, Nagasaki H, Akiyama Y. Relationship between CDX2 gene methylation and dietary factors in gastric cancer patients. *Carcinogenesis* 2005; **26**: 193-200. doi: 10.1093/carcin/bgh304
22. Lim U, Song M A. Dietary and lifestyle factors of DNA methylation, Methods Mol. *Biol* 2012; **863**: 359-376.
23. Elsayed I, Afa D, Khalid M F, Dina S M. Antitumoral and Antioxidant Potential of Egyptian Propolis against the PC3 Prostate Cancer Cell Line Asian Pacific. *Journal of Cancer Prevention* 2015; **16**. doi: 10.7314/apjcp.2015.16.17.7641

24. Peter Ferguson J, Kurowska E, Freeman D J, Chambers A F, James D. A Flavonoid Fraction from Cranberry Extract Inhibits Proliferation of Human Tumor Cell Lines. *Koropatnick Nutrition & Cancer* 2002; **5**: 1529-1535. doi: 10.1093/jn/134.6.152 9
25. Déziel B, MacPhee J, Patel K, Catalli A, Kulka M, Neto C, et al. American cranberry (Vacciniumm acrocarpon) extract affects human prostate cancer cell growth via cell cycle arrest by modulating expression of cell cycle regulators. *foddfunct* 2012; **3**(5): 556-564. doi: 10.1039/c2fo10145a
26. Susanne M H, Piwen W, Catherine L, David H. Epigenetic effects of green tea polyphenols in cancer. *Epigenomics* 2013; **5**(6): 729-741.
27. Krishna V D, Charles Y F, Donald J T. Oxidative Stress and DNA Methylation in Prostate Cancer. *Obstetrics and Gynecology International* 2010.
28. Bender C M, Pao M M, Jones P A. Inhibition of DNA methylation by 5-aza-2_deoxycytidine suppresses the growth of human tumor cell lines. *Cancer Res* 1998; **58**: 95-101.