

# اوتئولین یک شائق گیاهی - م می باشد، این دارا اشد التهابی، اشد سلولی - اپوپتوز بهار - سرطان معده یکی ا شایع ترین بیماری های - اوده و متاستاز در ان بیناری شیع بسیاری اشد و تشخیص دیر ا گام این بیماری - مرگ بینار می ادد و تئین های کافیلین، اکتین دی - کلتوتید فات کیناز ا پروتئین های - از و هم چنین - سلولی می اشد.

زهرا طهماسبی<sup>۱</sup> (M.Sc)، مازیار محمد اخوان<sup>۲\*</sup> (Ph.D)، سپیده ترابی<sup>۱</sup> (Ph.D)، ناصر عباسی<sup>۳</sup> (Ph.D)، الهام سرحدی<sup>۴</sup> (Ph.D)، نسیم حاتم نژادیان<sup>۵</sup> (M.Sc)

۱- گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه علوم و تحقیقات، تهران، ایران

۲- مرکز تحقیقات اختلالات اپیدمیولوژی پایه و مولکولی دستگاه گوارش، پژوهشکده گوارش و بیماری های کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

۳- آزمایشگاه فارماکولوژی، گروه فارماکولوژی، دانشکده علوم پزشکی ایلام، ایلام، ایران

۴- آزمایشگاه زیست جانوری، باغ ملی گیاه شناسی، موسسه تحقیقات جنگل ها و مراتع، تهران، ایران

۵- آزمایشگاه پروتئین و آنزیم، مرکز تحقیقات پوست، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

## چکیده

اوتئولین یک شائق گیاهی - م می باشد، این دارا اشد التهابی، اشد سلولی - اپوپتوز بهار - سرطان معده یکی ا شایع ترین بیماری های - اوده و متاستاز در ان بیناری شیع بسیاری اشد و تشخیص دیر ا گام این بیماری - مرگ بینار می ادد و تئین های کافیلین، اکتین دی - کلتوتید فات کیناز ا پروتئین های - از و هم چنین - سلولی می اشد. ا روش ا در این - به بررسی ا غلظت های الای اوتئولین در وی - لول های رطانی - رداخته ا بدین - ا ادا سلول ا محیط *In vitro* - سپس به مدت ۴۸ - تحت تاثیر ا - ا گرفتند. سلول ا جمع آوری ا - کل پروتئین آن ا - استخراج گردید و تئین های استخراج ا - استفاده ا وش ا - رز دو بعدی ا - ا - ارم مولکولی و pI ا سازی ا - سپس تعیین توالی اسید آمینه ا وش MALDI-TOF ا - ا گردید.

افته ا در این - ا - ا شخص شد که میان سلول های رطانی ا - ا از لوتئولین اشد می اید، بدین - معنی که - سلولی افزایش می اید ا ااس نتایج به - ا - ا از شناسایی ا پروتئینی ا ا شده برای ا نام MALDI-TOF mass spectrometry ا - ا ده گردید که بیان ا پروتئین کافیلین، اکتین - کلتوتید دین فات کیناز ا - ا - ا شده از لوتئولین اشد اشته اند.

ا - ا در این - ا - ا شاهده گردید که ا پروتئین اکر ا - ا - ا اار متاستاز و هم - نین ا - سلولی اشی ا اوتئولین اشد - همی اشته اند.

اژه ا - کلیدی: ا - معده، کافیلین، اکتین، کلتوتید دین فات کیناز، ا - رز دو بعدی

فلاونوئیدها از جمله مشتقات گیاهی می باشند که دارای

مقدمه

یوکاریوت‌ها سه نوع اکتین آلفا و بتا و گاما وجود دارد [۱۲] که دارای چندین فعالیت می‌باشند از جمله شرکت در تحکیم اسکلت سلولی، حرکت سلولی، تقسیم سلولی، انتقال سیگنال و هم‌چنین فرایندهایی در هسته سلول [۷].

نوکلئوتید دی فسفات کیناز موجب تنظیم بخشی از فعالیت‌های سلولی یوکاریوتیک مثل تکثیر و تمایز سلول‌ها می‌گردد [۸]. به نظر می‌رسد که نوکلئوتید دی فسفات کیناز در تحریک رگزایی در سرطان تاثیر دارد [۹] در رابطه با اثر نوکلئوتید دی فسفات کیناز در تکثیر سلول‌ها هنوز اختلاف نظر وجود دارد برخی مقالات اثر افزاینده [۱۰] و بسیاری دیگر اثر مهاری [۱۱،۲] این پروتئین در تکثیر سلول‌های سرطانی را گزارش کرده‌اند. با این همه تمام مطالعات ذکر شده در بالا اهمیت این پروتئین در تومورها را بیان می‌کنند.

بسیاری از سلول‌های تکثیر یافته سطوح بالایی از کافیلین را در خود دارند. کافیلین ۱، یک تنظیم‌کننده کلیدی پلیمریزه شدن اکتین است که در مهاجرت سلولی نقش دارد. بیان بالای این پروتئین با کاهش پیش‌بینی و افزایش تکثیر سلولی در بیماران مبتلا به تومور ریه همراه بوده است [۱۳،۱۲]. به‌علاوه این پروتئین در تنظیم مرگ سلولی در سرطان معده هم نقش مهمی دارد [۱۴،۲] به دلایل گفته شده در بالا بررسی و مطالعه اثر لوتولین در رشد سلول‌های سرطان معده اهمیت داشته و مطالعه حاضر به همین مسئله می‌پردازد. در جریان مطالعه حاضر با کمک کشت سلول‌های MKN-45 و اضافه کردن لوتولین به محیط کشت با کمک الکتروفورز دو بعدی پروتئین‌های تغییر یافته در کل پروتئین‌های سلول مورد بررسی قرار گرفتند.

این مطالعه به منظور بررسی اثرات لوتولین بر روی بیان و عدم بیان پروتئین‌های موثر بر رشد و گسترش و هم‌چنین مرگ تدریجی سلول‌های سرطانی انجام گردید.

با کمک نرم‌افزار ملانی نقاط پروتئینی مشابه در تمامی ژل‌ها شناسایی و شماره‌گذاری گردیدند. به کمک این نرم‌افزار می‌توان تغییرات در مقدار یک پروتئین به‌خصوص در مقایسه با نمونه‌های مختلف را به‌دست آورد که این کار با سایر

خواص بیولوژیکی و دارویی بالایی بوده و به ویژه در حفظ سلول‌ها از خطرات ناشی از فعالیت‌های اکسید شدن موثر هستند. گزارش شده که فلاونوئیدها می‌توانند برای سلامتی انسان و حیوان مفید باشند و این ماده در غذاها، سبزیجات، میوه‌ها، و گیاهان دارویی وجود دارد از جمله خواص فلاونوئیدها اثرات ضد اکسیدشدگی، تنظیم‌کننده استروژنیک و اثر ضد میکروبی آن‌ها می‌باشند [۱]. هم‌چنین بیان شده که فلاونوئیدها می‌توانند به عنوان پیشگیری‌کننده از سرطان مطرح شوند [۲]. زمانی که این ماده در غلظت‌های بالا مورد استفاده قرار گیرد موجب ایجاد سمیت در سلول‌های نرمال و بدخیم انسانی می‌گردد [۳،۴]. لوتولین فلاونوئیدی است که در بسیاری از گیاهان دارویی به فراوانی دیده می‌شود. این ماده گیاهی دارای اثرات ضد التهابی، مهار رشد سلولی، القاء‌کننده مرگ سلولی می‌باشد [۵].

سرطان معده یکی از رایج‌ترین سرطان‌ها در شرق آسیا به ویژه در کشورهای ژاپن کره جنوبی و چین می‌باشد که تقریباً ۴۷٪ سرطان‌ها را در این منطقه به خود اختصاص داده و در نهایت منجر به مرگ می‌شود. تکثیر سلول‌های سرطان معده به سایر اندام‌ها شایع بوده و از سوی دیگر چون این بیماری در بسیاری از بیماران، در مرحله پیشرفته تشخیص داده می‌شود میزان مرگ و میر ناشی از آن بالا است [۶].

مطالعه حاضر توانست سه پروتئین اکتین، کافیلین و نوکلئوتید دی فسفات کیناز را به‌عنوان پروتئین‌هایی که بیانشان بر اثر لوتولین در سلول‌های کشت شده سرطان معده کاهش می‌یابد مشخص کند. این احتمال وجود دارد که این سه پروتئین در نحوه عمل‌کرد اثر لوتولین در مهار سرطان درگیر باشند چون از جمله پروتئین‌هایی هستند که در برخی از عمل‌کردهای مهم در سلول سرطانی مثل تکثیر، رشد و رگزایی سلول‌های سرطانی موثرند و بیان آن‌ها در نتیجه لوتولین کاهش می‌یابد.

اکتین یکی از مهم‌ترین پروتئین‌های سلول‌های یوکاریوتی است که به میزان بالا در این سلول‌ها دیده می‌شود و حدود ۵٪ کل پروتئین‌های یک سلول را تشکیل می‌دهد. در

دمای ۴ درجه به مدت ۲۵ دقیقه و تعداد دور ۲۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند پس از آن ۱ ml از محلول شستشو که شامل DTT, Acetone می‌باشد به هر نمونه اضافه گردید و مجدداً به مدت ۱ ساعت در دمای ۲۰- درجه قرار گرفتند، سپس در دمای ۴ درجه به مدت ۱۵ دقیقه و تعداد دور ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند مرحله شستشو ۳ بار تکرار گردید و پس از آن نمونه‌ها به مدت ۱ ساعت در دستگاه خلاء خشک گردیدند. در مرحله بعدی مقدار ۲۰۰ تا ۳۰۰ µl از محلول lysis Buffer که حاوی urea, chaps, DTT, ampholytes, Tris base, water به ۲۰ میلی‌گرم از نمونه به دست آمده اضافه شد و به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه قرار گرفت، سپس در دمای اتاق به مدت ۱۵ دقیقه با تعداد دور ۱۲۰۰۰ در دقیقه سانتریفیوژ شد ماده رویی جدا شده در این مرحله پروتئین کل با استفاده از روش Bradford تعیین غلظت گردید و نمونه‌ها تا زمان مصرف در دمای ۸۰- درجه نگهداری شدند.

سپس پروتئین‌های استخراج شده برای آزمایش الکتروفورز ۲ بعدی مورد استفاده قرار گرفتند. در این مرحله از کار ابتدا بعد اول Iso Electric Focusing (IEF) انجام گرفت. ابتدا ماده Rehydration Buffer با استفاده از urea, chaps, Bromophenol blue, DTT, water آماده گردید و مقدار ۱۵۰ میکروگرم از پروتئین استخراج شده به ۱۴۰ میکرولیتر از این ماده اضافه گردید، سپس نوارهای IPG (جهت جداسازی پروتئین‌ها بر اساس pI) در داخل این ماده قرار گرفته و روی آن با روغن معدنی پوشانده شد و به مدت ۸-۱۴ ساعت جهت جذب پروتئین‌ها بر روی این نوارها در دمای محیط قرار گرفت (به ازای هر تیمار و تکرار یک نوار IPG مورد نیاز می‌باشد، در این مطالعه ۶ نوار حاوی پروتئین مورد نیاز است). در مرحله بعد نوارهای IPG از Rehydration Buffer خارج شده و روغن‌زدایی گردیدند، این نوارها در این مرحله به رنگ آبی روشن قابل مشاهده می‌باشند. سپس این نوارها در داخل پلیت‌های مخصوص IEF قرار داده شده و مجدداً روی آن‌ها با روغن پوشانده شد و در

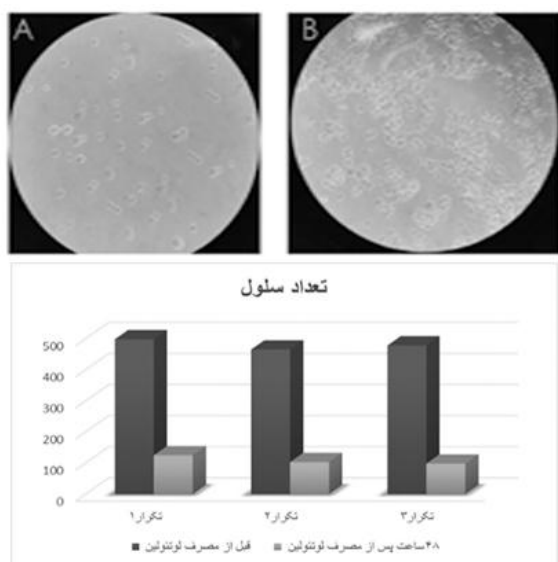
روش‌های آزمایشگاهی نظیر وسترن‌بلات در هر سری آزمایش فقط در رابطه با یک پروتئین قابل انجام است. به این ترتیب با کمک الکتروفورز ۲ بعدی امکان بررسی تفاوت‌های گروه بزرگی از پروتئین‌های سلول‌ها به صورت هم‌زمان فراهم می‌شود.

## مواد و روش‌ها

کشت سلول: سلول‌های مورد نیاز رده سلولی MKN-45 (سلول‌های سرطان معده با منشا انسانی) بودند که از مرکز ذخایر ژنتیک ایران خریداری گردید. سپس این سلول‌ها در محیط کشت DMEM به همراه ۱۵٪ FBS قرار گرفته و تکثیر شدند هنگامی که سلول‌ها رشد کردند پاساژ داده شده و به ۶ فلاسک (۳ فلاسک جهت هر تیمار) تقسیم گردید. این مطالعه شامل ۲ تیمار (کنترل و دارو) با هر کدام ۳ تکرار می‌باشد. پس از کشت سلول‌ها در فلاسک‌های تعیین شده، هنگامی که این سلول‌ها به میزان کافی رشد کردند و تقریباً ۸۰٪ سطح فلاسک‌ها را پوشاندند سلول‌ها با استفاده از لام نئوبار شمارش گردیدند، سپس سلول‌ها در داخل محیط فاقد FBS به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفتند. در مرحله بعد لوتولین که به صورت پودر می‌باشد در DMSO حل گردید و به محلول تبدیل شد و سپس با غلظت ۵۰ میکرومولار به سلول‌ها اضافه گردید (در این مرحله به دلیل خاصیت کشندگی که ماده DMSO دارد همان مقدار از DMSO به فلاسک‌های کنترل افزوده گردید) و سلول‌ها به مدت ۴۸ ساعت در این شرایط باقی ماندند پس از گذشت ۴۸ ساعت سلول‌ها مجدداً با استفاده از لام نئوبار شمارش گردیدند و پس از آن سلول‌ها جمع‌آوری شده و برای استخراج پروتئین به کار برده شدند.

برای استخراج پروتئین ابتدا سلول‌های جمع‌آوری شده از فلاسک‌های مورد مطالعه با استفاده از ازت مایع به سرعت منجمد گردیدند و پودر شدند سپس مقدار ۹۸۰ µl استون سرد شده و ۷۰۰ µl از محلول TCA که حاوی DTT, TCA, Acetone می‌باشد به آن اضافه گردید و سپس سلول‌ها در دمای ۲۰- درجه به مدت ۱ ساعت قرار گرفتند، سپس در

شدند در انجام الکتروفورز دو بعدی مورد استفاده قرار گرفتند. در این مرحله پروتئین‌ها بر اساس دو فاکتور pI و جرم مولکولی از یکدیگر جدا شده و از آنجایی که هیچ‌گاه دو پروتئین با جرم مولکولی و pI یکسان نداریم هر نقطه بر روی ژل نشان‌دهنده یک پروتئین می‌باشد که این نقاط پس از رنگ‌آمیزی ژل اکریل آمید با استفاده از نیترات نقره قابل مشاهده گردیدند. ژل‌های رنگ‌آمیزی شده اسکن شده و تصاویر آن‌ها با فرمت TIFF ذخیره گردیدند این تصاویر جهت آنالیز و شناسایی نقاط به نرم‌افزار ملانی منتقل گردیدند (شکل ۲).



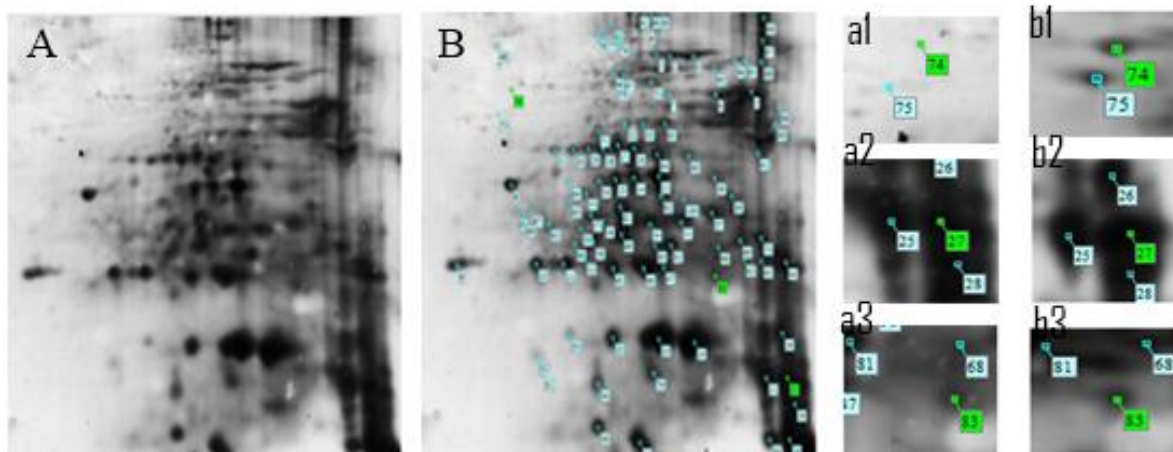
شکل ۱. تغییرات تعداد سلولها در محیط این ویتر و پس از مصرف لوتولین. تصاویر بیانگر تغییرات ناشی از تعداد سلولها قبل و پس از مصرف لوتولین در سلولهای سرطانی معده بوده است در این مطالعه ابتدا مقدار 1 ml از سلولها قبل از استفاده از لوتولین با استفاده از لام نئوبار شمارش گردیده و در عدد ۱۰۴ ضرب گردیدند سپس سلولها به مدت ۴۸ ساعت در معرض لوتولین قرار گرفته و مجدداً شمارش گردیدند و مشاهده گردید که تعداد سلولها به ۲۲ درصد کاهش داشته اند. همانگونه که در تصویر مشاهده میگردد تصویر سمت راست مربوط به تعداد سلولهای رشد یافته قبل از مصرف لوتولین و تصویر سمت چپ تعداد همان سلولها پس از مصرف لوتولین میباشد. نمودار نیز بیان‌کننده تغییرات تعداد سلولهای سرطان معده قبل و پس از مصرف لوتولین میباشد. بر اساس این نمودار مشاهده میگردد که تعداد سلولها ۴۸ ساعت پس از مصرف لوتولین به شکل معنی داری در هر سه تکرار کاهش یافته اند. براساس این تصویر میتوان بیان کرد که لوتولین موجب کاهش رشد سلولی میگردد.

داخل دستگاه IEF قرار گرفت و پروتئین‌ها بر اساس pH ایزو الکتريکیشن از یکدیگر جدا گردیدند.

پس از آنکه پروتئین‌ها بر اساس pI بر روی IPG تفکیک شدند، پروتئین‌های قرار گرفته بر روی IPG به ژل اکریل آمید جهت تفکیک از نظر جرم مولکولی منتقل شدند. ژل اکریل آمید حاوی Acrylamide/Bis (30%T, 2.6%C), Tris-HCl 1.5 M PH 8.8, SDS10%, Ammonium persulfate 10% and TEMED می‌باشد. به این منظور ابتدا نوارهای IPG که از دستگاه IEF خارج شده‌اند در محلول Equilibration Buffer که حاوی Tris-HCl, Urea, Glycerol, SDS, Bromophenol Blue, Double distilled water and DTT است به مدت ۳۰ دقیقه بر روی شیکر قرار گرفتند. پس از آن نوارهای IPG به بالای ژل اکریل آمید منتقل شده و به جهت اتصال بین IPG و ژل اکریل آمید، از ژل آگارز ۰/۸٪ استفاده شد. سپس ژل آماده شده در داخل تانک قرار گرفته و ابتدا ولتاژ ۲۰ ولت به آن وارد گردید هنگامی که رنگ آبی به طور کامل از IPG به ژل اکریل آمید منتقل گردید ولتاژ به ۷۰ ولت افزایش یافت تا هنگامی که پروتئین‌ها کاملاً بر اساس جرم مولکولیشان از یکدیگر جدا شدند. سپس ژل‌ها در محلول فیکساتور که حاوی methanol45%, acetic acid 1% and water 50% بوده به مدت ۸ ساعت قرار داده شد، سپس ژل‌ها با استفاده از محلول نیترات نقره رنگ‌آمیزی شدند. ژل‌های رنگ‌آمیزی شده با استفاده از اسکنر GS800 اسکن شدند و با فرمت TIFF ذخیره گردیدند، در آخر تصاویر اسکن شده به نرم‌افزار ملانی برای آنالیز نقطه‌ها منتقل شدند. و در پایان با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS داده‌ها بررسی گردیدند.

## نتایج

در این بررسی با شمارش تعداد سلول‌ها قبل و پس از مصرف دارو، مشاهده شد که پس از استفاده از لوتولین با غلظت بالا تعداد سلول‌های زنده مانده به طور معنی‌داری کاهش یافته است که این خود بیانگر اثر مهارکنندگی رشد و تقسیم سلولی لوتولین می‌باشد (شکل ۱). پروتئین‌های استخراج شده که با استفاده از روش Bradford تعیین غلظت



شکل ۲. تغییرات نقاط پروتئینی در اثر مصرف لوتولین. این تصویر بیان‌کننده تغییرات نقاط پروتئینی در اثر مصرف لوتولین می‌باشد همانگونه که در تصویر مشاهده می‌شود تصویر سمت چپ A، مربوط به ژل بدست آمده پس از انجام الکتروفورز ۲ بعدی می‌باشد و تصویر سمت راست B ژل آنالیز شده با نرم افزار ملانی است در این تصویر مشاهده می‌گردد که هر نقطه پروتئینی یک شماره را به خود اختصاص داده است. تصاویر کوچک پایین صفحه که دو به دو در کنار هم قرار گرفته اند بیانگر تغییرات نقاط پروتئینی در پروتئین های کافیلین، اکتین و نوکلئوتید دی فسفات کیناز می‌باشد تصاویر سمت چپ a جایگاه نقاط قبل از مصرف لوتین و تصاویر سمت راستی b جایگاه همان پروتئین ها پس از مصرف لوتولین می‌باشد. نقطه ۷۴ (a,b1) مربوط به پروتئین اکتین، نقطه ۲۷ (a,b2) پروتئین دی نوکلئوتید دی فسفات کیناز و نقطه ۸۳ (a,b3) پروتئین کافیلین و می‌باشد.

انجام روش MOLDITOFF Mass Spectrometry فرستاده گردید. نتایج بیان داشت که پروتئین های اکتین، کافیلین و نوکلئوتید دی فسفات کیناز از مهم ترین پروتئین هایی بودند که در اثر لوتولین از خود تغییرات نشان داده و همچنین از جمله پروتئین های مرتبط با متابولیزم می‌باشند، یکی از پروتئین های ارسال شده توسط روش MOLDITOFF شناسایی نگردید. (جدول ۲).

جدول ۱. نقاط پروتئینی که از نظر آماری معنی دار گشته اند

spot	Contol Avrage	L50 - Avrage	TTEST L-50/C	IFL50/C
8	0.44	0.23	0.04	0.53
21	0.22	0.11	0.01	0.51
26	1.39	0.37	0.04	0.27
27	1.68	0.38	0.01	0.23
43	0.22	0.12	0.02	0.54
53	0.34	0.13	0.05	0.39
59	0.35	0.08	0.03	0.23
61	0.57	0.14	0.18	0.24
67	0.29	0.09	0.04	0.32
75	0.23	0.06	0.05	0.29
99	0.51	0.17	0.00	0.35

براساس جدول بالا ابتدا میانگین نقاط پروتئینی در دو تیمار کنترل و دارو محاسبه گردید سپس آزمون آماری T Test Student و همچنین آزمون IF برای تمامی نقاط انجام گرفت. تقاطی که در این دو تست معنی دار گشته اند در جدول بالا آورده شده و مطابق این جدول

با کمک نرم افزار ملانی ۱۰۰ نقطه پروتئینی شناسایی و نشان‌گذاری شدند لازم به ذکر است که این نوع شناسایی به صورت مقایسه‌ای در تمامی ژل‌های تیمارها انجام گرفت. سپس مقدار این نقاط در هر ژل به دست آمده و از نظر آماری مورد بررسی و تجزیه و تحلیل قرار گرفت سپس آزمون T-Test در دو سطح ۱ و ۵٪ برای تمام نقاط انجام گرفت. مشاهده گردید که به طور کلی تعداد ۱۰ نقطه پروتئینی در میان نقاط شناسایی شد که دارای تغییر معنی‌داری بوده‌اند. سپس تمام ۱۰۰ نقطه از نظر درصد تغییر هر پروتئین در نمونه تست به کنترل بررسی گردیدند و تعداد نقاط با نسبت تغییر تست به کنترل کم‌تر از ۰٫۳ و بیش‌تر از ۳ جداسازی شدند. این کار به این منظور انجام شد تا پروتئین‌هایی که بیش‌ترین میزان تغییر بیان شدن نسبت به کنترل را داشته‌اند انتخاب کردند که در این مرحله تعداد ۵ نقطه در این دو رنج بیان شده مشاهده گردیدند (جدول ۱). سپس تقاطی در هر دو تست تفاوت معنی‌دار داشتند شناسایی گردیدند و مجدداً نام‌گذاری شدند در این مرحله تعداد ۴ نقطه شناسایی گردیدند و سپس این نقاط جدا شده و به دانشگاه یورک در انگلستان به منظور

و تعیین توالی به دانشگاه یورک انگلیس ارسال گردیدند که سه نقطه ۲۷ و ۷۵ شامل پروتئین های موثر در این بررسی بوده اند.

مشاهده شد که ۱۰ نقطه بر اساس آزمون T Test Student و ۵ نقطه هم بر اساس آزمون IF معنی دار گشته اند که ۴ نقطه از نظر هر دو آزمون معنی دار بوده که این نقاط جداسازی گشته و برای شناسایی

جدول ۲- نوع پروتئین و تغییرات ایجاد شده در درصد حجم آن قبل و پس از مصرف لوتولین و نقش آن در سلول

ردیف	نام پروتئین	درصد حجمی پروتئین قبل از لوتولین	درصد حجمی پروتئین بعد از لوتولین	نقش پروتئین
۱	نوکلئوتید دی فسفات کیناز	۱/۶۹	۰/۳۹	مهار متاستاز و رشد سلولی
۲	اکتین	۰/۱۳	۰/۰۶۹	مهار متاستاز و رشد سلولی
۳	کافیلین	۰/۷۳	۰/۴۴	مهار متاستاز و رشد سلولی

این جدول بیانگر نوع پروتئین تغییر یافته در اثر مصرف لوتولین و همچنین میزان تغییرات ناشی از آن میباشد. همانگونه که در جدول مشاهده میگردد سه پروتئین نوکلئوتید دی فسفات کیناز، اکتین و کافیلین توسط تکنیک 2DE شناسایی گردیدند و همانگونه که مشاهده میگردد درصد حجم این سه پروتئین پس از مصرف لوتولین به میزان چشمگیری کاهش داشته است. از آنجاییکه این پروتئین ها در مرگ سلولی و همچنین مهار متاستاز سلولی نقش دارند میتوان بیان کرد که کاهش این پروتئین ها موجب مرگ سلولهای سرطانی معده و همچنین ممانعت از ایجاد متاستاز سلولی در نوع پیشرفته آن می شود.

بیان شدن قرار گیرند. در مطالعه حاضر مشاهده گردید که بیان ۳ پروتئین نوکلئوتید دی فسفات کیناز، اکتین سیتوپلاسمیک ۱ و کافیلین ۱ در سلول های MKN-45 انسانی در غلظت های بالای لوتولین تغییر یافته اند که هر سه این پروتئین ها از جمله پروتئین های موثر در مرگ سلولی هستند که منجر به کاهش متاستاز می شوند.

نوکلئوتید دی فسفات کیناز در انسان شامل یک خانواده ده عضوی از پروتئین هایی است که یکی از عملکردهای اصلی آن ها انتقال یک فسفات از ATP برای تولید نوکلئوزید تری فسفات ها است [۱۱]. بعلاوه در ترمیم DNA، رشد سلولی، مهاجرت و آپوپتوزیس هم درگیر هستند [۱۱]. نتیجه برخی مطالعات نشانگر این نکته است که نوکلئوتید دی فسفات کیناز در برخی از تومورها مثل تومور پستان راحت تر به رگ های خونی وارد شده و یا از آن ها خارج می شوند [۱۰] ولی مطالعات دیگری هم نقش مهاری را برای این پروتئین ها در رشد و متاستاز سلول های سرطانی نشان داده اند [۱۱]. به طور کلی نقش این پروتئین در اتصال سلول ها از طریق اینترگرین ها و سایر اتصالات سلولی می تواند موجب کم و زیاد شدن چسبندگی سلول ها به هم شده و در میزان متاستاز موثر باشد. ولی چگونگی و شرایط مثبت یا منفی بودن نقش این پروتئین

## بحث و نتیجه گیری

مطالعات متعددی بر روی خواص ضد سرطانی لوتولین انجام گرفته است و این مطالعات بیان داشته اند که این ماده در غلظت های بالا و پایین اثرات متفاوتی از جمله مرگ سلولی یا زنده مانی سلول را در سلول های انسانی از خود نشان داده است [۱۴، ۱۵]. به نظر می رسد که لوتولین در غلظت های بالا ۲۵ میکرومولار اثر سائتوتوکسیک بر سلول های کشت شده در محیط *in vitro* داشته است [۱۵] که این نتیجه منطبق بر نتایج به دست آمده در مطالعه حاضر است. علاوه بر این در یک مطالعه دیگر نشان داده شد که لوتولین موجب مهار متاستاز سلول های مهاجم A431 می گردد [۲۰]. بررسی مکانیسم عمل کرد مواد مختلف که برای بررسی های بیش تر کاندید می شوند بسیار مهم است چرا که یک بخش مهم از اطلاعات مورد نیاز ما درباره چنین ترکیباتی به مکانیسم عمل آن ها بر می گردد. در مورد ترکیب مورد بررسی در این مطالعه و بررسی مکانیسم کشنده سلول آن، روش الکتروفورز دو بعدی انتخاب گردید؛ چرا که اطلاعات کافی در رابطه با مکانیسم عمل کرد آن وجود نداشت و با کمک الکتروفورز دو بعدی این امکان در اختیار ما قرار گرفت تا درصد قابل توجهی از پروتئین های درون یک سلول هدف مورد بررسی از نظر تغییر

به نظر می‌رسد که وجود یک نوع تعامل بین تنظیم ژن‌های اکتین پلیمریک و مونومریک ضروری می‌باشد [۷]. به عنوان مثال در گزارشات آمده که اکتین برای شروع رونویسی ژن و هم‌چنین طول ژن ضروری می‌باشد [۱۶]. نتایج مطالعه حاضر متناسب با نتایج مطالعه دیگری است که با استفاده از الکتروفورز دو بعدی مشخص نمود که لوتتولین (با همان غلظت مورد استفاده در مطالعه حاضر) می‌تواند موجب کاهش بیان پروتئین F-Actin در سلول‌های سرطانی CH27 گردد [۲۲]. اما عمل‌کرد پروتئین اکتین برای رونویسی از DNA هم در ارتباط با پروتئین کافلین است که بیان خود کافلین هم بر اثر لوتتولین کاهش می‌یابد.

عامل دپلیمریزه کردن اکتین / کافیلین می‌تواند در بروز بیماری سرطان موثر باشد [۱۷]. به نظر می‌رسد که در سلول‌های سرطانی فعالیت این عامل افزایش می‌یابد و سلول‌ها به گونه‌ای رشد می‌کنند که چسبندگی کم‌تری برای سلول‌های مجاور داشته باشند. علاوه بر این فعالیت‌های کافلین در غشا سلول برای حرکت سلولی به وسیله افزایش سطح سلولی و هم‌چنین برای متاستاز سلول‌های سرطانی ضروری است [۱۷]. اگرچه نتایج گاه متناقضی درباره چگونگی نقش این عامل در رشد سلول‌های سرطانی دیده می‌شود ولی در چندین مطالعه گزارش شده است که افزایش تهاجم تومورها با بیان بالای کافلین رابطه مستقیم دارد [۱۹، ۱۸]. بر طبق نتایج ما لوتتولین موجب کاهش میزان بیان کافلین در سلول‌های MKN45 سرطان معده گردیده است.

در مجموع نتایج این مطالعه بخشی از مکانیسم اثر لوتتولین در مرگ سلول‌های سرطانی کشت شده MKN45 را نشان می‌دهد. این مکانیسم شامل دخالت سه پروتئین است که هر سه تا حدودی و در برخی از عمل‌کردهایشان با هم در ارتباط هستند. اگرچه در برخی موارد حتی عمل‌کرد دقیق این سه عامل درگیر به‌خوبی معلوم نیست و گاهی جزئیات و جهت‌گیری عمل‌کرد آن‌ها در تقویت یا مهار رشد تومور سرطانی نیاز به بررسی‌های بیش‌تری دارد. درک این نکته که لوتتولین در ارتباط با این عوامل بخشی از اثرات خود را در

در رشد و مهاجرت سلول‌های توموری هنوز محل بحث و تردید است. در هر صورت نوکلئوتید دی فسفات کیناز توسط انواع تومورهای جامد و هم‌چنین تومورهای خونی ترشح می‌گردد. بعلاوه پیشنهاد شده که این ترکیب در حفظ انقباض عروقی و میزان جریان خون عروق و میزان رگزایی تومورها اثراتی دارد [۱۰]. نتیجه مطالعه حاضر با نتیجه مطالعه دیگری که با الکتروفورز دو بعدی اثر لوتتولین را بر سلول‌های PC12 بررسی نموده بود متناسب است [۲۱]. در این مطالعه ذکر شده هم معلوم شده بود که لوتتولین با غلظت معادل غلظتی که در مطالعه حاضر استفاده شد موجب کاهش میزان بیان NDPK در سلول‌های کشت شده می‌گردد.

بر طبق نتایج به‌دست آمده در این مطالعه به نظر می‌رسد که بیان نوکلئوتید دی فسفات کیناز در سلول‌های سرطانی معده در اثر لوتتولین کاهش داشته است. اگر چه این نکته که نوکلئوتید دی فسفات کیناز در اثر لوتتولین کاهش یافته است به خودی خود نمایشگر بخشی از مکانیسم اثر لوتتولین در روی سلول‌های سرطانی است ولی بررسی‌های دقیق‌تری برای روشن شدن چگونگی و شرایط اثر لوتتولین در این سلول‌ها لازم است. اما نوکلئوتید دی فسفات کیناز در ارتباط با پروتئین دیگری هم عمل می‌کند که بیان خود آن بر اثر لوتتولین تغییر می‌نماید. رشته‌های اکتین مهم‌ترین اجزا اسکلت سلولی هستند که در حرکات سلولی جهت‌دار درگیر هستند [۱۱]. نشان داده شده که دست کم بخشی از اثرات NDPK بر متاستاز سلول‌های سرطانی مربوط به تداخل این پروتئین با فاکتورهای مربوط به اکتین می‌باشد [۱۱].

نتایج مطالعه حاضر بیانگر این است که لوتتولین در غلظت‌های به‌کار رفته می‌تواند موجب کاهش بیان اکتین گردد. اکتین به عنوان یک پروتئین با کاربردهای متفاوت در سلول‌های یوکاریوتی می‌باشد که شامل نقش در استحکام سلولی رشد و حرکت سلولی تقسیم درون یاخته (Cytokinesis) و انتقال سیگنال‌ها و هم‌چنین در فعالیت‌های هسته‌ای می‌باشد [۷]. پیشنهاد شده است که اکتین دارای یک مکانیسم انتقالی بین هسته و سیتوپلاسم می‌باشد [۷]. هم‌چنین

metastasis of NB69-derived human neuroblastoma. *Mol Cancer Res* 2004; 2: 387-394.

[10] Yokdang N, Tellez JD, Tian H, Norvell J, Barsky SH, Valencik M, Buxton IL. A role for nucleotides in support of breast cancer angiogenesis: heterologous receptor signalling. *Br J Cancer* 2011; 104: 1628-1640.

[11] Snider NT, Altshuler PJ, Omary MB. Modulation of cytoskeletal dynamics by mammalian nucleoside diphosphate kinase (NDPK) proteins. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2015; 388: 189-197.

[12] Castro MA, Dal-Pizzol F, Zdanov S, Soares M, Müller CB, Lopes FM, et al. CFL1 expression levels as a prognostic and drug resistance marker in non-small cell lung cancer. *Cancer* 2010; 116: 3645-3655.

[13] Müller CB, de Barros RL, Castro MA, Lopes FM, Meurer RT, Roehe A, et al. Validation of cofilin-1 as a biomarker in non-small cell lung cancer: application of quantitative method in a retrospective cohort. *J Cancer Res Clin Oncol* 2011; 137: 1309-1316.

[14] Wang W, Goswami S, Lapidus K, Wells AL, Wyckoff JB, Sahai E, et al. Identification and testing of a gene expression signature of invasive carcinoma cells within primary mammary tumors. *Cancer Res* 2004; 64: 8585-8594.

[15] Abbasi N, Akhavan MM, Rahbar-Roshandel N, Shafiei M. The effects of low and high concentrations of luteolin on cultured human endothelial cells under normal and glucotoxic conditions: involvement of integrin-linked kinase and cyclooxygenase-2. *Phytother Res* 2014; 28: 1301-1307.

[16] Obrdlik A, Percipalle P. The F-actin severing protein cofilin-1 is required for RNA polymerase II transcription elongation. *Nucleus* 2011; 2: 72-79.

[17] Bamburg JR, Wiggan OP. ADF/cofilin and actin dynamics in disease. *Trends Cell Biol* 2002; 12: 598-605.

[18] Li R, Wang X, Zhang XH, Chen HH, Liu YD. Ursolic acid promotes apoptosis of SGC-7901 gastric cancer cells through ROCK/PTEN mediated mitochondrial translocation of cofilin-1. *Asian Pac J Cancer Prev* 2014; 15: 9593-9597.

[19] Sidani M, Wessels D, Mouneimne G, Ghosh M, Goswami S, Sarmiento C, et al. Cofilin determines the migration behavior and turning frequency of metastatic cancer cells. *J Cell Biol* 2007; 179: 777-791.

[20] Lin YC, Tsai PH, Lin CY, Cheng CH, Lin TH, Lee KP, et al. Impact of Flavonoids on Matrix Metalloproteinase Secretion and Invadopodia Formation in Highly Invasive A431-III Cancer Cells. *PLoS One* 2013; 8: e71903.

[21] E L Omri A, Han J, Ben Abdrabbah M, Isoda H. Down regulation effect of Rosmarinus officinalis polyphenols on cellular stress proteins in rat pheochromocytoma PC12 cells. *Cytotechnology* 2012; 64: 231-240.

[22] Lee HZ, Yang WH, Bao BY, Lo PL. Proteomic analysis reveals ATP-dependent steps and chaperones involvement in luteolin-induced lung cancer CH27 cell apoptosis. *Eur J Pharmacol* 2010; 642: 19-27.

سلول اعمال می‌کند نقطه شروع مناسبی به نظر می‌رسد که ما را در هدف‌گذاری برای مطالعات بعدی کمک می‌کند. با این همه بررسی تغییرات ناشی از لوتولین در سلول‌های دیگر تومورال و هم‌چنین در صورت امکان در بافت‌های جانوری پس از مصرف لوتولین توسط حیوان آزمایشگاهی مهم بوده ولی از دسترس ما خارج بود. بعلاوه تایید نتایج مطالعه حاضر با کمک روش‌های دیگر مثل وسترن بلات به افزایش درک ما از این مسیر عمل‌کرد لوتولین کمک فراوانی می‌نماید.

## تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از همکاری پرسنل آزمایشگاه

بیوتکنولوژی دانشگاه علوم و تحقیقات تهران کمال تشکر و قدر دانی را دارند.

## منابع

[1] Birt DF, Hendrich S, Wang W. Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids. *Pharmacol Ther* 2001; 90: 157-177.

[2] Neuhauser ML. Dietary flavonoids and cancer risk: evidence from human population studies. *Nutr Cancer* 2004; 50: 1-7.

[3] Liesveld JL, Abboud CN, Lu C, McNair C, Menon A, Smith A, et al. Flavonoid effects on normal and leukemic cells. *Leuk Res* 2003; 27: 517-527.

[4] Matsuo M, Sasaki N, Saga K, Kaneko T. Cytotoxicity of flavonoids toward cultured normal cells. *Biol Pharm Bull* 2005; 28: 253-259.

[5] Lin Y, Shi R, Wang X, Shen HM. Luteolin, a flavonoid with potential for cancer prevention and therapy. *Current Cancer Drug Targets* 2008; 8: 634-646.

[6] Shen L, Shan YS, Hu HM, Price TJ, Sirohi B, Yeh KH, et al. Management of gastric cancer in Asia: resource-stratified guidelines. *Lancet Oncol* 2013; 14: e535-547.

[7] Millard TH, Behrendt B, Launay S, Fütterer K, Machesky LM. Identification and characterisation of multiple forms of actin. *Cell* 1976; 9: 793-805.

[8] Yokdang N, Nordmeier S1, Speirs K1, Burkin HR1, Buxton IL. Blockade of extracellular NM23 or its endothelial target slows breast cancer growth and metastasis. *Integr Cancer Sci Ther* 2015; 2: 192-200.

[9] Almgren MA, Henriksson KC, Fujimoto J, Chang CL. Nucleoside diphosphate kinase A/nm23-H1 promotes



## Inhibitory effect of luteolin on MKN-45 tumorg gastric cells: The role of nucleoside-diphosphate kinases, cofilin and actin proteins

Zahra Tahmasebi (M.Sc)<sup>1</sup>, Maziar Mohammad Akhavan (Ph.D)<sup>\*2</sup>, Sepideh Torabi (Ph.D)<sup>1</sup>, Naser Abbasi (Ph.D)<sup>3</sup>, Elham Sarhadi (Ph.D)<sup>4</sup>, NAsim Hatam nejadian (M.Sc)<sup>5</sup>

1 - Biotechnology Department, Agricultural University, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran, Iran

2 - Basic and Molecular Epidemiology of Gastrointestinal Disorders Research Center, Reaserch Institute for Gastroenterology and Liver Diseases, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

3 - Pharmacological Lab., Department of Pharmacology, Ilam University of Medical Sciences, , Ilam, Iran

4 - Animal Biology Lab., National Botany Garden, Research Institute of Forests and Rangelands, Tehran, Iran

5- Protein and Enzyme lab, Skin Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

(Received: 26 Jul 2016; Accepted: 8 Apr 2017)

**Introduction:** Luteolin is an important plant extract. This shows anti-inflammatory, inhibition of cell growth, induction of apoptosis and inhibition of metastasis. Gastric cancer is one of the most common cancers in the world. Also metastasis is widespread in this kind of cancer and late diagnosis is a cause of patient's death. Cofilin, actin and nucleoside-diphosphate kinases (NDPK) are important in cell death and metastasis. In this study the effect of luteolin on MKN-45 gastric carcinoma cells was evaluated.

**Materials and Methods:** At first the cells were cultured and then for 48 hours were cultured with the drug concentration. Then the cells where collected and their protein were extracted and analyzed using 2D electrophoresis and separated on the basis of their molecular mass and PI. After that these samples were used for determine the amino acid sequence by MOLDI-TOF.

**Results:** The growth rate of MKN-45 inhibited under influence of luteolin, this means increasing Apoptosis. Based on the results presented here by identification of protein spots by MOLDI-TOF mass spectrometry the expression of three protein cofilin, actin and NDPK has been decreased by luteolin.

**Conclusion:** It seems that the anti- tumoral effect of luteolin is expressed through three proteins cofilin, actin and NDPK in gastric cancer cells.

**Keywords:** Luteolin, Stomach Neoplasms, Cofilin, Actins, Nucleoside-Diphosphate Kinase, Electrophoresis

\* Corresponding author. Tel: +98 9123361296

m\_akhavan@sbmu.ac.ir