Archive of SID

مطالعه تغییرات بیان ژن در سرطان اولیه پروستات موش تحت تیمار گیاه گزنه *Urtica dioicaL*

مریم وهاب‌زاده شهری[1]، خدیجه شاهرخ‌آبادی[2*]، جواد بهارآرا[3]

۱- کارشناسی ارشد ژنتیک، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد، مشهد، ایران

۲- استادیار، ژنتیک مولکولی، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد، مشهد، ایران

۳- استاد، تکوین جانوری، مرکز تحقیقات بیولوژی کاربردی گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد، مشهد، ایران

یافته / دوره ۲۳ / شماره ۲ / بهار ۱۴۰۰ / مسلسل ۸۷

چکیده

دریافت مقاله: ۹۹/۱۱/۴ پذیرش مقاله: ۱۴۰۰/۱/۱۴

مقدمه: در پیشرفت سرطان پروستات نقش ژن‌های سرکوبگر تومور به خوبی شناخته شده است. کاهش یا فقدان بیان این ژن‌ها باعث گسترش تومور از طریق متاستاز به بافت‌های دیگر بدن می‌شود. با توجه به اینکه گیاه گزنه دارای اثرات ضد سرطانی می‌باشد، پژوهش حاضر با هدف بررسی اثرات عصاره هیدروالکلی ساقه و ریشه گیاه گزنه بر تغییرات بیان ژن‌های PTEN و MAGI-2 و SMAD-2 در تومور القا شده پروستات موش انجام شده است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، عصاره هیدروالکلی گیاه گزنه با دستگاه سوکسله تهیه شد. موش‌ها بعد از تزریق ماده سرطانی DMBA به ترتیب با دوزهای ۷۵ و ۲۵۰ میلی‌گرم برکیلوگرم عصاره ساقه و ریشه گزنه به صورت زیر جلدی طی ۲۸ روز تیمار شدند. همچنین گروه کنترل (شاهد) هیچ ماده‌ای دریافت نکرد و به گروه شاهد آزمایشگاهی فقط عصاره تزریق شد. تغییرات بیان ژن‌های مورد نظر توسط Real time PCR مورد بررسی و نتایج، مورد آنالیز آزمون آماری قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که بیان ژن PTEN در تیمار با عصاره ریشه دوز ۲۵۰، نسبت به توموری روز ۱۴ افزایش دارد. بیان ژن MAGI-2 در تیمار با عصاره ریشه دوز ۷۵، در روز ۲۸ نسبت به توموری روز ۲۸، افزایش داشته است. بررسی تغییرات ژن SMAD-2 نشان داد که بیان این ژن در گروه تیمار با عصاره ریشه دوز ۲۵۰، در روز ۲۱ نسبت به توموری روز ۲۱ افزایش داشته است.

بحث و نتیجه‌گیری: طبق بررسی‌های انجام شده روی ژن‌های PTEN، MAGI-2 و SMAD-2 مشخص گردید که غیرفعال شدن این سه ژن بعنوان عامل خطر برای پیشرفت سرطان در نظر گرفته می‌شود.

واژه‌های کلیدی: سرطان پروستات، گیاه گزنه، PTEN، MAGI-2، SMAD-2.

*آدرس مکاتبه: مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، دانشکده علوم پایه.

پست الکترونیک: shahrokhabady@yahoo.com

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

امروزه دسترسی به داروهایی با اثربخشی بالا و سمیت کم که به صورت اختصاصی بر سلول‌های سرطانی تاثیر گذاشته و ارزان باشند، یکی از دغدغه‌های مهم جوامع دارویی دنیا و حوزه درمانی محسوب می‌شود. در این زمینه استفاده از گیاهان دارویی سرآغاز مناسبی برای تدوین پروژه‌های تحقیقاتی جهت دستیابی به داروهای نوین است (۱).

با توجه به عوارض جانبی داروهای شیمیایی، توجه بسیاری از محققین به سمت گیاهان دارویی معطوف گشته است. یکی از گیاهان مورد استفاده بدین منظور، گیاه گزنه می‌باشد. گزنه یک گیاه علفی و چند ساله است که دارای ساقه‌های راست به ارتفاع نیم تا یک متر و حتی بیشتر می‌باشد. گزنه غالبا در اماکن مخروبه، باغ‌ها و نواحی مرطوب خارج از شهر به صورت خودرو می‌روید و شامل واریته‌های مختلف است، که در این بین، واریته‌های *Urticadioica* و *U.urens L* به عنوان گیاهان دارویی بسیار مورد توجه هستند (۲).

سرطان پروستات یکی از شایع‌ترین سرطان‌ها در مردان و دومین عامل مرگ‌ومیر ناشی از سرطان، بعد از سرطان ریه در جمعیت مردان است (۳). مراحل مختلف بدخیمی پروستات از لحاظ بافت شناسی شامل هایپرپلازی خوش‌خیم پروستات، نئوپلازی درون اپیتلیالی پروستات، آدنوکارسینومای تهاجمی و فرم متاستاتیک می‌باشد (۴). در شروع و پیشرفت سرطان پروستات نقش ژن‌های سرکوبگر تومور به خوبی شناخته شده است. کاهش یا فقدان بیان این ژن‌ها زمینه‌ساز تغییرات بدخیم بعدی و گسترش تومور از طریق متاستاز به سایر بافت‌های بدن می‌باشد (۵).

از طرفی مواد شیمیایی موجود در محیط نقش مهمی در ایجاد انواع سرطان‌ها دارند. مهم‌ترین این مواد، هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای است که به فراوانی در دود سیگار، گوشت سرخ‌کرده، مواد غذایی دودی و قیر یافت می‌شود. ماده ۷ و ۱۲ دی‌متیل‌بنزآنتراسن (DMBA) نوعی کارسینوژن رایج آزمایشگاهی و از هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای و سنتتیک می‌باشد که معمولاً از آن برای القای سرطان در موجودات آزمایشگاهی استفاده می‌شود (۶-۸).

ژن PTEN روی کروموزوم 10q23 قرار گرفته و پپتیدی با ۴۰۳ اسیدآمینه را کد می‌کند. پروتئین PTEN در بافت‌های پستان، روده بزرگ، معده، مغز و سلول‌های اپیتلیال پروستات یافت می‌شود. همچنین در بسیاری از مسیرهای سیگنالینگ مهم مثل چرخه سلولی، مهاجرت سلولی، آپوپتوز و رگزایی نقش دارد و از اهداف اصلی غیرفعال شدن در سرطان‌های سوماتیک همچون پروستات می‌باشد (۹). این ژن، سطوح داخلی فسفاتیدیل‌اینوزیتول ۳ و ۴ و ۵ تری فسفاتاز (PIP3) را در سلول‌ها به صورت منفی تنظیم کرده و از طریق تنظیم منفی مسیر سیگنالینگ (PKB/ AKT)، به عنوان یک سرکوب کننده تومور فعالیت می‌کند (۱۰).

یکی دیگر از ژن‌های دخیل درسرطان پروستات، ژن مربوط به پروتئین MAGI-2 است که بیان آن نقش مهمی در روند برقراری سیناپس سلولی دارد (۱۱). این ژن به عنوان یک ژن نسبتا بزرگ، در جایگاه کروموزومی 7q21 قرار گرفته و باعث به کارگیری رسپتور نورون‌های انتقال دهنده می‌شود (۱۲). یک ارتباط منحصر به فرد بین عملکرد این ژن، با ژن PTEN وجود دارد به طوری که در حالت عادی از تخریب PTEN جلوگیری کرده و فعالیت آنرا افزایش می‌دهد (۱۱). در واقع ژن MAGI-2 به واسطه میان‌کنش مستقیم دومین PDZ-2 با موتیف اتصال به PDZ در PTEN، باعث افزایش پتانسیل عملکرد مهاری این ژن می‌شود (۱۳،۱۴).

از طرف دیگر ژن‌های مربوط به خانواده SMAD یک میانجی ضروری برای رسپتور فاکتور رشد TGF-β هستند

www.SID.ir

Archive of SID

که باعث فرایندهای طبیعی شامل تحریک فاکتور TGF-β، کنترل بیان ژن، کنترل آپوپتوز و توقف تومور می‌شوند. مهم‌ترین ژن مربوط به این خانواده، SMAD-2 است. بررسی‌ها نشان داده که عدم بیان ژن SMAD-2 به تنهایی باعث بدخیم شدن سلول‌های سرطانی پروستات می‌شود. اما جالبتر این که عدم بیان ژن SMAD-3 به تنهایی تاثیری در رشد تومور ندارد و حتماً باید با عدم بیان SMAD-2 همراه باشد.

این مساله می‌تواند در اندازه تومور نیز مؤثر باشد (۱۵). فاکتور TGF-β اعمال متنوعی دارد که طیف آن از تمایز سلولی و مهار رشد سلولی تا تحریک ماتریکس خارج سلولی و تعدیل و سرکوب پاسخ‌های ایمنی و التهابی متغیر می‌باشد و از سلول‌های لنفوسیت T، ماکروفاژها، کراتینوسیت‌ها و فیبروبلاست‌ها ترشح می‌شود (۱۶،۱۷).

پژوهش حاضر با هدف بررسی اثرات عصاره ساقه و ریشه گیاه گزنه بر بیان ژن‌های PTEN , SMAD-2 MAGI-2 در تومور القا شده پروستات موش انجام شد.

مواد و روش‌ها

گیاه گزنه از منطقه مسجد اولیا طرقبه جمع‌آوری و توسط کارشناس هرباریوم، با کد هرباریومی ۱۰۰۲۹ آزمایشگاه سیستماتیک دانشگاه آزاد (IAUM) تایید گردید. مقدار ۳۰ گرم پودر این گیاه با آب و الکل هر کدام به حجم ۱۵۰ سی‌سی حل شد و با دستگاه سوکسله عصاره گیری انجام گرفت. سپس به منظور خشک کردن عصاره‌ها با روش انجماد و خشک کردن در خلا، عصاره‌های مربوطه به دستگاه لیوفیلیزاتور (Lyphilizator) منتقل گشت. عصاره تهیه شده از ساقه و برگ گیاه، S و عصاره تهیه شده از ریشه گیاه، R نامگذاری گردید. سپس موش‌های سوری نر بالغ نژاد بالب سی به تعداد ۵۴ سر با وزن تقریبی ۳۰- ۲۵ گرم از سرمسازی رازی تهیه شدند. لازم به ذکر است که قبل از بررسی و آزمایش، حیوانات به مدت یک هفته در شرایط نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی نگه‌داری شدند. در این تحقیق ۷ گروه آزمایشی شامل شاهد، شاهد آزمایشگاهی و گروه‌های تجربی به شرح زیر مورد بررسی قرار گرفتند:

۱- گروه کنترل: موش‌هایی که به آنها هیچگونه ماده‌ای تزریق نشده است.

۲- گروه تجربی تومروی: موش‌هایی که جهت القا تومور فقط به آنها ماده سرطانی تزریق شده است.

گروه تجربی تیمار با عصاره: موش‌هایی که علاوه بر ماده سرطانی به آنها عصاره هم به عنوان تیمار تزریق شده است که براساس دوزهای متفاوت عصاره خود شامل ۴ گروه می‌شوند:

۳- گروه تیمار با عصاره ساقه با دوز ۷۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن موش(S-75).

۴- گروه تیمار با عصاره ساقه با دوز ۲۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن موش(S-250).

۵- گروه تیمار با عصاره ریشه با دوز ۷۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن موش(R-75).

۶- گروه تیمار با عصاره ریشه با دوز ۲۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن موش(R-250).

۷- گروه شاهد آزمایشگاهی: موش‌های سالمی که فقط به آنها عصاره با دوزهای مذکور تزریق شد.

برای القای سرطان نیز از دی‌متیل بنزآنتراسن (DMBA) استفاده گردید. ترکیب مذکور از شرکت سیگما آلدریچ خریداری و ۰/۱۲ میلی‌گرم از پودر آن با ۴۰ سی‌سی روغن زیتون حل شد سپس به همه موش‌ها بجز نمونه‌های شاهد و شاهد آزمایشگاهی، به صورت زیر جلدی تزریق گردید. تزریق عصاره‌ها به عنوان تیمار، به صورت زیر جلدی طی دو مرحله به ترتیب ۷ و ۱۴ روز بعد از توموری شدن به موش‌ها انجام گرفت.

www.SID.ir

Archive of SID

قبل از تزریق، پودر عصاره‌های خشک شده ساقه و ریشه، به مقدار لازم در PBS حل گردید و سپس فیلتر شد. حیوانات گروه تجربی به ترتیب دوزهای ۷۵ و ۲۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم از عصاره ساقه و ریشه گیاه گزنه را به صورت تزریق زیر جلدی دریافت کردند. در تمام مدت زمان آزمایش طبق پروتکل نگهداری حیوانات آزمایشگاهی، شرایط دمایی، نوری و دسترسی آسان به آب و غذا برای جانوران مهیا گشت.

تشریح و نمونه برداری به ترتیب در روزهای ۱۴، ۲۱ و ۲۸ انجام گرفت. بدین منظور جهت استخراج RNA از Animal tissue RNA isolation kit (شرکت دنا زیست) استفاده گردید. بعد از آن به منظور بررسی خلوص RNA های استخراج شده، نمونه‌ها در دستگاه نانودراپ قرار گرفت و کمیت آنها بر حسب میکروگرم بر میکرولیتر در طول موج ۲۶۰ به ۲۸۰ مورد سنجش قرار گرفت. همچنین جهت تایید کیفیت RNA استخراج شده، الکتروفورز انجام گردید.

برای سنتز cDNA مقدار RNA مورد نیاز با توجه به مقدار گزارش شده توسط نانودراپ استفاده شد. همچنین کیت‌های مربوط به سنتز از شرکت بتاژن تهیه شد. برای بررسی بیان ژن‌های PTEN، MAGI-2 و SMAD همچنین ژن مرجع GAPDH با استفاده از نرم افزار Oligo7 طراحی پرایمر صورت گرفت. سپس پرایمرها به شرکت ژن فناوران سفارش داده شد. توالی پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۱ آمده است.

برای ارزیابی تغییرات بیان ژن‌های مورد نظر از تکنیک Real-time PCR با استفاده از رنگ فلوئورسانس SYBR Green استفاده گردید. همچنین در این آنالیز، از ژن مرجع GAPDH استفاده شد. برای بررسی و آنالیز آماری، از دستگاه CFX 96 Real time PCR-BIORAD استفاده شد. نمونه‌ها هر کدام بصورت دوپلیکیت در دستگاه قرار گرفتند. برای تهیه Master mix ابتدا مقادیر SYBR Green، پرایمرهای Forward و Reverse برای هر ژن، مقدار DEPC treated Water و همچنین مقدار ثابت cDNA برحسب میکرولیتر مشخص شد تا این که حجم نهایی برای هر ول، ۲۰ میکرولیتر باشد. سپس نمونه‌ها در دستگاه قرار داده شد و PCR طبق برنامه دمایی انجام گرفت: ۹۵ درجه ۳ دقیقه در مرحله اول، ۹۵ درجه ۱۰ ثانیه و ۵۵ درجه ۳۰ ثانیه در مرحله دوم و به تعداد ۴۰ سیکل. آنالیز نتایج با استفاده از نرم‌افزار CFX و خروجی داده‌ها بر اساس ΔΔct مورد بررسی قرار گرفت.

جدول ۱. توالی، تعداد بازها و دمای ذوب پرایمرهای مورد استفاده در تحقیق.

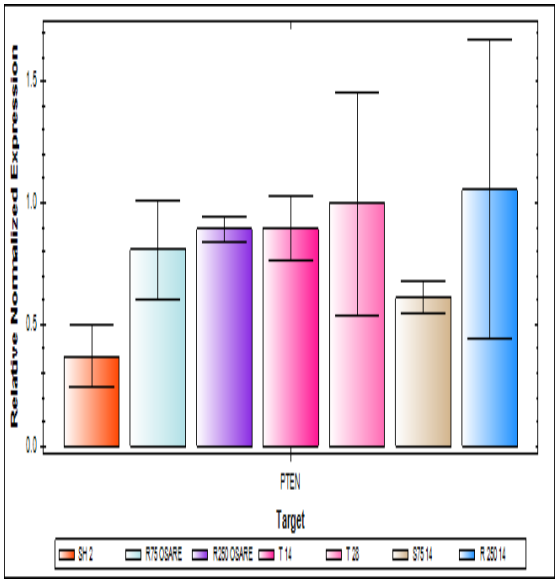
Oligo Name	Oligo Sequence 3'-> 5'	Base	Tm
PTEN F	TATTCTGGTGGGCTAACAAC	20 nt	۵۵/۱
PTEN R	AGTATGCTCAAATATGGCAGT	21 nt	۵۴/۹
MAGI-2 F	ATAGGCTTCAGAAGGACAACC	21 nt	۵۷/۲
MAGI-2 R	GATTACAGCCGCATAAAGCA	20 nt	۵۷
SMAD-2 F	TTGTAACAGAAACCGTGTGA	20 nt	۵۳/۵
SMAD-2 R	TACTGACTCCTTTACCTGCT	20 nt	۵۳/۶
GAPDH F	GTCTCCTGCGACTTCAACA	19 nt	۵۶
GAPDH R	CTGTAGCCGTATTCATTGTCA	21 nt	۵۶

یافته‌ها

با توجه به ویژگی ژن PTEN به عنوان ژن سرکوب کننده تومور، انتظار می‌رود که در مرحله القا تومور (نمونه‌های توموری)، افزایش بیان ژن دیده شده و سپس با تیمار با عصاره‌ها مطابق با عملکرد عصاره کاهش نسبی بیان ژن دیده شود. نمودار ۱ تغییرات بیان ژن PTEN را نشان می‌دهد. همانطور که در نمودار دیده می‌شود در نمونه‌های توموری نسبت به شاهد، افزایش بیان ژن مشاهده می‌شود. همچنین بیشترین کاهش بیان مربوط به عصاره ساقه با دوز ۷۵ است که باعث کاهش بیان ژن در این تیمار شده است.

www.SID.ir

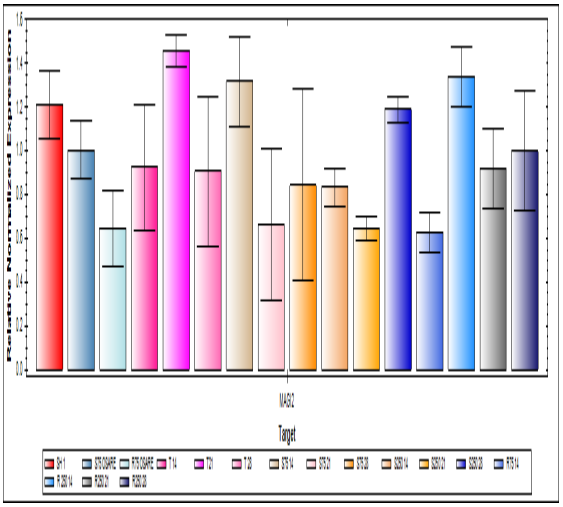
Archive of SID



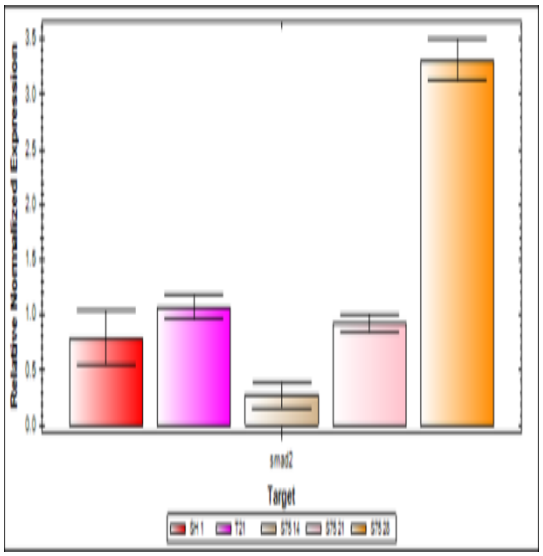
نمودار ۱. مقایسه میزان بیان ژن PTEN بین کنترل، توموری و تیمار با عصاره ساقه و ریشه در روز ۱۴. ستون‌ها به ترتیب از چپ به راست: شاهد، تیمار R75، تیمار R250، توموری روز ۱۴، توموری روز ۲۸، تیمار S75 و S250.

ژن MAGI-2 ژنی است که در برقراری سیناپس سلولی دخالت دارد، انتظار می‌رود که در تیمارهای مختلف، اثرات متفاوتی در بیان آن دیده شود. نمودار ۲ تغییرات بیان ژن MAGI-2 را نشان می‌دهد. همانطور که در گروه‌های مورد مطالعه دیده می‌شود، بیشترین بیان ژن در نمونه توموری روز ۲۱ نسبت به عصاره ساقه با دوز ۷۵ در روز ۲۱ مشاهده می‌گردد. عصاره ساقه با دوز ۲۵۰ در روز ۲۱ و عصاره ریشه با دوز ۲۵۰ در روز ۲۱ باعث کاهش بیان نسبت به نمونه توموری روز ۲۱ شده است. به نظر می‌رسد بهترین زمان مطالعه تغییرات بیان این ژن در روز ۲۱ پس از تزریق است.

نمودار ۳، تغییرات بیان ژن SMAD-2 را در گروه‌های مختلف مورد بررسی قرار داده است. نمودار ۳ مقایسه عصاره ۷۵ ساقه در روزهای ۱۴، ۲۱ و ۲۸ را نسبت به شاهد و توموری نشان می‌دهد. همانطور که دیده می‌شود عصاره ساقه با افزایش زمان، باعث افزایش بیان ژن نسبت به شاهد و نمونه توموری شده است. همچنین جدول ۲ مقایسه در تمام زمان‌ها و برای تمام تیمارها را نشان می‌دهد.



نمودار۲. مقایسه میزان بیان ژن MAGI-2 در گروه‌های کنترل، شاهد آزمایشگاهی، توموری و تیمار با عصاره‌های ساقه و ریشه. ستون‌ها از چپ به راست: ستون ۱، ۲ و ۳ شاهد و شاهد آزمایشگاهی. ستون ۴، ۵ و ۶ نمونه توموری روز ۱۴، ۲۱ و ۲۸، ستون ۷، ۸ و ۹ نمونه عصاره ساقه ۷۵ روز ۱۴، ۲۱ و ۲۸، ستون ۱۰، ۱۱ و ۱۲ نمونه عصاره ساقه ۲۵۰ روز ۱۴، ۲۱ و ۲۸، ستون ۱۳ نمونه ریشه روز ۱۴، ستون ۱۴، ۱۵ و ۱۶ نمونه عصاره ریشه ۲۵۰ روزهای ۱۴، ۲۱ و ۲۸.



نمودار۳. مقایسه تغییرات بیان ژن SMAD-2. ستون ۱ شاهد، ستون ۲ نمونه توموری، ستون ۳، ۴ و ۵ به ترتیب عصاره S75 در روزهای ۱۴، ۲۱ و ۲۸.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲. میزان تغییرات بیان ژن‌های PTEN و MAGI-2 و SMAD-2 در نمونه‌های شاهد، توموری و تیمار با عصاره‌های ساقه و ریشه گیاه گزنه، با دوزهای مختلف و در زمان‌های ۱۴، ۲۱ و ۲۸ روز پس از القاء سرطان. SEM نشان دهنده انحراف معیار از میانگین و حروف abcd نشان دهنده تفاوت معنادار در نمونه‌های مورد مطالعه است.

ژن مورد مطالعه		PTEN	SEM	MAGI-2	SEM	SMAD-2	SEM
شاهد		۰/۰۳۲d	۰/۴۵	۱/۴۴bc	۰/۱۰	۰/۳۴۲bcd	۰/۲۰
توموری	۱۴	۰/۰۳۴ d	۰/۱۲	۱/۰۷c	۰/۲۶	۰/۲۷۱ cd	۰/۲۳
	۲۱	-	-	۱/۶۲b	۰/۲۰	۰/۱۳۷de	۰/۱۲
	۲۸	۰/۱۱۹bc	۰/۴۶	۱/۸۰a	۰/۰۵	-	-
ساقه ۷۵	۱۴	۰/۰۱۷ d	۰/۱۱	۱/۵۶b	۰/۱۱	۰/۱۳۹de	۰/۰۹
	۲۱	-	-	۰/۸۸ d	۰/۶۲	۰/۱۲۹de	۰/۱۷
	۲۸	۰/۱۰۹bc	۰/۲۳	۱/۰۱c	۰/۷۴	۰/۰۸۷e	۰/۰۲
ساقه ۲۵۰	۱۴	-	-	۱/۰ c	۰/۰۱	۰/۴۴۳b	۰/۴۱
	۲۱	۰/۱۹ b	۱/۰۲	۰/۷۳d	۰/۱۱	۰/۰۷e	۰/۲۷
	۲۸	-	-	۱/۴۳bc	۰/۱۴	۰/۲۵۸cd	۰/۶۰
ریشه۷۵	۱۴	۲/۱۲ a	۰/۰	۰/۸d	۰/۲۷	۰/۵۳۰b	۰/۵۱
	۲۱	-	-	۱/۰c	۰/۱	۰/۱۷۲d	۰/۴۳
	۲۸	۲/۲۷۳a	۰/۶۷	۱/۰۸ c	۰/۲۵	۰/۱۰۲d	۰/۱۴
ریشه ۲۵۰	۱۴	۰/۱۶۶b	۰/۶۵	۱/۳۶bc	۰/۱۱	۰/۲۶۲ cd	۰/۲۱
	۲۱	۰/۹۹ c	۰/۱۳	۱/۰۱c	۰/۲۱	۱/۴۵a	۰/۶۵
	۲۸	-	-	۱/۱۷c	۰/۲۵	۰/۳۶۹bcd	۰/۳۵

بحث و نتیجه‌گیری

در شروع و پیشرفت سرطان پروستات نقش ژن‌های سرکوبگر تومور بسیار اهمیت دارد. کاهش یا فقدان بیان این ژن‌ها زمینه‌ساز تغییرات بدخیم بعدی و گسترش تومور از طریق متاستاز به بافت‌های دیگر بدن می‌باشد (۵). سرطان پروستات در واقع یک بیماری هتروژن است که تظاهرات آن می‌تواند به صورت کاملا خاموش و بدون علامت تا یک بیماری سیستماتیک پیشرفته بروز کند (۱۴). بنابراین مطالعه بر روی عملکرد ژن‌های دخیل در سرطان پروستات و عواملی که باعث اثرات مهاری در ایجاد تومور می‌شوند ضروری به نظر می‌رسد.

هدف از این مطالعه بررسی تاثیر عصاره هیدروالکلی ساقه و ریشه گیاه گزنه بر تغییرات بیان ژن‌های دخیل در تومور القا شده پروستات موش می‌باشد. بررسی‌هایی که روی بیان ژن‌ها انجام شده، نشان می‌دهد که این تغییرات ناشی از جهش یا بازآرایی ژنتیکی در محل ژن‌های سرکوبگر تومور نظیر PTEN رخ می‌دهد (۱۸). مطالعه ما نشان داد که میزان بیان ژن PTEN در نمونه‌های توموری افزایش و در نمونه‌های تیمار شده با عصاره کاهش دارد. بیشترین مقدار کاهش مربوط به عصاره ساقه، روز ۲۸ و دوز ۷۵ بوده است (نمودار ۱).

مطالعات قبلی نشان می‌دهد که ژن و پروتئین PTEN در بافت پستان و پروستات نیز بطور معمولی یافت می‌شود. یعنی مقدار آن در حضور سرطان کم می‌شود. این ژن بعنوان یک سرکوب کننده تومور از طریق تنظیم منفی مسیر سیگنالینگ Akt عمل می‌کند (۱۰). مطالعات متعدد دیگری نیز ارتباط ژن PTEN را با سرطان پستان نشان می‌دهند. Alimonti نشان داد که پروتئین PTEN در بیش از ۵۰٪ موارد تومورهای اسپورادیک سرطان پستان بیان پایینی دارد که در مقایسه با انواع دیگر سرطان، خصوصا سرطان پروستات، جهش‌ها و حذف‌های ژنی در سرطان‌های انفرادی مشترک نیستند (۲۴).

همچنین Jones و همکاران به منظور بهبود درک نقش PTEN در سرطان پستان از نظر دوز احتمالی و عملکرد مسیر PI3K و ارتباط آن با ژن P53مطالعه ای انجام دادند. نتایج این مطالعه نشان داد که کاهش بیان ژن PTEN ارتباطی با گیرنده‌های هورمونی یا انواع زیر گروه‌های سرطان پستان نداشته است (۲۵). مطالعه

www.SID.ir

Archive of SID

Kechagioglou و همکاران نیز نشان داد سرطان‌زایی به طور بالقوه با از دست دادن فعالیت ژن PTEN مرتبط است (۲۶).

از طرفی مطالعات انجام شده نشان می‌دهند که ژن MAGI-2 که در بافت‌های مختلف بدن بیان می‌شود، در همراهی با حذف PTEN گزارش شده است (۱۱،۱۹). بررسی‌ها نشان داده که در سرطان پروستات نوعی میکروآرانای باعث کاهش بیان ژن MAGI-2 شده و مهار بیان این ژن سطح پروتئین آنرا پایین می‌آورد. این تغییر باعث کاهش عملکرد PTEN نیز شده و می‌تواند آغازگر روند بدخیمی پروستات باشد (۲۰).

در مطالعه ما بیشترین بیان ژن MAGI-2 در نمونه توموری روز ۲۱ نسبت به سایر نمونه‌ها دیده شد. در حالیکه عصاره ساقه با دوز ۲۵۰ در روز ۲۱، و همچنین عصاره ریشه با همان دوز و در همان روز ۲۱ باعث کاهش بیان ژن MAGI-2 شده است (نمودار ۲). با توجه به مطالعات گذشته ژن MAGI-2 در سیناپس سلولی نقش دارد و باعث افزایش ارتباطات سلولی می‌گردد (۱۱)، همچنین در میان سه تیپ ژن‌های خانواده MAGI ، ژن MAGI-1 نقش مهمی در متاستاز سرطان دارد که با میانجی‌گری ژن MAGI-2، که خود در ارتباط با ژن PTEN است، نقش خود را ایفا می‌کند (۲۷).

بنابراین به نظر می‌رسد افزایش بیان این ژن روند سرطانی شدن بافت را افزایش دهد. پس انتظار این است که در نمونه‌های توموری میزان بیان آن بیشتر شده و با انجام تیمار عصاره ساقه و ریشه گیاه گزنه میزان بیان آن کاهش یابد. این موضوع در تحقیق انجام شده اثر بخشی عصاره گیاه گزنه را بر مهار سرطان نشان می‌دهد. از طرفی با توجه به ارتباط عملکردی این ژن با ژن PTEN انتظار می‌رود که با افزایش بیان ژن MAGI-2 میزان بیان ژن PTEN نیز افزایش یابد. هر دوی این موارد در نمودارهای ۱ و ۲ دیده می‌شود.

از طرفی با توجه به بررسی‌هایی که روی ژن SMAD صورت گرفته، نشان داده شده است که این ژن به عنوان یک میانجی ضروری برای رسپتور فاکتور TGF-β فعالیت می‌کند. ژن SMAD-2 در واقع فاکتور TGF-β را تحریک کرده و به دنبال آن فرآیند آپوپتوز، کنترل بیان ژن، رشد سلول و متوقف کنندگی تومور هم تنظیم می‌شود. همچنین بررسی‌هایی که روی سلول‌های اپیتلیال بازال در پروستات موش انجام شده، نشان می‌دهد که فقدان ژن SMAD-2 در این سلول‌ها، تومورزایی را افزایش می‌دهد (۱۵). در این مطالعه نیز نشان داده شد که میزان بیان این ژن در نمونه‌های توموری کاهش، و در تیمار با عصاره و با افزایش زمان افزایش می‌یابد (نمودار ۳).

همچنین طبق جدول ۲ عصاره ریشه با دوز ۷۵ در روز ۱۴ و عصاره ریشه با دوز ۲۵۰ در روز ۲۱ بیان ژن را افزایش داده است. مطالعات قبلی نیز نشان داد که عدم بیان این ژن به تنهایی باعث بدخیم شدن سلول‌های سرطانی می‌شود (۱۵). بنابراین به نظر می‌رسد در سلول‌های سرطانی شده، میزان بیان این ژن کاهش یافته و تیمار با عصاره‌های ساقه و ریشه باعث افزایش بیان این ژن می‌شود. به این ترتیب اثربخشی عصاره گیاه گزنه در مهار روند سرطانی شدن در این مطالعه دیده می‌شود. در سال‌های اخیر استفاده از محصولات گیاهی با توجه به متابولیت‌های متنوع گیاهی و ساختارهای بیولوژیکی، در درمان بسیاری از بیماری‌ها رو به افزایش می‌باشد (۲۱).

از سویی دیگر سلول نیاز به ترکیبات آنتی‌اکسیدان دارد زیرا این ترکیبات یا مانع فعالیت رادیکال‌های آزاد شده و یا باعث حذف آنها می‌شوند و سلول‌های بدن را از اثرات مخرب این ترکیبات مصون می‌دارند. همچنین این مواد از تشکیل رادیکال‌های آزاد در بدن جلوگیری می‌کنند و تاثیر آنها را در بدن کاهش می‌دهند. در واقع این ترکیبات با اثرات خود، مانع پیشرفت سرطان می‌شوند (۲۲و ۲۳). به نظر می‌رسد گیاه گزنه و متابولیت‌های

www.SID.ir

Archive of SID

حاصل از آن کاندیدی قوی برای سنتز ترکیبات آنتی اکسیدانی باشد.

با توجه به نتایج بدست آمده از اثر عصاره هیدروالکلی ساقه و ریشه گزنه بر بیان ژن‌های PTEN، MAGI-2 و SMAD-2 مشخص شد که عصاره، اثر افزایش دهنده بر بیان ژن‌ها دارد. بنابراین به نظر می‌رسد که عصاره ساقه و ریشه گیاه گزنه اثرات مهاری بر تومور القا شده داشته باشد. همچنین با توجه به افزایش بیان ژن در گروه‌های توموری نسبت به کنترل، در روزهای اول، اینطور به نظر می‌رسد که در مراحل اولیه القای تومور، افزایش بیان وجود دارد و در مراحل پیشرفته‌تر، با کاهش بیان همراه است. لذا این فرآیند می‌تواند به عنوان یک فاکتور شناسایی در مراحل اولیه سرطان، در نظر گرفته شود.

تشکر و قدردانی

از همکاران محترم گروه زیست‌شناسی دانشگاه آزاد اسلامی و همچنین مرکز تحقیقات بیولوژی کاربردی تکوین جانوری و پژوهشکده خوارزمی که در اجرای این پژوهش ما را یاری نموده‌اند، نهایت تشکر و قدردانی را داریم .

www.SID.ir

Archive of SID

References

1. Amin A, Gali-Muhtasib H, Ocker M, Schneider-Stock R. Overview of major classes of plant-derived anticancer drugs. 2009; IJBS, 5(1), 1-8.
2. Kavalal G, Tuncel H, Göksel S, Hatemi, HH. Hypoglycemic activity of Urtica pilulifera in streptozotocin-diabetic rats. J Ethnopharm, 2003; 84(2-3). 241-245.
3. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. CA: Cancer J Clin, 2011; 61(2), 69-90.
4. Ashida S, Nakagawa H, Katagiri T, Furihata M, Iiizumi M, Anazawa Y, et al. Molecular features of the transition from prostatic intraepithelial neoplasia (PIN) to prostate cancer: genome-wide gene-expression profiles of prostate cancers and PINs. Cancer Res, 2004; 64(17), 5963-5972.
5. Eeles RA, Kotejarai Z, Giles GG, Al Olama AA, Guy M, Jugurnnuth SK, et al. Multiple newly identified loci associated whit prostate cancer susceptibility. Nat Genet. 2008; 40(3), 316.
6. Toko T, Shibata J, Sugimoto Y, Yamaya H, Yoshida M, Ogawa K, Matsushima E. Comparative pharmacodynamic analysis of TAT-59 and tamoxifen in rats bearing DMBA-induced mammary carcinoma. Cancer Chem Pharm, 1995; 37(1-2), pp.7-13.
7. Luo S, Labrie C, Bélanger A, Candas B, Labrie F. Prevention of development of dimethylbenz (a) anthracene (DMBA)-induced mammary tumors in the rat by the new nonsteroidal antiestrogen EM-800 (SCH57050). Breast Cancer Res Treat, 1998; 49(1), 1-11.
8. Miyata M, Furukawa M, Takahashi K, Gonzalez FJ, Yamazoe Y. Mechanism of 7, 12-dimethylbenz [a] anthracene-induced immunotoxicity: Role of metabolic activation at the target organ. Jpn J Pharmacol, 2001; 86(3), 302-309.
9. Mulholland DJ, Tran LM, Li Y, Cai H, Morim A, Wang S, et al. Cell autonomous role of PTEN in regulating castration-resistant prostate cancer growth. Can Cell, 2011; 19(6), 792-804.
10. Esteva FJ, Guo H, Zhang S, Santa-Maria C, Stone S, Lanchbury JS, et al. PTEN, PIK3CA, p-AKT, and p-p70S6K status: association with trastuzumab response and survival in patients with HER2-positive metastatic breast cancer. Am J pathol. 2010; 1;177(4):1647-1656.
11. Berger MF, Lawrence MS, Demichelis F, Drier Y, Cibulskis K, Sivachenko AY, et al. The genomic complexity of primary human prostate cancer. Nature, 2011; 470(7333), 214.
12. Koide T, Banno M, Aleksic B, Yamashita S, Kikuchi T, Kohmura K, et al. Common variants in MAGI2 gene are associated with increased risk for Cognitive Impairment in Schizophrenic Patients. 2012; PLOS ONE open access, 7(9): e36836.
13. Shi Y, Wang J, Chandarlapaty S, Cross J, Thompson C, Rosen N, Jiang X. PTEN is a protein tyrosine phosphatase for IRS. Nat Struct Mol Biol, 2014; 21 (6): 522–527.
14. Wu X, Hepner K, Castelino-Prabhu S, Do D, Kaye MB, Yuan XJ, et al. Evidence for

www.SID.ir

Archive of SID

regulation of the PTEN tumor suppressor by a membrane-localized multi-PDZ domain containing scaffold protein MAGI-2. Proc Natl Acad Sci , 2000; 97(8), 4233-4238.

15. Yang J, Wahdan-Alaswad R, Danielpour D. Critical role of smad2 in tumor suppression and transforming growth factor-β–induced apoptosis of prostate epithelial cells. Cancer Res, 2009; 69(6), 2185-2190.
16. Letterio JJ, Roberts AB. 1998. Regulation of immune responses by TGF-β. Annu Rev Immunol, 1998; 16(1), 137-161.
17. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Cellular and molecular immunology E-book. Elsevier Heal Sci, 2014.
18. Phin S, Moore M, Cotter PD. 2013. Genomic rearrangements of PTEN in prostate cancer. Front Onco, 2013; 3(1), 240.
19. Tolkacheva T, Boddapati M, Sanfiz A, Tsuchida K, Kimmelman AC, Chan AM. Regulation of PTEN binding to MAGI-2 by two putative phosphorylation sites at threonine 382 and 383. Cancer Res, 2001; 61(13), 4985-4995.
20. Sachdeva M, Wu H, Ru P, Hwang L, Trieu V, Mo, YY. MicroRNA-101-mediated Akt activation and estrogen-independent growth. Oncogene, 2011; 30(7), 822.
21. Sharma M, Govind P. 2009. Ethnomedicinal plants for prevention and treatment of tumours. I J G P, 2009; 3(1).
22. Noguchi N, Niki E. Phenolic antioxidants: A rationale for design and evaluation of novel antioxidant drug for atherosclerosis. Free Radic Biol Med, 2000; 28(10), 1538-1546.
23. Konrad L, Müller HH, Lenz C, Laubinger H, Aumüller G, Lichius JJ. Antiproliferative effect on human prostate cancer cells by a stinging nettle root (Urtica dioica) extract. Planta Med, 2000; 66(01), 44-47.
24. Alimonti A. PTEN breast cancer susceptibility: a matter of dose. ecancer 2010, 4:192 DOI: 10.3332/ecancer.
25. Jones N, Bonnet FO, Sfar S, Lafitte M, Lafon D, Sierankowski G, Brouste V, Banneau G, Tunon de Lara C, Debled M, MacGrogan G. Longy M, and Sevenet N. Comprehensive analysis of PTEN status in breast carcinomas. I. J. C 2013: 133, 323–335.
26. Kechagioglou P, Papi RM, Provatopoulou X, Kalogera E, Papadimitriou E, Grigoropoulos P, Nonni A, Zografos Z, Kyriakidis DA, and Gounaris A. Tumor Suppressor PTEN in Breast Cancer: Heterozygosity, Mutations and Protein Expression. AntiCan Res 2014; 34: 1387-1400.
27. Kitamura K, Seike M, Okano T, Matsuda K, Miyanaga A, Mizutani H, Noro R, Minegishi Y, Kubota K, Gemma A. MiR-134/487b/655 clusters regulates TGF-β-induced epithelial-mesenchymal transition and drug resistance to gefitinib by targeting MAGI2 in lung adenocarcinoma cells. Mol Cancer Ther 2014; 13(2): 444-453.

www.SID.ir

Archive of SID

Study of gene expression changes in primary prostate cancer of mice treated with Urtica dioica L

Vahabzade Shahri M[1], Shahrokhabadi Kh[2*], Baharara J[3]

1. MSc of Genetic, Department of Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran

2. Assistant Professor of Molecular Genetic, Department of Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran, shahrokhabady@yahoo.com

3. Professor of Animal Development, Department of Biology, Applied Biology Research Center, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran

Received: *23 Jun 2021* Accepted: *3 April 2021*

Abstract

***Background*:** The role of tumor suppressor genes in the development of prostate cancer is well known. Decrease or lack of expression of these genes causes the tumor to spread through metastasis to other tissues of the body. Since nettle has anti-cancer effects, the aim of this study was to investigate the effects of hydroalcoholic extract of nettle stem and root on the expression changes of PTEN, MAGI-2 and SMAD-2 genes in mouse prostate induced tumor.

Materials and Methods: In this experimental study, hydroalcoholic extract of nettle was prepared by Soxhlet apparatus. The mice were injected subcutaneously for 28 days after injection of DMBA carcinoma with doses of 75 and 250 mg/kg, respectively. Also, the control group received no drug and the sham group received only the extract. The expression changes of the target genes were analyzed by Real Time PCR and the results were analyzed statistically.

Results: The results showed that PTEN gene expression was increased in treatment with 250 root extract compared to day 14 turmeric. Expression of MAGI-2 gene was increased in treatment with root extract of 75 dose on day 28 compared to day 28 tumor. Evaluation of SMAD-2 gene expression showed that expression of this gene in treatment group with 250 root extract increased on day 21 compared to day 21 tumor.

Conclusion: According to studies on PTEN, MAGI-2 and SMAD-2 have revealed that inactivation of these three genes is considered a risk for cancer progression.

Keywords: Prostate Cancer, Urtica dioica, PTEN, MAGI-2, SMAD-2.

Citation: Vahabzade Shahri M, Shahrokhabadi Kh, Baharara J. Study of gene expression changes in primary prostate cancer of mice treated with Urtica dioica L. Yafte. 2021; 23(2):35-45.

www.SID.ir