

تأثیر اسیدستریک بر میزان بیان ژن‌های $p21$ و $p53$ در رده سلولی آدنوکارسینوما معده انسان (AGS)

نویسندگان:

حامد نصر اصفهانی^۱، لیلا روحی^{۲*}، نوشا ضیاء جهرمی^۳، خلیل خاشعی ورنامخواستی^۴

- ۱- گروه ژنتیک، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران
- ۲- گروه فیزیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران
- ۳- گروه بیوشیمی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران
- ۴- گروه ژنتیک، دانشکده پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی کازرون، کازرون، ایران

Pars Journal of Medical Sciences, Vol.18, No.4, Winter 2021

چکیده:

مقدمه: آدنوکارسینوما معده دومین عامل مرگ ناشی از سرطان در سراسر جهان است. اسیدستریک یک اسید آلی طبیعی، به عنوان یک مهارکننده فیزیولوژیکی آنزیم‌های دخیل در مسیر گلیکولیز، در راستای حذف سلول‌های سرطانی مورد توجه می‌باشد. در این مطالعه اثر اسیدستریک بر میزان بیان ژن‌های $p21$ و $p53$ در رده سلولی آدنوکارسینوما معده انسان (AGS) مورد بررسی قرار گرفت.

روش کار: سلول‌های رده‌ی AGS با غلظت‌های مختلف اسیدستریک شامل ۴۰۰، ۸۰۰ و ۱۶۰۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر برای بررسی بیان ژن‌های $p53$ و $p21$ ظرف مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت انکوبه شدند. سپس میزان بیان ژن‌های مذکور از طریق تحلیل Real Time-PCR مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج حاصل از این پژوهش حاکی از آن است که تیمار با اسیدستریک سبب افزایش معناداری در بیان ژن‌های $p53$ و $p21$ در گروه‌های آزمایشی نسبت به گروه کنترل شد. افزایش بیان ژن $p53$ به صورت غیر وابسته به دوز و زمان در زمان‌های انکوباسیون ۲۴ و ۴۸ ساعته به ترتیب در غلظت ۱۶۰۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر و ۸۰۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر در مقایسه با گروه کنترل معنادار بود. افزایش بیان برای ژن $p21$ در هر دو زمان انکوباسیون به صورت وابسته به دوز و زمان بود.

نتیجه‌گیری: اسیدستریک قادر است با القاء بیان ژن‌های دخیل در مسیر آپوپتوز و جلوگیری از تکثیر، از میزان رشد سلول‌های آدنوکارسینوما معده کم کند. از این رو، به نظر می‌رسد اسیدستریک بتواند به عنوان یک ماده‌ی ضد سرطان در راستای درمان سرطان معده به کار رود.

واژگان کلیدی: اسیدستریک، آدنوکارسینوما، بیان ژن، $p21$ ، $p53$

Pars J Med Sci 2021;18(4):17-24

مقدمه:

سرطان به دسته‌ای از توده‌های سلولی با خصوصیت بدخیم اطلاق می‌شود. امروزه سرطان‌ها شایع‌ترین و شدیدترین بیماری‌های مشاهده شده در طب بالینی هستند [۱، ۲]. در بین انواع بدخیمی‌ها، آدنوکارسینوما معده یکی از سرطان‌های شایع در سراسر جهان است. با وجود کاهش میزان بروز آدنوکارسینوما معده در سال‌های اخیر، همچنان این نوع سرطان به عنوان چهارمین سرطان شایع و دومین علت مرگ ناشی از سرطان در جهان

محسوب می‌شود [۳]. سن شایع این بدخیمی دهه‌ی ششم عمر است، اما وقوع آن در سنین پایین‌تر نیز مشاهده شده است. سرطان معده از جمله بیماری‌هایی است که اگر زود تشخیص داده شود به طور کامل قابل علاج بوده، ولی در صورت تشخیص دیر هنگام ممکن است از معده فراتر رفته و به نقاط دیگر بدن دست‌اندازی کند. درمان اصلی این سرطان در مراحل اولیه با کمک فقط جراحی و در مراحل پیشرفته با انجام جراحی به همراه

* نویسنده مسئول، نشانی: گروه فیزیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

تلفن تماس: ۰۹۱۲۶۰۴۳۳۰۵

پست الکترونیک: lrouhi59@gmail.com

دریافت: ۱۳۹۹/۷/۱۳

اصلاح: ۱۳۹۹/۹/۲۲

پذیرش: ۱۳۹۹/۱۱/۱۱

پایداری یک جزء ساختاری این منافذ با عنوان VDAC شده که نقش آن تنظیم نفوذپذیری منافذ است. بدین ترتیب، پایداری ایجاد شده در این جزء توسط هگزوکیناز II، نفوذپذیری را در غشاء خارجی غیرفعال می‌کند. با حذف هگزوکیناز II از مجموعه، نفوذپذیری در غشاء خارجی میتوکندری القاء می‌شود که به دنبال آن سیتوکروم C به درن سیتوپلاسم ترشح شده و آبشارکسپازی به راه افتاده باعث القاء آپوپتوز می‌شود. اسیدسیتریک از طریق تأثیرگذاری بر سطح آنزیم هگزوکیناز II و دیگر آنزیم‌های دخیل در مسیر گلیکولیز عملکرد ضد سرطانی خود را اعمال می‌کند [۱۴-۱۲]. از این رو، مطالعه حاضر با هدف بررسی تأثیر این اسید و مدت زمان انکوباسیون با آن بر میزان بیان ژن‌های *p21* و *p53* در رده سلولی آدنوکارسینومای معده انسان انجام شد.

روش کار:

این مطالعه به صورت تجربی از اردیبهشت ۱۳۹۷ تا شهریور ۱۳۹۷ در مرکز تحقیقات سلولی-تکوینی و مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد با مجوز اخلاق در پژوهش به شماره IR.IAU.SHK.REC.1397.028 انجام شد. رده‌ی سلولی AGS از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران خریداری شد. در محیط کشت DMEM-F12 (Dulbecco's Modified Eagle's medium) (Gibco, USA) حاوی ۱۰ درصد FBS (Foetal Bovine Serum) (Gibco, USA) و یک درصد Penstrep (Penicillin-Streptomycin) (Gibco, USA) در انکوباتور (Memmert, Germany) با فشار ۵ درصد گاز CO₂، رطوبت ۹۰ درصد و دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی گراد، در فلاسک ۷۵ کشت داده شد. محیط کشت هفته‌ای سه بار تعویض و برای برداشت سلول‌ها از محلول تریپسین/EDTA استفاده شد. اسیدسیتریک به صورت آماده و به حالت جامد از شرکت SIGMA-ALDRICH با نام تجاری Citric acid- anhydrous، cell culture tested و شماره محصول C۲۴۰۴ تهیه شد. به منظور بررسی میزان بیان ژن‌های *p53* و *p21*، تعداد ۳×۱۰^۵ سلول در پلیت‌های شش خانه کشت داده شدند. سپس با غلظت‌های ۴۰۰، ۸۰۰ و ۱۶۰۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر اسیدسیتریک [۱۵] در بازه‌های زمانی ۲۴ و ۴۸ ساعت تیمار و انکوبه شدند. پس از گذشت زمان‌های مذکور سلول‌ها در سه گروه آزمایش با سه غلظت مختلف ۴۰۰، ۸۰۰ و ۱۶۰۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر و گروه کنترل برداشت و پس از شستشو با بافر PBS، Total RNA سلولی با استفاده از معرف بایوزول (Biozol Total RNA Extraction reagent)، با شماره محصول (BSC51M1)، (BioFlux, China) جداسازی شدند. به منظور انجام مرحله Heat block، نمونه‌های حاصل از مرحله‌ی قبل در دستگاه ترموسایکلر با دمای ۶۰ درجه

شیمی درمانی و رادیو درمانی است که معمولاً با نتایج خوبی همراه نیست [۴]. بنابراین، یک نیاز فوری برای یافتن راهکارهای درمانی موثرتر به منظور افزایش مدت زمان بقاء مبتلایان احساس می‌شود. از آن جایی که مقاومت به مرگ سلولی و عدم وجود تعادل بین تقسیم سلولی و مرگ سلولی، منجر به عدم کنترل تکثیر سلول‌های توموری معده می‌شود، هم‌اکنون بیشتر توجه‌ها به سوی شناسایی ترکیبات درمانی جلب شده است که می‌توانند تکثیر سلول‌های سرطانی معده را مهار کنند. برخی از این ترکیبات با هدف قرار دادن پروتئین‌های ضد آپوپتوزی منجر به افزایش پروتئین‌های پروآپوپتوزی از جمله *p53* و *p21* و تسهیل القاء آپوپتوز در سلول‌های سرطانی شده و بدین طریق باعث مرگ سلول‌های توموری می‌شوند [۵، ۶]. پروتئین *p53* توسط ژن سرکوبگر تومور *p53* واقع بر کروموزوم شماره‌ی ۱۷ رمزگذاری می‌شود. این پروتئین دارای نیمه عمر کوتاهی است و در سلول به طور طبیعی انباشته نمی‌شود، اما به محض وقوع آسیب به DNA، سطح آن به منظور ترمیم DNA یا القاء آپوپتوز افزایش می‌یابد. در این زمان پروتئین *p53* از طریق اتصال به DNA باعث تحریک ژن *WAF1* واقع در موقعیت کروموزومی *6p21.2* می‌شود که این ژن سازنده‌ی پروتئین *P21* است. پروتئین مذکور به پروتئین CDK2 می‌چسبد و اجازه‌ی ورود سلول به مرحله‌ی بعد را نداد و چرخه سلولی ترمیم را متوقف می‌کند. بدین ترتیب، پروتئین *p53* از طریق افزایش بیان پروتئین پروآپوپتوزی BAX آپوپتوز را القاء می‌کند [۸، ۷]. از جمله‌ی این ترکیبات می‌توان به ترکیبات با منشأ طبیعی اشاره کرد. استفاده از ترکیبات طبیعی به عنوان دارو به دلیل دارا بودن اثرات جانبی کمتر در مقایسه با ترکیبات شیمیایی همواره مورد توجه بوده است. از گذشته، ترکیبات طبیعی منبع منحصر به فردی برای تأمین داروهای مصرفی جامعه‌ی بشری بوده‌اند و به خاطر عدم بروز مشکلات بیشتر در اثر استفاده از آن‌ها نقش مهمی در درمان بیماری‌های انسانی ایفا کرده‌اند [۹]. اسیدسیتریک یک اسید آلی طبیعی است که عموماً در عصاره‌ی برخی از میوه‌جات و سبزیجات به ویژه مرکبات یافت می‌شود. این اسید آلی هم‌اکنون به طور گسترده به عنوان یکی از افزودنی‌ها و نگهدارنده‌های غذایی در صنعت مورد استفاده قرار می‌گیرد [۱۰]. علاوه بر آن، امروزه اسیدسیتریک به عنوان یک مهارکننده‌ی فیزیولوژیکی آنزیم‌های دخیل در مسیر گلیکولیز، در راستای حذف سلول‌های سرطانی از طریق القای مرگ برنامه‌ریزی شده نیز مورد توجه قرار گرفته است [۱۱]. ارتباط بین گلیکولیز و آپوپتوز به سطح آنزیم هگزوکیناز II بر می‌گردد. آنزیم مذکور گلوکز را به گلوکز ۶ فسفات تبدیل کرده و باعث پیشبرد فرآیند گلیکولیز به وسیله‌ی آبشار آنزیمی می‌شود و زمانی که منافذ غشاء خارجی میتوکندری باز هستند، باعث

(PCR) (Ampliqon) تهیه شد. توالی پرایمرهای پیش رو و پس رو ژن‌های GAPDH، *p53* و *P21* با استفاده از نرم افزار Oligo6 طراحی و سپس با Blast نمودن آن‌ها در NCBI از صحیح بودن آن‌ها اطمینان حاصل و در نهایت توسط شرکت Macrogen سنتز شدند (جدول ۱). از ژن GAPDH، به عنوان کنترل داخلی استفاده شد. سپس مخلوط واکنش پس از آماده سازی با حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر تحت تاثیر برنامه‌ی دمایی ذکر شده در جدول ۲ قرار گرفت. در نهایت تحلیل آماری با استفاده از آزمون من ویتنی با کمک نرم افزار SPSS انجام شد. حدود اطمینان برای تمام آزمون‌ها ۹۵٪ و سطح معناداری آماری $P < 5\%$ در نظر گرفته شد.

سانتی گراد به مدت ۲۰ دقیقه قرار داده شدند. در ادامه تمام توالی‌های RNA با استفاده از کیت سنتز cDNA (PrimeScript™ RT Reagent kit (Perfect Real Time)، (Takara)، به cDNA تبدیل و به فریزر -۲۰ درجه سانتی گراد منتقل شدند. سنجش میزان بیان ژن‌های *P21* و *p53* با استفاده از دستگاه Real Time PCR مدل Rotor gene 3000 corbett (Australia) ارزیابی شد. برای انجام واکنش، مخلوط واکنشی متشکل از cDNA، به مقدار ۱ میکرولیتر، پرایمر رفت و برگشت هر کدام به مقدار ۰/۵ میکرولیتر، RNase-free water، به مقدار ۵/۵ میکرولیتر و ۱۲/۵ میکرولیتر مسترمیکس (Master Mix RT-) قرار داده شدند.

جدول ۱: مشخصات پرایمرهای مورد مطالعه

	Official Name (gene)	mRNA accession number	Primers	RNA	DNA	Intron-span
1	<i>P53</i>	NM-00546.5	F ACATAGTGTGGTGGTGCCCT R ACCTCAAAGCTGTTCCGTC	20	152	-
2	<i>P21</i>	NM-001291549.1	F CATGTGGACCTGTCAGTGTCTT R CTGGTCTGCCGCGCTTTTC	22	110	-
3	GAPDH	NM-001256799.2	F CACATGGCTCCAAGGAGTAAG R AGGGGAGATTCAGTGTGGTG	22	286	286

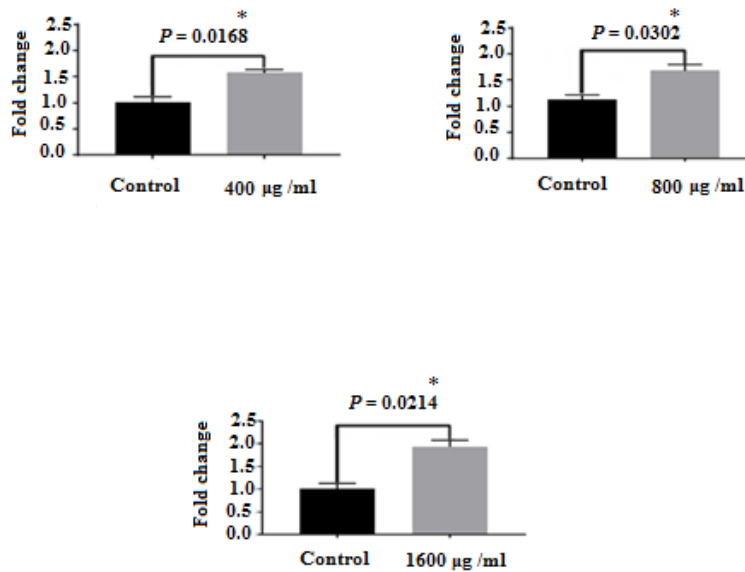
جدول ۲: شرایط دمایی واکنش Rael Time PCR

۱ سیکل	۹۵ درجه‌ی سانتی گراد	۱۰ دقیقه	PCR initial denaturation step
	۹۵ درجه‌ی سانتی گراد <td>۱۵ ثانیه <td>Denaturation</td> </td>	۱۵ ثانیه <td>Denaturation</td>	Denaturation
	۶۲ درجه‌ی سانتی گراد <td>۶۰ ثانیه <td>Annealing <i>p21</i> gene</td> </td>	۶۰ ثانیه <td>Annealing <i>p21</i> gene</td>	Annealing <i>p21</i> gene
۴۰ سیکل	۶۲ درجه‌ی سانتی گراد <td>۶۰ ثانیه <td>Annealing <i>p53</i> gene</td> </td>	۶۰ ثانیه <td>Annealing <i>p53</i> gene</td>	Annealing <i>p53</i> gene
	۶۱ درجه‌ی سانتی گراد <td>۶۰ ثانیه <td>Annealing <i>GAPDH</i> gene</td> </td>	۶۰ ثانیه <td>Annealing <i>GAPDH</i> gene</td>	Annealing <i>GAPDH</i> gene

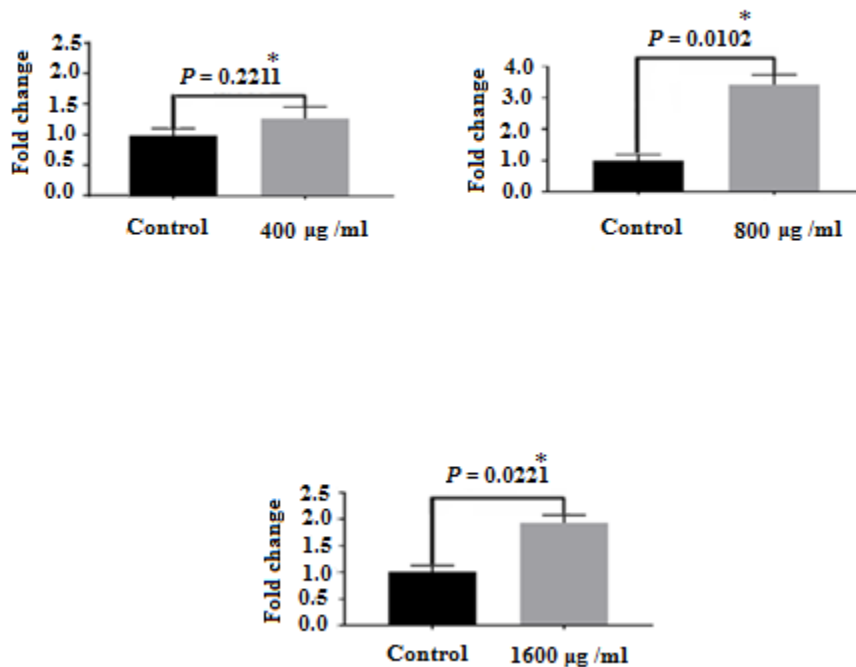
یافته‌ها:

به گروه کنترل به صورت وابسته به دوز مشاهده شد. حال آن که افزایش در میزان بیان ژن *p53* به صورت غیر وابسته به دوز در برخی از غلظت‌های اسیدسیتریک نسبت به گروه کنترل به طور چشمگیرتری مشاهده شد. بیشترین میزان بیان ژن مذکور مربوط به تیمار با غلظت ۸۰۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر بود که در حقیقت نشان دهنده‌ی اثر گذاری بیشتر این دوز از اسیدسیتریک بر مهار روند رشد سلول‌های سرطانی است.

میزان بیان ژن‌های *p21* و *p53* در رده سلولی AGS تیمار شده با غلظت‌های مختلف اسیدسیتریک (۴۰۰، ۸۰۰ و ۱۶۰۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر) بعد از گذشت زمان‌های دو گانه‌ی انکوباسیون (۲۴ و ۴۸ ساعت) با استفاده از Real Time-PCR مورد بررسی قرار گرفت. تجزیه و تحلیل مقادیر Ct حاصل با استفاده از فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$ بیانگر افزایش در میزان بیان هر دو ژن یاد شده در مقایسه با ژن مرجع در برخی از غلظت‌های مشخص است (شکل‌های ۱-۴). این افزایش در میزان بیان ژن *p21* در گروه‌های آزمایشی نسبت

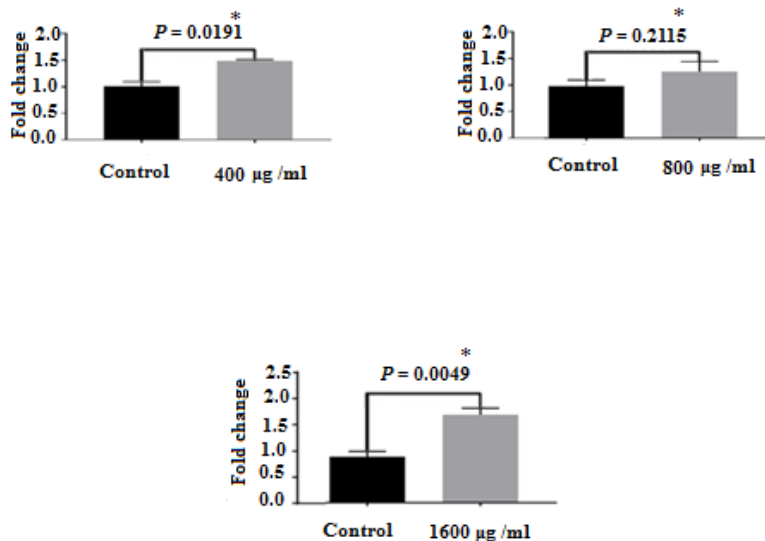
p53 - 24h

شکل ۱: نمودار میزان بیان ژن p53 بر اساس Ct در غلظت‌های (۴۰۰، ۸۰۰ و ۱۶۰۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر) و زمان انکوباسیون ۲۴ ساعت. $P < 0.05$ * اختلاف معنادار سایر گروه‌ها در مقابل گروه کنترل. داده‌ها به صورت $\text{mean} \pm \text{SD}$ نمایش داده شده‌اند.

p53 - 48h

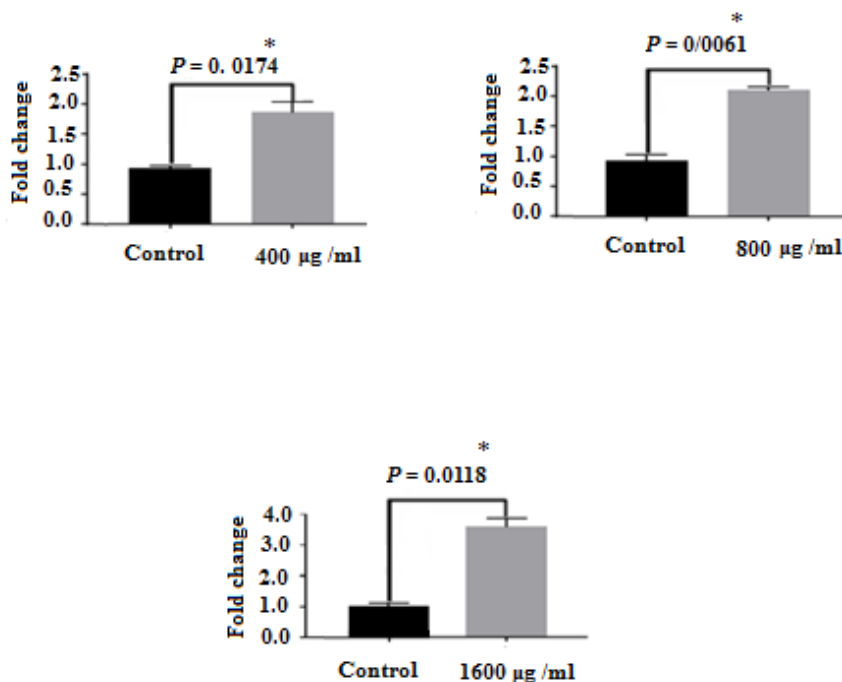
شکل ۲: نمودار میزان بیان ژن p53 بر اساس Ct در غلظت‌های (۴۰۰، ۸۰۰ و ۱۶۰۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر) و زمان انکوباسیون ۴۸ ساعت. $P < 0.05$ * اختلاف معنادار سایر گروه‌ها در مقابل گروه کنترل. داده‌ها به صورت $\text{mean} \pm \text{SD}$ نمایش داده شده‌اند.

p21 - 24 h



شکل ۳: نمودار میزان بیان ژن *p21* براساس Ct در غلظت‌های (۴۰۰، ۸۰۰ و ۱۶۰۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر) و زمان انکوباسیون ۲۴ ساعت. $P < 0.05$ * اختلاف معنادار سایر گروه‌ها در مقابل گروه کنترل. داده‌ها به صورت $\text{mean} \pm \text{SD}$ نمایش داده شده‌اند.

p21 - 48h



شکل ۴: میزان بیان ژن *p21* براساس Ct در غلظت‌های (۴۰۰، ۸۰۰ و ۱۶۰۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر) و زمان انکوباسیون ۴۸ ساعت. $P < 0.05$ * اختلاف معنادار سایر گروه‌ها در مقابل گروه کنترل. داده‌ها به صورت $\text{mean} \pm \text{SD}$ نمایش داده شده‌اند.

بحث:

۲۰۱۳ نشان داد که اسیدسیتریک نه تنها مانع از تکثیر سلول‌های HaCaT به صورت وابسته به دوز می‌شود، بلکه باعث القاء ژن‌های پروآپتوزی و توقف چرخه سلولی در مرحله G2/M می‌شود [۱۷]. در سال ۲۰۱۷ بررسی اثر درمانی اسیدسیتریک در سلول‌های مختلف سرطان نشان داد که تمایز سلول‌های سرطانی با اثر سیتریک اسید از طریق مهار چرخه‌ی تری کربوکسیلیک اسید متوقف می‌شود. بنابر این اسیدسیتریک می‌تواند برای درمان سرطان مفید باشد [۱۸]. از آن جایی که دخالت سایر ژن‌های دخیل در مسیرهای پیام رسان سلولی ممکن است بر تکثیر و فراوانی سلول‌های سرطانی معده از مرگ سلولی نقش ایفا کنند، پیشنهاد می‌شود مطالعات بیشتری در خصوص دیگر ژن‌ها انجام شود.

نتیجه‌گیری:

نتایج حاصل از Real Time PCR در پژوهش حاضر، بیانگر آن است که اسیدسیتریک قادر است با تأثیرگذاری بر بیان ژن‌های $p53$ و $p21$ و افزایش میزان تولید محصول آن‌ها مرگ را در سلول‌های آدنوکارسینومای معده انسان القاء کرده و از این طریق در درمان سرطان معده مؤثر واقع شود.

تشکر و قدردانی:

این مقاله حاصل پایان‌نامه کارشناسی ارشد با عنوان بررسی اثر اسیدسیتریک بر میزان بیان ژن‌های $p21$ و $p53$ در رده سلولی آدنوکارسینومای معده انسان (AGS) مصوب دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد در سال ۱۳۹۷ است. بدین وسیله از کلیه عزیزانی که در انجام آن همکاری داشته‌اند سپاسگزاری می‌شود.

در پژوهش حاضر توانایی اسیدسیتریک در تغییر بیان ژن‌های رمزکننده‌ی پروتئین‌های پروآپتوزی دخیل در مسیر مرگ سلولی سلول‌های رده‌ی آدنوکارسینومای معده انسان مورد بررسی قرار گرفت. در این پژوهش تیمار سلول‌های آدنوکارسینومای معده انسان با غلظت‌های مختلف اسیدسیتریک (۴۰۰، ۸۰۰ و ۱۶۰۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر) و انکوباسیون با زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت نتایج قابل توجهی را در افزایش میزان بیان ژن‌های هدف پژوهش ($p53$ و $p21$) نشان داد. شایان ذکر است که این افزایش در میزان بیان ژن $p21$ ، در گروه‌های آزمایشی نسبت به گروه کنترل به صورت وابسته به دوز و زمان مشاهده شد، حال آن که افزایش در میزان بیان ژن $p53$ به صورت غیر وابسته به دوز و زمان در برخی از غلظت‌های اسیدسیتریک نسبت به گروه کنترل به طور چشمگیرتری مشاهده شد. بیشترین میزان بیان ژن $p53$ در زمان‌های انکوباسیون ۲۴ و ۴۸ ساعت به ترتیب مربوط به تیمار با غلظت ۱۶۰۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر و ۸۰۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر بود که در حقیقت نشان دهنده‌ی اثر گذاری بیشتر این دوزها از اسیدسیتریک بر مهار روند رشد سلول‌های سرطانی است. بررسی انجام شده در سال ۲۰۰۸ در خصوص تأثیر اسیدسیتریک بر رشد و تکثیر سلول‌های سرطانی نشان داد که اسیدسیتریک با تأثیر روی بیان پروتئین $p53$ ، بیان پروتئین $p21$ و آزادسازی سیتوکروم C آپتوز را در سلول‌های سرطانی القاء می‌کند [۱۳]. بر اساس پژوهش انجام شده در سال ۲۰۱۱ نیز مشخص شد که اسیدسیتریک به عنوان یک آنتی‌گلیکولیتیک و مهارکننده‌ی آنزیم فسفو فروکتوکیناز قادر است از طریق کاهش بیان ژن Mcl-1 و افزایش بیان ژن‌های پروآپتوزی $p53$ و $p21$ باعث تخریب سلول‌ها و آپتوز در آن‌ها شود [۱۶]. مطالعه‌ی دیگری در سال

References:

1. Imanipour M. Principles of oncology nursing. Tehran, Tohfe & Boshra, Second ed 2009.[Persian]
2. Farazmandfar T, Janbabaie G, Azadeh H. Common on aspects of cancer. Sari, Mazandaran University of Medical Sciences, 1st ed, 2011.[Persian]
3. Hoda S, Aliee A, and Shakiba M. A study of frequency of cancerous organs in Guilan province (1999-2000). J Med Fac Guilan Uni Med Sci 2003; 12: 84-92.
4. Harrison, Fauci, and Braunwald. Principle of internal medicine. New York, McGraw Hill, 14th ed, 1998; 1610-1612.
5. Broecker-Preuss M, Viehof J, and Jastrow H. Cell death induction by the BH3 mimetic GX15-070 in thyroid carcinoma cells. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research 2015; 34(1): 15-186.
6. Broecker-Preuss M, Becher-Boveleth N, and Müller S. The BH3 mimetic drug ABT-737 induces apoptosis and acts synergistically with chemotherapeutic drugs in thyroid carcinoma cells. Cancer cell international 2016; 16(1): 303-8.
7. Xue X, Yu J-L, Sun D-Q. Curcumin induces apoptosis in SGC-7901 gastric adenocarcinoma cells via regulation of mitochondrial signaling pathways. APJCP 2013; 15(9): 3987-3992.
8. Broecker-Preuss M, Viehof J, Jastrow H. Cell death induction by the BH3 mimetic GX15-070 in thyroid carcinoma cells. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research 2015; 34(1): 15-186.
9. Zhu L, Li L, and Li Y. Chinese Herbal Medicine as an Adjunctive Therapy for Breast Cancer. Evid.comp.alter.med 2016; doi: 10.1155/2016/9469276.
10. Angumeena AR, Venkappayya D. An overview of citric acid production. LWT-Food Sci Technol 2013; 50(2): 367-370.

11. Zhang XD, Varin E, and Icard P. Effect of citrate on malignant pleural mesothelioma cells: a synergistic effect with cisplatin. *Anticancer Res* 2009; 29: 1249-1254.
12. Pedersen PL, Mathupala S, and Rempel A. Mitochondrial bound type II hexokinase: a key player in the growth and survival of many cancers and an ideal prospect for therapeutic intervention. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1555: 14-20.
13. Pastorino JG, Hoek JB. Regulation of hexokinase binding to VDAC. *J Bioenerg Biomembr* 2008; 40: 171-82.
14. Matoba Satoaki. *P53* regulates mitochondrial respiration. *Science* 2006; 312(5780): 1650-1653.
15. Chen X, Lv Q, Liu Y, Deng W. Effect of food additive citric acid on the growth of human esophageal carcinoma cell line EC109. *Cell Journal (Yakhteh)* 2017; 18(4): 493.
16. Lu Y, Zhang X, Zhang H. Citrate induces apoptotic cell death: a promising way to treat gastric carcinoma? *Anticancer research* 2011; 31(3): 797-805.
17. Ying TH, Chen CW, Hsiao YP. Citric acid induces cell-cycle arrest and apoptosis of human immortalized keratinocyte cell line (HaCaT) via caspase- and mitochondrial-dependent signaling pathways. *Anticancer research* 2013; 33(10): 4411-20.
18. Ren JG, Seth P, and Ye H. Citrate Suppresses Tumor Growth in Multiple Models through Inhibition of Glycolysis, the Tricarboxylic Acid Cycle and the IGF-1R Pathway. *Scientific reports* 2017; 7(1): 4537.

Effect of citric acid on *p53* and *p21* genes expression of the human gastric Adenocarcinoma cell line (AGS)

Hamed Nasr Isfahani¹, Leila Rouhi^{2*}, Noosha Ziya Jahromi³, Khalil Khashei Varnamkhasti^{1,4}

Received: 2020.10.04

Revised: 2020.12.12

Accepted: 2021.01.30

1. Department of Genetic, Shahrekord Branch, University of Islamic Azad, Shahrekord, Iran
2. Department of Physiology, Shahrekord Branch, University of Islamic Azad, Shahrekord, Iran
3. Department of Biochemistry, Shahrekord Branch, University of Islamic Azad, Shahrekord, Iran
4. Department of Genetics, School of Medicine, University of Islamic Azad, Kazerun, Iran

Pars Journal of Medical Sciences, Vol.18, No. 4, Winter 2021

Pars J Med Sci 2021;18(4):17-24

Abstract:

Introduction:

Gastric adenocarcinoma is the second leading cause of death from cancer worldwide. Citric acid is a naturally organic acid that considered as a physiological inhibitor of enzymes involved in glycolysis pathway to remove cancer cells. In this study, the effect of citric acid on *p53* and *p21* genes expression of the human gastric adenocarcinoma cell line (AGS) was examined.

Materials and Methods:

AGS cells with different concentrations of citric acid (400, 800 and 1600 µg / ml) to examine the expression of genes *P53* and *p21* were incubated for 24 and 48 hours. Then, the expression of *p53* and *p21* genes were analyzed by Real Time PCR.

Results:

The results of this study indicate that treatment with citric acid increased the expression of *p53* and *p21* genes in the experimental groups compared to the control group. Over expression of *p53* gene at concentrations of 1600 and 800 µg / ml, respectively, was significant at 24 and 48 hours incubation times in dose and time independent manner. Expression of *p21* gene at both incubation times was dose- and time dependent manner.

Conclusion:

The results indicate that citric acid can reduce the growth of gastric adenocarcinoma cells by inducing expression of genes that involved in the apoptosis pathway and preventing proliferation. Therefore, citric acid seems to be used as an anticancer agent for the treatment of gastric cancer.

Keywords: Citric Acid, Adenocarcinoma, Gene Expression, *p53*, *p21*

* Corresponding author Email: lrouhi59@gmail.com