

بررسی تاثیر خاصیت ضدسرطانی عصاره گیاه کاکوتی (*Ziziphora*) بر میزان بیان ژن *Claudin-1* (CLDN1) در رده سلول های سرطانی معده (AGS)

سارا نیری^۱، زهرا دیلمی خیابانی^۲

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه زیست شناسی، واحد زنجان، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی زنجان، ایران.

۲- استادیار گروه زیست شناسی، واحد زنجان، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی زنجان، ایران. نویسنده مسئول:

zahra.deilami@gmail.com

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۷/۱۳

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۵/۲۱

چکیده

زمینه و هدف: کلودین ها (*claudin*) پروتئین های ساختاری و عملکردی اتصالات محکم در سلول های اپیتلیال هستند. الگوهای بیان تغییر یافته از اعضای مختلف *claudin* در انواع بیماری ها، به ویژه در سرطان ها، به اثبات رسیده است. گزارش شده است که در سرطان معده *claudin-1*، ۲۲ برابر افزایش بیان را نشان داده است. هدف از این مطالعه بررسی میزان بیان ژن *claudin-1* در سلول های آدنوکارسینوما معده پس از تیمار سلول ها با عصاره گیاهی کاکوتی می باشد. مزیت این عصاره داشتن خاصیت ضد سرطانی و عدم وجود عوارض جانبی می باشد.

مواد و روش ها: سلولی آدنوکارسینوما معده (AGS) در پلیت های ۱۲ چاهکی با ۱۰٪ FBS و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس و انکوباتور ۵٪ CO₂ و رطوبت ۸۵٪ کشت داده شدند. سلول ها با غلظت های ۸۰۰، ۱۲۰۰، ۲۰۰۰ μg/ml از عصاره آبی کاکوتی به مدت ۴۸ و ۷۲ ساعت تیمار شده سپس استخراج RNA، سنتز cDNA با استفاده از کیت انجام گردید. در نهایت بررسی میزان بیان ژن *claudin-1* با پرایمرهای اختصاصی و Real time PCR انجام شده و از ژن GAPDH به عنوان ژن کنترل داخلی استفاده شد. آنالیز داده ها با $2^{-\Delta\Delta CT}$ محاسبه گردید و معنی دار بودن نتایج با T-test بررسی شد.

نتایج: آنالیز نتایج نشان داد که در تیمار ۴۸ ساعت سلول های AGS با عصاره کاکوتی در غلظت ۸۰۰ μg/ml و ۱۲۰۰ به ترتیب ۷ برابر و ۲/۳ برابر و در تیمار ۷۲ ساعت، در غلظت ۸۰۰ μg/ml و ۱۲۰۰ به ترتیب کاهش ۵۸ برابر و ۱۰ برابر کاهش در بیان ژن *claudin-1* مشاهده گردید و هیچ تغییر معنی داری در غلظت ۲۰۰۰ μg/ml در هر دو تیمار مشاهده نشد.

نتیجه گیری: با توجه به نتایج حاصل، تاثیر تیمار ۷۲ ساعت در سلول های AGS با غلظت ۱۲۰۰ μg/ml عصاره کاکوتی در کاهش بیان ژن *claudin-1* به عنوان ژن درگیر در سرطان زایی، بیشتر می باشد.

در این مطالعه، ژن *claudin-1* به عنوان یکی از عوامل در بدخیمی تومور با تاثیر عصاره کاکوتی به طور قابل توجهی کاهش بیان را نشان داده است.

کلمات کلیدی: 1- *claudin*، سرطان معده، سلول های AGS، کاکوتی

مقدمه:

سرطان معده چهارمین سرطان شایع و دومین عامل مرگ و میر بر اثر سرطان می باشد (۱) یک عامل multi factorial یا چندعاملی بوده که عفونت هلیکوباکتریلوری و عوامل محیطی چون مصرف دخانیات، الکل، تغذیه، سطح بهداشت، سابقه فامیلی و مواجه یکسان اعضای یک خانواده با عوامل خطر محیطی در شکل گیری آن تاثیرگذار است. از سوی دیگر وجود زمینه‌ی ژنتیکی، جهش‌ها مانند جهش در پروتوآنکوژن‌ها، غیرفعال شدن ژن‌های تعمیر DNA و ژن‌های سرکوب‌گر و... می‌تواند اشاره کرد (۲).

بیش از ۹۰ درصد مرگ و میرهای سرطانی به دلیل متاستاز رخ می‌دهند. تومورهای اولیه می‌توانند توسط جراحی یا درمان‌های مکمل شیمیایی به خوبی درمان شوند، اما سرطان‌هایی که به مرحله متاستاز رسیده‌اند به درمان مقاوم‌اند. خصوصیت مقاومت، دلیل فراوانی مرگ را در میان افراد دارای متاستاز نشان می‌دهد (۳،۴،۵). چند مرحله‌ای بودن فرآیند متاستاز نشان از یک برنامه دقیق و پیچیده دارد. شناخت ژن‌ها و پروتئین‌های کلیدی دخیل و نشان دادن ارتباط آن‌ها با هم و با بیماری نکته اصلی در شناخت و درمان سرطان‌های مهاجم است.

مطالعه ژن *Claudin* در سرطان‌ها به ویژه سرطان معده از اهمیت بالایی برخوردار است چرا که تحقیقات نشان داده *claudin1-4* و *claudin6* افزایش بیان دارند (۷،۸). در این میان در سرطان معده ژن *claudin-1* تا ۲۲ برابر افزایش بیان را نشان داده است (۹). *Claudin* ها جزء اجزای ساختاری و عملکردی ضروری اتصالات tight می‌باشد. اتصالات tight عملکردی سد مانند دارند که در عبور یون‌ها، آب‌ها، ماکرومولکول‌های مختلف و حتی سلول‌های سرطانی نقش تنظیمی دارد. *Claudin* ها نقش

مهمی در تنظیم نفوذپذیری و حفظ قطبیت سلولی در سلول‌های اپیتلیال (۱۰،۱۱) و اندوتلیال (۱۲) دارند. *CLDN1* در بافت سرطان معده تظاهر می‌یابد که بیان آن با تهاجم و متاستاز تومور در ارتباط است و آن به عنوان یک عامل پیش‌آگهی برای نشان دادن نتیجه‌ی ضعف می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد (۱۳،۱۴).

گزارش‌های قبلی نشان داد که *claudin1* فعال کننده *MMP-2* و *MMP-9* می‌باشد که افزایش دهنده متاستاز و تهاجم سلول است (۱۵،۱۶،۱۷). *Anoikis* شکل خاصی از آپوپتوز است هنگامی که سلول‌ها از ماتریکس خارج سلولی جدا شود رخ می‌دهد که یک مکانیسم کلیدی در حفظ هموستاز و توسعه بافت است (۱۸). عدم اجرای برنامه *anoikis* ممکن است منجر به زنده ماندن سلول تحت شرایط توقف یا تکثیر در محل نابجا شود. این بی‌نظمی در اجرای *anoikis* به عنوان یک مشخصه پدیدار شدن سلول‌های سرطانی در نظر گرفته می‌شود که منجر به ایجاد متاستاز در اندام‌های دور می‌شود (۱۹،۲۰). *Claudin1*، *anoikis* سلول را در سرطان روده بزرگ، از طریق تنظیم بیان *E-cadherin* و بتا کاتین و سیگنالینگ *SRC* را تنظیم می‌کند (۲۱،۲۲). در واقع یک تعامل متقابل بین کلودین ۱ و بتا کاتین وجود دارد (۲۳،۲۴). نقش *claudin1* و بتا کاتین در تومور معده و متاستاز باعث شد تحقیقات بیشتری در این زمینه صورت بگیرد. تعدادی از محققان با از کار انداختن بیان کلودین ۱، به وسیله القا سلول‌های *anoikis* مانع رشد تومور و متاستاز در شرایط *in vivo* و *in vitro* در سلول‌های سرطان معده شدند و سپس متوجه شدند که کلودین ۱ مقاومت سلول‌های *anoikis* را از طریق القا بیان بتا کاتین غشائی افزایش می‌دهد که به دنبال آن تجمع سلول‌ها القا می‌شود و فرآیند آپوپتوز مهار می‌شود و با انجام آزمایشی به این نتیجه رسیدند که کاهش بیان *Claudin1*

ارلن ۱ لیتری با ۵۰۰ میلی لیتر آب مقطر استریل مخلوط گردید. ارلن مذکور جهت حل شدن پلی فنل های کاکوتی، ۱۵ دقیقه در دمای جوش بن ماری قرار گرفته و سپس بر روی شیکر انکوباتور گذاشته شد. پس از گذشت ۲۴ ساعت، مخلوط مذکور توسط گاز استریل ۴ لایه و قیف صاف گردید. برای جدا کردن ناخالصی های موجود در عصاره مورد نظر عمل سانتریفوژ با دور rpm ۳۰۰۰ و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس انجام گرفت. عصاره صاف شده با استفاده از دستگاه روتاری تغلیظ گردید. سپس توسط فیلتر میکروبی ۰/۲۲ میکرونی استریل شده و در میکروتیوب های استریل تقسیم و تا زمان استفاده در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شد (۳۴).

سلول سرطانی معده (AGS) و پاساژ سلولی

سلول های AGS از انیستیتو پاستور خریداری گردید پس از ورود سلول به اتاق کشت آزمایشگاه علوم و تحقیقات، به سرعت مراحل Sub Culture انجام شد.

شمارش سلولی

پس از پاساژ سلولی، شمارش سلول ها با استفاده از تریبان بلو و لام نتوبار انجام شد. تعداد سلول ها: 10^5 سلول در پلیت های ۱۲ چاهکی کشت داده شد.

کشت سلول ها در پلیت های ۱۲ چاهکی

در ابتدا سلول ها با PBS شستشو و سپس تریپسینه شده تا از سطح فلاسک جدا شوند. سانتریفوژ با دور RPM ۱۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه انجام شده و رسوب سلولی در مقدار مناسبی از محیط کشت کامل به حالت سوپانسیون درآمد. در پلیت ۱۲ چاهکی، هر چاهک نیاز به ۲ml محیط کشت کامل و ۱۰۰ مایکرولیتر از سلول های شمارش شده دارد. یک پلیت با چهار چاهک حاوی سلول های AGS برای دوزهای ۸۰۰، ۱۲۰۰ و ۲۰۰۰ مایکروگرم بر میلی لیتر

در سلول های سرطان معده متاستاز را سرکوب می کند. (۲۵). ژن *claudin* در بافت سرطان معده بیانش افزایش می یابد می توان از آن به عنوان یک عامل پیش آگهی استفاده کرد (۲۸، ۲۷، ۲۶، ۲۳، ۱۳). بیان کلودین در برخی سرطان ها افزایش و در برخی سرطان ها کاهش می یابد ولی طی مطالعات انجام شده در بسیاری از سرطان ها شاهد بیان بیش از حد کلودین هستیم (۳۲، ۳۱، ۳۰، ۲۹). گزارش شده که بیان دوباره کلودین-۱ منجر به افزایش آپوپتوز در سلول های سرطانی سینه می شود (۳۳). بنابراین عملکرد کلودین ها در سرطان بستگی به نوع بافت و احتمالاً به نوع و مرحله سرطان بستگی دارد.

به نظر می رسد داروهای گیاهی با توجه به تاثیر موثر در جلوگیری از رشد تومور و عوارض جانبی کمتر، جایگزین مناسبی برای داروهای شیمیایی می باشند. در این مطالعه، ژن *claudin-1* به عنوان یکی از عوامل در بدخیمی تومور با تاثیر عصاره کاکوتی به طور قابل توجهی کاهش بیان را نشان داده است.

مواد و روش ها:

شامل عصاره گیری از کاکوتی، تقسیم بندی مواد مورد استفاده در فرایند کشت سلول، تهیه محیط کشت کامل، دکمپلمان کردن FBS، پاساژ سلولی، شمارش سلولی، کشت سلول های AGS در پلیت ۱۲ چاهکی، تیمار عصاره کاکوتی با دوزها و زمان های مشخص، استخراج RNA، تعیین غلظت RNA، سنتز cDNA، طراحی و سفارش پرایمر، انجام Real time PCR و آنالیز داده ها می باشد.

تهیه عصاره آبی کاکوتی

عمل عصاره گیری به روش ماسراسیون (خیساندن) انجام گرفت. برگ های خشک شده کاکوتی توسط آسیاب برقی پودر گردید. ۵۰ گرم از پودر گیاه توزین شده و در

عصاره کاکوتی و کنترل در بازه زمانی ۴۸ ساعت و پلیت دیگری به همین ترتیب در بازه زمانی ۷۲ ساعت آماده گشت.

بررسی کمی RNA استخراج شده

پس از استخراج کیفیت و غلظت RNA ها با دستگاه اسپکتروفتومتر بررسی شد

۱۱µ از RNA استخراج شده به همراه ۹۹µ آب مقطر سترن دوبار اتوکلاو شده تهیه شده و از محلول فوق ۱µ ادر کووت ریخته و در دستگاه اسپکتروفتومتر قرار داده شد

سنتز cDNA

در نسخه برداری معکوس، رشته مکمل mRNA سنتز می گردد. در این تحقیق کیت سنتز cDNA از شرکت تکاپوزیست با Cat.No:K-۲۰۴۶ R و مشخصات: تیوپ های لیوفیلیزه آماده RT دارای آنزیم Cycle Script حاوی شش پار تصادفی خریداری شد.

۲۰ مایکرولیتر DEPC Water (diethyl pyro carbonate) به همراه ۱ مایکرولیتر RNA استخراج شده به تیوپ های کیت RT اضافه شد و به مدت چند ثانیه SPIN گشت و در دستگاه PCR قرار داده شد. پس از اتمام زمان داده شده محصول cDNA حاصل در فریزر ۲۰ - درجه سانتی گراد نگهداری گردید.

طراحی پرایمر

توالی نوکلئوتیدی مربوط به رونوشت های ژن Claudin-1 و ژن رفرنس GAPDH از مقالات معتبر استخراج شد (۲۶۱، ۲۶۰) و صحت آنها با BLAST و GENE RUNNER تایید شد.

عصاره کاکوتی و کنترل در بازه زمانی ۴۸ ساعت و پلیت دیگری به همین ترتیب در بازه زمانی ۷۲ ساعت آماده گشت.

تیمار با عصاره کاکوتی

۲۴ ساعت پس از کشت سلول در پلیت های ۱۲ چاهکی، تیمار عصاره کاکوتی آغاز شده، زمان طی شده جهت اتصال پروتئین های سطح سلول به کف پلیت می باشد. یک چاهک بدون اضافه کردن عصاره دارویی به عنوان کنترل جهت بررسی بیان ژن های مورد مطالعه در حالت عادی در نظر گرفته شد.

چاهک های دیگر با دوزهای ۸۰۰، ۱۲۰۰ و ۲۰۰۰ مایکروگرم بر میلی لیتر از عصاره کاکوتی تیمار گردید. محیط کشت رویی سلول تخلیه شده و مقادیر محیط کشت کامل و عصاره کاکوتی به هر چاهک مخصوص به خود اضافه شد. مجموع مقادیر ۲ ml می باشد.

استخراج RNA Total

RNA کل سلول های یوکاریوتی حاوی RNA ریبوزومی (rRNA)، RNA ناقل (tRNA) و RNA پیامبر (mRNA) می باشد. در این مطالعه استخراج RNA در دوز های ۴۸ و ۷۲ ساعته به ۲ صورت انجام گرفت.

استخراج Total RNA از کیت استخراج

RNA از کشت سلول

کیت استخراج RNA از کشت سلول با Cat.NO:PR۸۹۱۶۲۰ از شرکت سیناکلون خریداری شد.

استخراج RNA Total توسط RNX

جدول ۱. توالی پرایمرها

Primer Name	Oligo sequences 5'→3'	Length
CLDN-1 F	5'- GCGCGATATTTCTTCTTGCAGG-3'	۲۲
CLDN-1 R	5'-TTCGTACCTGGCATTGACTGG-3'	۲۱
GAPDH F	5'-ACCCAGAAGACTGTGGATGG-3'	۲۰
GAPDH R	5'-TCTAGACGGCAGGTCAGGTC-3'	۲۰

روش مقایسه‌ای $2^{-\Delta\Delta Ct}$

در این روش مقدار Ct هر یک از نمونه‌ها از مقدار Ct ژن استاندارد مورد نظر کسر و تفاوت آن در مقابل Ct به دست آمده و روند کاهش یا نمونه کنترل ($\Delta\Delta Ct$) محاسبه شد. میزان بیان ژن با فرمول ۲ به توان $-\Delta\Delta Ct$ - به دست آمده و روند کاهش یا افزایشی ژن مورد بررسی قرار گرفت

در ارزیابی نسبی از چندین روش متفاوت می‌توان استفاده کرد که شامل: ارزیابی نسبی با استفاده از دو منحنی استاندارد، روش $\Delta\Delta Ct$ و روش پافل می‌باشد که از این بین در این مطالعه از روش مقایسه‌ای $\Delta\Delta Ct$ استفاده شد.

- $\Delta Ct(\text{Control}) = Ct(\text{Target gene}) - Ct(\text{Reference gene})$
- $\Delta Ct(\text{Treatment}) = Ct(\text{Target gene}) - Ct(\text{Reference gene})$
- $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(\text{Treatment}) - \Delta Ct(\text{Control})$
- $\text{Relative fold change} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$

$P\text{-value} < 0.05$ نشان‌دهنده معنی دار بودن کاهش یا افزایش بیان ژن claudin-1 می‌باشد.

جهت اطمینان یافتن از تحت تاثیر قرار گرفتن یا نگرگرفتن house keeping gene نسبت ژن مورد نظر به ژن مرجع با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد.

$\text{Ratio} = 2^{-\Delta Ct \text{ Sample}} / 2^{-\Delta Ct \text{ Reference gene}}$
برای بررسی میزان بیان ژن از Real Time PCR استفاده و آنالیز آماری برای معنی دار بودن صورت گرفت

نتایج

تغییرات بیان ژن claudin1 در سلول‌های

AGS در دوره ۴۸ ساعت

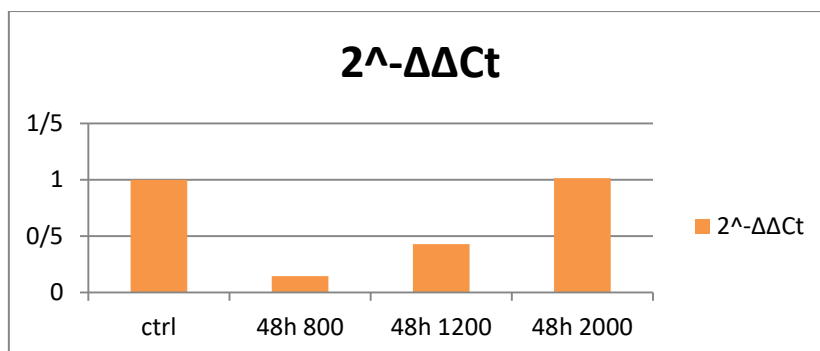
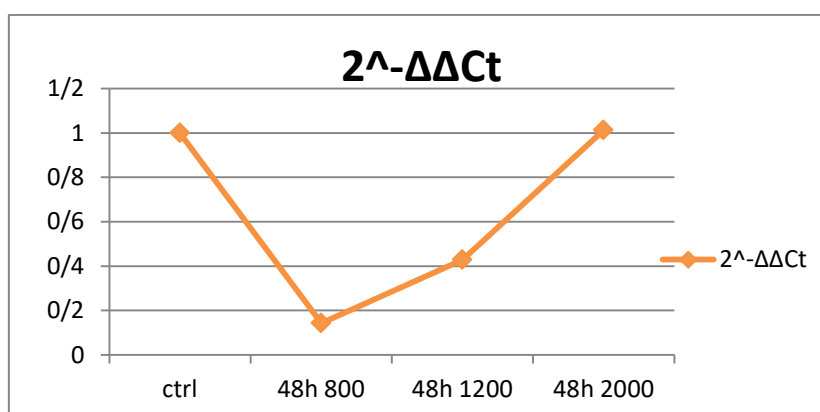
سلول‌های AGS با غلظت ۸۰۰، ۱۲۰۰ و ۲۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر از کاکوتی و نمونه کنترل در بازه زمانی ۴۸ ساعت تحت تیمار قرار گرفت. استخراج RNA و سنتز cDNA و در نهایت Real Time PCR انجام شد. نتایج به دست آمده از طریق فرمول روش مقایسه‌ای $\Delta\Delta Ct$ مورد آنالیز قرار گرفت. معنی دار بودن داده‌ها نیز توسط t-test بررسی شد.

روش t-test

در این روش هر گروه به‌طور جداگانه با گروه کنترل مقایسه شد تا معنی دار بودن یا نبودن نتایج مشخص گردد. این کار توسط سایت openepi به صورت آنالیز انجام گرفت. در خانه‌های این جدول میانگین $2^{-\Delta\Delta Ct}$ و انحراف معیار وارد شد و P-value برای گروه‌های تحت تیمار محاسبه گردید.

جدول ۲. نتایج تغییر میزان بیان ژن Claudin-1 تحت تیمار با غلظت‌های مختلف عصاره کاکوتی در بازه زمانی ۴۸ ساعت

توضیحات	P_Value	SD	Average $2^{-\Delta\Delta Ct}$	ژن claudin-1 (۴۸ ساعت)
-	Reference	۰	۱	کنترل
کاهش معنی‌دار	۰.۰۰۱۴	۰.۱۹	۰.۱۴	دوز ۸۰۰ $\mu\text{g/ml}$
----	۰.۲۰۲۶	۰.۶۶	۰.۴۲	دوز ۱۲۰۰ $\mu\text{g/ml}$
----	۰.۹۸۷۶	۱.۰۵	۱.۰۱	دوز ۲۰۰۰ $\mu\text{g/ml}$

نمودار ۱. نمودار ستونی تغییرات میزان بیان ژن *claudin-1* در گروه ۴۸ ساعتنمودار ۲. نمودار خطی تغییرات میزان بیان ژن *claudin-1* در گروه ۴۸ ساعت

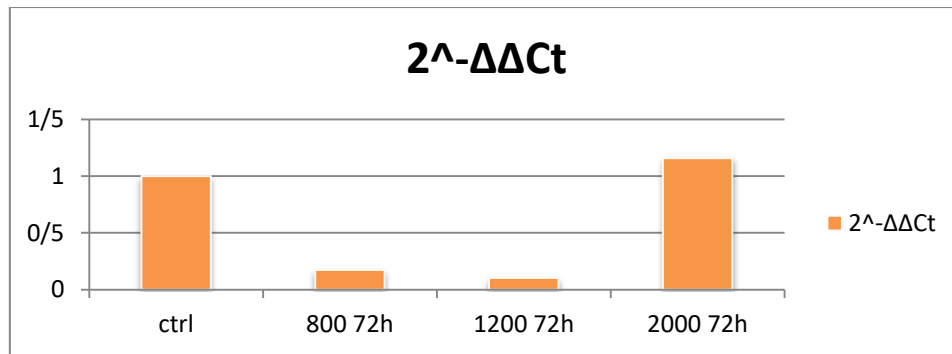
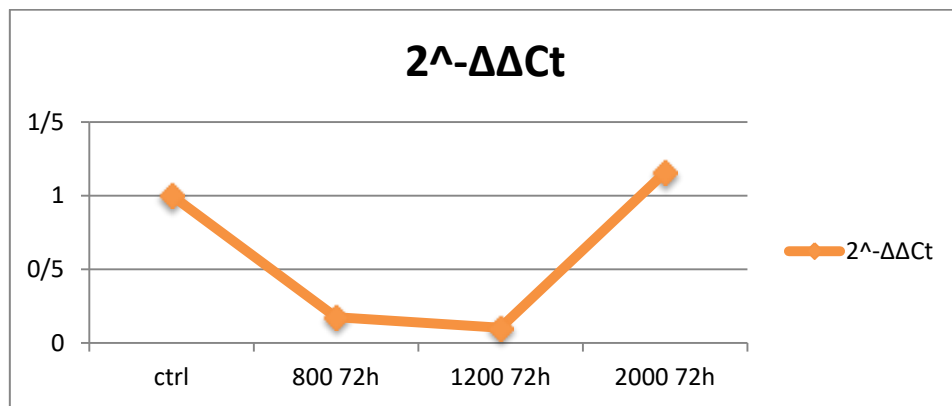
بررسی تغییرات میزان بیان ژن *claudin-1* در بازه زمانی ۷۲ ساعت

روش کار مشابه آزمایش در گروه ۴۸ ساعت می باشد با این تفاوت که در این گروه، زمان طی شده پس از تیمار با عصاره کاکوتی، ۷۲ ساعت می باشد.

در تیمار ۴۸ ساعت سلول های AGS با عصاره کاکوتی در غلظت ۸۰۰ $\mu\text{g/ml}$ بیشترین کاهش بیان این ژن را داریم قابل ذکر است در غلظت ۱۲۰۰ $\mu\text{g/ml}$ نیز کاهش بیان داریم اما با $p\text{-value} > 0.05$ معنی دار نیست ولی در غلظت ۲۰۰۰ $\mu\text{g/ml}$ تغییری مشاهده نشد.

جدول ۳. نتایج تغییر میزان بیان ژن *Claudin-1* تحت تیمار با غلظت های مختلف عصاره کاکوتی در بازه زمانی ۷۲ ساعت

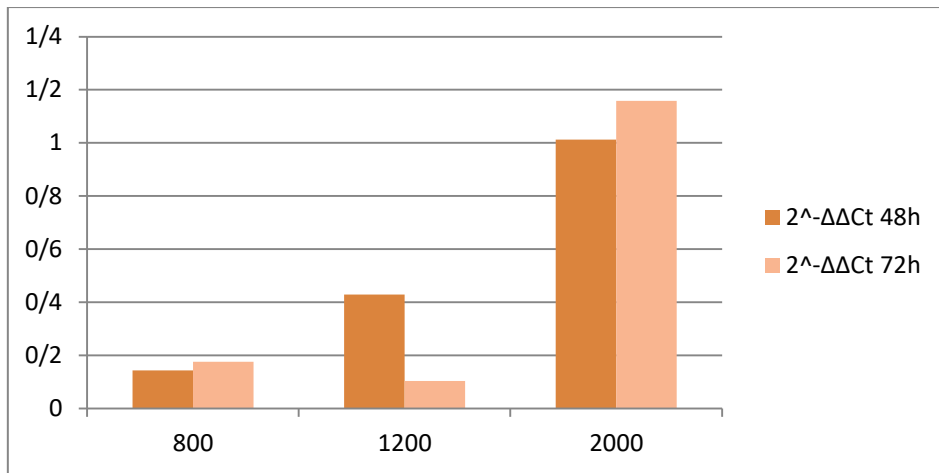
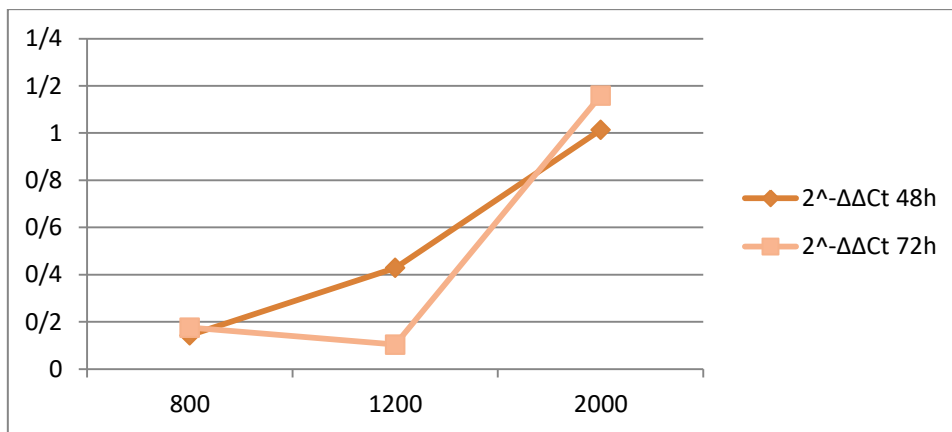
توضیحات	P_Value	SD	Average 2 ^{-ΔΔCt}	ژن <i>claudin-1</i> ۷۲ ساعت
-	Reference	۰	۱	کنترل
کاهش معنی دار	۰.۰۰۰۰۰۳۵۷۸	۰.۰۴	۰.۱۷	دوز ۸۰۰ $\mu\text{g/ml}$
کاهش معنی دار	۰.۰۰۰۰۱۳۰۴	۰.۰۶	۰.۱	دوز ۱۲۰۰ $\mu\text{g/ml}$
----	۰.۸۱۳۳	۱.۰۳	۱.۱۵	دوز ۲۰۰۰ $\mu\text{g/ml}$

نمودار ۳. نمودار ستونی تغییرات میزان بیان ژن *claudin-1* در گروه ۷۲ ساعتنمودار ۴. نمودار خطی تغییرات میزان بیان ژن *claudin-1* در گروه ۷۲ ساعت

در تیمار ۷۲ ساعت سلول‌های AGS با عصاره کاکوتی در غلظت‌های ۸۰۰ و ۱۲۰۰ $\mu\text{g/ml}$ کاهش معنی‌دار بیان این ژن را داریم قابل ذکر است در غلظت ۲۰۰۰ $\mu\text{g/ml}$ افزایش بیان داریم که با $p\text{-value} > 0.05$ معنی‌دار نیست.

جدول ۴. مقایسه میزان تغییرات بیان ژن *claudin-1* در بازه زمانی ۷۲ و ۴۸ ساعت

گروه‌ها	Average 2 ^{-ΔΔCt}	SD	P_Value	توضیحات
کنترل	۱	۰	Reference	—
کاکوتی ۸۰۰ (۴۸h)	۰.۱۴	۰.۱۹	۰.۰۰۱۴	کاهش معنی‌دار
کاکوتی ۱۲۰۰ (۴۸h)	۰.۴۲	۰.۶۶	۰.۲۰۲۶	---
کاکوتی ۲۰۰۰ (۴۸h)	۱.۰۱	۱.۰۵	۰.۹۸۷۶	---
کاکوتی ۸۰۰ (۷۲h)	۰.۱۷	۰.۰۴	۰.۰۰۰۰۰۳۵۷۸	کاهش معنی‌دار
کاکوتی ۱۲۰۰ (۷۲h)	۰.۱	۰.۰۶	۰.۰۰۰۰۱۳۰۴	کاهش معنی‌دار
کاکوتی ۲۰۰۰ (۷۲h)	۱.۱۵	۱.۰۳	۰.۸۱۳۳	---

نمودار ستونی مقایسه میزان تغییرات بیان ژن *claudin-1* در بازه‌های زمانی ۴۸ و ۷۲ ساعتنمودار خطی مقایسه میزان تغییرات بیان ژن *claudin-1* در بازه‌های زمانی ۴۸ و ۷۲ ساعت

غلظت های ۸۰۰ و ۱۲۰۰ و ۲۰۰۰ $\mu\text{g/ml}$ از عصاره کاکوتی وجود ندارد و می توان اینطور عنوان کرد که ژن رفرنس در بازه ی ۴۸ و ۷۲ ساعت تیمار با عصاره کاکوتی به طور مستقیم تحت تاثیر قرار نگرفته است و به عنوان ژن رفرنس، استاندارد می باشد.

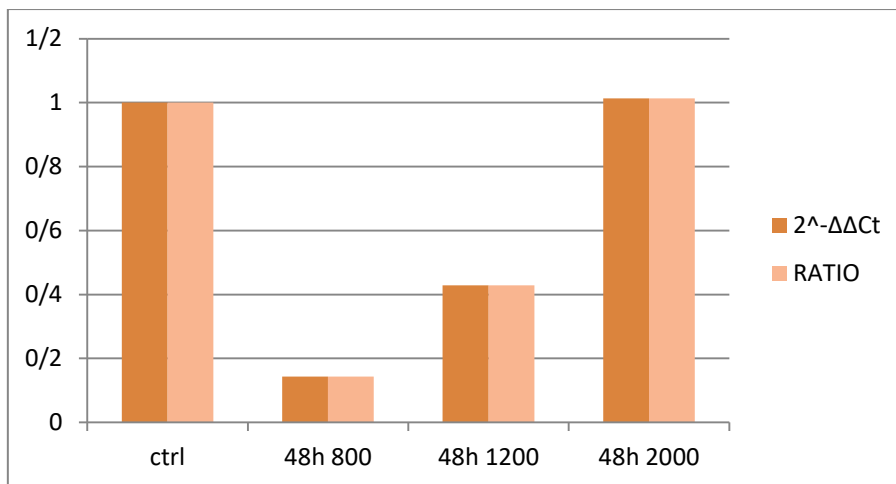
بحث

نام کلودین برگرفته از کلمه لاتین *claudere* (به معنی برای بستن) می باشد که این اسم نشان دهنده نقش سدی این پروتئین هاست. کلودین ها به عنوان یکی از مهم ترین اجزای اتصالات محکم در سلول های اپیتلیال است این پروتئین ها هموستاز بافت را از طریق تنظیم نفوذپذیری و انتقال سیگنال حفظ می کند.

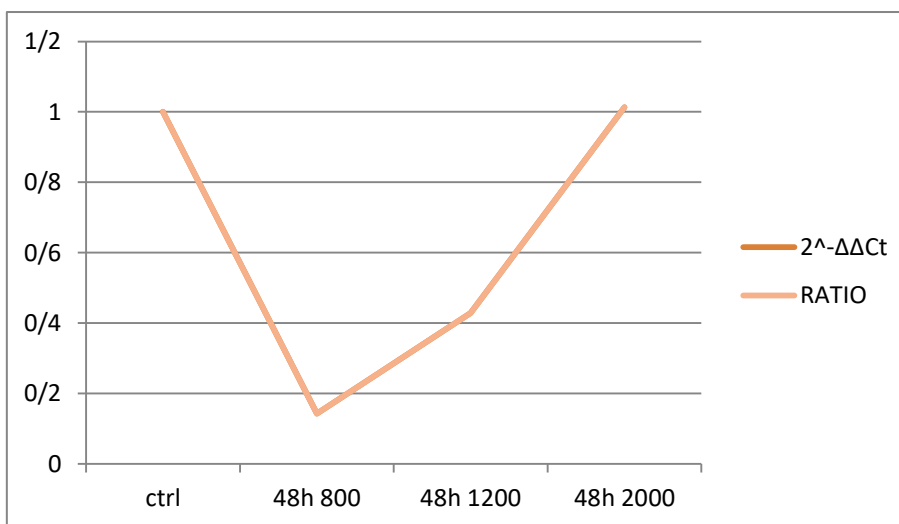
آنالیز نتایج نشان داد که در تیمار ۴۸ ساعت سلول های AGS با عصاره کاکوتی در غلظت $800 \mu\text{g/ml}$ و $1200 \mu\text{g/ml}$ به ترتیب ۷ برابر و $2/3$ برابر کاهش در بیان ژن *claudin-1* مشاهده گردید ولی تغییری در غلظت $2000 \mu\text{g/ml}$ مشاهده نشد. همچنین در تیمار ۷۲ ساعت، در غلظت $800 \mu\text{g/ml}$ و $1200 \mu\text{g/ml}$ به ترتیب کاهش ۵۸ برابر و ۱۰ برابر در بیان ژن *claudin-1* مشاهده گردید و در غلظت $2000 \mu\text{g/ml}$ افزایش بیان ژن *claudin-1* حاصل شد ولی این افزایش معنی دار نبود

نتایج مقایسه $2^{-\Delta\Delta Ct}$ و Ratio

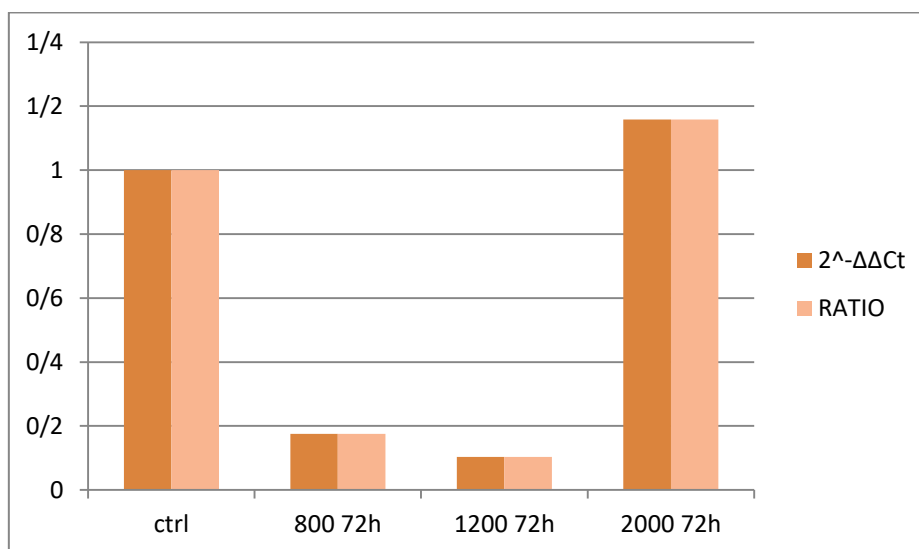
در گروه ۴۸ و ۷۲ ساعت، تفاوت محسوسی میان نتایج Ratio و $2^{-\Delta\Delta Ct}$ در میزان بیان ژن *claudin-1* در



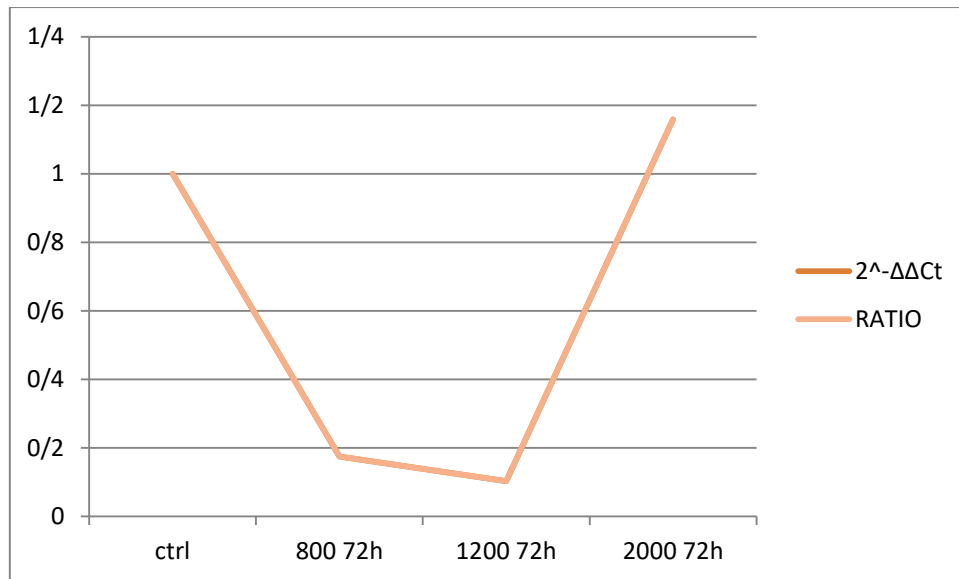
۷. نمودار ستونی مقایسه نتایج $2^{-\Delta\Delta Ct}$ و *claudin1* در گروه ۴۸ ساعت



۸. نمودار خطی مقایسه نتایج $2^{-\Delta\Delta Ct}$ و *claudin1* در گروه ۴۸ ساعت



۹. نمودار ستونی مقایسه نتایج $2^{-\Delta\Delta Ct}$ و *claudin1* در گروه ۷۲ ساعت



نمودار ۱۰. نمودار خطی مقایسه نتایج $2^{-\Delta\Delta Ct}$ و Ratio ژن *claudin1* در گروه ۷۲ ساعت

claudin انسان *claudin-1*، ۲۲ برابر و *claudin-4* و *claudin-6* هر کدام ۳ برابر در سرطان معده افزایش بیان داشتند و همچنین دریافتند که ۴ ژن درگیر در سرطان معده که افزایش بیان دارند با اتصال به *claudin-1* تشکیل یک شبکه یا مجموعه را می دهند. (۹)

طبق مطالعات Lars L Eftang و همکارانش مشخص شد که بیان بیش از حد *claudin-1* و IL-8 با عفونت حاد هلیکوباکتریلوری و تومورزایی در سلول های اپیتلیال معده در ارتباط است. (۳۵)

Jie Huang و همکارانش با انجام آزمایشی میزان بیان *claudin-1* را یک بار افزایش و بار دیگر کاهش دادند تا نقش *claudin* را در سرطان معده و پیشرفت تومور بررسی کنند آن ها مشاهده کردند که کاهش بیان این ژن در شرایط آزمایشگاهی (In vitro)، مهار و کاهش مهاجرت و تهاجم و تشکیل کلنی در شرایط in vivo (داخل بدن) نیز مهار تومورزایی و متاستاز را در پی دارد همچنین آن ها گزارش کردند که کاهش یا افزایش بیش از حد CLDN1 باعث تغییراتی در بتاکاتین غشائی در سلول های سرطانی معده می شود (بتا کاتین تنظیم کننده

کلودین ها پروتئین هایی هستند که در اتصالات محکم سلولی دخیل هستند و برای نگهداری از اپیتلیوم طبیعی (نرمال)، به ویژه در ساختار سدمانند، قطبیت سلولی و انتقال سیگنال مهم هستند. اختلال در تنظیم بیان این ژن ها در بسیاری از سرطان های مختلف شناسایی شده است (۳۵). بر اساس بیولوژی تومور، کاهش بیان *CLDN1* منجر به تخریب اتصالات محکم و از دست دادن چسبندگی سلول به سلول می شود که باعث پیشرفت تومور می شود (۳۶)، اما اهمیت بالینی آن در سرطان معده پیچیده تر است. شواهدی وجود دارد که تعدادی از کلودین ها، از جمله *CLDN1*، بیانشان افزایش می یابد، زیرا بافت معده به متاپلازی روده و سرطانی شدن زودرس معده منجر می شود.

طبق مطالعات Zavala-Zendejas VE و همکارانش، نقش *CLDN1* را در فرایندهای متاستاتیک از طریق فعال شدن متالوپروتئینازها، کاهش آپوپتوز و افزایش مهاجرت را در سرطان تخمدان و کولون گزارش کردند. (۳۷)

در مطالعه ای که در سال ۲۰۱۱ توسط Marimuthu و همکارانش انجام گرفت مشخص شد که از ۲۴ عضو از

۱۲۰۰ $\mu\text{g/ml}$ به میزان ۲.۳ برابر کاهش بیان رخ داد ولی در دوز ۲۰۰۰ $\mu\text{g/ml}$ تاثیری مشاهده نشد.

با بررسی تغییرات بیان ژن در بازه‌ی زمانی ۷۲ ساعت سلول‌های AGS با عصاره کاکوتی در غلظت ۱۲۰۰ $\mu\text{g/ml}$ ۸۰۰ کاهش بیان با محاسبه $p\text{-value} > 0.05$ معنی‌دار و به میزان ۵.۸ برابر بود و در دوز ۱۲۰۰ $\mu\text{g/ml}$ در این بازه‌ی زمانی به مقدار ۱۰ برابر کاهش معنی‌دار رخ داد ولی در دوز ۲۰۰۰ $\mu\text{g/ml}$ افزایش بیان ژن claudin-1 حاصل شد ولی این افزایش معنی‌دار نبود.

با انجام آزمایشات بر طبق t-test کاهش بیان ژن claudin-1 در دوز ۱۲۰۰ $\mu\text{g/ml}$ و ۸۰۰ از تیمار ۴۸ ساعته و در دوزهای ۱۲۰۰ $\mu\text{g/ml}$ و ۸۰۰ از تیمار ۷۲ ساعته با محاسبه $p\text{-value} > 0.05$ معنی‌دار بوده اما در دوز ۱۲۰۰ $\mu\text{g/ml}$ از تیمار ۴۸ ساعته بی‌معنی بوده است. همچنین در دوز ۲۰۰۰ $\mu\text{g/ml}$ از هر دو بازه زمانی ۴۸ و ۷۲ ساعت افزایش بیان رخ داد که بی‌معنی گزارش شد.

نتیجه‌گیری

با توجه به افزایش مصرف گیاهان دارویی و خطرات مصرف با دور غیر موثر و گاهی سمی این ترکیبات نتایج بدست آمده طبق تحقیق حاضر می‌تواند مورد استفاده شرکت‌های دانش بنیان برای تولید داروهای گیاهی با عصاره کاکوتی در دوزهای مناسب برای بهبود و کنترل پیشرفت بیماری در بیماران مبتلا به سرطان معده قرار گیرد.

تعارض منافع

نویسندگان مقاله تعارضی در منافع ندارند

فهرست منابع

1. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. CA Cancer J Clin 2011; 61 (2): 69- 90.

مهم چسبندگی سلول-سلول است) آن‌ها مشاهده کردند که بیان کلودین-۱ با بیان بتاکاتین در بافت سرطان معده در ارتباط است و گزارش کردند که تنظیم بیان بتاکاتین توسط کلودین-۱ ممکن است یک مسیر کلیدی در روند anoikis سلول سرطانی معده باشد (۲۵). همچنین هاف من و همکاران نیز گزارش کردند که یکپارچگی تماس سلول-سلول می‌تواند به حفظ بقای سینگنال بتاکاتین و SRC ، PI3K/AKT و جلوگیری از anoikis کمک کند.

مطالعه حاضر با هدف تأیید خاصیت ضد سرطانی عصاره گیاه کاکوتی بر سلول‌های سرطانی بوده است و ما در تحقیقات خود اثر عصاره کاکوتی را بر ژن-claudin I بررسی کردیم و شاهد کاهش این ژن در دوزهای ۱۲۰۰ $\mu\text{g/ml}$ و ۸۰۰ بودیم. پیشبرد واکنش‌های پیوسته به سمت مرگ سلولی در سلول‌های غیر طبیعی و سرطانی قطعاً همراه با کاهش یا افزایش برخی از ژن‌های درگیر در این روند بوده است، اما این پروسه نیازمند مطالعات دیگری برای شناخت ژن‌های تاثیر پذیر بر عصاره ضد سرطانی کاکوتی بوده است.

بر طبق آزمایشات انجام شده آنالیز نتایج نشان داد که در بازه زمانی ۴۸ ساعت سلول‌های AGS با عصاره کاکوتی در غلظت‌های ۱۲۰۰ $\mu\text{g/ml}$ و ۸۰۰ کاهش در بیان ژن claudin-1 مشاهده گردید که در دوز ۱۲۰۰ $\mu\text{g/ml}$ این کاهش بیان محسوس‌تر از دوز ۱۲۰۰ بود به نحوی که در دوز ۱۲۰۰ $\mu\text{g/ml}$ از تیمار ۴۸ ساعته ۷ برابر و در دوز

2. Lichtenstein P, Holm NV, Verkasalo PK, Iliadou A, Kaprio J, Koskenvuo M, et al. Environmental and heritable factors in the causation of cancer-analyses of cohorts of twins from

Sweden, Denmark, and Finland. *N Engl J Med* 2000; 343(2): 78-85

3. Gupta GP and Massague J. Cancer metastasis: building a framework. *Cell* 2006;127(4):679-9.

4. Valastyan S, Weinberg RA. Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. *Cell* 2011;147(2):275-92.

5. Noori-Dalooi MR. Medical Molecular Genetics in The Third Millennium. Tehran: Samer publishing; 2009, 2012. [Persian]

6. Noori-Dalooi MR. Emery's Elements of Medical genetics. 6th ed. Tehran: Jame-e-Negar and Salemi Publishing; 2012. [Persian]

7. Rendon-Huerta E, Teresa F, Teresa GM, Xochitl GS, Georgina AF, et al. (2010) Distribution and expression pattern of claudins 6, 7, and 9 in diffuse- and intestinal-type gastric adenocarcinomas. *J Gastrointest Cancer* 41: 52-59.

8. Jung H, Jun KH, Jung JH, Chin HM, Park WB (2010) The Expression of Claudin-1, Claudin-2, Claudin-3, and Claudin-4 in Gastric Cancer Tissue. *J Surg Res.*

9. Arivusudar Marimuthu and et al. Gene Expression Profiling of Gastric Cancer. *J Proteomics Bioinform* 2011, 4:4

10. Schneeberger EE and Lynch RD. The tight junction: a multifunctional complex. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2004; 286(6):C1213-1228.

11. Findley MK and Koval M. Regulation and roles for claudin-family tight junction proteins. *IUBMB Life.* 2009; 61(4):431-437.

12. Lal-Nag M, Morin PJ (2009) The claudins. *Genome Biol* 10: 235.

13. Wu YL, Zhang S, Wang GR and Chen YP. Expression transformation of claudin-1 in the process of gastric

adenocarcinoma invasion. *World J Gastroenterol.* 2008; 14(31):4943-4948.

14. Jung H, Jun KH, Jung JH, Chin HM and Park WB. The expression of claudin-1, claudin-2, claudin-3, and claudin-4 in gastric cancer tissue. *J Surg Res.* 2011; 167(2):e185-191.

15. Ichiyasu H, McCormack JM, McCarthy KM, Dombkowski D, Preffer FI and Schneeberger EE. Matrix metalloproteinase-9-deficient dendritic cells have impaired migration through tracheal epithelial tight junctions. *American journal of respiratory cell and molecular biology.* 2004; 30(6):761-770.

16. Yoon CH, Kim MJ, Park MJ, Park IC, Hwang SG, An S, Choi YH, Yoon G and Lee SJ. Claudin-1 acts through c-Abl-protein kinase Cdelta (PKCdelta) signaling and has a causal role in the acquisition of invasive capacity in human liver cells. *J Biol Chem.* 2010; 285(1):226-233.

17. Leotlela PD, Wade MS, Duray PH, Rhode MJ, Brown HF, Rosenthal DT, Dissanayake SK, Earley R, Indig FE, Nickoloff BJ, Taub DD, Kallioniemi OP, Meltzer P, Morin PJ and Weeraratna AT. Claudin-1 overexpression in melanoma is regulated by PKC and contributes to melanoma cell motility. *Oncogene.* 2007; 26(26):3846- 3856.

18. Frisch SM and Francis H. Disruption of epithelial cellmatrix interactions induces apoptosis. *J Cell Biol.* 1994; 124(4):619-626.

19. Frisch SM and Sreaton RA. Anoikis mechanisms. *Curr Opin Cell Biol.* 2001; 13(5):555-562.

20. Taddei ML, Giannoni E, Fiaschi T and Chiarugi P. Anoikis: an emerging hallmark in health and diseases. *J Pathol.* 2012; 226(2):380-393

21. Dhawan P, Singh AB, Deane NG, No Y, Shiou SR, Schmidt C, Neff J,

Washington MK and Beauchamp RD. Claudin-1 regulates cellular transformation and metastatic behavior in colon cancer. *J Clin Invest*. 2005; 115(7):1765-1776.

22. Singh AB, Sharma A and Dhawan P. Claudin-1 expression confers resistance to anoikis in colon cancer cells in a Src-dependent manner. *Carcinogenesis*. 2012; 33(12):2538-2547.

23. Huang J, Li J, Qu Y, Zhang J, Zhang L, Chen X, Liu B and Zhu Z. The expression of claudin 1 correlates with betacatenin and is a prognostic factor of poor outcome in gastric cancer. *Int J Oncol*. 2014; 44(4):1293-1301.

24. Miwa N, Furuse M, Tsukita S, Niikawa N, Nakamura Y and Furukawa Y. Involvement of claudin-1 in the beta-catenin/ Tcf signaling pathway and its frequent upregulation in human colorectal cancers. *Oncol Res*. 2001; 12(11-12):469-476.

25. Jie Huang, et al, Claudin-1 enhances tumor proliferation and metastasis by regulating cell anoikis in gastric cancer. 2014

26. Eftang LL, Esbensen Y, Tannaes TM, Blom GP, Bukholm IR and Bukholm G. Up-regulation of CLDN1 in gastric cancer is correlated with reduced survival. *BMC Cancer*. 2013; 13:586.

27. Soini Y, Tammola S, Helin H and Martikainen P. Claudins 1, 3, 4 and 5 in gastric carcinoma, loss of claudin expression associates with the diffuse subtype. *Virchows Arch*. 2006; 448(1):52-58

28. Resnick MB, Gavilanez M, Newton E, Konkin T, Bhattacharya B, Britt DE, Sabo E and Moss SF. Claudin expression in gastric adenocarcinomas: a tissue microarray study with prognostic correlation. *Hum Pathol*. 2005; 36(8):886-892.

29. Resnick MB, Gavilanez M, Newton E, et al. Claudin expression in gastric adenocarcinomas: a tissue microarray study with prognostic correlation. *Hum Pathol*. 2005;36(8):886-892.

30. Györfy H, Holczbauer A, Nagy P, et al. Claudin expression in Barrett's esophagus and adenocarcinoma. *Virchows Arch*. 2005;447(6): 961-968.

31. Hough CD, Sherman-Baust CA, Pizer ES, et al. Large-scale serial analysis of gene expression reveals genes differentially expressed in ovarian cancer. *Cancer Res*. 2000;60(22):6281-6287.

32. Kwon MJ, Kim SH, Jeong HM, et al. Claudin-4 overexpression is associated with epigenetic derepression in gastric carcinoma. *Lab Invest*. 2011;91(11):1652-1667.

33. Hoevel T, Macek R, Swisshelm K, Kubbies M. Reexpression of the TJ protein CLDN1 induces apoptosis in breast tumor spheroids. *Int J Cancer*. 2004;108(3):374-383.

34. Hossein Zadegan, Hassan, Ezzatpour, Abdollahpour, Fawad, Motamedi, Rashidipour. Investigating the cytotoxicity effects of olive and green tea extracts on breast cancer cell line. *Journal of Ardabil University of Medical Sciences*. 2010 Dec 10;10(4):287-94

35. Lars L Eftang, Ying Esbensen, Tone M Tannæs, Gustav P Blom, Ida RK Bukholm and Geir Bukholm: Up-regulation of CLDN1 in gastric cancer is correlated with reduced survival. *BMC Cancer* 2013, 13:586

36. Jung H, Jun KH, Jung JH, Chin HM, Park WB: The expression of claudin-1, claudin-2, claudin-3, and claudin-4 in gastric cancer tissue. *J Surg Res* 2011, 167:e185-e191.

37. Zavala-Zendejas VE, Torres-Martinez AC, Salas-Morales B, Fortoul TI, Montano LF, Rendon-Huerta EP: Claudin-6, 7, or 9 overexpression in the human

gastric adenocarcinoma cell line AGS increases its invasiveness, migration, and proliferation rate. *Cancer Invest* 2011, 29:1-11.



The study of *Ziziphora* Extract on *Claudin1* Gene Expression in Cancerous Cell line AGS.

Sara Nayyeri¹, Zahra Deilami Khiabani²

1- Master of Science, Faculty of Basic Sciences, Zanjan Branch, Islamic Azad University, Zanjan, Iran

2- Assistant Professor, Faculty of Basic Sciences, Zanjan Branch, Islamic Azad University, Zanjan, Iran.

Corresponding author: zahra.deilami@gmail.com

Received: 2023.08. 12

Accepted: 2023.10.05

Abstract

Background & Aims: Claudins are the main structural and functional proteins of tight junctions in epithelial cells. The altered expression patterns of different claudin members have been demonstrated in a variety of diseases, particularly in cancers. It has been reported that *claudin 1* is overexpressed 22-fold in gastric adenocarcinoma. Considering the least side effect of herbal extracts, in this study we have evaluated *claudin-1* gene expression in AGS cells treated with *ziziphora* extract.

Materials and Methods: The AGS cells were incubated 37°C containing 5% CO₂ with 85% humidity DMEM with 10% FBS. The cells were treated with concentrations of 800, 1200, 2000 µg /ml of *ziziphora* for 48 and 72 hours. Extraction of RNA, synthesis of cDNA has been done using kit. The study of *claudin-1* gene expression was performed by Real time PCR and also GAPDH gene was used as the internal control. Data analysis was performed with $2^{-\Delta\Delta CT}$ and statistically analyzed by T-Test.

Results: The results of Real time PCR data have shown in 48 hours treatment, reduction of 7 and 2.3 fold with concentrations of 800 and 1200 µg /ml of *ziziphora* respectively and in 72 hours treatment, reduction of 5.8 and 10 fold have seen in concentrations of 800 and 1200µg /ml of *ziziphora*, respectively and there was no significant change in concentration of 2000µg / ml in both treatments.

Conclusion: *Ziziphora* extract in 1200 µg /ml concentration, reduced the expression of *claudin-1* remarkably. *Claudin-1* may become therapeutic targets for cancer treatment and *ziziphora* as a herbal extract decreased the expression rate of *claudin1* significantly, in lower concentrations treatment.

Keywords: *Claudin-1*, Gastric cancer, AGS cells, *ziziphora*