زیست‌شناسی جانوری، سال پانزدهم، شماره اول، پاییز ۱۴۰۱، صفحات ۱۶۶- ۱۵۵

مقاله پژوهشی

بررسی اثر سینامالدئید بر تغییرات بیان ژن‌های Bax، Bcl2 و TGF-B در سلول‌های سرطانی شده بافت معده موش توسط دی متیل هیدرازین

صابر قراتپه لو[1]، طاهره ناجی[1*]، عبدالرضا محمدنیا[2]

۱-گروه علوم پایه، دانشکده داروسازی و علوم دارویی، واحد علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲-مرکز تحقیقات بیماری‌های مزمن تنفسی پژوهشکده سل و بیماری‌های ریوی، بیمارستان مسیح دانشوری، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

*مسئول مکاتبات: naji_t@iaups.ac.ir

DOI: 10.22034/ascij.2022.1949934.1356

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۰/۲۵ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۳/۲۲

چکیده

مطالعات نشان می‌دهند Bax و Bcl2 به عنوان ژن‌های بسیار مهم در فرآیند آپوپتوز می‌توانند از بروز سرطان جلوگیری کنند. نقش ژن TGF-β نیز به عنوان یک ژن مهم در فرآیند متاستاز در سرطان‌ها به اثبات رسیده است. هدف از این بررسی ارزیابی تغییرات بیانی این سه ژن در سلول‌های سرطانی شده بافت معده موش توسط دی متیل هیدرازین می‌باشد. در این مطالعه تعداد ۴۰ سر موش نژاد ویستار نر ۵۳ هفته‌ای بالغ مورد ارزیابی قرار گرفتند و در چهار گروه ۱۰ تایی تقسیم شدند. گروه شاهد فقط آب و غذا دریافت کردند. گروه دوم کارسینوژن بدون سینامالدهید، گروه سوم فقط سینامالدهید و گروه چهارم کارسینوژن همراه با سینامالدهید را همزمان دریافت کردند. سپس بافت معده جداسازی شده و بیان سه ژن با Real time PCR ارزیابی شد. داده‌ها با نرم افزار SPSS و آزمون آماری one-way ANOVA مورد بررسی قرار گرفت. بررسی نتایج نشان داد که بیان ژن‌های مذکور در دریافت کننده کارسینوژن همراه با سینامالدهید نسبت به گروه شاهد برای Bax افزایش و برای Bcl2 کاهش معناداری داشت اما برای ژن TGF-β معنادار نبود. نتایج پژوهش نشان داد که سینامالدهید می‌تواند با تغییراتی که در بیان ژن‌های Bax، Bcl2 و TGF-β در بیماری سرطان معده القاء شده توسط دی متیل هیدرازین داشته باشد، پس می‌توان امید داشت در تحقیقات تکمیلی سینامالدهید به عنوان یک کاندید در درمان طب مکمل مد نظر قرار گیرد.

کلمات کلیدی: بیان ژن، دی متیل هیدرازین، سرطان معده، سینامالدهید.

مقدمه

سرطان به گروه بزرگی از بیماری‌ها گفته می‌شود که نقطه اصلی اشتراک بین آنها رشد بی‌رویه سلول‌ها می‌باشد که این رشد لجام گسیخته می‌تواند به برهم خوردن تعادل طبیعی بدن و اختلالات جدی و مرگبار منجر گردد (۲۵). سرطان معده چهارمین سرطان شایع و دومین سرطان منجر به مرگ در جهان می‌باشد (۱۶،۱۹). نشانه‌های اولیه این بیماری سوزش معده، درد ناحیه بالای شکم، تهوع و بی‌اشتهایی است. از نشانه‌های دیگر کاهش وزن، زردی پوست، استفراغ، مشکل بلع غذا و مشاهده خون در مدفوع می باشد. این نوع از سرطان ممکن است گسترش یابد و از معده به دیگر اعضای بدن، به خصوص کبد، ریه‌ها،

استخوان، دیواره شکم و گره‌های لنفاوی سرایت کند. هر چند که هنوز عوامل اتیولوژیک سرطان معده کاملا شناخته نشده است ولی بسیاری از عوامل محیطی و فردی از جمله سن، جنسیت، گروه خونی، توارث، رژیم غذایی و منطقه جغرافیایی از فاکتورهای خطر احتمالی این سرطان به شمار می‌آیند (۲۱).

سرطان‌هایی که در بخش‌های مختلف معده آغاز می‌شوند، ممکن است علایم متفاوتی را ایجاد کنند و دارای پیامدهای بسیار مختلفی باشند. از انواع سرطان معده می‌توان به موارد آدنوکارسینوم، لنفوم، تومور استرومال گوارشی و تومور کارسینوئید اشاره نمود (۳، ۲۲).

امروزه یک راهکار امیدوارکننده برای جلوگیری از بروز سرطان، پیشگیری می‌باشد که استفاده از عوامل مصنوعی یا طبیعی (به تنهایی یا ترکیبی) در رژیم غذایی، برای جلوگیری از پیدایش یا عود سرطان در انسان می‌باشد. اخیرا گیاهان، سبزی‌ها، داروهای گیاهی و چاشنی‌های متداول در طب سنتی، به عنوان یکی از منابع اصلی تولید و توسعه داروهای شیمی پیشگیری در سرطان، مطرح شده‌اند (۱).

دارچین با نام علمی *Cinnamomum verum* از داروهای گیاهی محسوب می‌شود. درخت دارچین که بیشتر در هندوستان و چین میروید، جزو رده دولپه‌ای‌های جداگلبرگ می‌باشد و همیشه سبز است. در واقع این درختچه بومی سریلانکا است و بهترین نوع آن دارچین سیلانی است. در قرون وسطی از دارچین برای درمان سرفه، ورم مفاصل و گلودرد استفاده می‌شد. تحقیقات جدید نیز بر خواص و فواید پزشکی دارچین تأکید دارند (۲۲).

سینامالدئید به عنوان عمده‌ترین ترکیب فعال دارچین محسوب می‌شود. این ترکیب مایع روغنی و زرد رنگ آلدهیدی به فرمول شیمیایی C_9H_8O با جرم مولکولی ۱۳۲/۱۶ گرم بر مول است که مسبب طعم و بوی خاص دارچین می‌باشد. این ماده به طور طبیعی در پوست جنس‌های مختلف دارچین از جمله کافور سنتز می‌شود و در صنعت برای استخراج سینامالئید از تقطیر بخار حاصل از پوسته‌ی دارچین استفاده می‌شود. گزارش شده است که مشتقات سینامالدئید دارای فعالیت ضدمیکروبی و ضدتوموری هستند (۱۸).

ترکیبات آنتی اکسیدان موجود در عصاره‌های الکلی دارچین می‌توانند اکسیژن‌های واکن پذیر مانند آنیون‌های سوپراکسید و رادیکال‌های هیدروکسیل و سایر رادیکال‌های آزاد را در آزمایشگاه از بین ببرند و در برابر آسیب‌های شیمیایی از سلول محافظت کنند. از سوی دیگر، مصرف دارچین به عنوان ادویه به دلیل خاصیت آنتی اکسیدانی قوی که دارد از اکسیداسیون مواد آلی در بدن جلوگیری می کند و میزان رادیکال‌های آزاد را کاهش می‌دهد (۲۰).

دارچین دارای اثر ضد سرطانی نیز هست و از جمله مکانیسم‌های ضد سرطانی آن القاء آپوپتوز در سلول‌های سرطانی می‌باشد. از آنجایی که سلول‌های سرطانی به آپوپتوز مقاوم هستند، یک روش مؤثر برای تولید داروهای ضد سرطان جدید از بین بردن انتخابی آنها با تحریک مسیر آپوپتوز است (۱٤).

در این بررسی برای سرطانی کردن بافت معده موش‌ها از ماده‌ای شیمیایی به نام ۱و۲–دی متیل هیدرازین با فرمول شیمیایی $(CH_3NH)_2$ استفاده شد. که یک مایع بی‌رنگ در دمای اتاق است و خصوصیاتی مشابه متیل آمین‌ها دارد (۱۱). طی بررسی های انجام شده، دی متیل هیدرازین در کبد فعال شده و تبدیل به متابولیت فعال خود یعنی آزوکسی متان و متیل ازوکسی متانول می‌شود، سپس توسط صفرا به خون و روده بزرگ منتقل می‌شود و در آنجا سبب تولید رادیکال‌های آزاد می شود که وظیفه‌ی آنها ایجاد آسیب اکسیداتیو به DNAسلول‌های کولون و کبد است. در نهایت دی

متیل هیدرازین با مکانیسم بیان شده، باعث ایجاد و رشد تومور می‌شود (٦).

دی متیل هیدرازین و متابولیت آن، آزوکسی متان، پروکارسینوژن‌هایی هستند که برای تشکیل محصولات واکنش پذیر DNA به فعال‌سازی متابولیکی نیاز دارند. عوامل آلکیله کننده دی متیل هیدرازین و آزوکسی متان فعالیت جهش‌زایی خود را از طریق متیلاسیون گوانین در DNA در موقعیت N-7 آغاز می‌کنند. این گوانین آلکیله شده با از دست دادن پروتون به جای باز آلی سیتوزین با تیمیدین جفت می‌شود و پیوند هیدروژنی برقرار می‌نماید که منجر به تغییراتی در ساختارهای بازهای آلی می‌گردد، در ادامه فرآیند همانندسازی جفت شدن اشتباه گوانین به تیمین و سیتوزین به آدنین رخ می‌دهد که منجر به رخداد فرآیند جهش در DNAمی‌شود. متابولیسم این ترکیبات پروکارسینوژن شامل آنزیم‌های متابولیکی مختلف، از جمله آنزیم‌های متابولیزه کننده زنوبیوتیک است، این آنزیم‌ها چندین مرحله هیدروکسیلاسیون اکسیداسیون را پردازش می‌کنند (۸، ۱۷، ۲۳).

ژن Bax مخفف Bcl-2-associated X protein است. اعضای خانواده Bcl2 هترو یا هومودایمر تشکیل می‌دهند و به عنوان تنظیم کننده‌های آنتی آپوپتوتیک و یا پروآپوپتوتیک عمل می‌کنند که در طیف گسترده‌ای از فعالیت‌های سلولی نقش دارند. گزارش شده است که این پروتئین با کانال آنیونی وابسته به ولتاژ میتوکندری تعامل کرده و دهانه آن را افزایش می‌دهد که منجر به از دست رفتن پتانسیل غشا و آزاد شدن سیتوکروم *C* می‌شود. در حالت عادی، این پروتئین در سیتوزول سلول‌های پستانداران واقع شده است. با آغاز آپوپتوز این پروتئین وابسته به غشاء اندامک‌های سلولی شده و به ویژه در غشاء میتوکندری جای می‌گیرد. داروهایی که Bax را فعال می کنند، داروهای نویدبخشی در درمان سرطان هستند (۷).

ژن Bcl2 روی کروموزوم 18q21 قرار دارد که وزن مولکولی پروتئین آن ۲۰ کیلو دالتون و طولش ۲۳۹ اسید آمینه است. Bcl2 یک پروتئین غشایی است که اساسا در غشاء خارجی میتوکندری قرار دارد و یک پروتئین میتوکندریال را رمزگذاری می‌کند که از مرگ برنامه-ریزی شده سلول‌های طبیعی جلوگیری می‌کند (۱۳). Bcl2 یک پروتئین ضدآپوپتوزی است که در مسیر داخلی آپوپتوز (مرگ برنامه‌ریزی شده سلول) نقش دارد و مانع فعالیت کاسپازها می‌شود. کاسپازها گروهی از آنزیم‌ها هستند که به خانواده پروتوآز ها تعلق دارند و این آنزیم‌ها، نوعی فعالیت سیستئین پروتئازی ویژه دارند، بدین نحو که یک سیستئین در جایگاه فعالشان به صورت نوکلئوفیل به پروتئین هدف حمله ور شده و آنرا در محل باقیمانده اسید آسپارتیک می‌شکند آنزیم های کاسپاز در مرگ برنامه ریزی شده آپوپتوز ، التهاب و تمایز سلولی نقش مهمی دارند.

Bax پروتئینی است که با خنثی کردن عمل Bcl2، آپوپتوز را فعال می‌کند و تغییرات بافت شناختی معینی از جمله کاهش یا عدم چسبندگی سلول آپوپتوزی به سلول‌های دیگر، قطعه قطعه شدن DNA ژنومی، آزادسازی ریبوزیم‌ها و تجزیه سلول به اجسام آپوپتوزی و سلول در حال مرگ را ایجاد می‌کند. افزایش مقادیر Bax باعث افزایش میزان آپوپتوز و کاهش آن باعث بقای سلول و ترمیم آن می‌شود. همچنین افزایش مقادیر Bcl2 در جهت بقاء و ترمیم سلول است و آپوپتوز را مهار می‌کند؛ بنابراین تعادل بین Bax/Bcl2 یک عامل مهم در تعیین میزان آپوپتوز به شمار می‌رود (٢٦).

فاکتور رشدی توموری بتا (TGF-β) یک مولکول پروتئینی با وزن مولکولی ۲۵ کیلودالتون می‌باشد. این ژن توسط بخشی ژنی واقع بر روی بازوی بزرگ کروموزم 13q9 کد می‌شود (۹). TGF-β یک فاکتور رشدی چندکاره است که رفتارهای گوناگون سلول

شامل تکثیر، تمایز، مهاجرت و آپوپتوز را تنظیم می‌کند و مسیر سیگنالینگ این ژن رشد سلول‌های تومور را مهار می کند و شناخته شده است که مانند سرکوبگر تومور در طی مراحل اولیهٔ سرطانی شدن سلول عمل می‌کند. به طور خاص، مسیر سیگنالینگ TGF-β نقش مهمی در طی پیشرفت و متاستاز سرطان‌ها دارد (۱۲).

مواد و روش‌ها

این تحقیق پس از کسب مجوز از کمیته اخلاق دانشگاه علوم دارویی با کد .IR.IAU.PS.REC.1400 233 انجام گرفت. تعداد ۴۰ سر موش نر نژاد ویستار، ۵۳ هفته‌ای بالغ به وزن ۱۰ ± ۲۳۰ گرم مورد ارزیابی قرار گرفتند و در چهار گروه ۱۰ تایی تقسیم شدند. گروه۱ یا شاهد فقط آب و غذا دریافت کردند.

گروه۲: دریافت کننده کارسینوژن (ماده سرطان‌زا) بدون سینامالدهید که در این گروه با ایجاد سرطان تغییر بیان ژن‌های مربوطه بررسی شد.

گروه ۳: به این گروه از موش‌ها فقط سینامالدهید داده شد برای اینکه اطمینان حاصل گردد که سینامالدهید به تنهایی ایجاد بیماری خاص یا تغییر بیان ژن نکند.

گروه ٤: کارسینوژن همراه با سینامالدهید ،که به این گروه از موش‌ها کارسینوژن همراه با سینامالدهید داده شد تا مشخص گردد که سینامالدهید در بیان ژن‌های مربوطه چه مقدار تغییر در سلول سرطانی شده ایجاد می‌کند. جهت زمان‌بندی و ایجاد کارسینوژنسیتی۲۰ میلی‌گرم دی‌متیل هیدرازین به موش‌های آلبینو ویستار نر تزریق شد، در هفته اول ۲۵۰ میکرولیتر و در هفته دوم به بعد ٤۰۰ میکرولیتر تزریق صفاقی گردید. پس از مصرف آن در ۲۰ هفته متوالی به صورت روزانه موش‌ها چک شدند. سپس بافت معده موش‌ها با رعایت اصول و موازین اخلاقی جداسازی گردید. برای جداسازی بافت، ابتدا موش‌ها با کتامین بصورت کامل بیهوش شدند و معده آنها خارج شد. سپس بافت‌ها، توسط دستگاه هموژنایزر در سرما همگن‌سازی و در دمای ۷۰-درجه سانتیگراد نگهداری شدند. به منظور ارزیابی میزان بیان ژن های مورد نظر ابتدا RNA بافت-های بدست آمده از حیوان استخراج شد. در بررسی حاضر برای استخراج RNA از محلول ترایزول Ribox از شرکت Gene all استفاده گردید. به این صورت که ۵۰ تا ۱۰۰ میلی‌گرم از بافت معده موش را برش داده سپس یک میلی‌لیتر ترایزول را به آن اضافه نموده و به مدت ٢٤ ساعت کرایوتیوب حاوی نمونه در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. در ادامه توسط دستگاه هموژنایزر مکانیکی، بافت بصورت هموژن درآمد، سپس کلروفرم به مقدار۲۰۰ میکرولیتر به نمونه اضافه شد و به مدت ۱ دقیقه ورتکس گردید .سپس به مدت۲ دقیقه نمونه در دمای اتاق نگهداری شد و با دور ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵دقیقه در دمای ٤ درجه سانتیگراد سانتریفیوژ گردید. فاز بالایی لوله که RNAمی‌باشد را به میکروتیوب جدید انتقال داده و ۵۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول سرد به آن اضافه و به مدت۱۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد، سپس به مدت ۱۰ دقیقه در دمای٤ درجه سانتی گراد با دور ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ کرده و بعد از آن فاز بالایی را دور ریخته و در ادامه یک میلی‌لیتر الکل ۷۵درصد سرد برای شستشوی RNA به رسوب اضافه شد. سپس به مدت ۵ دقیقه در دمای ٤ درجه سانتی گراد با دور ۷۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ کرده و بار دیگر فاز بالایی را دور ریخته و به رسوب باقی مانده DEPC-water افزوده شد. در مرحله بعد استخراج RNA انجام شد. در مرحله بعدی به سنتز *c-DNA* پرداخته شد. از آنجایی که mRNA ترکیبی به شدت ناپایدار است می بایست آن را به DNA مکمل یا همان c-DNA تبدیل کرد .در حضور داکسی نوکلئوتیدها و آنزیم ترانس کریپتاز معکوس از روی mRNA حاصل، DNAمکمل سنتز شد. در مرحله بعدی طراحی و

سنتز پرایمرها انجام شد. طراحی primer توسط نرم افزار oligo-7 صورت پذیرفت و سنتز آن توسط شرکت سیناکلون (ایران-تهران) انجام شد. سپس Real-time PCR با دستگاه Rotor-gene Q انجام شد. پرایمرهای ساخته شده از شرکت سیناکلون به صورت لیوفیلیزه تحویل گرفته شد . بر اساس اطلاعات مربوط به هر پرایمر حجم مشخصی آب مقطر دیونیزه اضافه شد که در نهایت غلظت تمام پرایمرها در حد۱۰۰ میکرومولار (غلظت پرایمر ذخیره) باشد. پرایمرهای آماده شده در مقادیر۱۰ پیکومول بر میکرولیتر تقسیم و در ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند (جدول۱).

روش آماری: نتایج حاصل از Real-time PCR توسط نرم‌افزار REST و prism GraphPad مورد بررسی قرار گرفت. جمع آوری داده‌ها با استفاده از نسخه نهایی نرم‌افزار آماری SPSS به بررسی و تجزیه و تحلیل اطلاعات پرداخته شد. آنالیز با آزمون‌های T test، post hoc و Tukey و داده‌ها بصورت Mean ± SD انجام شد و سطح معنی‌دار شدن به صورت $P <$ ۰/۰۵ در نظر گرفته شد. سطح معناداری $p <$ ۰/۰۵ در بررسی‌های آماری به این مسئله اشاره دارد که تفاوت مشاهده شده بین گروه‌های مورد مطالعه کاملا واقعی است یا اینکه صرفاً حاصل شانس و اتفاق است. به منظور محاسبه نتایج Real-time PCR از فرمول زیر استفاده گردید:

$$\text{Fold Change} = \frac{(E\,\text{target})^{\Delta Ct\ \text{target (control-treated)}}}{(E\,\text{ref})^{\Delta Ct\ \text{ref (control-treated)}}}$$

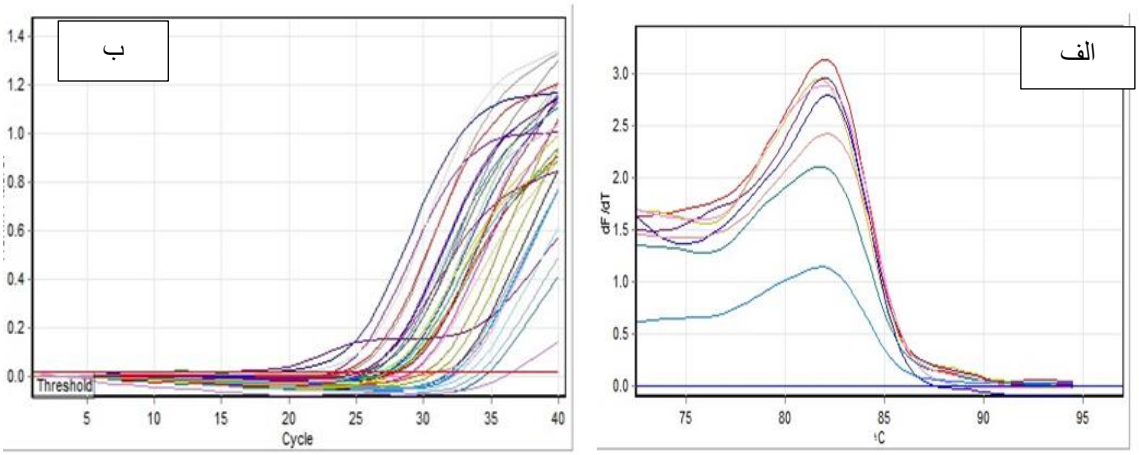
جدول ۱. توالی پرایمر مورد استفاده در تحقیق حاضر

نام پرایمر	توالی پرایمر	OD	TM(°C)
GAPDH	F: 5´-ATCACTGCCACTCAGAAGAC	4.5	59.35
	R: 5´-ACATTGGGGGTAGGAACAC	4.3	59.35
BCL-2	F: 5´-AATTCTGGCCTCCTCTTGCT	4.5	51.8
	R: 5´-TTTAACGCGCACTTTGACCT	4.3	49.7
Bax	F: 5´-AAGTGTCCTGAGTGCTGTGT	5.4	51.8
	R: 5´-TGTCTTCGCTCCATACACCA	4.9	51.8
TGF-β	F:5´-GCCCTGTATTCCGTCTCCTT-3´	4.0	59.35
	R:5´-TGCAAGATCCCCAATGACCT-3´	4.7	57.30

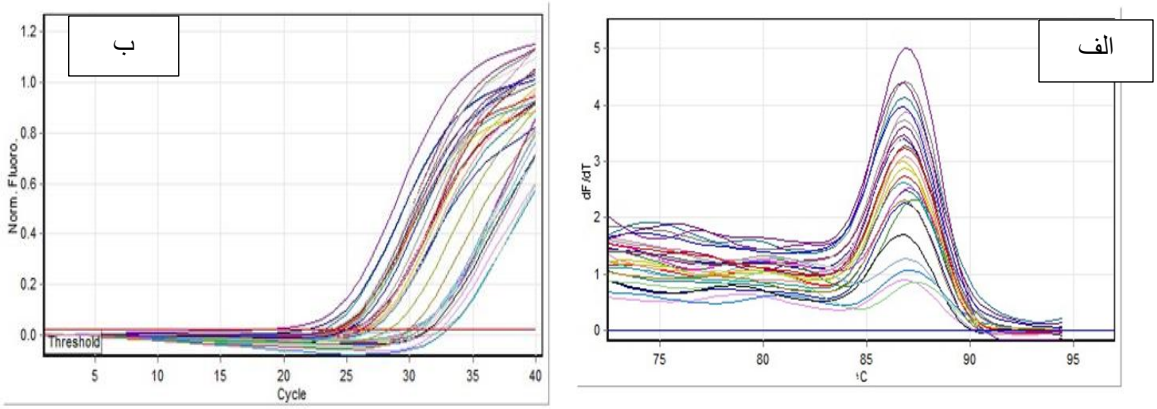
نتایج

نتایج بدست آمده نشان داد در تیمار ۱ (کارسینوژن فاقد سینامالدهید) نسبت به گروه شاهد، به‌میزان ۸۳۵/ ۱برابر کاهش بیان ژن Bax مشاهده شد. در تیمار ۲ (کارسینوژن همراه با سینامالدهید) نسبت به گروه شاهد، به‌میزان ۵/٦۷ برابر افزایش بیان ژن Bax مشاهده گردید و در تیمار۳ (فقط سینامالدهید) نسبت به گروه شاهد، به میزان ۲۲/٦۱ برابر افزایش بیان ژن Bax مشاهده شد. نتایج نهایی نشان داد بیان ژن Bax در دریافت کننده کارسینوژن همراه با سینامالدهید نسبت به گروه شاهد افزایش معناداری پیدا کرده است (p = ۰/۰۰۰۸) (نمودار ٤). نتایج بدست آمده نشان داد در تیمار ۱ (کارسینوژن فاقد سینامالدهید) نسبت به گروه شاهد، به‌میزان۱/۲۲۱ برابر افزایش بیان ژن BcL2 مشاهده شد. در تیمار۲ (کارسینوژن همراه با سینامالدهید) نسبت به گروه شاهد، به میزان ۲/٤۹۸ برابر کاهش بیان ژن BcL2 مشاهده شد. در تیمار۳ (فقط سینامالدهید) نسبت به گروه شاهد، به میزان٤/۷ برابر افزایش بیان ژن BcL2 مشاهده شد. نتایج نهایی نشان داد بیان ژن BCL2 در دریافت کننده کارسینوژن همراه با سینامالدهید نسبت به گروه شاهد کاهش معناداری پیدا کرده است (p =۰/۰۲۹۳)(نمودار۵).

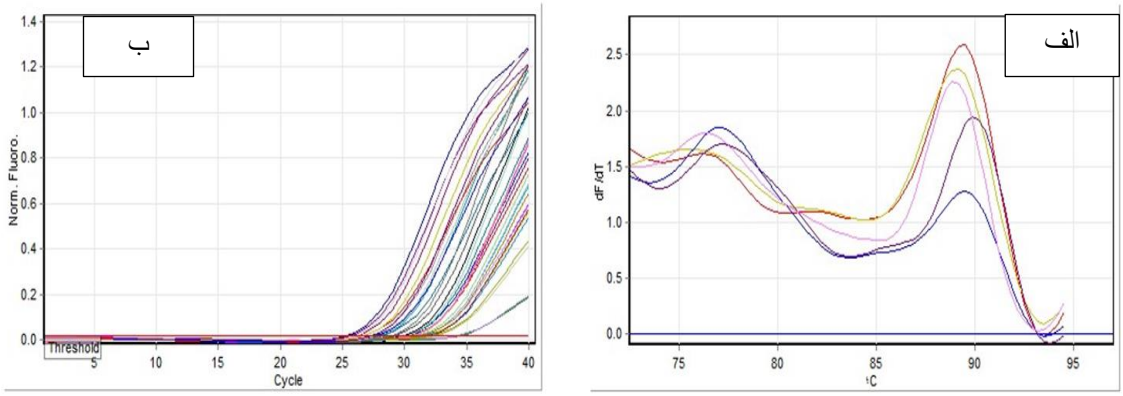
آنالیز ژن TGF-β: نتایج بدست آمده نشان داد در تیمار ۱ (کارسینوژن فاقد سینامالدهید) نسبت به گروه شاهد، به میزان ۱/۲۹۴ برابر کاهش بیان ژن TGF-β مشاهده شده است. در تیمار ۲ (کارسینوژن همراه با سینامالدهید) نسبت به گروه شاهد، به میزان ۱/۷۸۶برابر افزایش بیان ژن TGF-β مشاهده شده است. در تیمار ۳ (فقط سینامالدهید) نسبت به گروه شاهد، به میزان ۱/۷۶ برابر افزایش بیان ژن TGF-β مشاهده شده است. نتایج نهایی نشان داد بیان ژن TGF-β در دریافت کننده کارسینوژن همراه با سینامالدهید نسبت به گروه شاهد کاهش معناداری پیدا کرده است (p = ۰/۰۸۵۵)(نمودار۶).



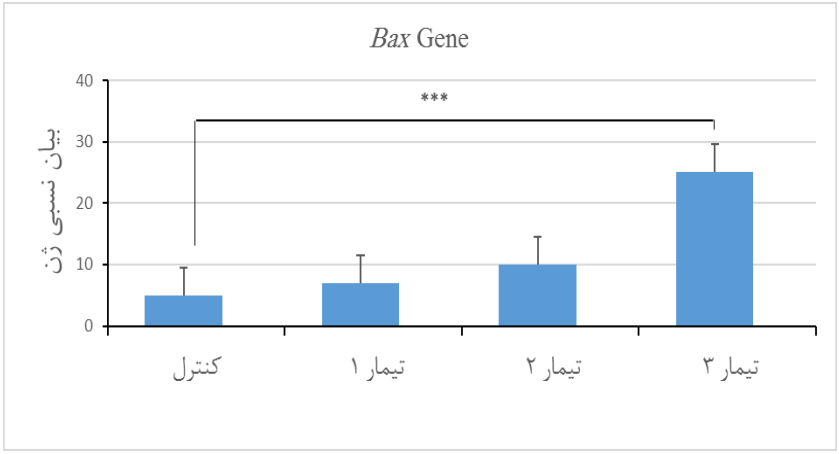
نمودار ۱- الف: منحنی ذوب، ب: تکثیر ژن Bax



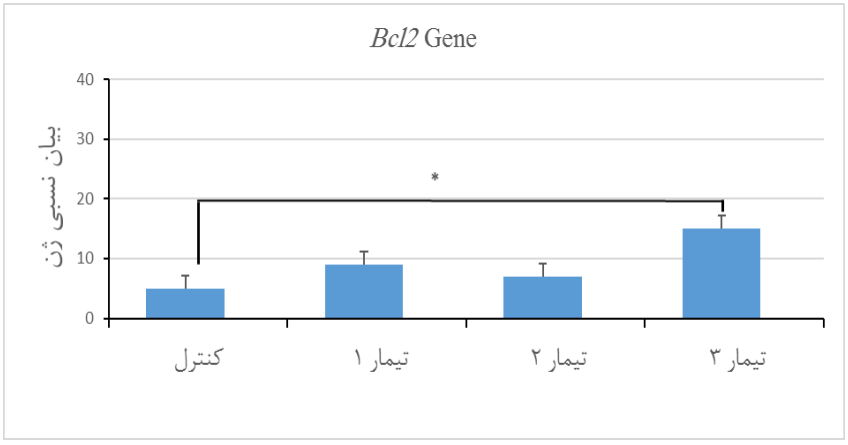
نمودار ۲- الف: منحنی ذوب، ب :تکثیر ژن Bcl2



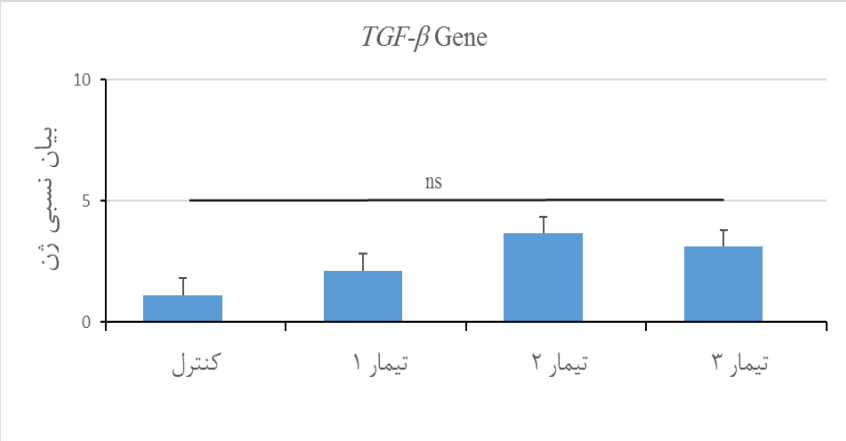
نمودار ۳- الف: منحنی ذوب، ب: تکثیر ژن TGF-β



نمودار ٤- نمودار آنالیز آماری ژن Bax بین گروه کنترل و تیمار ۳ (سالم همراه با سینامالدهید) ارتباط معناداری را نشان داد (p = ۰/۰۰۰۸) ($p \leq$ ۰/۰۵) دلالت بر معنادار بودن است). اما بین گروه کنترل با تیمار۱ (کارسینوژن فاقد سینامالدهید) و تیمار۲ (کارسینوژن همراه با سینامالدهید) هیچ ارتباط معناداری وجود نداشت .



نمودار ۵- نمودار آنالیز آماری ژن Bcl2 بین گروه کنترل و تیمار ۳ (سالم همراه با سینامالدهید) ارتباط معناداری را نشان داد (p =۰/۰۲۹۳)(علامت ستاره دلالت بر معناداری دارد). اما بین گروه کنترل با تیمار ۱(کارسینوژن فاقد سینامالدهید) و تیمار۲ (کارسینوژن همراه با سینامالدهید) ارتباط معناداری وجود نداشت.



نمودار ٦- نمودار آنالیز آماری ژن TGF-β. بین هیچ یک از گروه‌های مورد بررسی نسبت به گروه کنترل افزایش بیان ژن TGF-β معنادار نمی باشد (p =0.0855). علامت NS بالای خط نمودارهای بیان ژن TGF-β دلالت بر عدم معناداری می‌نماید.

بحث

در بررسی حاضر به ارزیابی اثر سینامالدهید بر تغییرات بیان ژن‌های Bax، Bcl2 و TGF-β در سلول-های سرطانی شده بافت معده‌ی موش توسط دی متیل هیدرازین پرداخته شد. بررسی آماری نتایج حاصله در این بررسی نشان داد که استفاده از کارسینوژن همراه با سینامالدهید موجب افزایش بیان ژن TGF-β، کاهش بیان ژن BcL2 و افزایش بیان ژن Bax نسبت به گروه شاهد گردید. نتایج این پژوهش نشان داد که سینامالدهید می‌تواند تغییراتی در بیان ژن‌های Bax، Bcl2 و TGF-β در بیماری سرطان معده القاء شده توسط دی متیل هیدرازین داشته باشد.

در تحقیقی که Chew و همکاران در سال ۲۰۱۰ انجام دادند مشخص شد سینامالدئید و مشتقاتش بر روی تومور و سلول‌های سرطانی اثرات مفیدی دارند. در این پژوهش فعالیت ضدتومور ترنس سینامالدئید (CA) و مشتقاتش از قبیل ۲-هیدروکسی سینامالدئید و ۲-بنزوئیلوکسی سینامالئید گزارش شده است. در این بررسی سینامالدئید به عنوان فعال‌کننده فاکتور NRF-2 (فاکتوری که در برابر رادیکال‌های آزاد برای حفاظت از سلول تولید می‌شود) شناخته شد. نتیجه این مطالعه نشان داد که سینامالدئید و مشتقاتش در دوزهای مختلف می‌توانند به منظور درمان مکمل تومور استفاده شوند (۵). نتایج تحقیق حاضر نیز نشان داد بیان ژن‌های وابسته به فرآیند آپوپتوز از جمله Bcl2 و Bax که به ترتیب ژن ضد آپوپتوزی (آنتی آپوپتوزی) و مشتق آپوپتوز (پروآپوپتوزی) هستند تحت تاثیر سینامالدهید تغییر می کند. بیان ژن Bcl2 به طور معناداری تحت تاثیر قرار می‌گیرد، همچنین بیان ژن Bax نیز به طور بسیار معناداری افزایش یافت. این موضوع نشان می‌دهد ابتدا سلول در برابر القاء آپوپتوز از خود مقاومت نشان می‌دهد (با افزایش سطح Bcl2) اما زمانیکه این مقاومت نتیجه نداشته باشد با افزایش سطح بیان Bax سعی بر ترغیب سلول جهت مرگ می‌نماید.

Liu و همکاران در سال ۲۰۱٦ به بررسی نقش فعال سازی مستقیم ژن Bax برای درمان سرطان پرداختند. Bax، تنظیم‌کننده مرکزی مرگ سلولی و یکی از اعضای خانواده تنظیم‌کننده آپوپتوز است که آپوپتوز سلول‌های نرمال و سرطانی را کنترل می‌کند. همچنین نشان دادند که فعال‌سازی Bax موجب القاء آپوپتوز در سلول‌های سرطانی می‌شود و این موضوع نوید دهنده این امید است که بتوان سلول‌های سرطانی را

وادار به خودکشی کرد و بطور مهندسی شده بافت سرطانی را تخریب نمود (۱٤).

نتایج تحقیق حاضر نشان داد بیان ژن Bax در موش-هایی که توامان سرطانی شده بودند و سینامالدئید دریافت نموده بودند تغییر نموده است پس می‌توان از سینامالدئید به عنوان القاء کننده فرآیند آپوپتوز استفاده نمود. همچنین در این تحقیق مشخص شد Bax به طور بسیار معناداری در سلول‌های سرطانی شده تحت تیمار سینامالدئید تغییر بیان می‌دهد، لذا نتایج این تحقیق با نتایج Liuو همکاران کاملا همسو می‌باشد.

Hong و همکاران در سال ۲۰۱٦ به بررسی تاثیر سینامالدئید در شیمی درمانی سرطان پرداختند. آن ها مکانیسم‌هایی که از طریق آن سینامالدئید القای آپوپتوز سلولی می‌کند را مشخص کردند و مدارکی برای اثرات تنظیمی سینامالدئید روی متاستاز سلولی ارائه دادند. این گروه مدارکی از نقش سینامالدئید برای کاهش سطح بیان ژن‌های موثر در آپوپتوز در سلول-های سرطانی پستان، پروستات، کولون، کبد و لوکمی ارائه دادند (۱۰). در تحقیق حاضر مشخص شد بیان ژن‌های Bcl2 و Bax به عنوان ژن‌های کلیدی آپوپتوز تحت تاثر سینامالدئید قرار می‌گیرد، در نهایت می‌توان عنوان نمود نتایج تحقیق حاضر با نتایج گزارش شده توسط Hong و همکاران همسو می‌باشد و تایید کننده نقش سینامالدئید بر روی ژن‌های کلیدی آپوپتوز است.

Xie و همکاران در سال ۲۰۱۸ تحقیقی مبنی بر نقش TGF-β در متاستاز سلول‌های سرطانی انجام دادنـد. نقش این ژن در کنترل تقسیم سلولی، تمایز، آپوپتوز و جهش به صورت کامل شناخته شده است. بیان TGF-β نقش اساسی در سرطان دارد، از جمله: در مرحله‌ی پیش از بدخیم شدن سلول، TGF-β نقش در سرکوب تومور دارد. نتایج بررسی آنها نشان داد، بلاک کردن بیان ژن TGF-β می‌تواند فرصت‌درمانی ویژه‌ای برای درمان سرطان‌های مختلف مهیا کند (۲۵).

در تحقیق حاضر مشخص شد سینامالدئید می‌تواند بر بـیان ژن TGF-β اثرگذار باشد و می‌توان از سینامالدئید جهت جلوگیری از افزایش بیان ژن TGF-β و نهایتا جلوگیری از فرآیندهای سلولی مولکولی سرطان از جمله متاستاز استفاده کرد.

Cabello و همکاران در سال ۲۰۰۹ به بررسی اثر سینامالدهید بر روی تکثیر سلول‌های ملانوما، تهاجم و رشد تومور پرداختند. نتایج این بررسی نشان داد که تجویز خوراکی سینامالدهید، باعث فعالیت ضدملانوما و اختلال در رشد سلول سرطانی در مدل حیوانی موش‌ها می‌شود. این مهار و سرکوب یک کمک اضافی را برای نقش سینامالدهید به عنوان یک ضد تومور فراهم می‌کند (٤). بررسی حاضر نیز تایید کننده نتایج بدست آمده فوق بود. این تحقیق نشان داد که سینامالدهید می‌تواند با تاثیر بر روی ژن‌های موثر در فرآیند مرگ سلولی موجب القاء مرگ سلولی در سلول‌های سرطانی گردد.

نتیجه‌گیری

در انتها با در نظر گرفتن تمامی نتایج بدست آمده در پژوهش حاضر و مقایسه این نتایج با بررسی‌های گذشته می‌توان عنوان نمود، در فرآیند سرطان یکسری ژن‌های بسیار کلیدی وجود دارند که در تنظیم سیکل سلولی و همچنین القاء فرآیند مرگ برنامه‌ریزی شده سلول یا همان آپوپتوز نقـش اسـاسی را بر عـهده دارند از جـمله *Bax,Bcl2,TGF-β* که در تمامی بررسی‌ها نتایج مشابهی با تحقیق حاضر گزارش شده است یعنی این ژن‌ها در طی فرآیند سرطانی شدن بافت تغییرات سطح بیان خواهند داشت. پس چنانچه بتوان بیان این ژن‌ها را مدیریت کرد مثلا با استفاده از miRNAها، siRNAها و یا داروهای گیاهی موثر می-

توان امیدوار بود بتوان سرطان را تا حدودی کنترل نمود و به درمان هدفمند این بیماری مهلک کمک کرد. نتیجه نهایی این مطالعه نشان داد که سینامالدئید و مشتقاتش در دوزهای مختلف می‌توانند با تاثیر بر بیان ژن‌های مذکور برای طب مکمل استفاده شوند و این موضوع می‌تواند نوید بخش روش‌های نوین درمان بیماری سرطان باشد.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله نویسندگان مقاله از تمامی کسانی که ما را در انجام این پژوهش در مرکز حیوانات و آزمایشگاه دانشگاه بقیه‌الله همراهی کردند صمیمانه تشکر و قدردانی مینماییم.

منابع

1. Abdullaev F.I. 2002. Cancer chemopreventive and tumoricidal properties of saffron (*Crocus sativus L.*). *Experimental Biology and Medicine*, 227(1):20-5.

2. Akira T., Tanaka S., Tabata M. 1986. Pharmacological studies on the antiulcerogenic activity of Chinese cinnamon. *Planta medica*, 52(06):440-3.

3. Allum W.H., Powell D.J., McConkey C.C., Fielding J.W. 1989. Gastric cancer: a 25-year review. *Journal of British Surgery*, 76(6):535-40.

4. Cabello C.M., Bair W.B., Lamore S.D., Ley S., Bause A.S., Azimian S., Wondrak G.T. 2009.The Cinnamon-derived Michael acceptor cinnamic aldehyde impairs melanoma cell proliferation, invasiveness, and tumor growth. *Free Radical Biology and Medicine*, 46(2):220-231.

5. Chew E.H., Nagle A.A., Zhang Y., Scarmagnani S., Palaniappan P., Bradshaw T.D., Holmgren A., Westwell A.D. 2010. Cinnamaldehydes inhibit thioredoxin reductase and induce Nrf2: potential candidates for cancer therapy and chemoprevention. *Free Radical Biology and Medicine*, 48(1):98-111.

6. Choudhary G., Hansen H. 1998. Human health perspective of environmental exposure to hydrazines: *A review Chemosphere*, 37(5):801-843.

7. Elmore S. 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology*, 35(4):495-516.

8. Fiala E.S., Sohn O.S., Puz C., Czerniak R. 1987. Differential effects of 4-iodopyrazole and 3-methylpyrazole on the metabolic activation of methylazoxymethanol to a DNA methylating species by rat liver and rat colonmucosa in vivo. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 113:145–150.

9. Fujii D., Brissenden J.E., Derynck R., Francke U. 1986. Transforming growth factor beta gene maps to human chromosome 19 long arm and to mouse chromosome 7. *Somatic Cell and Molecular Genetics*, 12:281-288.

10. Hong S.H., Ismail I.A., Kang S.M., Han D.C., Kwon B.M. 2016. Cinnamaldehydes in cancer chemotherapy. *Phytotherapy Research*, 30(5):754-767.

11. Hoshyar R. 2013. Comparative studies of the effect of main saffron carotenoides, crocin and crocetin, on cell proliferation and apoptosis (Bax/Bcl-2 expression rate) on AGS human gastric adenocarcinoma cell line [PhD thesis] Tarbiat Modares University [In Persian].

12. Imamura T., Hikita A., Inoue Y. 2012. The roles of TGF-β signaling in carcinogenesis and breast cancer metastasis. *Breast Cancer*, 19(2):118-224.

13. Kwon H.K., Hovang J., So J.S., Lee C.G., Sahoo A., Ryu J.H. 2010. Cinnamon extract induces tumor cell death through inhibition of NFB and AP1BMC *Cancer*, 10(392):30-35.

14. Liu Z., Ding Y., Ye N., Wild C., Chen H., Zhou J. 2016. Direct activation of bax protein for cancer therapy. *Medicinal Research Reviews*, 36(2):313-341.

15. MacMahon B., Cole P, Brown J. 1973. Etiology of human breast cancer: a review. *Journal of the National Cancer Institute*, 50(1):21-42.

16. Murphy G., Pfeiffer R., McCamargo, Rabkin C. 2009. Meta-analysis shows that prevalence of Epstein-Barr virus-positive gastric cancer differs based on sex and anatomic location. *Gastroenterology*, 137:824-833.

17. Notman J., Tan Q.H., Zedeck M.S. 1982. Inhibition of methylazoxymethanol-induced intestinal tumors in the rat by pyrazole with paradoxical effects on skin and kidney. *Cancer Research*, 42:1774–1780.

18. Parekh J., Inamdhar P., Nair R., Baluja S., Chanda S. 2005. Synthesis and antibacterial activity of some Schiff bases derived from 4-aminobenzoic acid. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 70(10):1155-1162.

19. Parkin D., Bray F., Ferlay J., Pisani P. Global cancer statistics. 2005: CA. *Cancer Journal Clinical*, 55:74-108.

20. Ranasinghe P., Pigera S., Premakumara S., Galappaththy P., Constantine G.R., Katulanda P. 2013. Medicinal properties of ‘true’ Cinnamon *(Cinnamomum zeylanicum*): a systematic review. *BMC Complement Alternative Medication,*13(2):75-77.

21. Stewart B., Kleihues P. 2003. International agency for research on cancer: world cancer report. Lyon*: International Agency for Research on Cancer (IARC)*, Press. 1-26.

22. Tavakoli A. 2007. Expression of Bcl-2 gene in primary breast cancer and its correlation with some prognostic factors. *Journal of Mazandaran University of Medical Sciences*, 17(58):30-36 [In Persian].

23. Tredaniel J., Boffetta P., Buiatti E., Saracci R., Hirsch A. 1997.Tobacco smoking and gastric cancer: review and meta- analysis. *International Journal of cancer*, 72(4):565-573.

24. Venkatachalam K., Vinayagam R., Arokia Vijaya Anand M., Isa N.M., Ponnaiyan R. 2020. Biochemical and molecular aspects of 1,2-dimethylhydrazine (DMH)-induced colon carcinogenesis: a review. *Toxicology research*, 9(1): 2-18.

25. Xie F., Ling L., van Dam H., Zhou F., Zhang L. 2018. TGF-β signaling in cancer metastasis. *Acta biochimica et biophysica Sinica*, 50(1):121-132.

26. Yavari P., Hosseini B., Haghdoost A., Rad M., Shahismail A., Shamshiri A. 2013. Epidemiology textbook of prevalent diseases in Iran. Tehran, Publishing gap (Department of Health and Medical Sciences), First Edition, p. 15 [In peersian].

27. Zinkel S., Gross A., Yang E. 2006. BCL2 family in DNA damage and cell cycle control. *Cell Death and Differentiation*, 13(8):1351-1359.

Investigating the Effect of Cinnamaldehyde on the Changes of Bax, BCL2, TGF-β Genes Expression in Cancer Cells of Rat's Gastric Tissue by Dimethylhydrazine

Saber Gharatapehloo[1], Tahereh Naji [1*], Abdolreza Mohammadnia[2]

1- Department of Basic Sciences, Faculty of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Tehran Medical Sciences Unit, Islamic Azad University, Tehran, Iran

2- Chronic Respiratory Diseases Research Center, Tuberculosis and Lung Diseases Research Institute, Masih Daneshvari Hospital, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Abstract

The studies showed Bax and Bcl2, as very important genes in the process of apoptosis that can prevent cancer. The role of TGFβ gene has been also proven as a very important gene in the process of invasion and metastasis in cancers. This study aims at evaluating the expression changes of these three very important genes in cancer cells of rat gastric tissue by Dimethylhydrazine. In this study, forty male Wistar rats and 53 weeks old rats were evaluated and were divided into four ten-groups. The control group received only water and food, the second group received carcinogens without Cinnamaldehyde, the third group received only Cinnamaldehyde and the fourth group received carcinogens with Cinnamaldehyde at the same time. Then, the gastric tissue of rats was isolated and evaluated for the expression of Bax, Bcl2 and TGFβ genes with real-time PCR. The data was analyzed with one-way Anova using SPSS. The results of statistical analysis showed that the expression of in the carcinogen receptor Cinnamaldehyde increased in Bax, decreased in Bcl2 but increased in TGFβ genes compared with the control group, respectively. The results of this study showed that Cinnamaldehyde can be altered by changes in the expression of genes and it is hoped that in further researches, Cinnamaldehyde be considered as a candidate for therapeutic supplements.

Keyword: Cinnamaldehyde, Dimethylhydrazine, Gastric cancer, Gene expression changes