

# اثرات اسید رتینوئیک تمام ترانس بر القا آپوتوز و بیان ژن های *hes1* و *notch1* در رده سلولی سرطان معده MKN-45

نازیلا نیپور<sup>۱</sup> (M.Sc)، سمیرا شکری<sup>۲</sup> (M.D)، مجتبی امانی<sup>۳</sup> (Ph.D)، مرضیه شریفی پاسندی<sup>۳</sup> (M.Sc)، حسین صالحی<sup>۴</sup> (Ph.D)، علی نیپور<sup>۳\*</sup> (Ph.D)

۱- آزمایشگاه تحقیقاتی جنین شناسی و سلول های بنیادی، گروه علوم تشریحی و پاتولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران

۲- کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران

۳- گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران

۴- گروه علوم تشریحی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

## چکیده

سابقه و هدف: سرطان معده یکی از شایع ترین و کشنده ترین بدخیمی ها در جهان است. اسید رتینوئیک تمام ترانس (ATRA) به عنوان القاکننده ی تمایز در درمان بسیاری از سرطان ها و به طور ویژه در درمان لوسمی پرومیلوئیک حاد (APL) استفاده می شود. مسیر پیام رسانی سلولی Notch نقش مهمی در حفظ تعادل میان تکثیر سلولی و آپوتوز ایفا می کند. فعالیت نابه جای این مسیر در توسعه و پیشرفت بسیاری از بدخیمی ها از جمله سرطان معده نقش دارد. هدف از این مطالعه بررسی اثر ATRA بر روند بقا سلولی، روند تغییرات چرخه سلولی و القا آپوتوز در سلول های سرطانی معده رده سلولی MKN-45 بود. هم چنین تغییرات بیان ژن های *hes1* و *notch1* به دنبال تیمار با ATRA مد نظر قرار گرفت.

مواد و روش ها: در این مطالعه سلول های سرطانی معده رده ی سلولی MKN-45 با غلظت های افزایشی ۲/۵، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵ میکرومولار از اسید رتینوئیک تمام ترانس تیمار شدند. بقای سلولی با استفاده دی متیل تترازولیم بروماید (MTT) بررسی شد. کیت اندازه گیری فعالیت کاسپاز ۳ و ۷ برای سنجش میزان آپوتوز سلولی مورد استفاده قرار گرفت. روش فلوسیتومتری برای مطالعه ی روند تغییرات چرخه ی سلولی به کار گرفته شد. بررسی پروفایل بیان ژن های *hes1* و *notch1* از طریق تکنیک RT-PCR انجام شد.

یافته ها: نتایج MTT نشان داد که تیمار با ATRA سبب کاهش میزان بقا سلول های سرطانی MKN-45 شد که بیش ترین کاهش در غلظت ۱۰ میکرومولار بود. دوزهای بالاتر ATRA تفاوت معنی داری در کاهش بقا سلول های سرطانی نسبت به غلظت 10  $\mu\text{M}$  را نشان ندادند. تیمار سلول های سرطانی معده با ATRA سبب افزایش فعالیت کاسپاز ۳ و ۷ در این سلول ها شد. هم چنین نتیجه ی فلوسیتومتری حاکی از تجمع سلول های سرطانی تحت تیمار با ATRA در مرحله G1 از چرخه سلولی بود که در مقایسه با گروه کنترل معنی دار بود. نتایج RT-PCR نشان داد که میزان بیان *hes1* و *notch1* در گروه تحت تیمار با ATRA در مقایسه با گروه کنترل کاهش معنی داری یافته است.

نتیجه گیری: بر اساس یافته های ما ATRA می تواند از طریق کاهش بقای سلولی و القای آپوتوز اثرات سمی خود را بر روی سلول های سرطانی معده رده سلولی MKN-45 اعمال می نماید. توقف سیکل سلولی در فاز G1 و کاهش بیان ژن *notch1* و *hes1* موید اثرات ضد تکثیری ATRA می باشد.

واژه های کلیدی: سرطان معده، اسید رتینوئیک تمام ترانس، آپوتوز، هدایت سیگنال

رتینوئیدها از مشتقات ویتامین A هستند و به خاطر داشتن

مقدمه

عملکرد مهم در تنظیم تمایز و تکثیر سلولی اهمیت ویژه‌ای در درمان و پیشگیری از سرطان دارند. از میان آنالوگ‌های طبیعی رتینوئیدها، اسید رتینوئیک تمام ترانس (All-trans retinoic acid: ATRA) به عنوان یک فاکتور حیاتی در تعدیل تکثیر، تمایز، بلوغ و آپتوز سلول‌ها و همچنین به عنوان مورفوژن در روند تکوین جنین محسوب می‌شود [۱،۲]. ATRA اثرات خود را از طریق اتصال به رسپتورهای اسید رتینوئیک (Retinoic acid receptor: RAR) و رسپتورهای X اسید رتینوئیک (Retinoic X receptor: RXR) اعمال می‌کند [۳]. از دیدگاه بالینی، ATRA به دلیل توانایی در القای تمایز پرومیولوسیت‌ها به گرانولوسیت‌ها، اولین بار در سال ۱۹۸۷ به عنوان یک هدف دارویی در درمان لوسمی پرومیولیتیک حاد (Acute promyeloid leukemia: APL) به کار برده شد و بعدها به عنوان اولین عامل القاکننده‌ی تمایزی موثر در سلول‌های بنیادی سرطان در حوزه‌ی تمایز درمانی استفاده گردید [۴]. توانایی ATRA در القا تمایز و جلوگیری از تکثیر سلول‌های بنیادی سرطانی در چندین نوع از سرطان‌های بافت‌های جامد مثل تیروئید، پوست، پروستات، پستان و گردن رحم به اثبات رسیده است [۱]. مطالعات محققان نشان داده است که ATRA با توقف سیکل سلولی در فاز G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> و کاهش بیان VEGF (Vascular endothelial growth factor) تکثیر سلول‌های سرطانی معده رده‌ی سلولی BGC-823 را مهار می‌کند [۵]. سرطان معده چهارمین سرطان شایع و دومین علت مرگ و میرهای مرتبط با سرطان در جهان می‌باشد [۶]. علی‌رغم پیشرفت در تکنولوژی‌های جراحی و توسعه‌ی مواد شیمی‌درمانی، حیات بیماران مبتلا به سرطان پیشرفته‌ی معده پایین بوده و بقای پنج ساله کم‌تر از بیست درصد دارند [۷]. بنابراین درک بهتر از مکانیسم‌ها و تغییرات مولکولی طی بیماری‌زایی سرطان معده از نقطه نظر درمانی به منظور طراحی و به کار بردن مواد موثر بر مسیرهای چندگانه‌ی پیام‌رسانی در بیولوژی سرطان حائز اهمیت است. یکی از مسیرهای پیام‌رسانی مهم، مسیر پیام‌رسانی Notch است که در طی روند

تکوین فعال بوده و نقش حیاتی را در بسیاری از فرایندهای درون سلولی شامل آپتوز، تکثیر و تمایز سلولی دارد [۸]. در سلول‌های پستانداران، چهار نوع گیرنده ناچ (Notch1-4) و پنج لیگاند شامل دو لیگاند از خانواده‌ی Jagged1-2 و سه لیگاند از خانواده‌ی شبه دلتا (DLL1, DLL3, DLL4) وجود دارد. اتصال رسپتورها به لیگاندهای اختصاصی، سبب به راه انداختن یک سری از واکنش‌های پروتئولیتیک می‌شود که آخرین برش از طریق کمپلکس آزمیمی  $\gamma$ -secretase میانجی‌گری می‌شود. پیامد مجموع واکنش‌های پروتئولیتیک، رهاسازی قسمت داخل سلولی Notch تحت عنوان NICD (Notch Extracellular Domain) به سیتوپلاسم می‌شود.

NICD وارد هسته شده و با اتصال به CSL (CBF1, Suppressor of Hairless, Lag-1)، بیان ژن‌های هدف شامل خانواده‌ی (Hes1, 3,5 hairy enhancer of split) و Hey (Hes-related) را فعال و تنظیم می‌کند [۹،۱۰]. به این ترتیب مسیر پیام‌رسانی Notch، موجب مهار تمایز و حفظ و تکثیر سلول‌های بنیادی و پروژنیاتور می‌شود [۱۰]. ژن Hes1، یک ژن هدف برای مسیر سیگنالینگ Notch1 است و نقش مهمی را در حفظ سلول‌های بنیادی عصبی، سلول‌های پیش‌ساز روده، تعیین سرنوشت سلول‌ها و آپتوز آن‌ها ایفا می‌کند [۱۱،۱۰]. رسپتور Notch1 نیز یکی از مهم‌ترین رسپتورها در مسیر پیام‌رسانی Notch است. برخی شواهد حاکی از این است که Notch1-3 و Hes1 در موکوس معده‌ی انسان بیان می‌شوند [۷،۱۰]. در دستگاه گوارش، Notch1 به همراه افزایش بیان ژن Hes1، در کنترل تعداد و سرنوشت سلول‌های بنیادی روده نقش دارد. همچنین مطالعات اخیر نشان داده است که رسپتورهای Notch و لیگاندهایش نقش مهمی را در برخی سرطان‌ها ایفا می‌کنند. مسیر سیگنالینگ Notch1 با رشد، تهاجم و متاستاز سرطان معده ارتباط دارد [۱۰،۱۲]. بیان Notch1 و Hes1 با تکثیر سلول‌های سرطانی و رگ‌زایی سرطان مرتبط است، به طوری که محققان در مطالعه‌ی اثبات کردند، بیان ژن‌های Notch1 و Hes1 در سلول‌های بنیادی سرطان (Cancer stem cells; CSCs) بسیار بالاست و بیان

محیط کشت DMEM با مقدار گلوکز بالا (Gibco:12800116)، سرم جنین گاوی ۱۰٪ (FBS; Gibco:10270)، آنتی‌بیوتیک یک درصد (Pen/strep; Gibco:15140-122) و گلوتامکس (Gibco:35050-038) در انکوباتور شرکت Memmert آلمان در دمای ۳۷ °C و فشار دی‌اکسیدکربن ۵٪ نگهداری و کشت شدند.

بررسی سمیت سلولی با روش MTT جهت بررسی اثر سمیت اسید رتینوئیک تمام ترانس بر میزان بقای سلول‌های سرطان معده رده‌ی MKN-45 (از تکنیک 3-4-5) MTT (3-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide استفاده شده است. سنجش MTT یک روش رنگ‌سنجی و بر پایه تبدیل نمک زرد رنگ تترازولیوم MTT به محصول فورامازان بنفش رنگ توسط آنزیم سوکسینات دهیدروژناز میتوکندریایی می‌باشد. این تبدیل فقط توسط سلول‌های زنده انجام می‌شود و میزان فورامازان تولید شده با میزان سلول‌های زنده رابطه مستقیم دارد. به طور خلاصه،  $5 \times 10^2$  سلول درون هر چاهک ظروف کشت ۹۶ خانه پلیت شدند. پس از گذشت ۲۴ ساعت از انکوباسیون، سلول‌ها با غلظت‌های مختلف از اسید رتینوئیک (Sigma: R2625) (۲/۵، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰ و ۲۵ میکرومولار) تیمار شدند. ۴۸ ساعت بعد از مواجهه با اسید رتینوئیک، تعویض محیط صورت گرفت. در نهایت، در روز پنجم انکوباسیون،  $180 \mu\text{L}$  از محیط کشت همراه با  $20 \mu\text{L}$  محلول MTT (Sigma: M2128) که با غلظت ۵ mg/ml تهیه شده بود، به هر چاهک اضافه شد و به مدت ۴ ساعت در انکوباتور نگهداری شد. پس از اتمام زمان انکوباسیون، مایع رویی برداشته شد و  $200 \mu\text{L}$  حلال متوقف‌کننده‌ی دی‌متیل سولفوکساید (DMSO; Merck: K41063043) به درون هر چاهک اضافه گردید. سنجش MTT در طول موج ۵۷۰ nm به روش اسپکترومتری (Synergy HT, BioTek) انجام شد [۱۷، ۱۶].

بررسی روند تغییرات چرخه سلولی. اطلاعات لازم در مورد تکثیر سلول‌ها را می‌توان از توزیع سلول‌ها در مراحل

Notch1 در سلول‌های سرطانی نسبت به بافت نرمال بیش‌تر است [۷]. پایین بودن میزان بقای بیماران مبتلا به سرطان معده با بیان بالای رسپتور Notch-1 و لیگاند Jagged-1 نسبت به بیماران منفی از نظر بیان این رسپتور و لیگاند نشان می‌دهد که احتمالاً Notch-1 و Jagged-1 به عنوان مارکرهای بارز تشخیصی در سرطان معده محسوب شده و می‌توانند به عنوان اهداف درمانی منحصر به فرد در درمان این نوع سرطان به کار روند [۱۳]. لذا شیوه‌های درمانی متعددی به منظور مهار پیام‌رسانی Notch و جلوگیری از پیشرفت سرطان در حوزه‌ی درمان سرطان‌های مختلف به کار رفته است. کاربرد داروهای مهارکننده‌ی گاما سکرکراز به عنوان داروی شیمی‌درمانی، متداول‌ترین شیوه درمان برای مهار فعالیت مسیر پیام‌رسانی Notch، در چند سال اخیر بوده است. اما به خاطر عوارض جانبی و مقاومت دارویی مشاهده شده، روش‌های دیگری از جمله استفاده از ترکیبات موثر در تمایز درمانی جهت مهار مسیر Notch پیشنهاد شده‌اند [۱۴]. برخی شواهد حاکی است از آن است که ATRA، بیان Jagged1 را در APL کاهش می‌دهد [۱۵]. با توجه به اثر مهارکنندگی ATRA در روند تکثیر سلولی در رده‌های مختلف سلول‌های سرطانی به ویژه اثر آن بر کاهش بیان لیگاند مسیر پیام‌رسانی Notch در APL، در مطالعه‌ی حاضر به بررسی اثر رتینوئیک اسید بر حیات سلولی، روند تغییرات چرخه سلولی و القا آپوپتوز و هم‌چنین تغییرات بیان ژن‌های *hes1*، *notch1* در سلول‌های سرطانی معده رده سلولی MKN-45 پرداخته شده است.

## مواد و روش‌ها

رده‌ی سلولی و شرایط نگهداری. کلیه‌ی مراحل آزمایش، در آزمایشگاه جنین‌شناسی و سلول‌های بنیادی و آزمایشگاه بیولوژی سلولی و مولکولی واقع در دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اردبیل صورت گرفت. در این بررسی از رده‌ی سلولی سرطان معده MKN-45 استفاده شد. این رده‌ی سلولی از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران به صورت ویال منجمد شده خریداری گردید و پس از ذوب، در فلاسک حاوی

لومینسانس می‌باشد و حاوی بافر لیزکننده‌ی سلول‌های پستانداران در شرایط کشت و یک سوسترای فلوئورسنت برای آسپارٹیک اسید است. میزان نشر لومینسانس، نشان‌دهنده‌ی میزان فعالیت کاسپاز ۳ و ۷ در سلول‌های گروه کنترل و گروه تیمار است [۱۷]. به منظور اجرای سنجش، تعداد  $5 \times 10^4$  سلول‌های سرطانی در هر چاهک از ظروف کشت ۶ خانه قرار داده شد. پس از گذشت ۲۴ ساعت، سلول‌ها با غلظت  $10 \mu\text{M}$  رتینوئیک اسید تمام ترانس تیمار و به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور نگهداری شدند. بعد از انکوباسیون، سلول‌ها در یک میکروتیوب جمع‌آوری و به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۲۰۰۰ rpm سانتریفوژ گردید. به منظور حذف کامل تریپسین بار دیگر پلاک سلولی با  $\text{PBS}^-$  شستشو داده شد. تعداد سلول‌ها در گروه تیمار و کنترل شمارش گردید. به تعداد  $1 \times 10^4$  سلول در حجم  $50 \mu\text{l}$  از محیط کشت به همراه  $50 \mu\text{l}$  از مخلوط کیت به داخل چاهک پلیت مخصوص لومینسانس منتقل گردید. پس از گذشت یک ساعت، پلیت با دستگاه پلیت‌خوان (Synergy HT, BioTek) در طول موج Excitation  $490 \text{ nm}$  و Emission  $570 \text{ nm}$  قرائت گردید. این کار در فواصل زمانی یک ساعته به مدت سه ساعت تکرار شد.

بررسی بیان ژن‌های **hes1** و **notch1** با استفاده از روش **RT-PCR**. واکنش زنجیره‌ای پلیمریزاسیون به صورت نسخه‌برداری معکوس (Reverse transcription-PCR) یکی از حساس‌ترین تکنیک‌های تعیین بیان ژن‌ها از روی RNA آن‌ها است. در این بررسی، با استفاده از این تکنیک بیان ژن‌های **hes1** و **notch1** در سلول‌های سرطانی مورد ارزیابی قرار گرفتند. برای بررسی بیان ژن‌های مورد نظر، ابتدا RNA کل سلول به کمک **TRIZOL** (Invitrogen: 15596-026) و طبق دستورالعمل شرکت سازنده استخراج و غلظت RNA استخراج شده با دستگاه نانودراپ (Thermo scientific) تعیین شد. مقدار  $2 \mu\text{g}$  از RNA برای سنتز cDNA وارد واکنش ۴۰ تایی شد. سنتز cDNA با استفاده از کیت شرکت فرمتاز

مختلف چرخه‌ی سلولی به دست آورد. در جمعیت‌های سلولی که به طور فعال در حال تقسیم هستند، کسر بزرگی از سلول‌ها در فاز S (Synthesis) هستند. در حالی که جمعیتی از سلول‌ها که به صورت فعال تزیاید نمی‌کنند، درصد قابل توجهی از سلول‌ها در فاز  $G_1/G_0$  (Gap<sub>1</sub>/Gap<sub>0</sub>) هستند. جمعیت سلولی دچار آپوتوز نیز دارای DNA قطعه قطعه هستند که در فاز Sub-G1 قرار می‌گیرند [۱۸]. به منظور بررسی کمی محتوای DNA سلول‌ها و توزیع چرخه‌ی سلولی در گروه تیمار و جمعیت سلولی گروه شاهد از آنالیز فلوسیتومتری استفاده شد. بدین منظور،  $1 \times 10^6$  سلول تحت تیمار با غلظت  $10 \mu\text{M}$  از ATRA قرار گرفت. پس از سپری شدن مدت زمان تیمار، سلول‌ها تریپسین و جدا شدند و به مدت ده دقیقه با سرعت ۱۸۰۰ دور در دقیقه (rpm) سانتریفوژ شدند. سپس سلول‌ها با  $\text{PBS}^-$  (Phosphate buffer saline) شستشو و مجدد سانتریفوژ شدند. به منظور فیکساسیون سلولی،  $4 \text{ ml}$  از اتانول ۷۰٪ به آرامی به سلول‌ها اضافه گردید و در دمای  $4^\circ \text{C}$  به مدت ۴ ساعت نگهداری شدند. سپس سلول‌های فیکس شده در دمای  $4^\circ \text{C}$  به مدت ۵ دقیقه و با دور ۳۰۰۰ در دقیقه سانتریفوژ (Sigma 3-30K, Germany) شدند و بار دیگر با  $\text{PBS}^-$  شستشو داده شدند. در مرحله‌ی آخر هسته سلول‌ها با محلول DAPI(2-(4-amidinophenyl)-1H-indole-6-carboxamide Sigma: D8417)  $10 \mu\text{g/ml}$ , Triton X-100 (0.1% in PBS) رنگ‌آمیزی شدند و پس از عبور از فیلترهایی با منافذ  $30 \mu\text{m}$ ، به لوله‌های مخصوص فلوسیتومتری منتقل شدند. با استفاده از یک فلوسیتومتر (Partec CyFlow space, Germany) بررسی سلول‌ها انجام شد. توزیع سلول‌ها در فازهای مختلف چرخه سلولی به وسیله‌ی نرم‌افزار Partec FlowMax آنالیز شد [۱۹].

بررسی فعالیت کاسپاز ۳ و ۷ در روند آپوتوز. کاسپازها از خانواده‌ی سیستئین پروتئازها هستند و نقش اساسی در آپوتوز سلول‌های پستانداران ایفا می‌کنند. کیت-Caspase (Glo 3/7 kit (Promega: G8090) یک روش برای اندازه‌گیری فعالیت کاسپازهای ۳ و ۷ بر مبنای طیف سنجی

اختصاص داده شد. دستگاه به جریان الکتریسیته وصل شد و ولتاژ آن بر روی ۱۰۰ ولت به مدت ۲۰ دقیقه تنظیم گردید. در نهایت عکس برداری از باندهای به دست آمده، در دستگاه Gel Doc (Uvitech) و به کمک نور UV صورت گرفت [۲۰]. در جدول یک، لیست پرایمرهای مورد استفاده، اندازه محصول PCR، دماهای اتصال و هم‌چنین شماره‌های دستیابی (Accession No) آورده شده است. از برنامه Image J نسخه ۱/۵ و پروتوکل دانسیتومتری، جهت کمی کردن باندهای PCR استفاده شد. شدت باندهای ژن‌های هدف نسبت به ژن خانگی (Housekeeping) نرمال گردید. سپس نمودار مربوط به میزان بیان ژن با استفاده از اطلاعات به دست آمده از نرم‌افزار Image J رسم شد.

آنالیز آماری. نتایج به صورت میانگین  $\pm$  خطای معیار میانگین بیان و ارزش احتمالی کم‌تر از ۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد. جهت بررسی نتایج حاصل از آزمایش MTT assay از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه و تست تکمیلی توکی بهره گرفته شد. نتایج مربوط به دیگر آزمایش‌ها با استفاده از آنالیز آماری Student's t-test توسط نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۲۱ انجام شد.

(ReverseAid™ First Strand cDNA Synthesis) (Fermentas: K1622) و طبق دستورالعمل آن انجام گرفت. در ادامه ۵۰ ng از DNA حاصل برای واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) استفاده شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز حاوی یک واحد DNA پلیمرز، ۱  $\mu$ L از هر کدام از پرایمرهای پیشرو و پسر و اختصاصی، ۰/۵  $\mu$ L از dNTP mix، ۰/۷۵  $\mu$ L از Mgcl2، ۲/۵  $\mu$ L از ۱۰ X PCR buffer و در حجم ۲۴  $\mu$ L انجام گرفت. همه موارد مربوط به واکنش PCR از شرکت سیناژن خریداری شدند. واکنش PCR با استفاده از دستگاه ترمال سایکلر BioRAD مدل ۱۰۰T انجام شد. بعد از دناتوراسیون اولیه به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۴°C، تکثیر برای ۳۰ سیکل انجام گرفت که هر سیکل مشتمل بر ۴۵ ثانیه در دمای ۹۴°C برای دناتوراسیون، ۴۵ ثانیه در دمای مربوط به فاز اتصال و ۴۵ ثانیه در دمای ۷۲°C جهت فاز گسترش و یک مرحله گسترش نهایی در دمای ۷۲°C به مدت ۱۰ دقیقه بود. محصول واکنش روی ژل آگار ۱/۲٪ محتوی ۱۰ ng/ml اتیدیوم بروماید، در بافر (۰/۵ x) TBE الکتروفورز گردید. به این ترتیب که ۹  $\mu$ L از محصول PCR مربوط به هر گروه با یک میکرولیتر Loading dye مخلوط گشته و به چاهک ژل آگارز منتقل گردید. یک چاهک نیز به نشانگر اندازه DNA

جدول ۱. توالی پرایمرها و اندازه قطعات تکثیری، شماره‌های دستیابی و شرایط PCR.

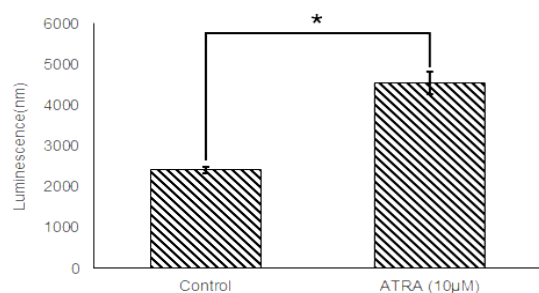
Gene	Primer Sequence (5' toward 3')	Size (bp)	Annealing Temperature(°C)	Accession No.
gapdh	F: CATCACCATCTTCCAGGAGC R: CCTGCTTACCACCTTCTTG	575	54	NM_002046.5
notch1	F: CGCCTACCTCTGCTTCTGCCT R: GGCAGGTGGGGTTCGTGGTAG	271	63	NM_017617.3
hes1	F: CGACACCGGATAAACCAAAAG R: CGGTACTTCCCCAGCACAC	264	52	NM_005524.3

نانومتر بود. میزان OD در گروه تیمار شده با غلظت‌های ۱  $\mu$ M، ۲۵ و ۲۰، ۱۵، ۱۰، ۵، ۲/۵ ATRA نسبت به گروه کنترل کاهش داشت به طوری که کم‌ترین دانسیته نوری در غلظت ۱۰  $\mu$ M و معادل ۰/۱۵  $\pm$  ۰/۴۶۰ قرائت شد. مقایسه میانگین جذب گروه‌های تیمار شده با میانگین جذب گروه کنترل نشان‌دهنده اختلاف آماری معنادار بین آن‌ها بود ( $P < 0/01$ ). با توجه به کاهش میزان حیات سلول‌های

## نتایج

تأثیر غلظت‌های مختلف ATRA بر میزان حیات سلول‌های سرطانی معده رده MKN-45. میزان حیات سلول‌های سرطانی (Viability) به روش MTT اندازه‌گیری شد. این تست میزان فعالیت متابولیکی سلول‌ها را نشان می‌دهد. شدت جذب نور بر حسب نانومتر در گروه کنترل معادل ۰/۱۵  $\pm$  ۰/۷۵۴ بود.

جمعت سلولی در فاز G1 از  $34/78 \pm 2/82$  درصد در گروه کنترل به  $45/56 \pm 1/29$  درصد افزایش پیدا کرد که این تفاوت به لحاظ آماری معنی‌دار بود ( $P < 0/001$ ). توزیع جمعیت سلولی در فاز S چرخه سلولی بین گروه‌های تیمار و کنترل تقریباً یکسان بود. لیکن در مرحله G2/M (Gap2/Mitosis) از  $38/1 \pm 0/11$  درصد گروه کنترل به  $26/81 \pm 1/81$  در گروه ATRA کاهش یافت. این تغییرات نشانگر انباشت بیش‌تر سلول‌ها در فاز G1 به دنبال تیمار با ATRA است که به خراج کاهش جمعیت سلولی در فاز G2/M صورت پذیرفته است (شکل ۳).

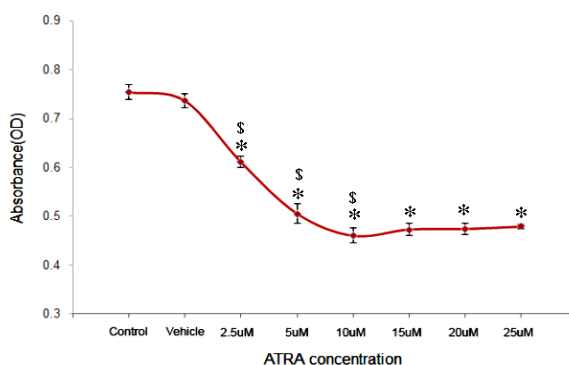


تصویر ۲: بررسی میزان فعالیت کاسپاز های ۳ و ۷.

\* وجود تفاوت آماری معنی‌دار ( $P < 0.001$ ) در مقایسه با گروه کنترل

بررسی بیان ژن‌های مسیر پیام‌رسانی Notch با استفاده از تکنیک RT-PCR. بیان ژن‌های notch1 و hes1 از مسیر پیام‌رسان Notch بررسی شد. RNA به روش دستی و با استفاده از ترايزول استخراج شد و مقدار آن با استفاده از نانودراپ تعیین گردید. در تصویر A4 به ترتیب از سمت چپ، ستون اول تصویر الکتروفورز RNA استخراج شده را نشان می‌دهد که دو باند ۱۸ و ۲۸ S در آن مشهود است. ستون‌های بعدی باندهای مربوط به gapdh، hes1 و notch1 را در گروه کنترل و ATRA نشان می‌دهد (تصویر A4). قسمت B از تصویر ۴ بیان نیمه کمی ژن‌های hes1 و notch1 را نسبت به gapdh نشان می‌دهد. نتایج حاکی از آن است که میانگین نسبی بیان ژن hes1 و notch1 در گروه تیمار با ATRA کم‌تر از گروه کنترل است ( $P < 0/05$ ) (تصویر B4).

سرطانی MKN-45 از غلظت ۲/۵ تا ۱۰ میکرومولار و خطی شدن تقریبی نمودار حیات سلول‌های سرطانی از غلظت ۱۰ تا ۲۵ میکرومولار، دوز ۱۰µM ATRA به عنوان غلظت مورد نظر برای ادامه آزمایشات مد نظر قرار گرفت (شکل ۱).



شکل ۱. تاثیر غلظت های ۲/۵، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰ و ۲۵ µM از ATRA بر میزان حیات سلول های MKN-45 به روش MTT. \* تفاوت آماری معنی‌دار ( $P < 0.001$ ) در مقایسه با گروه کنترل. \$ تفاوت آماری معنی‌دار ( $P < 0.05$ ) در مقایسه با غلظت قبل از خود

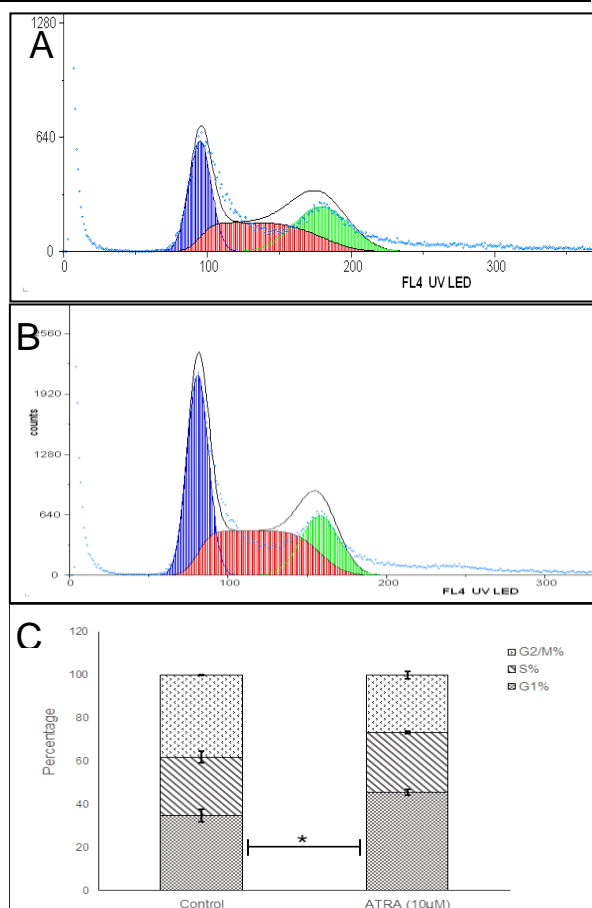
بررسی میزان آپوتوز با استفاده از کیت Caspase-Glo ۳/۷. اثر غلظت ۱۰µM ATRA در القای آپوتوز در رده سلولی MKN-45 با استفاده از کیت Caspase-Glo ۳/۷ مورد ارزیابی قرار گرفت. با استفاده از این کیت فعالیت آنزیم‌های کاسپاز ۳ و ۷ به عنوان دو کاسپاز کلیدی در روند آپوتوز در غلظت ذکر شده بررسی شد. میانگین جذب لومینیسانس در گروه کنترل معادل  $2407 \pm 79$  و در گروه تیمار با ATRA  $4536/455 \pm 281/165$  نانومتر ثبت گردید. مقایسه میانگین جذب گروه‌های تیمار شده با میانگین جذب گروه کنترل، نشان‌دهنده اختلاف آماری معنادار بین این دو گروه بود ( $P < 0/001$ ) و بیانگر تاثیر آپوتوتیک ATRA از طریق افزایش فعالیت آنزیم‌های کاسپاز ۳ و ۷ می‌باشد (شکل ۲).

بررسی روند تغییرات چرخه سلولی. اثر ۱۰µM ATRA بر روند چرخه سلولی در رده سلولی MKN-45 با استفاده از تکنیک فلوسیتومتری مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج فلوسیتومتری نشان داد که بیرو تیمار با اسید رتینوئیک

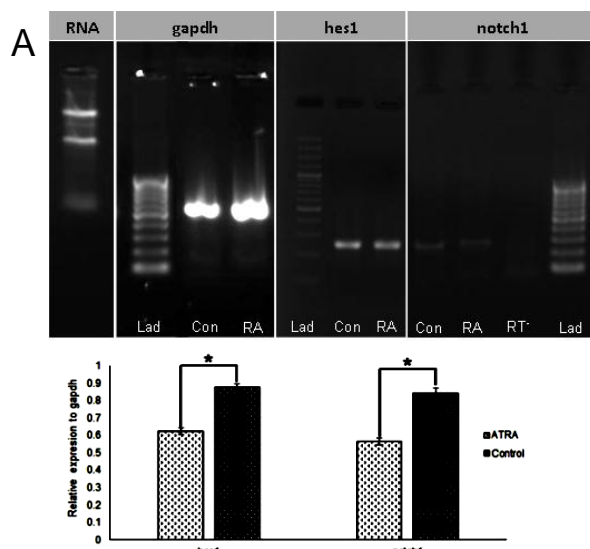
آگاروز در گروه ای کنترل (Con) و اسید رتینوئیک (RA) نشان داده شده است. قسمت B از تصویر ۴ بیان نیمه کمی ژن های *hes1* و *notch1* را نسبت به *gapdh* نشان می دهد. Lad نشانگر مولکولی (100 bp) شرکت Vivantis و RT- کنترل منفی فاقد آنزیم نسخه برداری معکوس. \* وجود تفاوت آماری معنادار ( $P < 0.05$ ) در مقایسه با گروه کنترل.

## بحث و نتیجه گیری

سرطان معده یکی از سرطان های شایع در جهان است. علی رغم توسعه راه کارهای درمانی جدید در جلوگیری از پیشرفت سرطان و کنترل آن، هم چنان میزان مرگ و میر بیماران مبتلا به سرطان معده بالا می باشد. مسیر پیام رسانی Notch در پیشرفت سرطان معده حائز اهمیت است؛ به طوری که بیان رسپتور Notch-1 در سلول های سرطانی معده نسبت به بافت نرمال بالاتر می باشد [۱۳]. هم چنین، تحقیقات بیش تری نشان داده اند که تغییرات ژنتیکی در مسیر پیام رسانی Notch باعث انتقال سرطان به مراحل پیشرفته تر می شود و جهش در انکوژن ها، ژن های سرکوبگر تومور و ژن های ترمیم سیکل سلولی را القا می کند [۱۰]. مسیر پیام رسانی Notch به داروهای مهارکننده های اختصاصی این مسیر پاسخ می دهد. ATRA از نظر بیولوژیکی یکی از متابولیت های فعال ویتامین A می باشد که در روند تکثیر و تمایز سلولی در سلول های بنیادی سرطان نقش دارد. اثرات ATRA در القاء تمایز سلول های سرطانی مختلف و به ویژه لوسمی پرومیلوتیک حاد (APL) مطالعه شده است. بر اساس شواهد به دست آمده، استفاده از ATRA باعث بهبود ۸۵٪ از بیماران APL می شود. این امر از طریق القاء تمایز و اثرات ضد تکثیر اسید رتینوئیک همراه با القاء آپوپتوز فراهم می شود [۲۱]. علاوه بر این، مطالعات حیوانی نیز نشان داده است که ATRA باعث مهار رشد تومور و گسترش سرطان پروستات شده و در نهایت باعث سرکوب تومور می شود [۲۲]. نقش مهارکنندگی ATRA در روند تکثیر سلولی در رده های مختلف سلول های سرطانی معده (MGC80-3, MKN-45, BGC823, SGC-7901)، به اثبات رسیده است. مطالعات Liu و همکارانش نشان داد که ATRA به وسیله تنظیم افزایشی سطح گیرنده  $RAR\alpha$  مانع از رشد



شکل ۳. Population histogram و فلوسایتومتری در سلول های سرطانی معده رده MKN-45. قسمت A و B به ترتیب روند تغییرات چرخه سلولی را در گروه های کنترل و تیمار با ATRA را نشان داده است. در هر هیستوگرام از چپ به راست به ترتیب پیک اول مربوط به مرحله G1، دوم S و پیک آخر مرحله G2/M چرخه سلولی را نشان می دهد. نتایج کمی هیستوگرام های پیشین به صورت نمودار ستونی در قسمت C نشان داده شده است. \* وجود تفاوت آماری معنادار ( $P < 0.05$ ) در مقایسه با گروه کنترل.



شکل ۴. نتایج RT-PCR: در قسمت A به ترتیب از سمت چپ به راست الکتروفورز RNA و بیان ژن های *gapdh*، *hes1* و *notch1* روی ژل

HEY انجام می‌شود. به این منظور میزان بیان ژن‌های notch1 و hes1 با استفاده از تکنیک RT-PCR در گروه تیمار با ATRA مورد بررسی قرار گرفت که مبین کاهش بیان ژن notch1 و hes1 نسبت به گروه کنترل در سلول‌های سرطانی معده نیز بود و بنابراین در امتداد یافته‌های Mying و همکارانشان است [۲۵]. Murata و همکارانش در بررسی اثر تمایزی ATRA بر سلول‌های F9 و EC به این نتیجه رسیدند که بیان hes1 در سلول‌های F9 پیرو مواجهه با رتینوئیک اسید به طور قابل توجهی کاهش یافته است [۲۶]. در مطالعه ما نیز بیان ژن‌های notch1 و hes1 پیرو تیمار با رتینوئیک کاهش معنی‌داری را نشان داد. از طرف دیگر، استفاده از مهارکننده‌های آنزیم گاما سکرناز مثل DAPT (N-[N-(3,5-Difluorophenacetyl)-L-alanyl]-S-phenylglycine t-butyl ester) سبب توقف چرخه‌ی سلول‌های سرطانی T-ALL در فاز G1 شده و بیان ژن‌های notch و hes را کاهش داد [۲۷]. از یافته‌های مطالعه حاضر و مقالات مشابه دیگر چنین استنباط می‌شود که احتمالاً ATRA علاوه بر مسیر متعارف پیام‌رسانی خود، از طریق ایجاد تغییراتی در مسیر پیام‌رسانی Notch نیز می‌تواند اثرات ضد تکثیری، آپوتوتیک و تمایزی خود را اعمال کند. البته تأیید این مهم، مستلزم انجام بررسی‌های دقیق‌تر در رده‌های مختلف سلول‌های سرطانی و دستکاری‌های ژنتیکی مسیرهای پیام‌رسان داخل سلولی است. در مطالعه حاضر مشخص گردید که ATRA اثر سمیت خود را از طریق کاهش میزان حیات سلولی و القای آپوتوز در رده MKN-45 اعمال می‌نماید. هم‌چنین با بررسی‌های تأییدی معلوم شد که این ماده اثرات آپوتوتیک خود را از طریق افزایش فعالیت کاسپاز ۳،۷ و کاهش بیان ژن notch1 و هم‌چنین تغییر درصد سلول‌ها در فازهای مختلف چرخه سلولی اعمال می‌نماید. این مطالعه درک جدیدی از اثرات سیتوتوکسیک این ماده بر روی سلول‌های سرطانی معده فراهم آورده است. در آخر خاطر نشان می‌شود که این یافته‌ها محدود به یک رده از سلول‌های سرطانی معده می‌باشد و نیاز به بررسی‌های بیش‌تر ضرورت دارد.

سلول‌های سرطانی معده می‌شود [۲۳]. نتایج حاصل از مطالعه حاضر با روش MTT نیز در امتداد یافته‌های مقالات پیشین است و مشاهده شد که کاهش بقاء سلول‌های سرطانی معده رده‌ی MKN-45، در غلظت  $10\ \mu\text{M}$  از بیش‌ترین مقدار برخوردار بود. مسیر پیام‌رسان اسید رتینوئیک و Notch در دوره جنینی با یکدیگر در ارتباط بوده و در تکثیر و تمایز سلولی نقش به‌سزایی دارند. به طوری‌که در بافت‌های نرمال Notch در طی مرحله جنینی تنظیم تمایز دودمان‌های سلولی و در سلول‌های بالغ تعدیل تمایز را بر عهده دارد [۲۴]. ATRA می‌تواند به عنوان یک مهارکننده‌ی چرخه‌ی سلولی عمل نماید، به طوری‌که بررسی‌های محققان نشان داده است که ATRA در سلول‌های میلوئید و سلول‌های کارسینومای تخمدان، سیکل سلولی را در فاز G0/G1 متوقف کرده است [۵]. در مطالعه دیگری نشان داده شده است که ATRA به صورت وابسته به دوز سلول‌های سرطانی معده رده‌ی BCG-823 را در فاز G0/G1 متوقف کرد [۵]. در تأیید این مطالعات، نتایج ما نیز نشان داد که ATRA توانسته در غلظت  $10\ \mu\text{M}$  باعث تجمع معنی‌دار سلول‌های سرطانی در مرحله G1 از چرخه سلولی شود. هم‌چنین در این مطالعه اثر غلظت  $10\ \mu\text{M}$  از ATRA در القاء آپوتوز در سلول‌های سرطانی معده رده‌ی MKN-45 با استفاده از کیت Caspase-Glo ۳/V مورد ارزیابی قرار گرفت. با استفاده از این کیت فعالیت آنزیم‌های کاسپاز ۳ و ۷ به عنوان دو کاسپاز کلیدی در روند آپوتوز در غلظت ذکر شده بررسی شد که میزان فعالیت کاسپاز در گروه تیمار تقریباً دو برابر گروه کنترل بود؛ که بیانگر اثر ATRA بر القاء آپوتوز و مهار تکثیر سلول‌های سرطانی معده است. محققان نشان دادند که بیان notch1 و hes1 در سلول‌های بنیادی سرطان بالاست و هدف قرار دادن notch1 می‌تواند تعداد CSCs را کاهش دهد [۷]. مطالعات Mying و همکارانش در مورد تاثیر اسید رتینوئیک در تنظیم سلول‌های بنیادی گلیوبلاستوم نشان داده است که مسیر پیام‌رسانی Notch برجسته‌ترین مسیر پاسخ‌دهنده به RA می‌باشد و تنظیم کاهشی مسیر Notch بر اساس تنظیم کاهشی اعضای خانواده HES و



[13] Sethi N, Dai X, Winter CG, Kang Y. Tumor-derived JAGGED1 promotes osteolytic bone metastasis of breast cancer by engaging notch signaling in bone cells. *Cancer Cell* 2011; 19: 192-205.

[14] Lee HW, Kim SJ, Choi IJ, Song J, Chun KH. Targeting Notch signaling by gamma-secretase inhibitor I enhances the cytotoxic effect of 5-FU in gastric cancer. *Clin Exp Metastasis* 2015; 32: 593-603.

[15] Grieselhuber NR, Klco JM, Verdoni AM, Lamprecht T, Sarkaria SM, Wartman LD, Ley TJ. Notch signaling in acute promyelocytic leukemia. *Leukemia* 2013; 27: 1548-1557.

[16] Niapour N, Mohammadi-Ghalehbin B, Golmohammadi MG, Gholami MR, Amani M, Niapour A. An efficient system for selection and culture of Schwann cells from adult rat peripheral nerves. *Cytotechnology* 2015.

[17] Niapour N, Niapour A, Milan HS, Amani M, Salehi H, Najafzadeh N, Gholami MR. All trans retinoic acid modulates peripheral nerve fibroblasts viability and apoptosis. *Tissue Cell* 2015; 47: 61-65.

[18] Schippers KJ, Martens DE, Pomponi SA, Wijffels RH. Cell cycle analysis of primary sponge cell cultures. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2011; 47: 302-311.

[19] Bohlooli S, Bohlooli S, Aslanian R, Nouri F, Teimourzadeh A. Aqueous extract of *Agrostemma githago* seed inhibits caspase-3 and induces cell-cycle arrest at G1 phase in AGS cell line. *J Ethnopharmacol* 2015; 175: 295-300.

[20] Niapour N, Taghipour Z, Salehi H, Bagheri A, Rouhani A, Talebi M, et al. Isolation and identification of mesenchymal and neural crest characteristics of dental pulp derived stem cells. *Koomesh* 2015; 16: 520-526.

[21] Zhu B, Smith J, Yarmush ML, Nahmias Y, Kirby BJ, Murthy SK. Microfluidic enrichment of mouse epidermal stem cells and validation of stem cell proliferation in vitro. *Tissue Eng Part C Methods* 2013; 19: 765-773.

[22] Lee JH, Yoon JH, Yu SJ, Chung GE, Jung EU, Kim HY, et al. Retinoic acid and its binding protein modulate apoptotic signals in hypoxic hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Lett* 2010; 295: 229-235.

[23] Liu S, Wu Q, Chen ZM, Su WJ. The effect pathway of retinoic acid through regulation of retinoic acid receptor alpha in gastric cancer cells. *World J Gastroenterol* 2001; 7: 662-666.

[24] Zhang J, Niu C, Ye L, Huang H, He X, Tong WG, et al. Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature* 2003; 425: 836-841.

[25] Ying M, Wang S, Sang Y, Sun P, Lal B, Goodwin CR, et al. Regulation of glioblastoma stem cells by retinoic acid: role for Notch pathway inhibition. *Oncogene* 2011; 30: 3454-3467.

[26] Murata K, Hattori M, Hirai N, Shinozuka Y, Hirata H, Kageyama R, et al. Hes1 directly controls cell proliferation through the transcriptional repression of p27Kip1. *Mol Cell Biol* 2005; 25: 4262-4271.

[27] Uyttendaele H, Marazzi G, Wu G, Yan Q, Sassoon D, Kitajewski J. Notch4/int-3, a mammary proto-oncogene, is an endothelial cell-specific mammalian Notch gene. *Development* 1996; 122: 2251-2259.

## تشکر و قدردانی

هزینه‌های مربوط به این مطالعه از محل اعتبار طرح

تحقیقاتی مصوب دانشگاه علوم پزشکی اردبیل به شماره

۹۲۲۳ و پایان‌نامه دانشجویی به شماره ۱/۹۲۲۷/د مصوب

دانشگاه علوم پزشکی اردبیل تامین گردیده است.

## منابع

[1] Jin J, Li X, Xing L, Chang Y, Wu L, Jin Z, et al. Addition of all-trans-retinoic acid to omeprazole and sucralfate therapy improves the prognosis of gastric dysplasia. *J Int Med Res* 2015; 43: 204-216.

[2] Cheng B, Martinez AA, Morado J, Scofield V, Roberts JL, Maffi SK. Retinoic acid protects against proteasome inhibition associated cell death in SH-SY5Y cells via the AKT pathway. *Neurochem Int* 2013; 62: 31-42.

[3] Soprano DR, Qin P, Soprano KJ. Retinoic acid receptors and cancers. *Annu Rev Nutr* 2004; 24: 201-221.

[4] Ju J, Wang N, Wang X, Chen F. A novel all-trans retinoic acid derivative inhibits proliferation and induces differentiation of human gastric carcinoma xenografts via up-regulating retinoic acid receptor beta. *Am J Translat Res* 2015; 7: 856-865.

[5] Zhang JP, Chen XY, Li JS. Effects of all-trans-retinoic on human gastric cancer cells BGC-823. *J Dig Dis* 2007; 8: 29-34.

[6] Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 2012; 62: 10-29.

[7] Yan B, Liu L, Zhao Y, Xiu LJ, Sun DZ, Liu X, et al. Xiaotan Sanjie decoction attenuates tumor angiogenesis by manipulating Notch-1-regulated proliferation of gastric cancer stem-like cells. *World J Gastroenterol* 2014; 20: 13105-13118.

[8] Brzozowa M, Mielanczyk L, Michalski M, Malinowski L, Kowalczyk-Ziomek G, Helewski K, et al. Role of Notch signaling pathway in gastric cancer pathogenesis. *Contemp Oncol* 2013; 17: 1-5.

[9] Du X, Cheng Z, Wang YH, Guo ZH, Zhang SQ, Hu JK, Zhou ZG. Role of Notch signaling pathway in gastric cancer: a meta-analysis of the literature. *World J Gastroenterol* 2014; 20: 9191-9199.

[10] Katoh M, Katoh M. Notch signaling in gastrointestinal tract (review). *Int J Oncol* 2007; 30: 247-251.

[11] Yuan R, Ke J, Sun L, He Z, Zou Y, He X, et al. HES1 promotes metastasis and predicts poor survival in patients with colorectal cancer. *Clin Exp Metastasis* 2015; 32: 169-179.

[12] Li LC, Peng Y, Liu YM, Wang LL, Wu XL. Gastric cancer cell growth and epithelial-mesenchymal transition are inhibited by gamma-secretase inhibitor DAPT. *Oncol Lett* 2014; 7: 2160-2164.

## Effects of all trans retinoic acid on apoptosis induction and notch1, hes1 genes expression in gastric cancer cell line MKN-45

Nazila Niapour (M.Sc)<sup>1</sup>, Samira Shokri (M.D)<sup>2</sup>, Mojtaba Amani (Ph.D)<sup>3</sup>, Marzieh Sharifi Pasandi (MSc)<sup>3</sup>, Hossein Salehi (Ph.D)<sup>4</sup>, Ali Niapour (Ph.D)<sup>\*1</sup>

1 – Research Laboratory for Embryology and Stem Cells, Department of Anatomical Sciences, School of Medicine, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran.

2 - Student Research Committee, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran

3 – Dept. of Biochemistry, School of Medicine, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran

4 – Dept. of Anatomical Sciences, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

(Received: 26 Sep 2015; Accepted: 22 Feb 2016)

**Introduction:** Gastric cancer is one of the most common and lethal malignancies in the world. All-trans retinoic acid (ATRA) has been widely used to treat cancers, most notably for the acute promyelocytic leukemia (APL) - as a differentiation inducer. Notch signaling plays important roles in cell proliferation and apoptosis. Aberrant activation of notch signaling pathway has been stated in different malignancies including gastric cancer. The aim of this study was to assess the possible effects of ATRA on cellular viability, cell cycle shift and apoptosis induction of gastric MKN-45 cell line. Moreover, alterations of notch1 and hes1 gene expression profiles after ATRA treatment have been considered.

**Materials and Methods:** Human gastric carcinoma cells (MKN-45) were treated with increasing concentrations of ATRA (2.5, 5, 10, 15, 20, 25  $\mu$ M). The viability of cells was determined with 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay. Caspase-Glo 3/7 assay kit was applied to measure the apoptosis. Flow-cytometry was employed to distinguish cells in different phases of cell cycle. Expression profiles for the notch1 and hes1 genes were evaluated by reverse transcriptase PCR (RT-PCR).

**Results:** MTT assay showed that ATRA could diminish MKN-45 cell line viability rate; the most effective dose was 10  $\mu$ M. Concentrations higher than 10  $\mu$ M of ATRA had no significant effect on reducing cancerous cell viability. Furthermore, ATRA treatment significantly amplified caspase3/7 activation. Flow-cytometry analyses showed significant accumulation of cells in G1 phase of cell cycle in ATRA treated group in compare to control. Following treatment with ATRA, showed a significant reduction in notch1 and hes1 genes profile expression.

**Conclusion:** According to our findings, ATRA could exert its cytotoxic effects on gastric cancer MKN-45 cell line through reducing cellular viability and inducing apoptosis. Remaining at G1 phase of cell cycle and reducing notch1 and hes1 gene expressions suggest the antiproliferative activity of ATRA.

**Keywords:** Stomach Neoplasm, ATRA, Apoptosis, Signal transduction, Receptors, Notch

\* Corresponding author. Tel: +98 45 33510052

a.niapour@arums.ac.ir