اثر لوتئولین در مهار رشد سلول‌های MKN45 تومور معده: نقش پروتئین‌های کافلین، اکتین و نوکلئوتید دیفسفات کیناز

زهرا طهماسبی [۱](M.Sc)، مازیار محمد اخوان [۲*](Ph.D)، سپیده ترابی [۱](Ph.D)، ناصر عباسی [۳](Ph.D)، الهام سرحدی [۴](Ph.D)، نسیم حاتم‌نژادیان [۵](M.Sc)

۱- *گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه علوم و تحقیقات، تهران، ایران*

۲- *مرکز تحقیقات اختلالات اپیدمیولوژی پایه و مولکولی دستگاه گوارش، پژوهشکده گوارش و بیماری‌های کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران*

۳- *ازمایشگاه فارماکولوژی، گروه فارماکولوژی، دانشکده علوم پزشکی ایلام، ایلام، ایران*

۴- *آزمایشگاه زیست جانوری، باغ ملی گیاه‌شناسی، موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع، تهران، ایران*

۵- *آزمایشگاه پروتئین و آنزیم، مرکز تحقیقات پوست، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران*

چکیده

هدف: لوتئولین یک مشتق گیاهی مهم می‌باشد، این ماده دارای اثرات ضد التهابی، مهار رشد سلولی و القا آپوپتوز و مهار متاستاز است. سرطان معده یکی از شایع‌ترین بیماری‌های موجود در جهان بوده و متاستاز در این بیماری شیوع بسیاری داشته است و تشخیص دیر هنگام این بیماری موجب مرگ بیمار می‌گردد. پروتئین‌های کافیلین، اکتین و دی نوکلئوتید فسفات کیناز از جمله پروتئین‌های موثر در ایجاد متاستاز و هم‌چنین مرگ سلولی می‌باشند.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه به بررسی اثر غلظت‌های بالای لوتئولین بر روی سلول‌های سرطانی معده پرداخته شد بدین منظور ابتدا سلول‌ها در محیط *In vitro* کشت شده و سپس به مدت ۴۸ ساعت تحت تاثیر دارو قرار گرفتند. سپس سلول‌ها جمع‌آوری شده و کل پروتئین آن‌ها استخراج گردید پروتئین‌های استخراج شده با استفاده از روش الکتروفورز دو بعدی از نظر جرم مولکولی و pI جداسازی شدند سپس تعیین توالی اسید آمینه با روش MALDI-TOF انجام گردید.

یافته‌ها: در این مطالعه مشخص شد که میزان رشد سلول‌های سرطانی با استفاده از لوتئولین کاهش می‌یابد، بدین معنی که مرگ سلولی افزایش می‌یابد. بر اساس نتایج به‌دست آمده از شناسایی نقاط پروتئینی ارسال شده برای انجام MOLDI-TOF mass spectrometry مشاهده گردید که بیان سه پروتئین کافلین، اکتین و نوکلئوتید دیفسفات کیناز پس از استفاده از لوتئولین کاهش یافته‌اند.

نتیجه‌گیری: در این مطالعه مشاهده گردید که هر سه پروتئین ذکر شده در بالا در مهار متاستاز و هم‌چنین در مرگ سلولی ناشی از لوتئولین نقش مهمی داشته‌اند.

واژه‌های کلیدی: سرطان معده، کافلین، اکتین، نوکلئوتید دیفسفات کیناز، الکتروفورز دو بعدی

مقدمه

فلاونوئیدها ازجمله مشتقات گیاهی می‌باشند که دارای

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۲۳۳۶۱۲۹۶

Email: m_akhavan@sbmu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۵/۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱/۱۹

خواص بیولوژیکی و دارویی بالایی بوده و به ویژه در حفظ سلول‌ها از خطرات ناشی از فعالیت‌های اکسید شدن موثر هستند. گزارش شده که فلاونوئیدها می‌توانند برای سلامتی انسان و حیوان مفید باشند و این ماده در غذاها، سبزیجات، میوه‌ها، و گیاهان دارویی وجود دارد از جمله خواص فلاونوئیدها اثرات ضد اکسیدشدگی، تنظیم‌کننده استروژنیک و اثر ضد میکروبی آن‌ها می‌باشند [۱]. هم‌چنین بیان شده که فلاونیدها می‌توانند به عنوان پیشگیری‌کننده از سرطان مطرح شوند [۲]. زمانی که این ماده در غلظت‌های بالا مورد استفاده قرار گیرد موجب ایجاد سمیت در سلول‌های نرمال و بدخیم انسانی می‌گردد [۴،۳]. لوتئولین فلاونوئیدی است که در بسیاری از گیاهان دارویی به فراوانی دیده می‌شود. این ماده گیاهی دارای اثرات ضد التهابی، مهار رشد سلولی، القاءکننده مرگ سلولی می‌باشد [۵].

سرطان معده یکی از رایج‌ترین سرطان‌ها در شرق آسیا به ویژه در کشورهای ژاپن کره جنوبی و چین می‌باشد که تقریباً ۴۷٪ سرطان‌ها را در این منطقه به خود اختصاص داده و در نهایت منجر به مرگ می‌شود. تکثیر سلول‌های سرطان معده به سایر اندام‌ها شایع بوده و از سوی دیگر چون این بیماری در بسیاری از بیماران، در مرحله پیشرفته تشخیص داده می‌شود میزان مرگ و میر ناشی از آن بالا است [۶].

مطالعه حاضر توانست سه پروتئین اکتین، کافلین و نوکلئوتید دی فسفات کیناز را به‌عنوان پروتئین‌هایی که بیانشان بر اثر لوتئولین در سلول‌های کشت شده سرطان معده کاهش می‌یابد مشخص کند. این احتمال وجود دارد که این سه پروتئین در نحوه عمل‌کرد اثر لوتئولین در مهار سرطان درگیر باشند چون از جمله پروتئین‌هایی هستند که در برخی از عمل‌کردهای مهم در سلول سرطانی مثل تکثیر، رشد و رگزایی سلول‌های سرطانی موثرند و بیان آن‌ها در نتیجه لوتئولین کاهش می‌یابد.

اکتین یکی از مهم‌ترین پروتئین‌های سلول‌های یوکاریوتی است که به میزان بالا در این سلول‌ها دیده می‌شود و حدود ۵٪ کل پروتئین‌های یک سلول را تشکیل می‌دهد. در یوکاریوت‌ها سه نوع اکتین آلفا و بتا و گاما وجود دارد [۱۲] که دارای چندین فعالیت می‌باشند از جمله شرکت در تحکیم اسکلت سلولی، حرکت سلولی، تقسیم سلولی، انتقال سیگنال و هم‌چنین فرایندهایی در هسته سلول [۷].

نوکلئوتید دی فسفات کیناز موجب تنظیم بخشی از فعالیت‌های سلولی یوکاریوتیک مثل تکثیر و تمایز سلول‌ها می‌گردد [۸]. به‌نظر می‌رسد که نوکلئوتید دی فسفات کیناز در تحریک رگزایی در سرطان تاثیر دارد [۹] در رابطه با اثر نوکلئوتید دی فسفات کیناز در تکثیر سلول‌ها هنوز اختلاف نظر وجود دارد برخی مقالات اثر افزاینده [۱۰] و بسیاری دیگر اثر مهاری [۱۱،۲] این پروتئین در تکثیر سلول‌های سرطانی را گزارش کرده‌اند. با این همه تمام مطالعات ذکر شده در بالا اهمیت این پروتئین در تومورها را بیان می‌کنند.

بسیاری از سلول‌های تکثیر یافته سطوح بالایی از کافیلین را در خود دارند. کافیلین ۱، یک تنظیم‌کننده کلیدی پلیمریزه شدن اکتین است که در مهاجرت سلولی نقش دارد. بیان بالای این پروتئین با کاهش پیش‌بینی و افزایش تکثیر سلولی در بیماران مبتلا به تومور ریه همراه بوده است [۱۳،۱۲]. به‌علاوه این پروتئین در تنظیم مرگ سلولی در سرطان معده هم نقش مهمی دارد [۱۴،۲] به دلایل گفته شده در بالا بررسی و مطالعه اثر لوتئولین در رشد سلول‌های سرطان معده اهمیت داشته و مطالعه حاضر به همین مسئله می‌پردازد. در جریان مطالعه حاضر با کمک کشت سلول‌های MKN-45 و اضافه کردن لوتئولین به محیط کشت با کمک الکتروفورز دو بعدی پروتئین‌های تغییر یافته در کل پروتئین‌های سلول مورد بررسی قرار گرفتند.

این مطالعه به منظور بررسی اثرات لوتئولین بر روی بیان و عدم بیان پروتئین‌های موثر بر رشد و گسترش و هم‌چنین مرگ تدریجی سلول‌های سرطانی انجام گردید.

با کمک نرم‌افزار ملانی نقاط پروتئینی مشابه در تمامی ژل‌ها شناسایی و شماره‌گزاری گردیدند. به کمک این نرم‌افزار می‌توان تغییرات در مقدار یک پروتئین به‌خصوص در مقایسه با نمونه‌های مختلف را به‌دست آورد که این کار با سایر

روش‌های آزمایشگاهی نظیر وسترن‌بلات در هر سری آزمایش فقط در رابطه با یک پروتئین قابل انجام است. به این ترتیب با کمک الکتروفورز ۲ بعدی امکان بررسی تفاوت‌های گروه بزرگی از پروتئین‌های سلول‌ها به صورت هم‌زمان فراهم می‌شود.

مواد و روش‌ها

کشت سلول: سلول‌های مورد نیاز رده سلولی MKN-45 (سلول‌های سرطان معده با منشا انسانی) بودند که از مرکز ذخایر ژنتیک ایران خریداری گردید. سپس این سلول‌ها در محیط کشت DMEM به همراه ۱۵٪ FBS قرار گرفته و تکثیر شدند هنگامی که سلول‌ها رشد کردند پاساژ داده شده و به ۶ فلاسک (۳ فلاسک جهت هر تیمار) تقسیم گردید. این مطالعه شامل ۲ تیمار (کنترل و دارو) با هر کدام ۳ تکرار می‌باشد. پس از کشت سلول‌ها در فلاسک‌های تعیین شده، هنگامی‌که این سلول‌ها به میزان کافی رشد کردند و تقریباً ۸۰٪ سطح فلاسک‌ها را پوشاندند سلول‌ها با استفاده از لام نئوبار شمارش گردیدند، سپس سلول‌ها در داخل محیط فاقد FBS به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفتند. در مرحله بعد لوتئولین که به صورت پودر می‌باشد در DMSO حل گردید و به محلول تبدیل شد و سپس با غلظت ۵۰ میکرومولار به سلول‌ها اضافه گردید (در این مرحله به دلیل خاصیت کشندگی که ماده DMSOدارد همان مقدار از DMSO به فلاسک‌های کنترل افزوده گردید) و سلول‌ها به مدت ۴۸ ساعت در این شرایط باقی ماندند پس از گذشت ۴۸ ساعت سلول‌ها مجدداً با استفاده از لام نئوبار شمارش گردیدند و پس از آن سلول‌ها جمع‌آوری شده و برای استخراج پروتئین به کار برده شدند.

برای استخراج پروتئین ابتدا سلول‌های جمع‌آوری شده از فلاسک‌های مورد مطالعه با استفاده از ازت مایع به سرعت منجمد گردیدند و پودر شدند سپس مقدار ۹۸۰ µl استون سرد شده و ۷۰۰ µl از محلول TCA که حاوی TCA, DTT, Acetone می‌باشد به آن اضافه گردید و سپس سلول‌ها در دمای ۲۰- درجه به مدت ۱ ساعت قرار گرفتند، سپس در دمای ۴ درجه به مدت ۲۵ دقیقه و تعداد دور ۲۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند پس از آن ml ۱ از محلول شستشو که شامل DTT, Acetone می‌باشد به هر نمونه اضافه گردید و مجدداً به مدت ۱ ساعت در دمای ۲۰- درجه قرار گرفتند، سپس در دمای ۴ درجه به مدت ۱۵دقیقه و تعداد دور ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند مرحله شستشو ۳ بار تکرار گردید و پس از آن نمونه‌ها به مدت ۱ ساعت در دستگاه خلاء خشک گردیدند. در مرحله بعدی مقدار۲۰۰ تا ۳۰۰ µl از محلول lysis Buffer که حاوی urea, chaps, DTT, ampholytes, Tris base, water به ۲۰ میلی‌گرم از نمونه به‌دست آمده اضافه شد و به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه قرار گرفت، سپس در دمای اتاق به مدت ۱۵ دقیقه با تعداد دور ۱۲۰۰۰ در دقیقه سانتریفیوژ شد ماده رویی جدا شده در این مرحله پروتئین کل با استفاده از روش Bradford تعیین غلظت گردید و نمونه‌ها تا زمان مصرف در دمای۸۰ – درجه نگهداری شدند.

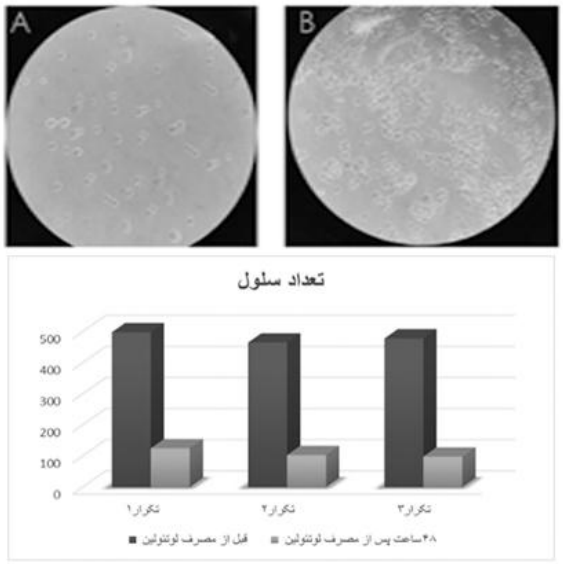
سپس پروتئین‌های استخراج شده برای آزمایش الکتروفورز ۲ بعدی مورد استفاده قرار گرفتند. در این مرحله از کار ابتدا بعد اول Iso Electric Focusing (IEF) انجام گرفت. ابتدا ماده Rehydration Buffer با استفاده از urea, chaps, Bromophenol blue, DTT, water آماده گردید و مقدار ۱۵۰ میکروگرم از پروتئین استخراج شده به۱۴۰ میکرولیتر از این ماده اضافه گردید، سپس نوارهای IPG (جهت جداسازی پروتئین‌ها بر اساس pI) در داخل این ماده قرار گرفته و روی آن با روغن معدنی پوشانده شد و به مدت ۸-۱۴ ساعت جهت جذب پروتئین‌ها بر روی این نوارها در دمای محیط قرار گرفت (به ازای هر تیمار و تکرار یک نوار IPG مورد نیاز می‌باشد، در این مطالعه ۶ نوار حاوی پروتئین مورد نیاز است). در مرحله بعد نوارهای IPG از Rehydration Buffer خارج شده و روغن‌زدایی گردیدند، این نوارها در این مرحله به رنگ آبی روشن قابل مشاهده می‌باشند. سپس این نوارها در داخل پلیت‌های مخصوص IEF قرار داده شده و مجدداً روی آن‌ها با روغن پوشانده شد و در

داخل دستگاه IEF قرار گرفت و پروتئین‌ها بر اساس pH ایزو الکتریکیشان از یک‌دیگر جدا گردیدند.

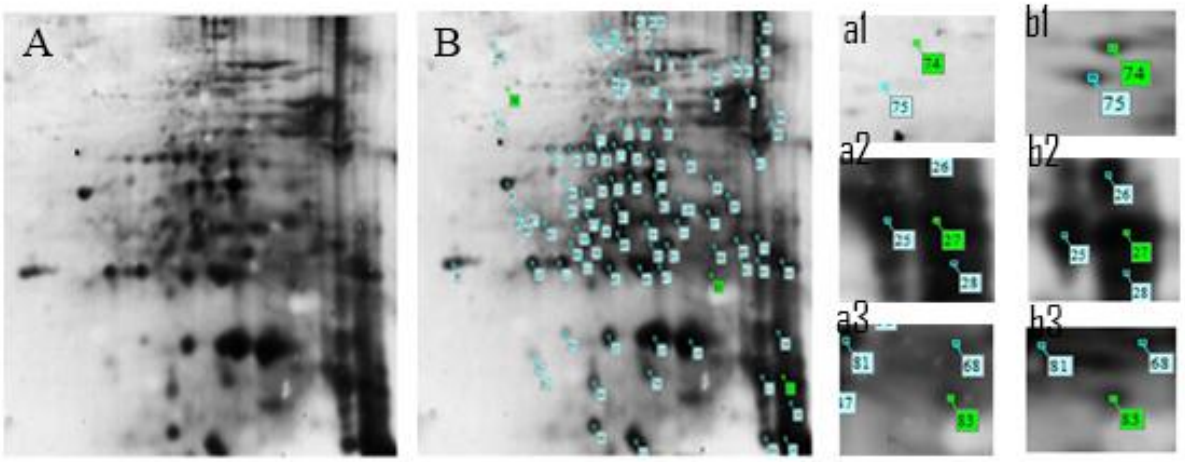
پس از آن‌که پروتئین‌ها بر اساس pI بر روی IPG تفکیک شدند، پروتئین‌های قرار گرفته بر روی IPG به ژل اکریل آمید جهت تفکیک از نظر جرم مولکولی منتقل شدند. ژل اکریل آمید حاوی Acrylamide/Bis (30%T, 2.6%C), Tris-Hcl 1.5 M PH 8.8, SDS10%, Ammonium persulfate 10% and TEMED می‌باشد. به این منظور ابتدا نوارهای IPG که از دستگاه IEF خارج شده‌اند در محلول Equlibration Buffer که حاوی Tris-Hcl, Urea, Glycerol, SDS, Bromophenol Blue, Double distilled water and DTT است به مدت ۳۰ دقیقه بر روی شیکر قرار گرفتند. پس از آن نوارهای IPG به بالای ژل اکریل آمید منتقل شده و به جهت اتصال بین IPG و ژل اکریل آمید، از ژل آگارز ۰/۸٪ استفاده شد. سپس ژل آماده شده در داخل تانک قرار گرفته و ابتدا ولتاژ ۲۰ ولت به آن وارد گردید هنگامی که رنگ آبی به طور کامل از IPG به ژل اکریل آمید منتقل گردید ولتاژ به ۷۰ ولت افزایش یافت تا هنگامی که پروتئین‌ها کاملاً بر اساس جرم مولکولیشان از یک‌دیگر جدا شدند. سپس ژل‌ها در محلول فیکساتور که حاوی methanol45%, acetic acid 1% and 50%water بوده به مدت ۸ ساعت قرار داده شد، سپس ژل‌ها با استفاده از محلول نیترات نقره رنگ‌آمیزی شدند. ژل‌های رنگ‌آمیزی شده با استفاده از اسکنر GS800 اسکن شدند و با فرمت TIFF ذخیره گردیدند، در آخر تصاویر اسکن شده به نرم‌افزار ملانی برای آنالیز نقطه‌ها منتقل شدند. و در پایان با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS داده‌ها بررسی گردیدند.

نتایج

در این بررسی با شمارش تعداد سلول‌ها قبل و پس از مصرف دارو، مشاهده شد که پس از استفاده از لوتئولین با غلظت بالا تعداد سلول‌های زنده مانده به طور معنی‌داری کاهش یافته است که این خود بیانگر اثر مهارکنندگی رشد و تقسیم سلولی لوتئولین می‌باشد (شکل ۱). پروتئین‌های استخراج شده که با استفاده از روش Bradford تعیین غلظت شدند در انجام الکتروفورز دو بعدی مورد استفاده قرار گرفتند. در این مرحله پروتئین‌ها بر اساس دو فاکتور pI و جرم مولکولی از یک‌دیگر جدا شده و از آن‌جایی که هیچ‌گاه دو پروتئین با جرم مولکولی و pI یکسان نداریم هر نقطه بر روی ژل نشان‌دهنده یک پروتئین می‌باشد که این نقاط پس از رنگ‌آمیزی ژل اکریل آمید با استفاده از نیترات نقره قابل مشاهده گردیدند. ژل‌های رنگ‌آمیزی شده اسکن شده و تصاویر آن‌ها با فرمت TIFF ذخیره گردیدند این تصاویر جهت آنالیز و شناسایی نقاط به نرم‌افزار ملانی منتقل گردیدند (شکل ۲).



شکل ۱. تغییرات تعداد سلولها در محیط این ویترو پس از مصرف لوتئولین. تصاویر بیانگر تغییرات ناشی از تعداد سلولها قبل و پس از مصرف لوتئولین در سلولهای سرطانی معده بوده است در این مطالعه ابتدا مقدار 1 ml از سلولها قبل از استفاده از لوتئولین با استفاده از لام نئوبار شمارش گردیده و در عدد ۱۰۴ ضرب گردیدند سپس سلولها به مدت۴۸ ساعت در معرض لوتئولین قرار گرفته و مجددا شمارش گردیدند و مشاهده گردید که تعداد سلولها به ۲۲ درصد کاهش داشته اند . همانگونه که در تصویر مشاهده میگردد تصویر سمت راست مربوط به تعداد سلولهای رشد یافته قبل از مصرف لوتئولین و تصویر سمت چپ تعداد همان سلولها پس از مصرف لوتئولین میباشد . نمودار نیز بیان کننده تغییرات تعداد سلولهای سرطان معده قبل و پس از مصرف لوتئولین میباشد. بر اساس این نمودار مشاهده میگردد که تعداد سلولها ۴۸ ساعت پس از مصرف لوتئولین به شکل معنی داری در هر سه تکرار کاهش یافته اند. براساس این تصویر میتوان بیان کرد که لوتئولین مجوب کاهش رشد سلولی میگردد.



شکل ۲. تغییرات نقاط پروتئینی در اثر مصرف لوتئولین. این تصویر بیان کننده تغییرات نقاط پروتئینی در اثر مصرف لوتئولین میباشد همانگونه که در تصویر مشاهده میشود تصویر سمت چپA ، مربوط به ژل بدست آمده پس از انجام الکتروفورز ۲ بعدی میباشد و تصویر سمت راستB ژل آنالیز شده با نرم افزار ملانی است در این تصویر مشاهده میگردد که هر نقطه پروتئینی یک شماره را به خود اختصاص داده است . تصاویر کوچک پایین صفحه که دو به دو در کنار هم قرار گرفته اند بیانگر تغییرات نقاط پروتئینی در پروتئین های کافیلین، اکتین و نوکئوتید دی فسفات کیناز میباشد تصاویر سمت چپی aجایگاه نقاط قبل از مصرف لوتئین و تصاویر سمت راستیb جایگاه همان پروتئین ها پس از مصرف لوتئولین میباشند . نقطه ۷۴ (a,b1)مربوط به پروتئین اکتین ، نقطه ۲۷(a,b2) پروتئین دی نوکلئوتید دی فسفات کیناز و نقطه ۸۳ (a,b3)پروتئین کافیلین و میباشد.

با کمک نرم‌افزار ملانی ۱۰۰ نقطه پروتئینی شناسایی و نشان‌گزاری شدند لازم به ذکر است که این نوع شناسایی به صورت مقایسه‌ای در تمامی ژل‌های تیمارها انجام گرفت. سپس مقدار این نقاط در هر ژل به‌دست آمده و از نظر آماری مورد بررسی و تجزیه و تحلیل قرار گرفت سپس آزمون T-Test در دو سطح ۱ و ۵٪ برای تمام نقاط انجام گرفت. مشاهده گردید که به طور کلی تعداد ۱۰ نقطه پروتئینی در میان نقاط شناسایی شد که دارای تغییر معنی‌داری بوده‌اند. سپس تمام ۱۰۰ نقطه از نظر درصد تغییر هر پروتئین در نمونه تست به کنترل بررسی گردیدند و تعداد نقاط با نسبت تغییر تست به کنترل کم‌تر از ۰,۳ و بیش‌تر از ۳ جداسازی شدند. این کار به این منظور انجام شد تا پروتئین‌هایی که بیش‌ترین میزان تغییر بیان شدن نسبت به کنترل را داشته‌اند انتخاب کردند که در این مرحله تعداد ۵ نقطه در این دو رنج بیان شده مشاهده گردیدند (جدول۱). سپس نقاطی در هر دو تست تفاوت معنی‌دار داشتند شناسایی گردیدند و مجدداً نام‌گزاری شدند در این مرحله تعداد ۴ نقطه شناسایی گردیدند و سپس این نقاط جدا شده و به دانشگاه یورک در انگلستان به منظور انجام روش MOLDITOFF Mass Spectrometry فرستاده گردید. نتایج بیان داشت که پروتئین‌های اکتین، کافیلین و نوکلئوتید دیفسفات کیناز از مهم‌ترین پروتئین‌هایی بودند که در اثر لوتئولین از خود تغییرات نشان داده و هم‌چنین از جمله پروتئین‌های مرتبط با متاستاز می‌باشند، یکی از پروتئین‌های ارسال شده توسط روش MOLDITOFF شناسایی نگردید. (جدول ۲).

جدول ۱. نقاط پروتئنی که از نظر آماری معنی دار گشته اند

spot	Contol Avrage	L50 - Avrage	TTEST L-50/C	IFL50/C
8	0.44	0.23	0.04	0.53
21	0.22	0.11	0.01	0.51
26	1.39	0.37	0.04	0.27
27	1.68	0.38	0.01	0.23
43	0.22	0.12	0.02	0.54
53	0.34	0.13	0.05	0.39
59	0.35	0.08	0.03	0.23
61	0.57	0.14	0.18	0.24
67	0.29	0.09	0.04	0.32
75	0.23	0.06	0.05	0.29
99	0.51	0.17	0.00	0.35

براساس جدول بالا ابتدا میانگین نقاط پروتئنی در دو تیمار کنترل و دارو محاسبه گردید سپس آزمون آماری T Test Student و همچنین آزمون IF برای تمامی نقاط انجام گرفت . نقاطی که در این دو تست معنی دار گشته اند در جدول با لا آورده شده و مطابق این جدول

مشاهده شد کخ ۱۰ نقطه بر اساس آزمون T Test Student و ۵ نقطه هم بر اساس آزمون IF معنی دار گشته اند که ۴ نقطه از نظر هر دو آزمون معنی دار بوده که این نقاط جداسازی گشته و برای شناسایی و تعیین توالی به داشگاه یورک انگلیس ارسال گردیدند که سه نقطه ۲۶و۲۷و ۷۵ شامل پروتئین های موثر در این بررسی بوده اند.

جدول ۲- نوع پروتئین و تغیرات ایجاد شده در درصد حجم آن قبل و پس از مصرف لوتئولین و نقش آن در سلول

ردیف	نام پروتئین	درصد حجمی پروتنین قبل از لوتئولین	درصد حجمی پروتئین بعد از لوتئولین	نقش پروتئین
۱	نوکلئوتید دی فسفات کیناز	۱/۶۹	۰/۳۹	مهار متاستاز و رشد سلولی
۲	اکتین	۰/۱۳	۰/۰۶۹	مهار متاستاز و رشد سلولی
۳	کافیلین	۰/۷۳	۰/۴۴	مهار متاستاز و رشد سلولی

این جدول بیانگر نوع پروتئین تغییر یافته در اثر مصرف لوتئولین و همچنین میزان تغییرات ناشی از آن میباشد . همانگونه که در جدول مشاهده میگردد سه پروتئین نوکلوتید دی فسفات کیناز ، اکتین و کافیلین توسط تکنیک 2DE شناسایی گردیدند و همانگونه که مشاهده میگردد درصد حجم این سه پروتئین پس از مصرف لوتئولین به میزان چشمگیری کاهش داشته است. از آنجاییکه این پروتئین ها در مرگ سلولی و همچنین مهار متاستاز سلولی نقش دارند میتوان بیاند کرد که کاهش این پروتئین ها موجب مرگ سلولهای سرطانی معده و همچنین ممانعت از ایجاد متاستاز سلولی در نوع پیشرفته آن می‌شود.

بحث و نتیجه‌گیری

مطالعات متعددی بر روی خواص ضد سرطانی لوتئولین انجام گرفته است و این مطالعات بیان داشته‌اند که این ماده در غلظت‌های بالا و پایین اثرات متفاوتی از جمله مرگ سلولی یا زنده مانی سلول را در سلول‌های انسانی از خود نشان داده است [۱۵،۱۴]. به‌نظر می‌رسد که لوتئولین در غلظت‌های بالا ۲۵ میکرومولار اثر سایتوتوکسیک بر سلول‌های کشت شده در محیط in vitro داشته است [۱۵] که این نتیجه منطبق بر نتایج به‌دست آمده در مطالعه حاضر است. علاوه بر این در یک مطالعه دیگر نشان داده شد که لوتئولین موجب مهار متاستاز سلول‌های مهاجم A431 می‌گردد [۲۰]. بررسی مکانیسم عمل‌کرد مواد مختلف که برای بررسی‌های بیش‌تر کاندید می‌شوند بسیار مهم است چرا که یک بخش مهم از اطلاعات مورد نیاز ما درباره چنین ترکیباتی به مکانیسم عمل آن‌ها بر می‌گردد. در مورد ترکیب مورد بررسی در این مطالعه و بررسی مکانیسم کشنده سلول آن، روش الکتروفورز دو بعدی انتخاب گردید؛ چرا که اطلاعات کافی در رابطه با مکانیسم عمل‌کرد آن وجود نداشت و با کمک الکتروفورز دو بعدی این امکان در اختیار ما قرار گرفت تا درصد قابل توجهی از پروتیین‌های درون یک سلول هدف مورد بررسی از نظر تغییر بیان شدن قرار گیرند. در مطالعه حاضر مشاهده گردید که بیان۳ پروتئین نوکلوئوتید دیفسفات کیناز، اکتین سیتوپلاسمیک ۱و کافلین ۱ در سلول‌های MKN-45 انسانی در غلظت‌های بالای لوتئولین تغییر یافته‌اند که هر سه این پروتئین‌ها از جمله پروتئین‌های موثر در مرگ سلولی هستند که منجر به کاهش متاستاز می‌شوند.

نوکلئوتید دی فسفات کیناز در انسان شامل یک خانواده ده عضوی از پروتئین‌هایی است که یکی از عمل‌کردهای اصلی آن‌ها انتقال یک فسفات از ATP برای تولید نوکلیوزید تری فسفات‌ها است [۱۱]. بعلاوه در ترمیم DNA، رشد سلولی، مهاجرت و آپوپتوزیس هم درگیر هستند [۱۱]. نتیجه برخی مطالعات نشانگر این نکته است که نوکلئوتید دی فسفات کیناز در برخی از تومورها مثل تومور پستان راحت‌تر به رگ‌های خونی وارد شده و یا از آن‌ها خارج می‌شوند [۱۰] ولی مطالعات دیگری هم نقش مهاری را برای این پروتیین‌ها در رشد و متاستاز سلول‌های سرطانی نشان داده‌اند [۱۱]. به‌طور کلی نقش این پروتیین در اتصال سلول‌ها از طریق اینتگرین‌ها و سایر اتصالات سلولی می‌تواند موجب کم و زیاد شدن چسبندگی سلول‌ها به هم شده و در میزان متاستاز موثر باشد. ولی چگونگی و شرایط مثبت یا منفی بودن نقش این پروتیین

در رشد و مهاجرت سلول‌های توموری هنوز محل بحث و تردید است. در هر صورت نوکلئوتید دی فسفات کیناز توسط انواع تومورهای جامد و هم‌چنین تومورهای خونی ترشح می‌گردد. بعلاوه پیشنهاد شده که این ترکیب در حفظ انقباض عروقی و میزان جریان خون عروق و میزان رگزایی تومورها اثراتی دارد [۱۰]. نتیجه مطالعه حاضر با نتیجه مطالعه دیگری که با الکتروفورز دو بعدی اثر لوتئولین را بر سلول‌های PC12 بررسی نموده بود متناسب است [۲۱]. در این مطالعه ذکر شده هم معلوم شده بود که لوتئولین با غلظت معادل غلظتی که در مطالعه حاضر استفاده شد موجب کاهش میزان بیان NDPK در سلول‌های کشت شده می‌گردد.

بر طبق نتایج به‌دست آمده در این مطالعه به‌نظر می‌رسد که بیان نوکلئوتید دی فسفات کیناز در سلول‌های سرطانی معده در اثر لوتئولین کاهش داشته است. اگر چه این نکته که نوکلئوتید دی فسفات کیناز در اثر لوتئولین کاهش یافته است به خودی خود نمایشگر بخشی از مکانیسم اثر لوتئولین در روی سلول‌های سرطانی است ولی بررسی‌های دقیق‌تری برای روشن شدن چگونگی و شرایط اثر لوتئولین در این سلول‌ها لازم است. اما نوکلئوتید دی فسفات کیناز در ارتباط با پروتیین دیگری هم عمل می‌کند که بیان خود آن بر اثر لوتئولین تغییر می‌نماید. رشته‌های اکتین مهم‌ترین اجزا اسکلت سلولی هستند که در حرکات سلولی جهت‌دار درگیر هستند [۱۱]. نشان داده شده که دست کم بخشی از اثرات NDPK بر متاستاز سلول‌های سرطانی مربوط به تداخل این پروتیین با فاکتورهای مربوط به اکتین می‌باشد [۱۱].

نتایج مطالعه حاضر بیانگر این است که لوتئولین در غلظت‌های به‌کار رفته می‌تواند موجب کاهش بیان اکتین گردد. اکتین به عنوان یک پروتئین با کاربردهای متفاوت در سلول‌های یوکاریوتی می‌باشد که شامل نقش در استحکام سلولی رشد و حرکت سلولی تقسیم درون یاخته (Cytokinesis) و انتقال سیگنال‌ها و هم‌چنین در فعالیت‌های هسته‌ای می‌باشد [۷]. پیشنهاد شده است که اکتین دارای یک مکانیسم انتقالی بین هسته و سیتوپلاسم می‌باشد [۷]. هم‌چنین به نظر می‌رسد که وجود یک نوع تعامل بین تنظیم ژن‌های اکتین پلیمریک و مونومریک ضروری می‌باشد [۷]. به عنوان مثال در گزارشات آمده که اکتین برای شروع رونویسی ژن و هم‌چنین طول ژن ضروری می‌باشد [۱۶]. نتایج مطالعه حاضر متناسب با نتایج مطالعه دیگری است که با استفاده از الکتروفورز دو بعدی مشخص نمود که لوتئولین (با همان غلظت مورد استفاده در مطالعه حاضر) می‌تواند موجب کاهش بیان پروتئین F-Actin در سلول‌های سرطانی CH27 گردد [۲۲]. اما عمل‌کرد پروتیین اکتین برای رونویسی از DNA هم در ارتباط با پروتیین کافلین است که بیان خود کافلین هم بر اثر لوتئولین کاهش می‌یابد.

عامل دپلیمریزه کردن اکتین/ کافیلین می‌تواند در بروز بیماری سرطان موثر باشد [۱۷]. به‌نظر می‌رسد که در سلول‌های سرطانی فعالیت این عامل افزایش می‌یابد و سلول‌ها به گونه‌ای رشد می‌کنند که چسبندگی کم‌تری برای سلول‌های مجاور داشته باشند. علاوه بر این فعالیت‌های کافلین در غشا سلول برای حرکت سلولی به وسیله افزایش سطح سلولی و هم‌چنین برای متاستاز سلول‌های سرطانی ضروری است [۱۷]. اگرچه نتایج گاه متناقضی درباره چگونگی نقش این عامل در رشد سلول‌های سرطانی دیده می‌شود ولی در چندین مطالعه گزارش شده است که افزایش تهاجم تومورها با بیان بالای کافلین رابطه مستقیم دارد [۱۹،۱۸]. بر طبق نتایج ما لوتئولین موجب کاهش میزان بیان کافلین در سلول‌های MKN45 سرطان معده گردیده است.

در مجموع نتایج این مطالعه بخشی از مکانیسم اثر لوتئولین در مرگ سلول‌های سرطانی کشت شده MKN45 را نشان می‌دهد. این مکانیسم شامل دخالت سه پروتیین است که هر سه تا حدودی و در برخی از عمل‌کردهایشان با هم در ارتباط هستند. اگرچه در برخی موارد حتی عمل‌کرد دقیق این سه عامل درگیر به‌خوبی معلوم نیست و گاهی جزییات و جهت‌گیری عمل‌کرد آن‌ها در تقویت یا مهار رشد تومور سرطانی نیاز به بررسی‌های بیش‌تری دارد. درک این نکته که لوتئولین در ارتباط با این عوامل بخشی از اثرات خود را در

سلول اعمال می‌کند نقطه شروع مناسبی به‌نظر می‌رسد که ما را در هدف‌گذاری برای مطالعات بعدی کمک می‌کند. با این همه بررسی تغییرات ناشی از لوتئولین در سلول‌های دیگر تومورال و هم‌چنین در صورت امکان در بافت‌های جانوری پس از مصرف لوتئولین توسط حیوان آزمایشگاهی مهم بوده ولی از دسترس ما خارج بود. بعلاوه تایید نتایج مطالعه حاضر با کمک روش‌های دیگر مثل وسترن بلات به افزایش درک ما از این مسیر عمل‌کرد لوتئولین کمک فراوانی می‌نماید.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از همکاری پرسنل آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشگاه علوم و تحقیقات تهران کمال تشکر و قدر دانی را دارند.

منابع

[1] Birt DF, Hendrich S, Wang W. Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids. Pharmacol Ther 2001; 90: 157-177.

[2] Neuhouser ML. Dietary flavonoids and cancer risk: evidence from human population studies. Nutr Cancer 2004; 50: 1-7.

[3] Liesveld JL, Abboud CN, Lu C, McNair C, Menon A, Smith A, et al. Flavonoid effects on normal and leukemic cells. Leuk Res 2003; 27: 517-527.

[4] Matsuo M, Sasaki N, Saga K, Kaneko T. Cytotoxicity of flavonoids toward cultured normal cells. Biol Pharm Bull 2005; 28: 253-259.

[5] Lin Y, Shi R, Wang X, Shen HM. Luteolin, a flavonoid with potential for cancer prevention and therapy. Current Cancer Drug Targets 2008; 8: 634-646.

[6] Shen L, Shan YS, Hu HM, Price TJ, Sirohi B, Yeh KH, et al. Management of gastric cancer in Asia: resource-stratified guidelines. Lancet Oncol 2013; 14: e535-547.

[7] Millard TH, Behrendt B, Launay S, Fütterer K, Machesky LM. Identification and characterisation of multiple forms of actin. Cell 1976; 9: 793-805.

[8] Yokdang N, Nordmeier S1, Speirs K1, Burkin HR1, Buxton IL. Blockade of extracellular NM23 or its endothelial target slows breast cancer growth and metastasis. Integr Cancer Sci Ther 2015; 2: 192-200.

[9] Almgren MA, Henriksson KC, Fujimoto J, Chang CL. Nucleoside diphosphate kinase A/nm23-H1 promotes metastasis of NB69-derived human neuroblastoma. Mol Cancer Res 2004; 2: 387-394.

[10] Yokdang N, Tellez JD, Tian H, Norvell J, Barsky SH, Valencik M, Buxton IL. A role for nucleotides in support of breast cancer angiogenesis: heterologous receptor signalling. Br J Cancer 2011; 104: 1628-1640.

[11] Snider NT, Altshuler PJ, Omary MB.. Modulation of cytoskeletal dynamics by mammalian nucleoside diphosphate kinase (NDPK) proteins. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 2015; 388: 189-197.

[12] Castro MA, Dal-Pizzol F, Zdanov S, Soares M, Müller CB, Lopes FM, et al. CFL1 expression levels as a prognostic and drug resistance marker in no small cell lung cancer. Cancer 2010; 116: 3645-3655.

[13] Müller CB, de Barros RL, Castro MA, Lopes FM, Meurer RT, Roehe A, et al. Validation of cofilin-1 as a biomarker in non-small cell lung cancer: application of quantitative method in a retrospective cohort. J Cancer Res Clin Oncol 2011; 137: 1309-1316.

[14] Wang W, Goswami S, Lapidus K, Wells AL, Wyckoff JB, Sahai E, et al. Identification and testing of a gene expression signature of invasive carcinoma cells within primary mammary tumors. Cancer Res 2004; 64: 8585-8594.

[15] Abbasi N, Akhavan MM, Rahbar-Roshandel N, Shafiei M. The effects of low and high concentrations of luteolin on cultured human endothelial cells under normal and glucotoxic conditions: involvement of integrin-linked kinase and cyclooxygenase-2. Phytother Res 2014; 28: 1301-1307.

[16] Obrdlik A, Percipalle P. The F-actin severing protein cofilin-1 is required for RNA polymerase II transcription elongation. Nucleus 2011; 2: 72-79.

[17] Bamburg JR, Wiggan OP. ADF/cofilin and actin dynamics in disease. Trends Cell Biol 2002; 12: 598-605.

[18] Li R, Wang X, Zhang XH, Chen HH, Liu YD. Ursolic acid promotes apoptosis of SGC-7901 gastric cancer cells through ROCK/PTEN mediated mitochondrial translocation of cofilin-1. Asian Pac J Cancer Prev 2014; 15: 9593-9597.

[19] Sidani M, Wessels D, Mouneimne G, Ghosh M, Goswami S, Sarmiento C, et al. Cofilin determines the migration behavior and turning frequency of metastatic cancer cells. J Cell Biol 2007; 179: 777-791.

[20] Lin YC, Tsai PH, Lin CY, Cheng CH, Lin TH, Lee KP, et al. Impact of Flavonoids on Matrix Metalloproteinase Secretion and Invadopodia Formation in Highly Invasive A431-III Cancer Cells. PLoS One 2013; 8: e71903.

[21] E L Omri A, Han J, Ben Abdrabbah M, Isoda H. Down regulation effect of Rosmarinus officinalis polyphenols on cellular stress proteins in rat pheochromocytoma PC12 cells. Cytotechnology 2012; 64: 231-240.

[22] Lee HZ, Yang WH, Bao BY, Lo PL. Proteomic analysis reveals ATP-dependent steps and chaperones involvement in luteolin-induced lung cancer CH27 cell apoptosis. Eur J Pharmacol 2010; 642: 19-27.

Inhibitory effect of luteolin on MKN-45 tumorg gastric cells: The role of nucleoside-diphosphate kinases, cofilin and actin proteins

Zahra Tahmasebi (M.Sc)[1] , Maziar Mohammad Akhavan (Ph.D)[*2] , Sepideh Torabi (Ph.D)[1], Naser Abbasi (Ph.D)[3], Elham Sarhadi (Ph.D)[4], NAsim Hatam nejadian (M.Sc)[5]

1 - Biotechnology Department, Agricultural University, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran, Iran

2 - Basic and Molecular Epidemiology of Gastrointestinal Disorders Research Center, Reaserch Institute for Gastroenterology and Liver Diseases, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

3 - Pharmacological Lab., Department of Pharmacology, Ilam University of Medical Sciences, , Ilam, Iran

4 - Animal Biology Lab., National Botany Garden, Research Institute of Forests and Rangelands, Tehran, Iran

5- Protein and Enzyme lab, Skin Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

(Received: 26 Jul 2016; Accepted: 8 Apr 2017)

Introduction*:* Luteolin is an important plant extract. This shows anti-inflammatory, inhibition of cell growth, induction of apoptosis and inhibition of metastasis. Gastric cancer is one of the most common cancers in the world. Also metastasis is widespread in this kind of cancer and late diagnosis is a cause of patient's death. Cofilin, actin and nucleoside-diphosphate kinases (NDPK) are important in cell death and metastasis. In this study the effect of luteolin on MKN-45 gastric carcinoma cells was evaluated.

Materials and Methods*:* At first the cells were cultured and then for 48 hours were cultured with the drug concentration. Then the cells where collected and their protein were extracted and analyzed using 2D electrophoresis and separated on the basis of their molecular mass and PI. After that these samples were used for determine the amino acid sequence by MOLDI-TOF.

Results*:* The growth rate of MKN-45 inhibited under influence of luteolin, this means increasing Apoptosis. Based on the results presented here by identification of protein spots by MOLDI-TOF mass spectrometry the expression of three protein cofilin, actin and NDPK has been decreased by luteolin.

Conclusion*:* It seems that the anti- tumoral effect of luteolin is expressed through three proteins cofilin, actin and NDPK in gastric cancer cells.

Keywords*:* Luteolin, Stomach Neoplasms, Cofilin, Actins, Nucleoside-Diphosphate Kinase, Electrophoresis

* Corresponding author. Tel: +98 9123361296

m_akhavan@sbmu.ac.ir