اثر عصاره استونی دانه انار بر بیان پروتئینهای β-catenin و E-cadherin در سلولهای سرطانی PC-3

مجید تفریحی[۱*] و روح الله نخعی سیستانی[۲]

[۱] بابلسر، دانشگاه مازندران، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی

[۲] کاشان، دانشگاه کاشان، دانشکده شیمی، گروه بیوتکنولوژی

تاریخ دریافت: ۹۳/۱۱/۲۰ تاریخ پذیرش: ۹۴/۲/۲۹

چکیده

پروتئین E-cadherin یکی از اعضاء فوق خانواده پروتئینهای E-cadherin است که به طور عمده در سطح سلولهای بافتهای اپیتلیال بیان می‌شود. کاهش بیان این پروتئین علاوه بر تضعیف اتصالات بین سلولی، موجب بروز پدیده Epithelial-mesenchymal transition (EMT) و مهاجرت و متاستاز سلولهای سرطانی بافتهای اپیتلیال می‌شود. در طب سنتی، از انار (*Punica granatum*) برای درمان بسیاری از بیماریها استفاده می‌شود. هدف این تحقیق بررسی اثر عصاره استونی ۷۰ درصد (در آب) دانه های انار بر میزان بیان پروتئینهای β-catenin و E-cadherin در رده سلولی PC-3 است. برای این منظور پس از بررسی اثر سمیت غلظتهای مختلف عصاره، استخراج RNA و پروتئین کل از سلولهای تیمار شده صورت گرفت. نتایج آزمایشات MTT نشان داد که عصاره استونی دانه انار قادر است حیات سلولهای PC-3 را به خصوص در غلظتهای بالاتر از ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر مهار کند. همچنین IC_{50} عصاره استونی دانه انار در حدود ۸۶ میکروگرم در میلی لیتر تخمین زده شد. نتایج آزمایشات وسترن بلاتینگ نیز نشان داد که تیمار سلولهای PC-3 با غلظتهای ۲۰ و ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر عصاره دانه انار موجب افزایش مقدار پروتئین β-catenin و E-cadherin به میزان تقریبی ۱/۵ و ۲/۲ برابر می‌شود. نتایج این پژوهش پیشنهاد می‌کند احتمالاً دانه انار پتانسیل بالایی در مهار متاستاز سلولهای سرطانی با افزایش بیان پروتئینهای دخیل در اتصالات سلولی از جمله β-catenin و E-cadherin دارد.

واژه های کلیدی: انار، سلولهای PC-3، پروتئین β-catenin ، پروتئین E-cadherin

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۱۱۳۵۳۰۲۴۵۰، پست الکترونیکی: M.tafrihi@umz.ac.ir

مقدمه

اتصالات سلولی adherens Junction مشخصه بارز بافتهای اپیتلیال و اندوتلیال می‌باشد. مهمترین نقش این اتصالات، برقرای ارتباط فیزیکی بین سلولها، تعیین شکل سلولی و حفظ یکپارچگی بافتی است (۱۰). از جمله پروتئینهای شرکت کننده در این اتصالات، پروتئینهای فوق خانواده Cadherin هستند. از آنجایی‌که این گلیکوپروتئینها با اکتین اسکلت سلولی برهمکنش دارند، بنابراین در انتقال پیام از سطح سلول و تغییر مورفولوژی و سایر فرآیندهای سلولی نقش دارند (۲۱). پروتئین E-cadherin، عضوی از این فوق خانواده بوده که به طور عمده در بافتهای اپیتلیال بیان می شود و از اینرو یکی از مارکرهای سطحی سلولهای اپیتلیال محسوب می‌شود. این پروتئین توسط ژن *CDH1* ساخته می‌شود که بر روی بازوی بلند کروموزوم شماره ۱۶ قرار گرفته (16q22.1) و از ۱۶ اگزون تشکیل شده است (۴). این پروتئین از سه دامین (Domain) خارج سلولی (Extracellular)، عرض غشایی (Transmembrane) و

سیتوپلاسمی تشکیل شده است. دو سلول مقابل که بین آنها، این نوع اتصالات برقرار شده است، از طریق دامین خارج سلولی پروتئینهای E-cadherin خود با یکدیگر ارتباط برقرار می‌کنند. از طرفی پروتئین E-cadherin از طریق بخش سیتوپلاسمی خود با پروتئینهای خانواده Catenin به خصوص پروتئینهای γ-catenin و β-catenin برهمکنش داده و از این طریق با اسکلت سلولی در ارتباط می‌باشد (۲۶). پروتئین β-catenin علاوه بر شرکت در اتصالات سلولی Adherens Junction یکی از اجزاء مسیر انتقال پیام Wnt signaling است. این مسیر انتقال پیام، با اتصال لیگاندهای Wnt به گیرنده‌های Frizzled در سطح غشای سلول آغاز می‌شود. در حالت طبیعی میزان پروتئین β-catenin در سلول در حد بسیار پایینی است و مقدار آن توسط کمپلکس پروتئینی متشکل از APC (Adenomatous polyposis coli)، Axin، GSK-3β و CKIα کنترل می‌شود. با فعال شدن مسیر انتقال پیام Wnt، کمپلکس تخریب پروتئین β-catenin غیر فعال شده و مقدار پروتئین β-catenin سلولی افزایش می‌یابد (۳). با تخریب اتصالات سلولی، پروتئین β-catenin از E-cadherin جدا شده و همراه فاکتورهای رونویسی TCF/LEF1 وارد هسته سلول می‌شود و رونویسی از ژنهای هدف این مسیر را به راه می اندازد (۹).

در بسیاری از سرطانهای بافتهای اپیتلیال، بیان ژن *CDH1* کاهش یافته و یا متوقف می‌شود (۹). بنابراین اتصالات بین سلولها ضعیف شده و پدیده مهاجرت و متاستاز سلولهای سرطانی آغاز می‌شود. کاهش و یا عدم بیان پروتئین E-cadherin در سلولهای سرطانی، همچنین موجب بروز پدیده EMT (Epithelial-mesenchymal transition) می شود (۳۰). در این پدیده، سلولهای اپیتلیال مورفولوژی قطبی و ورقه‌ای خود را از دست داده و مورفولوژی سلولهای مزانشیمی با قابلیت مهاجرت را به خود می‌گیرند. بنابراین یکی از راههای مهار متاستاز سلولهای سرطانهای اپیتلیال، القای بیان ژن سازنده پروتئین E-cadherin و تقویت اتصالات سلولی Adherens junction است (۳۱).

تاکنون مطالعات زیادی جهت مهار متاستاز سلولهای سرطانهای اپیتلیال صورت گرفته است ولی دارویی که قابلیت مهار متاستاز را داشته باشد تاکنون شناسایی و معرفی نشده است. میوه‌ها، سبزیجات و ادویه‌ها به دلیل توانایی در مهار سرطان (مراحل مختلف تشکیل و گسترش سرطان) در سالهای اخیر مورد توجه محققین قرار گرفته‌اند. میوه‌ها و سبزیجات به خصوص غنی از مواد ریز مغذی از جمله فیبر، انواع ویتامینها و مواد معدنی و همچنین ترکیباتی نظیر پلی فنلها، ترپنها و آلکالوئیدها می-باشند که قادر هستند سلولهای سرطانی را مهار می‌کنند (۱، ۲، ۲۵، ۲۹ و ۳۲).

مطالعات انجام شده بر روی جمعیتهای مختلف و همچنین مطالعات آزمایشگاهی نشان می‌دهند که بین مصرف غذاهای گیاهی (شامل میوه‌ها و سبزیجات) و خطر بروز برخی سرطانها رابطه عکس وجود دارد (۲۷). مطالعات اپیدمیولوژیک نیز نشان می‌دهند که ۱۰ تا ۷۰ درصد (میانگین ۳۵ درصد) سرطانهای انسانی با الگوی غذایی افراد در ارتباط است. از این رو امروزه گیاهان و ترکیبات گیاهی در زمینه پیشگیری و درمان سرطان مورد توجه محققین قرار گرفته‌اند (۲۷). در سالهای اخیر، چندین داروی ضد سرطان با منشاء گیاهی روانه بازار شده و در کنار سایر روشهای درمان سرطان در کلینیک مورد استفاده قرار می‌گیرند. امروزه بیش از ۶۰ درصد داروهای ضد سرطان که مورد استفاده قرار می‌گیرند، منشاء طبیعی (گیاهی) دارند. از جمله این داروها می‌توان به Taxol، Vinblastine، Vincristine، Topotecan، Irinotecan و Etoposide اشاره کرد که توسط مؤسسه FDA آمریکا تأیید شده و مورد استفاده قرار می‌گیرند (۱۹). علاوه بر این، گیاهان و یا ترکیبات گیاهی دیگری هستند که اثرات ضد سرطانی آنها مورد توجه محققین قرار گرفته و حتی

مکانیسم عمل برخی از آنها نیز تا حدودی شناسایی شده است (۶، ۱۳، ۱۷ و ۲۲).

انار (*Punica granatum*) گیاهی است که در مناطق نیمه گرمسیری رویش دارد. گفته می‌شود خواستگاه اولیه این گیاه، ایران است و به تدریج به چین، هند، شمال آفریقا، اروپا و کشور امریکا گسترش پیدا کرده است (۷). در پزشکی سنتی هند، از انار به عنوان یک داروخانه یاد می شود. به طوری که گفته می‌شود تنه و ریشه‌های درخت انار قابلیت دفع کرم روده را دارد (۲۴). همچنین دانه‌های انار برای درمان اسهال و عصاره آن به عنوان یک سردکننده و نیز تقویت کننده خون مورد استفاده قرار می‌گیرد. امروزه از انار و مشتقات آن علاوه بر استفاده‌های آرایشی و بهداشتی، برای درمان بیماریهایی مانند AIDS، بیماریهای قلبی، فشار خون و همچنین سرطان استفاده می‌شود (۱۴).

تاکنون مطالعات زیادی در مورد اثرات ضد سرطانی انار صورت گرفته و گزارشهای محدودی در زمینه تأثیر مهاری عصاره انار بر تهاجم سلولهای سرطانی ارائه شده است (۲۴). در این مطالعه به بررسی اثر عصاره استونی بخش خوراکی بر رونویسی ژن *CDH1* و همچنین تأثیر این عصاره بر میزان پروتئینهای E-cadherin و β-catenin در سلولهای PC-3 پرداخته شده است.

مواد و روشها

کشت سلول: رده سلولی PC-3 (ATCC No. CRL-1435) از بانک سلولی انیستیتو پاستور ایران خریداری شد. سلولها در محیط کشت RPMI-1640 حاوی ۱۰ درصد سرم گاوی (Invitrogen)، آنتی بیوتیک استرپتومایسین / پنی سیلین (۱ درصد حجمی/حجمی) کشت داده شدند.

تهیه عصاره از بخش خوراکی انار: بخش خوراکی (دانه) انار از پوست جدا شده و با محلول استون ۷۰ درصد در آب، به نسبت حجمی ۱ (دانه انار) به ۱۵ (حجم استن ۷۰ درصد درآب) مخلوط و با کمک دستگاه آب میوه‌گیری آشپزخانه به مدت ۳۰ دقیقه هم زده شد. مخلوط حاصله به مدت ۲۴ ساعت روی شیکر قرار داده شد تا کاملاً هم بخورد. سپس مخلوط به دست آمده از صافیهای مختلف عبور داده شد تا رسوب و ذرات آن از بخش مایع جدا شوند. محلول حاصله تغلیظ شده و با استفاده از دستگاه Freeze-dryer، به صورت پودر درآمد. از این عصاره، غلظت ۲۰ میکروگرم در میلی لیتر تهیه شد و به همراه بقیه پودر تا زمان استفاده در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد.

بررسی سمیت سلولی: در هر یک از چاهکهای ظروف ۹۶ خانه، تعداد 5×10^3 سلول PC-3 کشت داده شدند. پس از ۴۸ ساعت، سلولها با غلظتهای ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میکروگرم در میلی لیتر از عصاره استونی دانه انار به مدت ۴۸ ساعت تیمار شدند. پس از ۴۸ ساعت، محیط کشت خارج شد و ۱۰۰ میکرولیتر بافر PBS حاوی ۵ میکروگرو بر میلی لیتر نمک MTT (3-[4, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide) افزوده شد. سه ساعت بعد، محلول MTT خارج شد. سپس ۱۰۰ µl از محلول DMSO در تاریکی به هر چاهک افزوده شد و به مدت ۱۰ تا ۳۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد. در نهایت جذب محلول فورمازان با دستگاه Eliza reader در طول موج ۵۹۰ nm اندازه گیری شد و حیات سلولها با استفاده از رابطه [۱۰۰ × (جذب نمونه‌ی کنترل / جذب نمونه تیمار شده) = (٪) حیات] محاسبه شد.

استخراج RNA و آزمایش RT-PCR: پس از تیمار سلولها با ۲۰ و۵۰ میکروگرم در میلی لیتر عصاره به مدت ۴۸ ساعت، با استفاده از EDTA-Trypsin، سلولها از پلیتها جدا شده و استخراج RNA با استفاده از کیت استخراج RNA شرکت سیناژن (RNXPlus) انجام شد. پس از سنجش غلظت RNA استخراجی با دستگاه نانودراپ، ۲ میکروگرم از RNA برای ساخت cDNA مورد استفاده قرار گرفت. با استفاده از پرایمرهای ویژه ژن سازنده

E-cadherin، بیان این ژن در سلولهای تیمار شده با غلظتهای مختلف عصاره دانه انار مورد مطالعه قرار گرفت. جدول ۱، پرایمرهای مربوط به ژن *CDH1* و *β-actin* را نشان می دهد. جدولهای۲ و ۳ مشخصات برنامه زمانی واکنش PCR برای ژنهای E-cadherin و *β-actin* را نشان می‌دهند.

جدول ۱- مشخصات پرایمرهای مورد استفاده برای دو ژن *E-cadherin* و *β-actin* در آزمایش RT-PCR

نام ژن	پرایمر	توالی	طول قطعه (جفت باز)
E-cadherin	F	5′-TGGAATCCAAGCAGAATTGC-3′	۲۸۲
	R	5′-TATGTGGCAATGCGTTCTCTATCCA-3′	
β-actin	F	5′-CACTCTTCCAGCCTTCCTTC-3′	۳۵۷
	R	5′-AGTCCGCCTAGAAGCATTTG- 3′	

جدول ۲- برنامه دمایی و زمانی واکنش PCR برای ژن *E-cadherin*

نوع واکنش	دما (°C)	زمان	تعداد سیکل
Initial Denaturation	۹۵	۵′	۱
Denaturation	۹۵	۶۰"	۳۰
Annealing	۵۵	۳۰"	
Extension	۷۲	۶۰"	
Final extension	۷۲	۱۰′	۱

جدول۳- برنامه دمایی و زمانی واکنش PCR برای ژن *β-actin*

نوع واکنش	دما (°C)	زمان	تعداد سیکل
Initial Denaturation	۹۵	۵′	۱
Denaturation	۹۵	۶۰"	۳۰
Annealing	۵۵	۳۰"	
Extension	۷۲	۴۵"	
Final extension	۷۲	۱۰′	۱

استخراج پروتئین و آزمایش وسترن بلاتینگ: پس از تیمار سلولها با غلظتهای ۲۰ و ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر عصاره دانه انار به مدت ۴۸ ساعت در پلیتهای ۶ خانه، سلولها با استفاده از EDTA-Trypsin از پلیتها جدا شده و با دور ۳۰۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. رسوب سلولی به دست آمده از سانتریفیوژ در بافر لیز (50mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, EDTA 2mM, pH=7.8) بر روی یخ انکوبه شده و به تعداد حداقل ۲۵ بار، مخلوط سلولی از سرنگ انسولین عبور داده شد تا سلولها متلاشی شده و پروتئینهای سلولی آزاد شوند. محلول لیز شده سپس با سرعت ۱۴۰۰۰دور در دقیقه، در دمای ۴ درجه سانتی گراد و به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. محلول رویی حاوی پروتئین به ویال جدید منتقل شده و با استفاده از روش برادفورد، غلظت پروتئینها مشخص شد. برای انجام الکتروفورز، ۲۵ میکروگرم پروتئین روی ژل پلی آکریل آمید ۸ درصد سوار شده و پس از الکتروفورز و انتقال به کاغذ نیتروسلولز، با آنتی بادیهای اولیه و ثانویه ویژه پروتئینهای β-catenin، E-cadherin و

β-actin انکوبه شدند. با استفاده از کیت ECL (شرکت زیست فن آوران نجم)، آشکارسازی نهایی پروتئینها بر روی فیلم عکاسی انجام شد.

کمّی سازی نتایج و آنالیز آماری: تمام آزمایشات مربوط به سنجش حیات سلولها، RT-PCR و وسترن بلاتینگ حداقل سه بار تکرار شد و در نهایت، معنا دار بودن داده-های مربوط به این آزمایشات با استفاده از آزمون t و نرم افزار SPSS مورد بررسی قرار گرفت. سطح معناداری نیز P< ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

نتایج

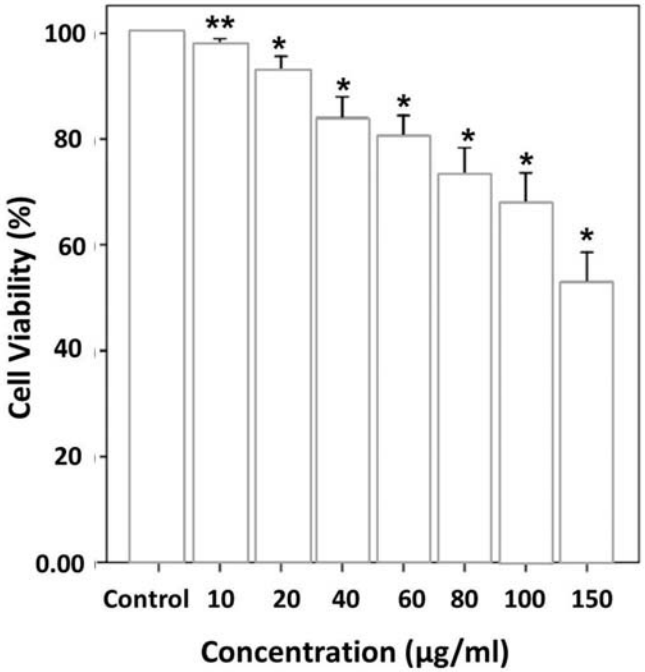
آزمایش سنجش حیات سلولها: در ابتدا به منظور بررسی تأثیر عصاره استونی بخش خوراکی انار بر رشد و حیات سلولهای PC-3، آزمون MTT انجام شد. در این آزمایش، سلولها با غلظتهای ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میکروگرم در میلی لیتر از عصاره تیمار شدند. پس از ۴۸ ساعت، حیات سلولهای تیمار شده با عصاره در مقایسه با سلولهای تیمار نشده (سلولهای کنترل) محاسبه شد. لازم به ذکر است در نمونه کنترل، هم حجم بالاترین غلظت عصاره، حلال مربوطه به محیط کشت سلولی اضافه شد. همان طور که در جدول ۴ و شکل ۱ مشاهده می شود، غلظتهای ۱۰، ۲۰، ۴۰، و ۶۰ میکروگرم در میلی لیتر عصاره اثر مهاری بارزی بر حیات سلولهای PC-3 نداشته-اند. غلظت ۸۰ میکروگرم در میلی لیتر حیات سلولها را به میزان حدود ۳۰ درصد کاهش داده است و غلظتهای ۱۰۰ و ۱۵۰ میکروگرم در میلی لیتر موجب مهار حیات و رشد سلولهای PC-3 به ترتیب به میزان ۶۸ درصد و ۵۳ درصد شده‌اند. این آزمایش سه بار تکرار شد و در پایان، برای هر غلظت، یک عدد میانگین به دست آمد (جدول ۴). سپس با استفاده از نرم افزار Excel، نمودار نتایج رسم شد (شکل ۱). محاسبات نشان داد مقدار IC_{50} (غلظتی که موجب کاهش ۵۰ درصدی جمعیت سلولی می‌شود) حدود ۸۶ میکروگرم در میلی لیتر می‌باشد.

جدول ۴- حیات سلولهای PC-3 تیمار شده با عصاره استونی دانه انار

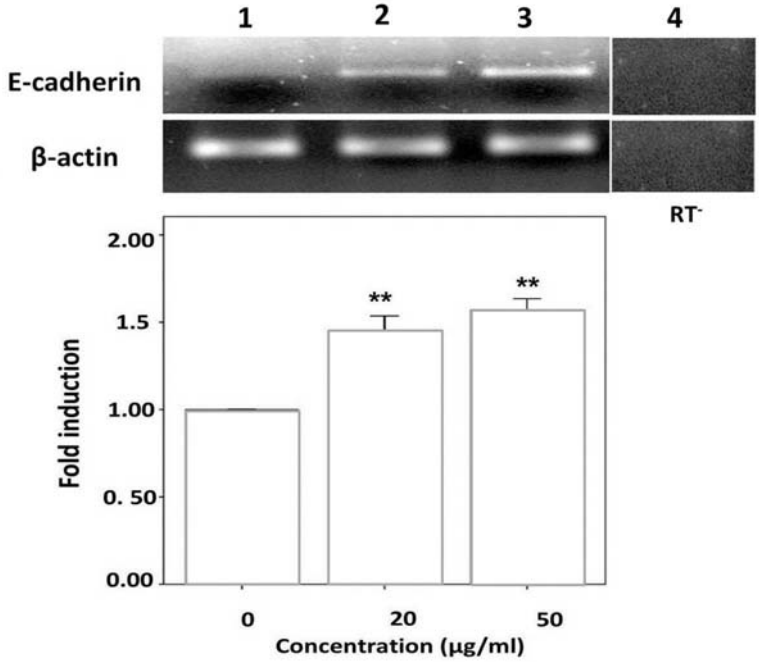
غلظت عصاره (میکروگرم در میلی لیتر)	میانگین حیات سلولی (٪)
۰ (کنترل)	۱۰۰
۱۰	۹۸
۲۰	۹۳
۴۰	۸۴
۶۰	۸۰/۶
۸۰	۷۳/۳
۱۰۰	۶۸
۱۵۰	۵۳

آزمایش RT-PCR: آزمایش MTT مشخص کرد که عصاره انار در غلظتهای بالاتر از ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر برای سلولهای PC-3، کشنده بوده و موجب کاهش جمعیت سلولی می‌شود. در این مطالعه، مقدار IC_{50} برای عصاره دانه انار حدود ۸۶ μg/ml به دست آمد. در این مطالعه، میزان پروتئینهای شرکت کننده در اتصالات سلولی مورد مطالعه قرار گرفته است بنابراین سلولها باید به لحاظ مورفولوژیک طبیعی باشند و کمترین میزان مرگ سلولی ناشی از تیمار با عصاره رخ دهد. بنابراین با استفاده از نتایج آزمایش MTT و همچنین مشاهدات میکروسکوپی در مورد ظاهر سلولها (داده‌ها نشان داده نشده است) و از طرفی فاصله قابل توجه غلظتها (اختلاف ۲/۵ برابری در غلظتها)، از دو غلظت ۲۰ و ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر به عنوان غلظتهای مناسب برای تیمار سلولها جهت بررسی تأثیر آن بر بیان ژن *CDH1* و نیز میزان پروتئینهای E-cadherin و β-catenin سلول، استفاده شد. بررسی بیان ژن *CDH1* در سلولهای PC-3 تیمار شده انجام شد و اعداد به دست آمده از اندازه گیری شدت باندها با اعداد مربوط به باندهای ژن *β-actin* به عنوان کنترل با استفاده از نرم افزار *Image J* ، استاندارد و نرمالیزه شدند. بررسیهای کمّی نشان داد غلظتهای ۲۰ و ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر

عصاره موجب افزایش بیان ژن *E-cadherin* به میزان حدود ۱/۵ برابر می‌شود (شکل۲).

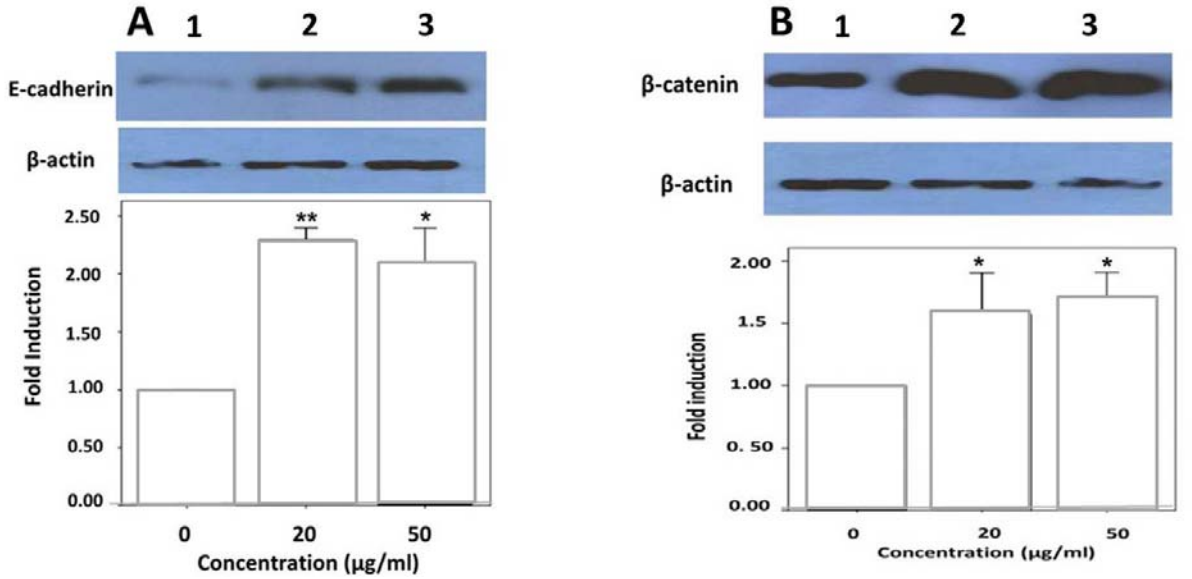


شکل۱- سنجش حیات سلولهای PC-3 تیمار شده با غلظتهای ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میکروگرم در میلی لیتر از عصاره استونی دانه انار. غلظت ۱۰ میکروگرم در میلی لیتر به میزان بسیار کمی بر حیات سلولها اثر مهاری داشته و غلظتهای بالاتر از ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر نیز به میزان قابل توجهی موجب مهار حیات سلولها شده‌اند. نتایج ارائه شده، میانگین حاصل از سه آزمایش مستقل می‌باشد. (*: $P<0.05$ و **: $p<0.01$).



شکل۲- بررسی بیان ژن *CDH1* در سلولهای PC-3 تیمار شده با غلظتهای ۲۰ و ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر عصاره استونی دانه انار. همانطور که در شکل مشاهده می‌شود، غلظتهای ۲۰ و ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر موجب افزایش حدود ۱/۵ برابری بیان ژن *CDH1* در سطح رونویسی شده است. نمودار معرف میانگین نتایج حاصل از سه آزمایش مستقل می‌باشد (*: $P<0.05$ و **: $p<0.01$).

آزمایش وسترن بلاتینگ: پس از اینکه مشخص شد تیمار سلولهای PC-3 با غلظتهای ۲۰ و ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر عصاره دانه انار موجب افزایش بیان ژن *E-cadherin* در سطح رونویسی شد (شکل ۲)، تأثیر عصاره بر تغییر میزان پروتئین E-cadherin و β-catenin در سلولهای PC-3 مورد بررسی قرار گرفت. اعداد به دست آمده از اندازه گیری شدت باندهای پروتئینی در آزمایش وسترن بلاتینگ مربوط به سلولهای تیمار شده با غلظتهای ۲۰ و ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر عصاره دانه انار با اعداد مربوط به باندهای پروتئین β-actin به عنوان نمونه کنترل، استاندارد و نرمالیزه شدند. نتایج حاصل از اندازه گیری شدت باندها نشان داد که تیمار سلولهای PC-3 با غلظتهای۲۰ و ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر عصاره موجب افزایش میزان پروتئین E-cadherin به میزان تقریبی ۲/۲ برابر شد (شکل ۳A). همچنین تیمار سلولهای PC-3 با غلظتهای ۲۰ و ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر نیز موجب افزایش پروتئین β-catenin سلولی به میزان حدود ۱/۵ برابر شد (شکل ۳B).



شکل ۳- بررسی تأثیر غلظتهای ۲۰ و ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر عصاره دانه انار بر مقدار سلولی پروتئین E-cadherin (A) و β-catenin (B) در سلولهای PC-3 با استفاده از روش وسترن بلاتینگ. نتایج، میانگین حاصل از سه آزمایش مستقل می‌باشد (*: $p<0.05$ و **: $p<0.01$).

بحث و نتیجه گیری

در این مطالعه اثرات ضد سرطانی گیاه انار بر سلولهای سرطانی PC-3 مورد مطالعه قرار گرفت. سلولهای PC-3 در تحقیقات مربوط به سرطان پروستات به خصوص در زمینه مطالعه تأثیر داروها و پاسخ آنها به داروها، سلولهای مناسبی هستند. این سلولها، دوکی شکل بوده و به دلیل اینکه پروتئین E-cadherin را به میزان کمی بیان می‌کنند از قدرت تهاجمی بالایی برخوردار می‌باشند (۳۰). در این مطالعه ابتدا اثرات سیتوتوکسیک عصاره استونی دانه انار بر حیات سلولهای PC-3 با استفاده از آزمون MMT مورد مطالعه قرار گرفت. آزمایشات MTT نشان داد که عصاره استونی دانه انار قادر است رشد سلولهای PC-3 را به خصوص در غلظتهای بالاتر از ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر مهار کند. همچنین IC_{50} عصاره استونی دانه انار در حدود ۸۶ میکروگرم در میلی لیتر تعیین شد (شکل ۱).

مطالعات مختلفی در مورد اثرات ضد سرطانی گونه‌های مختلف گیاهی انجام شده است و نتایج جالبی به دست

آمده است. Khan و همکاران نشان دادند که عصاره استونی دانه انار موجب کاهش رشد سلولهای A549 (سلولهای سرطان ریه) می‌شود (۱۳). Malik و همکاران نشان دادند که عصاره استونی دانه انار موجب کاهش رشد و حیات سلولهای PC-3 و القای آپوپتوز در این سلولها می‌شود (۱۵).

در این مطالعه، IC_{50} عصاره دانه انار در حدود ۸۶ میکروگرم در میلی لیتر به دست آمد. آزمایشات MTT نشان داد در غلظتهای پایین‌تر، تأثیر مهاری عصاره بر رشد و حیات سلولها قابل توجه نبود و همچنین مشاهدات میکروسکوپی نشان داد مورفولوژی سلولهای تیمار شده با غلظتهای پایین‌تر عصاره، طبیعی بود. بنابراین تصمیم گرفته شد تا از غلظتهای ۲۰ و ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر (بین دو غلظت ۴۰ و ۶۰ میکروگرم در میلی لیتر) عصاره در آزمایشات بعدی استفاده گردد. مطالعات اولیه نیز نشان داد که ژن *CDH1* در سلولهای PC-3 در سطح بسیار پایینی بیان می‌شود (۲۹). بنابراین به نظر می‌رسد سلولهای PC-3 مدل مناسبی برای مطالعه تأثیر ترکیبات و داروهای مختلف بر بیان ژن سازنده E-cadherin و تهاجم سلولی باشند. نتایج این آزمایشات نشان داد غلظتهای ۲۰ و ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر عصاره دانه انار موجب افزایش بیان ژن سازنده E-cadherin (*CDH1*)در سطح mRNA به میزان تقریبی ۱/۵ برابر می‌شود (شکل ۲). در مطالعه دیگری که بر روی رده‌های سلولی DU145 صورت گرفته مشخص شده است که عصاره انار موجب افزایش بیان برخی ژنهای سلولی از جمله ژنهای *ICAM-1* (Intracellular adhesion molecule 1)، *PDCD4* (Programmed cell death 4)، *MARCKS* (Myristoylated alanine-rich protein kinase C substrate) و *CDH1* می‌شود (۱۵). مشخص شده است این ژنها همگی در اتصالات سلولی نقش دارند. به همین دلیل در این تحقیق نیز تصمیم گرفته شد تا اثر عصاره استونی دانه انار را بر بیان دو پروتئین اصلی شرکت کننده در اتصالات سلولی Adherens junction، مورد بررسی قرار گیرد.

پروتئین E-cadherin یکی از پروتئینهای اصلی شرکت کننده در اتصالات سلولی adherens junction بین سلولهای اپیتلیال است (۱۲، ۱۸ و ۲۰). گزارشهای زیادی وجود دارد مبنی بر اینکه در بسیاری از سرطانهای پیشرفته و تهاجمی، یکی از ژنهایی که بیان آن کاهش می‌یابد، ژن سازنده پروتئین E-cadherin است (۱۸). بنابراین انتظار می‌رود کاهش بیان آن در سلولهای سرطانی موجب سست شدن اتصالات سلولی و جدا شدن سلولها از یکدیگر شود (۵ و ۳۲). Kandouz و همکاران نشان داده‌اند که تیمار سلولهای PC-3 با عصاره متانولی *Teucrium polium*، باعث تغییر مورفولوژی این سلولها از حالت دوکی (مزانشیمی) به حالت اپیتلیال می‌شود (۱۲). این تغییر شکل سلولها یکی از ویژگیهای پدیده MET (عکس فرآیند EMT) است (۳۱). همچنین این محققین نشان دادند که تیمار این سلولها با عصاره متانولی گیاه *T. polium* موجب افزایش میزان پروتئین E-Cadherin در غشاء می‌شود (۱۲). آزمایشات وسترن بلاتینگ مشخص کرد تیمار سلولهای PC-3 با غلظتهای ۲۰ و ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر موجب افزایش مقدار پروتئین E-cadherin سلولی به میزان تقریبی ۲/۲ برابر در مقایسه با سلولهای کنترل می‌شود (شکل ۳A). بنابراین می‌توان این گونه پیشنهاد کرد که عصاره انار احتمالاً در مهار تهاجم سلولهای PC-3 پتانسیل خوبی دارد که البته تأیید این نظریه نیازمند مطالعات بیشتری است. همچنین آزمایشات وسترن بلاتینگ نشان داد تیمار سلولهای PC-3 با غلظتهای ۲۰ و ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر عصاره استونی دانه انار موجب افزایش حدود ۱/۵ برابری میزان پروتئین β-catenin در سلولهای PC-3 می شود (شکل ۳B). پروتئین β-catenin یکی از اجزای اصلی مسیر انتقال پیام Wnt و نیز یکی از پروتئینهای همراه E-cadherin در محل اتصالات سلولی adherens junction بوده که به بخش سیتوپلاسمی پروتئین E-cadherin متصل

می‌شود و از این‌رو نقش مهمی در اتصال پروتئین E-cadherin به اسکلت سلولی دارد (۱۱و ۱۶). مشخص شده است که مسیر انتقال پیام Wnt در تکوین بسیاری از موجودات نقش دارد (۱۶). علاوه بر این مشخص شده است که فعالیت نامتعادل این مسیر انتقال پیام، در شکل گیری بسیاری از سرطانها نقش دارد (۲۳ و ۲۶). مطالعات مختلف نشان داده است در برخی سرطانهای انسانی، ژن سازنده پروتئین β-catenin جهش یافته و مقدار پروتئین β-catenin سلولی افزایش می‌یابد (۸، ۹ و ۲۸). مشخص شده است در این سرطانها، پروتئین β-catenin از E-cadherin جدا شده و به همراه فاکتورهای رونویسی TCF و LEF-1 به هسته منتقل می‌شود و موجب تغییر بیان برخی ژنها و سرطانی شدن سلول می‌شود. جدا شدن پروتئین β-catenin از پروتئین E-cadherin موجب تضعیف اتصالات سلولی می‌شود (۱۱، ۲۳و ۲۶).

عصاره انار با افزایش بیان ژنهای *p21* و *p27* و کاهش بیان ژنهای *cyclin D*، *cyclin E*، *cdk2* و *cdk4* موجب توقف چرخه سلولی در مرحله G1/S در سلولهای مختلف می‌شود. عصاره انار، بیان ژنهای آپوپتوزی را افزایش داده و ژنهای ضد آپوپتوزی را مهار می‌کند (۱۴، ۱۵ و ۲۴). همچنین تیمار سلولهای سرطانی PC-3 نیز با عصاره انار نیز موجب تغییر بیان برخی ژنها می‌شود (۲۴).

مطالعات نشان داده‌اند که بیان پروتئین E-cadherin در سلول و قرار گرفتن آن در غشاء از انتقال پروتئین β-catenin به هسته سلولی جلوگیری می‌کند (۲۱ و ۲۹). به عنوان مثال آزمایشات ایمونوهیستوشیمی در سلولهای سرطانی پیشرونده معده حاکی از کاهش پروتئین β-catenin در غشای سلول است (۹). گزارشهای زیادی هم وجود دارد که در مراحل پیشرفته سرطانهای بافتهای اپیتلیال، میزان پروتئین E-cadherin در غشای سلولی کاهش یافته و همین امر موجب تضعیف اتصالات سلولی و مهاجرت سلولها می‌شود (۲۰). نتایج پژوهش حاضر نشان می‌دهد که به دلیل اینکه تیمار سلولهای PC-3 با عصاره استونی انار موجب افزایش میزان پروتئینهای E-cadherin و β-catenin می‌شود، بنابراین احتمالاً این گیاه پتانسیل بالایی در مهار متاستاز سلولهای سرطانی دارد. به طور قطع، جهت تکمیل نتایج حاصله در این مطالعه و شناخت مکانیسمهای مولکولی این اثرات، نیاز است تا آزمایشات ایمونوفلورسانس جهت تعیین موقعیت پروتئینهای E-cadherin و β-catenin پس از تیمار سلولهای PC-3 با عصاره دانه انار و تأثیر آن بر متاستاز سلولهای سرطانی و همچنین مطالعه بیان برخی ژنهای هدف پروتئین β-catenin از جمله ژنهای *cyclin D1*، *c-myc* و ... در سلولهای تیمار شده با غلظتهای مختلف عصاره دانه انار انجام شود.

منابع

۱. حضوری، الهام. سپهری، حوری. دلفی، لادن. دشت بزرگی، سارا. گلیایی، بهرام. ۱۳۹۲. اثر پکتین تغییر یافته مرکبات (MCP) بر فرآیند رگزایی سلولهای HUVEC و دودمان سلولی سرطان پروستات انسانی DU145، مجله پژوهشهای سلولی و مولکولی (مجله زیست شناسی ایران). ۲۶، ۴: ۴۲۶-۴۳۷.

۲. دشت بزرگی، سارا. سپهری، حوری. گلیایی، بهرام. دلفی، لادن. جان زمین، احسان. ۱۳۹۲. بررسی اثر مشتقات پکتینی در القای مرگ برنامه ریزی شده یا آپوپتوز در دودمان سلولی سرطان پروستات انسانی DU145. مجله پژوهشهای سلولی و مولکولی (مجله زیست شناسی ایران). ۲۶، ۲: ۱۸۶-۱۹۹.

3. Anastas, J. and Moon, R. 2013. WNT Signalling pathways as therapeutic targets in cancer. Nature Reviews Cancer 13: 11-26.

4. Batlle, E., Sancho, E., Francí, C., Domínguez, D., Monfar, M., Baulida, J. and García De Herreros, A. 2000. The transcription factor Snail is a repressor of *E-cadherin* gene expression in epithelial tumour cells. Nature Cell Biology 2: 84-89.

5. Bertocchi, C., Vaman Rao, M. and Zaidel-Bar, R. 2012. Regulation of Adherens Junction

Dynamics by Phosphorylation Switches. Journal of Signal Transduction 2012: 1-14.

6. Chu, Q., Ling, MT., Feng, H., Cheung, HW., Tsao, SW., Wang, X. and Wong, YC. 2006. A novel anticancer effect of garlic derivatives: inhibition of cancer cell invasion through restoration of E-cadherin expression. Carcinogenesis 27(11): 2180-2189.

7. Ebadi, M. 2007. Pharmacodynamic Basis of herbal medicine. p; 507. New York: Taylor & Francis

8. Fujimori, M., Ikeda, S., Shimizu, Y., Okajima, M. and Asahara, T. 2001. Accumulation of β-Catenin Protein and Mutations in Exon 3 of *β-Catenin* Gene in Gastrointestinal Carcinoid Tumor. Cancer Research 61: 6656-6659.

9. Hajra, K. and Fearon, E. 2002. Cadherin and Catenin Alterations in Human Cancer. Genes Chromosomes Cancer 34(3): 255-268.

10. Harris, T. and Tepass, U. 2010. Adherens junctions: from molecules to morphogenesis. Nature Reviews Molecular Cell Biology 11: 502-514.

11. Heuberger, J. and Birchmeier, W. 2009. Interplay of Cadherin-Mediated Cell Adhesion and Canonical Wnt Signaling. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology 2(2): 1-24.

12. Kandouz, M., Alachkar, A., Zhang, L., Dekhil, H., Chehna, F., Yasmeen, A. and AlMoustafa, AE. 2009. *Teucrium polium* plant extract inhibits cell invasion and motility of human prostate cancer cells via the restoration of the E-cadherin/catenin complex. Journal of Ethnopharmacology 129 (3): 410-415.

13. Khan, N., Hadi, N., Afaq, F., Syed, D.S., Kweon, MH. and Mukhtar, H. 2007. Pomegranate fruit extract inhibits prosurvival pathways in human A549 lung carcinoma cells and tumor growth in athymic nude mice. Carcinogenesis 28 (1): 163-173.

14. Lansky, E. and Newman, R. 2006. *Punica granatum* (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. Journal of Ethnopharmacology 109(2): 177-206.

15. Malik, A., Afaq, F., Sarfaraz, S., Adhami, V.M., Syed, D.N. and Mukhtar, H. 2005. Pomegranate fruit juice for chemoprevention and chemotherapy of prostate cancer. PNAS 102(41): 14813-14818.

16. Miller, J. and Moon, R. 1996. Signal transduction through β-Catenin and specification of cell fate during embryogenesis. Genes & Development 10: 2527-2539.

17. Milner, J.A. 2006. Preclinical Perspectives on Garlic and Cancer. The Journal of Nutrition 136(3S): 827S-831S.

18. Nakamura, T., Kato, Y., Fuji, H., Horiuchi, T., Chiba, Y. and Tanaka, K. 2003. E-cadherin-dependent intercellular adhesion enhances chemoresistance. Int J Mol Med 12(5): 693-700.

19. Nobili, S., Lippi, D., Witort, E., Donnini, M., Bausi, L., Mini, E. and Capaccioli, S. 2009. Natural compounds for cancer treatment and prevention. Pharmacological research 59: 365-378.

20. Onder, T.T. and Gupta, P.B. 2008. Loss of E-cadherin promotes metastasis via multiple downstream transcriptional pathways. Cancer Research 68(10): 3645-3654.

21. Orsulic, S., Huber, O., Aberle, H., Arnold, S. and Kemler, R. 1999. E-cadherin binding prevents β-catenin nuclear localization and β-catenin/LEF-1-mediated transactivation. Journal of Cell Science 112(8): 1237-1245.

22. Park, H.K., Han, D.W. and Park, J.C. 2005. Differential biological responses of green tea polyphenol in normal cells vs. cancer cells. Current Applied physics 5: 449-452.

23. Polakis, P. 2000. Wnt signaling and cancer. Genes & development 14(15): 1837-1851.

24. Rettig, M., Heber, D., An, J., Seeram, N.P., Rao, J.Y., Liu, H., Klatte, T., Belldegrun, A., Moro, A., Henning, S.M., Mo, D., Aronson, W.J. and Pantuck, A. 2008. Pomegranate extract inhibits androgen-independent prostate cancer growth through a nuclear factor-κB-dependent mechanism. Mol Cancer Ther 7(9): 2662-2671.

25. Rucinska, A., Roszczyk, M. and Grabryelak, T. 2008. Cytotoxicity of the isoflavone genistein in NIH 3T3 cells. Cell Biology International 32: 1019-1023.

26. Seidensticker, M. and Behrens, J. 2000. Biochemical interactions in the wnt pathway. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research 1495(2): 168-182.

27. Surh, Y.J. 2003. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. Nature Reviews Cancer 3: 768-780.

28. Tafrihy, M., Mohammadzadeh, R., Jahanzad, M. and Arab Najafi, S.M. 2006-2007. Mutations in the *β-catenin* Gene in Gastric and Esophageal Cancers: an Analysis in Iranian Patients. Journal of Science (University of Tehran) 32(4): 161-167.

29. Tafrihi, M., Toosi, S., Minaei, T., Gohari, AR., Niknam, V. and Najafi, S.M.A. 2014. Anticancer Properties of *Teucrium persicum* in PC-3 Prostate Cancer Cells. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention 15 (1): 785-791.

30. Tai, S., Sun, Y., Squires, J.M., Zhang, H., Oh, W.K., Liang, CZ, and Huang, J. 2011. PC3 Is a Cell Line Characteristic of Prostatic Small Cell Carcinoma. Prostate 71(15): 1668-1679.

31. Voulgari, A. and Pintzas, A. 2009. Epithelial–mesenchymal transition in cancer metastasis: Mechanisms, markers and strategies to overcome drug resistance in the clinic. Biochimica et Biophysica Acta 1796: 75-90.

32. Vlad-Fiegen, A., Langerak, A., Eberth, S. and Muller, O. 2012. The Wnt pathway destabilizes adherens junctions and promotes cell migration via β-catenin and its target gene cyclin D1. FEBS Open Bio 2: 26-31.

Effect of acetone-derived pomegranate extract on the expression of E-cadherin and β-catenin proteins in PC-3 cells

Tafrihi M.[1] and Nakhaei Sistani R.A.[2]

[1] Molecular & Cell Biology Dept., Faculty of Basic Sciences, University of Mazandaran, Babolsar, I.R. of Iran

[2] Biotechnology Dept., Faculty of Chemistry, University of Kashan, Kashan, I.R. of Iran

Abstract

E-cadherin protein is a member of cadherin superfamily which expressed mainly at the surface of epithelial cells. Reduced expression of this protein results in cell adhesion weakening, EMT (Epithelial-mesenchymal transition), migration and metastasis of epithelial cancer cells. In traditional medicine, pomegranate (*Punica granatum*) is used to treat several diseases including diarrhea, heart diseases and blood pressure disorders. In this study, we examined the effect of pomegranate acetone extract on the expression of β-catenin and E-cadherin proteins in PC-3 cancer cells. The results of MTT experiments showed that acetone-derived extract of pomegranate inhibits viability of PC-3 cells, especially in concentrations higher than100 μg/ml. The IC_{50} value of pomegranate extract was estimated to be 86μg/ml. The results of western blotting experiments showed that concentrations of 20 and 50 μg/ml of pomegranate extract led to 1.5- and 2.2-folds increase in β-catenin and E-cadherin protein levels, respectively. The results of this study suggest that pomegranate fruit which induces the expression of proteins involved in adherens junctions including E-cadherin and β-catenin may have great potentials in inhibition of cancer cell metastasis.

Key words: Pomegranate, PC-3 cells, β-catenin protein, E-cadherin protein