

تأثیر متابولیت‌های کاتچین حاصل از میکروبیوتای روده بر قدرت تکثیری رده سلولی Ca SKi

الناز خجسته^۱، چنگیز احمدی زاده^{۱*}

گروه زیست‌شناسی، واحد اهر، دانشگاه آزاد اسلامی، اهر، ایران

تاریخ وصول: ۱۳۹۸/۰۴/۲۷ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۱/۳۰

چکیده

زمینه و هدف: در ایران، سرطان دهانه رحم دومین عامل مرگ و میر در زنان می‌باشد. عفونت ویروس پاپیلوم مهم‌ترین عامل خطر برای توسعه سرطان دهانه رحم است. سلول Ca SKi یک سلول کارسینوم سرویکس انسانی است که ویروس پاپیلوم نوع ۱۶ را به ژنوم خود متصل می‌کند. کاتچین یک نوع فنل و متابولیت ثانویه یک گیاه است، پلی‌فنول‌ها علاوه بر نابودکردن رادیکال‌های آزاد با تسریع مرگ سلول‌های سرطانی از سلول‌های سالم نیز حفاظت می‌کنند. هدف از این مطالعه تعیین و بررسی تأثیر متابولیت‌های کاتچین حاصل از میکروبیوتای روده بر قدرت تکثیری رده سلولی Ca SKi بود.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی آزمایشگاهی که در سال ۱۳۹۷ انجام شد. متابولیت‌های کاتچین از نمونه‌های مدفوع حاوی میکروبیوتای روده به روش HPLC استخراج و رده سلولی با غلظت‌های مختلفی از کاتچین به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت تیمار شدند. اثرات سمیت سلولی عصاره سلول باکتری رده سلولی Ca SKi با استفاده از روش MTT بررسی شد. پس از استخراج RNA و تهیه cDNA، میزان بیان ژن *bax*، *bcl2* در رده سلولی Ca SKi با استفاده از روش Real Time PCR مورد بررسی قرار گرفت. داده‌ها با استفاده از آزمون آماری آنالیز واریانس یک طرفه تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: بیان ژن *bax* با افزایش دوز مؤثر کاتچین در ۷۲ ساعت اول رابطه معنی‌داری پیدا نمی‌کند ($p > 0.05$)، اما با بالاتر رفتن دوز مؤثر شاهد تأثیر افزایش بیان معنی‌دار ژن *bax* هستیم. نتایج نشان داد بیان ژن *bcl2* با افزایش دوز مؤثر کاتچین در ۷۲ ساعت اول رابطه معنی‌داری پیدا می‌کند، این تغییر کاهشی است و رابطه مستقیمی با دوز مؤثر دارد.

نتیجه‌گیری: کاتچین می‌تواند باعث افزایش بیان *BCL2* در سلول‌های سرطانی شود که می‌توان جهت ایجاد یک راه کار نوین درمانی با تأثیر بالا، به عنوان درمان و همچنین پیشگیری از سرطان سرویکس و از ژن *bax* به عنوان پیش‌آگهی در سرطان دهانه رحم بهره جست.

واژه‌های کلیدی: کاتچین، میکروبیوتای روده، رده سلولی Ca SKi

نویسنده مسئول: چنگیز احمدی زاده، اهر، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اهر، گروه زیست‌شناسی

Email: dr_ahmadizadeh@yahoo.com

مقدمه

سرطان دهانه رحم بعد از سرطان پستان دومین بدخیمی شایع و سومین سرطان شایع دستگاه تناسلی زنان است (۱). میزان بروز و شیوع سرطان‌های دستگاه تناسلی زنان در نقاط مختلف جهان، متفاوت است (۲). سرطان‌های دهانه رحم، تخمدان و جسم رحم از جمله این سرطان‌ها می‌باشند (۳). بر اساس آمار سازمان بهداشت جهانی حدود ۵۰۰۰۰۰ مورد جدید از این بیماری در هر سال ثبت می‌شود که از این میان ۲۵۰۰۰۰ مورد به مرگ منتهی می‌شود. عامل ۲۵ درصد از مرگ و میر زنان، تومورهای بدخیم است که ۱۸ درصد موارد ناشی از سرطان دهانه رحم می‌باشد. سرطان دهانه رحم به عنوان مشکل اساسی در کشورهای توسعه نیافته و یا در حال توسعه است. بیشترین میزان بروز این سرطان در جنوب آمریکا، آفریقا و جنوب آسیا می‌باشد (۱). سرطان سرویکس یا گردن رحم در لایه داخلی گردن رحم ایجاد می‌شود، منطقه‌ای که در بخش تحتانی رحم است و به داخل واژن پیشروی می‌کند. این روند معمولاً به مرور زمان ایجاد می‌شود. در اغلب موارد میزان ویروس در بدن به طور خود به خود کاهش یافته و مشکلی برای سلامت فرد ایجاد نمی‌کند، اما در غیر این صورت ایجاد زگیل‌های تناسلی و ابتلا به سرطان را در پی خواهد داشت (۴). HPV شامل گروهی هتروژن از ویروس‌هایی است که باعث القاء تومورهای سلول سنگفرشی مانند: زگیل و پاپیلوماس روی پوست، غشاء مخاطی دستگاه تنفسی،

دستگاه گوارش و دستگاه تناسلی می‌شوند. HPV یکی از متداول‌ترین عوامل بیماری‌های مقاربتی (STD) است (۵). عفونت پایدار با HPV‌های با خطر بالا سرطان‌زا باعث تمامی سرطان‌های سرویکس، بیشتر سرطان‌های مقعد و برخی از سرطان‌های Vulvar، واژن، آلت تناسلی و سرطان‌های اوروفارنژ می‌شوند (۶). سلول Ca SKi یک سلول کارسینوم سرویکس انسانی است که حدود ۶۰۰ نسخه از ویروس پاپیلوم ویروسی نوع ۱۶ (HPV 16) را به ژنوم خود متصل می‌کند (۷)، تریلیون‌ها میکروب در روده انسان زندگی می‌کنند. این میکروب‌ها جامعه‌ای تشکیل می‌دهند که از طریق فعالیت‌های متابولیکی جمعی، بر روی میزبان تأثیرگذار هستند (۸). نه تنها روده بلکه دستگاه گوارش انسان حاوی جمعیت پویایی از میکروب‌ها است که بیشتر آنها مفید و برخی از آنها خطرناک هستند. میکروب‌های موجود در روده که میکروبیوتای روده‌ای نامیده می‌شوند بر انرژی‌زایی، عملکرد طبیعی بدن، سیستم ایمنی، چاقی، لاغری، سوءتغذیه، اختلال‌های عصبی، بیماری‌ها و به خصوص بیماری‌های روده‌ای و سرطان در انسان تأثیرگذار هستند. میکروبیوتای روده مجموعه‌ای از باکتری‌ها، آرکی‌ها و یوکاریوت‌ها هستند که عمدتاً رابطه متقابل و سودمندی با انسان برقرار کرده‌اند. میکروبیوم یا باکتری‌های موجود در بدن به خصوص روده (فلور

خود نشان دادند که کاتچین‌های چای سبز به عنوان یک آنتی‌اکسیدان قوی با مهار استرس اکسیداتیو و پراکسیداسیون لیپیدی از تخریب بافتی جلوگیری می‌کند و نیز از طریق تقویت سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی موجب محافظت بافتی می‌شوند. همچنین می‌توانند میزان آنتی‌اکسیدان‌های آندوژن و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی را افزایش دهند (۱۱). کرسپی و همکاران در مطالعه‌ای بیان کردند کاتچین به عنوان یک آنتی‌اکسیدان طبیعی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی پلاسما را افزایش داده و موجب کاهش تجمع رادیکال‌های آزاد سلولی می‌شود. همچنین با کاهش شرایط استرس اکسیداتیو مانع از اثر عوامل جهش‌زا روی کروموزوم‌ها می‌شود (۱۲). لذا هدف از این مطالعه تعیین و بررسی تأثیر متابولیت‌های کاتچین حاصل از میکروبیوتای روده بر قدرت تکثیری رده سلولی Ca Ski بود.

روش بررسی

در این مطالعه تجربی آزمایشگاهی که در سال ۱۳۹۷ انجام شد، این پروژه رده سلولی Ca Ski از بانک سلولی انیستیتو پاستور تهیه گردید. سلول‌ها در داخل فلاسک حاوی ۹۰ سی سی محیط کشت DMEM دارای گلوکز کم غنی شده با ۵ درصد سرم جنین گاوی (Fetal Bovine Serum-FBS)، ۱۰۰ ماکرولیتر آنتی‌بیوتیک (penicillin and streptomycin) در انکوباتور در شرایط دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و دی‌اکسیدکربن ۵ درصد کشت داده و سپس سلول‌ها پاساژ داده شدند و با

روده) نقش مهمی در ایجاد یا پیشگیری التهاب بدن و در نتیجه پیشگیری از سرطان ایفا می‌کند (۸). کاتچین یک نوع فنل و متابولیت ثانویه یک گیاه است، نام خانواده شیمیایی کتیچین از کتیچو گرفته شده است، که آب مازویی یا عصاره جوشیده میموسا کتچو است. در چای سبز به نسبت چای سیاه کاتچین‌ها به مقدار قابل ملاحظه‌ای یافت می‌شوند. پلی‌فنول‌ها رایج‌ترین آنتی‌اکسیدان‌های مواد غذایی هستند و از طریق مهار رادیکال‌های آزاد نقش مهمی در پیشگیری از بیماری‌های مزمن از جمله سرطان دارند. رادیکال‌های آزاد با حمله به غشای سیتوپلاسمی سلول و نابود کردن آن، به DNA داخل سلول دسترسی پیدا می‌کنند و از طریق تغییر DNA باعث سرطان می‌شوند. پلی‌فنول‌ها علاوه بر نابود کردن رادیکال‌های آزاد با تسریع مرگ سلول‌های سرطانی از سلول‌های سالم نیز حفاظت می‌کنند (۹). *Bcl-2* یک ژن ضد آپوپتوزی می‌باشد که بقای سلول را پیش می‌برد در حالی که *bax* یک ژن پرو آپوپتوزی بوده که منجر به پیشبرد مرگ سلولی می‌گردد. محصول ژن *Bcl-2* در تحریک رشد و بقا و مهار مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده نقش ایفا می‌کند، در حالی که پروتئین *bax* سبب القای مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده در سلول‌ها شده و عملکردی برخلاف پروتئین *BCL-2* دارد. پروتئین‌ها ساختارهای همودایمر و هتروداایمر را تشکیل می‌دهند، این دو پروتئین فاکتورهای مرتبطی با هم هستند که فرآیند مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده را تنظیم می‌کنند (۱۰). سننایاکه و همکاران در مطالعه

شمارش سلول‌ها و با توجه به محاسبات مربوط به Seedind density مورد نظر برای انجام آزمایش‌ها، مقدار مورد نیاز از سوسپانسیون سلولی را به وسیله محیط کشت کامل به حجم مورد نظر رسانده و بعد از بررسی فلاسک مورد نظر به وسیله میکروسکوپ در انکوباتور قرار گرفت (۱۳).

متابولیت‌های کاتچین از نمونه‌های مدفوع حاوی میکروبیوتای روده به روش HPLC استخراج و با غلظت‌های (۱۰، ۵۰، ۱۰۰) نانومولی از کاتچین به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت تیمار شدند (۱۴).

اثر سایتوتوکسیک باکتری بر روی سلول‌های سرطانی با روش رنگ سنجی، با استفاده از رنگ تترازولیوم با نام شیمیایی Tetrazolium 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl bromide که اختصاراً MTT (Merck، آلمان) نامیده می‌شود، بررسی شد. سلول‌های رده CA-SKI در چاهک‌های ۹۶ تایی به تعداد متوسط ۵۰،۰۰۰ سلول در هر چاهک و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد همراه با ۵ درصد CO₂ و ۹۵ درصد رطوبت به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شدند. سپس سلول‌ها با غلظت‌های مختلف از کاتچین شامل ۱۰، ۵۰، ۱۰۰ نانومول بر لیتر به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت تیمار شدند. از هر دوزاژ کاتچین در ۳ چاهک تکرار صورت گرفت. پس از این مدت داخل هر کدام از چاهک‌ها ۲۰ میکرولیتر از پودر MTT (۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) اضافه و انکوبه شد. بعد از گذشت ۴ ساعت پلیت‌ها از انکوباتور خارج و مایع

رویی دور ریخته و داخل هر کدام ۱۰۰ میکرولیتر از DMSO اضافه شد تا فورمازان شکل گیرد. جذب نوری فورمازان در طول موج ۵۷۰ با استفاده از خوانشگر ELISA اندازه گرفته شد. با به کارگیری جذب نوری کنترل، بلانک و نمونه، درصد حیاتی سلول‌ها به دنبال تأثیر کاتچین (IC₅₀) مورد بررسی قرار گرفت. این مقدار از روی نمودار با استفاده از نرم‌افزار Excel تعیین گشت (۱۵).

برای جداسازی RNA توتال از پروتئین و DNA استخراج شده از نمونه‌های مورد آزمایش با استفاده از روش پیشنهادی شرکت سازنده (CinnaGen, Iran) و به روش زیر عمل گردید. یک میلی‌لیتر محلول RNXTM-PLUS به هر یک از چاهک‌ها افزوده شد و سپس به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد و سوسپانسیون به میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری RNase Free و DNase Free انتقال یافت. به هر میکروتیوب ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم افزوده شد و میکروتیوب ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید و در ادامه به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و RPM 12000 سانتریفوژ گردید. فاز رویی که حاوی RNA بود جداسازی شده به محلول جدا شده حجم مساوی از ایزوپروپانول اضافه شد و ۱۵ دقیقه دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. میکروتیوب به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و RPM 12000 سانتریفوژ شده و ۱ میلی‌لیتر اتانول ۷۵ درصد به میکروتیوب

اضافه گردید. بلافاصله میکروتیوب به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و RPM 7500 سانتریفیوژ شد، به هر میکروتیوب ۱۰ میکرولیتر DEPC-treated water افزوده شد. به منظور بررسی کیفیت RNAهای استخراج شده، ۵ نمونه به صورت راندوم بر روی ژل آگارز ۲ درصد الکتروفورز شد.

۱ میکروگرم از total RNA که با ۰/۲ ماکرومولار هگزامر پرایمر و ۱ ماکرولیتر dNTP mM mix و آب Diethyl Pyrocarbonate مخلوط کرده و انکوبه شد، سپس ۵ یونیت آنزیم RT (MMLV) ساخت شرکت Thermo Fisher، بافر ۱ (buffer for MMLV RT)، یک یونیت بر ماکرولیتر مهارگر RNase را افزوده و در واقع در انتها حجم کلی هر تیوب باید ۲۰ ماکرولیتر شود، بعد تیوب‌ها را در دستگاه PCR قرار داده شد و cDNAها سنتز شدند (۱۶).

برای اندازه‌گیری میزان بیان BAX و BCL2 از دستگاه Eco illumine استفاده شد. جفت پرایمرهای مربوط به هر ژن با استفاده از نرم‌افزار Primer3 طراحی و (Bioneer Co., South Korea) سنتز شده و برای کار با غلظت نهایی ۱۰۰ نانومولار مورد استفاده قرار گرفته‌اند (جدول ۱). واکنش‌ها بر مبنای استفاده از رنگ Syber green I انجام گرفت. رنگ Syber green I طی واکنش PCR به DNA دو رشته‌ای متصل شده و نور فلورسنت ساطع می‌کند. بیان ژن *bax* و *bcl2* نسبت به

بیان ژن *GAPDH* اندازه گرفته و در واقع نرمالیزه شد. مقادیر نرمالیزه (واحد نسبی) به وسیله کالیبراتور داخلی (نمونه‌های کنترل هر آزمایش) استاندارد سازی شدند.

واکنش Real time PCR به صورت تکرارهای ۳ تایی صورت گرفت. بدین شکل که در تیوب‌های مخصوص cDNA Real time PCR و مسترمیکس سایبرگرین حاوی ۱ ماکرولیتر پرایمر فوروارد، ۱ ماکرولیتر پرایمر ریورز، ۷ ماکرولیتر Diethyl Pyrocarbonate و ۱۰ ماکرولیتر Mastermix 1x Real time ریخته شد. بعد تیوب‌ها را در دستگاه Real time PCR قرار داده و دستگاه گردید (جدول ۲ و ۳).

آزمون‌ها زمانی معنی‌دار در نظر گرفته شدند که مقدار *p* کمتر از ۰/۰۵ بود و سپس نسبت بیان هر ژن نسبت به ژن رفرنس (*GAPDH*) محاسبه شد، فرمول محاسبات به شرح ذیل می‌باشد (۱۷).

$$\text{ratio} = \frac{(E_{\text{target}})^{\Delta\text{CP}_{\text{target}}(\text{control} - \text{sample})}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta\text{CP}_{\text{ref}}(\text{control} - \text{sample})}}$$

داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS و آنالیز واریانس یک طرفه تجزیه و تحلیل شدند و برای مقایسه میانگین گروه‌ها از آزمون حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD) استفاده گردید.

جدول ۱: پرایمر های مورد استفاده در Real-Time PCR

نام آغازگر (شماره دسترسی)	توالی آغازگر	اندازه محصول PCR (bp)	Tm آغازگر
<i>GAPDH-F(2597)</i>	GTGACTAACCTGCGCTCC	۹۹	۶۰/۶۰
<i>GAPDH-R</i>	ATCACCCGGAGGAGAAATCG		۵۹/۳۰
<i>Bcl-2 F</i>	TGTGGATGACTGAGTACCTGAACC	۱۲۲	۶۸
<i>Bcl-2 R</i>	CAGGCAGGAGAAATCAAACAGAG		۶۸
<i>Bax F</i>	TTGCTTCAGGGTTTCATCCAG	۱۰۱	۶۱
<i>Bax R</i>	AGCTTCTTGGTGGACGCATC		۶۱

جدول ۲: سیکل های به کار برده شده برای انجام Real-Time PCR ژن *GAPDH* و *BAX*

مرحله	دما (درجه سانتی گراد)	زمان (ثانیه)	تعداد تکرار
فعال سازی اولیه	۹۵	۳۰۰	۱
جداسازی	۹۵	۲۰	۴۵
اتصال و طولی سازی	۶۰	۴۰	
منحنی ذوب	از ۶۵ درجه سانتی گراد به ۹۵ درجه سانتی گراد با افزایش ۰/۵ درجه ای دما به ازای هر سیکل		

جدول ۳: پروتکل سیکل های به کار برده شده برای انجام Real-Time PCR ژن *GAPDH* و *Bcl2*

مرحله	دما (درجه سانتی گراد)	زمان (ثانیه)	تعداد تکرار
فعال سازی اولیه	۹۵	۳۰۰	۱
جداسازی	۹۵	۲۰	۴۵
اتصال و طولی سازی	۶۰	۴۰	
منحنی ذوب	از ۶۵ درجه سانتی گراد به ۹۵ درجه سانتی گراد با افزایش ۰/۵ درجه ای دما به ازای هر سیکل		

Real-time RT-PCR

یافته ها

پس از استخراج RNA طبق دستورالعمل کیت

شرکت سازنده، برای کنترل کیفیت و محاسبه غلظت،

الکتروفورز بر روی ژل آگارز انجام شد (شکل ۱).

بیان ژن *BCL2* در رده سلولی CA-SKI پس از

مجاورت های دوزاژی مختلف و در بازه زمانی ۲۴ الی

۷۲ ساعت مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج حاصل

نشان داد بیان ژن *BCL2* با افزایش

دوزاژ مؤثر کاتچین در ۷۲ ساعت اول

رابطه معنی داری پیدا می کند ($p > 0.05$) (نمودار ۲)، این

ابتدا محدوده IC50 و یا به عبارتی غلظتی از

دارو که ۵۰ درصد رشد سلول ها را در

مقایسه با کنترل مهار می کند، تعیین شد.

نتایج حاکی از سمیت وابسته به دوز برای Ca SKi

هستند. تا جایی که این دارو در غلظت ۸۰ نانومول بر

لیتر منجر به کاهش ۵۱ درصدی حیات

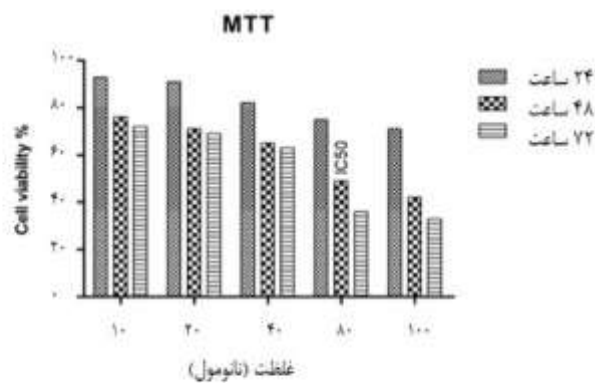
سلولی Ca SKi در مدت زمان ۴۸ ساعت

گردید (نمودار ۱).

تغییر کاهشی است و رابطه مستقیمی با دوزاژ مؤثر دارد.

بیان ژن *bax* در رده سلولی Ca-Ski پس از مجاورت‌های دوزاژی مختلف و در بازه زمانی ۲۴ الی ۷۲ ساعت مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج حاصل

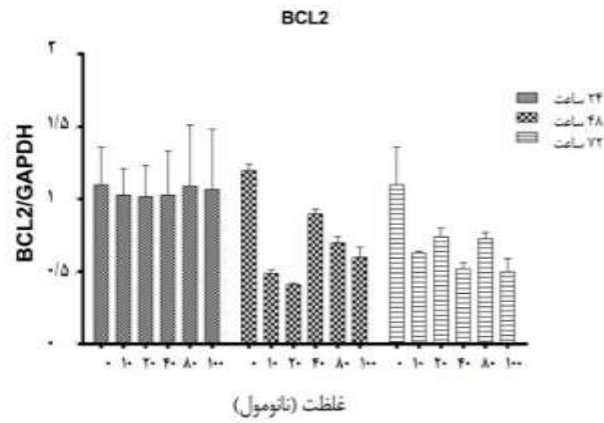
نشان داد بیان ژن *bax* با افزایش دوزاژ مؤثر کاتچین در ۷۲ ساعت اول رابطه معنی‌داری پیدا نشد ($p > 0.05$) (نمودار ۳)، اما با بالاتر رفتن دوزاژ تأثیر شاهد افزایش بیان معنی‌دار ژن *bax* هستیم، این افزایش بیان از نظر آماری معنی‌دار نیست.



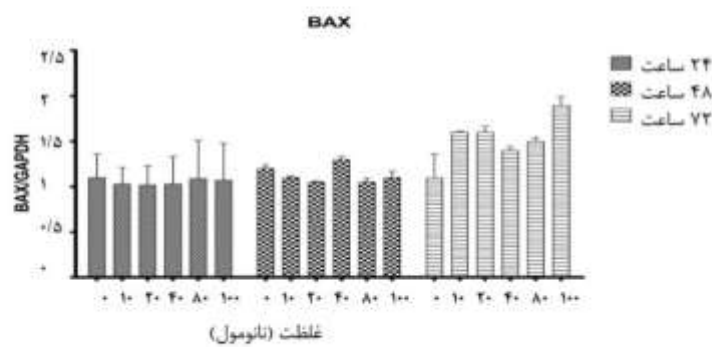
نمودار ۱: تأثیر غلظت‌های مختلف کاتچین بر حسب نانومول بر لیتر در واحد زمان بر میزان زنده ماندن سلول‌های رده Ca Ski



شکل ۱: زیرواحدهای 28S و 18S حاصل از الکتروفورز RNA استخراجی در رده سلولی Ca Ski



نمودار ۲: تغییر بیان ژن *BCL2* در رده سلولی *Ca-Ski* در مجاورت‌های دوزاژی مختلف از کاتچین ، در بازه زمانی ۲۴ الی ۷۲ ساعت



نمودار ۳: تغییر بیان ژن *BAX* در رده سلولی *Ca-Ski* در مجاورت‌های دوزاژی مختلف از کاتچین ، در بازه زمانی ۲۴ الی ۷۲ ساعت

بحث

سرطان سرویکس یا گردن رحم در لایه داخلی گردن رحم ایجاد می‌شود (۴). سلول Ca SKi یک سلول کارسینوم سرویکس انسانی است که حدود ۶۰۰ نسخه از ویروس پاپیلوم ویروسی نوع ۱۶ (HPV 16) را به ژنوم خود متصل می‌کند (۷)، تریلیون‌ها میکروب در روده انسان زندگی می‌کنند. این میکروب‌ها جامعه‌ای تشکیل می‌دهند که از طریق فعالیت‌های متابولیکی جمعی، بر روی میزبان تأثیرگذار هستند. نه تنها روده بلکه دستگاه گوارش انسان حاوی جمعیت پویایی از میکروب‌ها است که بیشتر آنها مفید و برخی از آنها خطرناک هستند. میکروب‌های موجود در روده که میکروبیوتای روده‌ای نامیده می‌شوند بر انرژی‌زایی، عملکرد طبیعی بدن، سیستم ایمنی، چاقی، لاغری، سوء تغذیه، اختلال‌های عصبی و بیماری‌ها به خصوص بیماری‌های روده‌ای و سرطان در انسان تأثیرگذار هستند (۸). کتچین یک نوع فنل و متابولیت ثانویه یک گیاه است. پلی فنول‌ها رایج‌ترین آنتی‌اکسیدان‌های مواد غذایی هستند و از طریق مهار رادیکال‌های آزاد نقش مهمی در پیشگیری از بیماری‌های مزمن از جمله سرطان دارند (۹)، لذا هدف از این مطالعه تعیین و بررسی تأثیر متابولیت‌های کاتچین حاصل از میکروبیوتای روده بر قدرت تکثیری رده سلولی Ca SKi بود.

نتایج این مطالعه نشان داد بیان ژن *bax* با

افزایش دوز ژن مؤثر کاتچین در ۷۲ ساعت اول رابطه معنی‌داری پیدا نمی‌کند، اما با بالاتر رفتن دوز ژن شاهد تأثیر افزایش بیان معنی‌دار ژن *bax* هستیم. نتایج نشان داد بیان ژن *bcl2* با افزایش دوز ژن مؤثر کاتچین در ۷۲ ساعت اول رابطه معنی‌داری پیدا می‌کند، این تغییر کاهشی است و رابطه مستقیمی با دوز ژن مؤثر دارد. *Bcl-2* یک ژن ضد آپوپتوزی می‌باشد که بقای سلول را پیش می‌برد در حالی که *bax* یک ژن پروآپوپتوزی بوده که منجر به پیشبرد مرگ سلولی می‌گردد. محصول ژن *Bcl-2* در تحریک رشد و بقا و مهار مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده نقش ایفا می‌کند. در حالی که پروتئین BAX سبب القای مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده در سلول‌ها شده و عملکردی برخلاف پروتئین BCL-2 دارد. پروتئین‌ها ساختارهای همودایمر و هتروداایمر را تشکیل می‌دهند، این دو پروتئین فاکتورهای مرتبطی با هم هستند که فرآیند مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده را تنظیم می‌کنند (۷). حاریم ارتباطی بین پاسخ به RT از بیماران سرطان دهانه رحم و میزان بیان *bax* و *Bcl-2* قبل از RT نشان نداد (۱۸). اولتوی و همکاران گزارش دادند که *bax* همودایمرها را با *bcl-2* در *in vivo* شکل می‌دهد و نسبت *Bcl-2* به *bax* بقا یا مرگ را به دنبال محرک آپوپتوتیک تعیین می‌کند (۱۹). ژیلت بیان کرد یکی از ژن‌ها *bcl-2* است که یک پروتئین سلولی مرتبط با غشای سلولی پلاسما، سلول اندوپلاسمی و میتوکندری است که در شکل پیچیده، مانع از مرگ سلولی در شرایط خاص

می‌شود (۲۰). دیمیتراکاکیس و همکاران در مطالعه خود نشان داده‌اند که بیان بالایی از *bcl-2* ممکن است به پیش‌آگهی خوب در چندین سرطان مانند؛ سرطان پستان، تخمدان و سرطان دهانه رحم و همچنین لنفوم مربوط باشد (۲۱). در پژوهش‌های چانگ، بیان پروتئین *bcl-2* در پیشرفت ضایعات دهانی تقریباً غایب نبود (۲۲). مطالعه اوهارا و همکاران نشان می‌دهد در حال حاضر، *bcl-2* بیان صرف نظر از درجه‌بندی بافتی یا پیشرفت SIL به لایه سلول پایه در تمام بیوپسی‌ها محدود شد. برخی از نویسندگان نتیجه می‌گیرند که بیان *bcl-2* ممکن است نشانگر خوبی برای پیش‌بینی پیشرفت ضایعات گردنی نباشد (۲۳). پژوهش‌های نیکلسون نشان داد که پروتئین‌های خانواده *Bcl-2* یکپارچگی غشاء خارجی بر میزان بقا میتوکندری را حفظ می‌کنند و از اعضاء آنتی آپوپتوتیک و پرو آپوپتوتیک تشکیل شده‌اند. این خانواده آزاد شدن سیتوکروم C به درون سیتوزول و در نتیجه فعال شدن، *caspase-3* را تنظیم می‌کند (۲۴). پژوهش‌های گرین و همکاران بر روی کشت کاردیومیوسیت‌ها نیز نشان دادند که داکسوروبیسین موجب افزایش بیان ژن *bax* و از طرفی موجب کاهش بیان ژن *Bcl-2* و در نهایت موجب القاء آپوپتوز در کاردیومیوسیت‌ها شده است (۲۵). بیدنر و همکاران در مطالعه خود نشان دادند که آپوپتوز به وسیله تأثیر متقابل تعداد زیادی از ژن‌هایی که مسئول تحریک یا تنظیم آپوپتوز هستند کنترل می‌شود. اعضای

خانواده *bcl-2*، با تنظیم نفوذپذیری غشاء، از تنظیم کننده‌های اصلی این روند هستند (۲۶). وو و همکاران در مطالعه خود نشان دادند. *p53* به عنوان تنظیم کننده بالا دستی ژن *bax* عمل می‌کند. این ژن سرکوبگر تومور، به ناحیه پروموتور ژن *Bax* متصل شده و مستقیماً باعث ترانس اکتیواسیون این ژن پیش آپوپتوزی می‌شود. پروموتور *bax* تنها با نوع وحشی و نه موتاسیون یافته *p53*، فعال می‌شود و به همین دلیل بین میزان بیان *p53* و بیان *bax* می‌تواند ارتباط وجود داشته باشد (۲۷). یکی از مسیرهای درگیر در آپوپتوز، مسیر درونی (یا مسیر میتوکندریایی) است. در این مسیر، تغییرات مختلف درون سلولی از جمله شرایط تنش‌های اکسیداتیو، آسیب DNA و جهش در ژن‌های مسئول در آپوپتوز می‌توانند به عنوان سیگنال‌های داخلی عمل کنند. این سیگنال‌ها منجر به برهمکنش‌های پروتئین‌های ویژه‌ای از خانواده‌ای به نام خانواده ۲-*Bcl*-Family (Bcl) شده است؛ از این طریق، سیتوکروم C از فضای بین دو غشاء میتوکندری وارد سیتوزول می‌گردد و با تشکیل کمپلکسی به نام آپوپتوزوم، مسیر آبشاری کاسپازها فعال می‌شود (۲۸). تروشوا در مطالعه خود نشان دادند که ژن *bax* یک نقطه ورود منحصر به فرد برای مسیر سیگنالینگ آپوپتوز درونی است. این مسیر به وسیله محرک‌های مختلف از جمله محرومیت سیتوکین و استرس سیتوتوکسیک آغاز می‌شود. پروتوآنکوژن *bcl-2* به عنوان یک مهارکننده آپوپتوز شناخته شده که سبب تجمع و انتشار سلول‌های

راه کار نوین درمانی با تأثیر بالا، به عنوان درمان و همچنین پیشگیری از سرطان سرویکس و از ژن *bax* به عنوان پیش آگهی در سرطان دهانه رحم بهره جست.

تقدیر و تشکر

این مقاله برگرفته از پایان‌نامه دوره کارشناسی ارشد رشته ژنتیک با کد ۲۲۰۳۰۵۰۳۹۷۱۰۰۶ دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهر می‌باشد. نویسندگان بر خود لازم می‌دانند از معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهر و تمامی کسانی که در طول اجرای این پژوهش ما را یاری کردند تقدیر و تشکر به عمل می‌آید.

حاوی تغییرات ژنتیکی شده و به نظر می‌رسد فعالیت غیرطبیعی ژن *bcl-2* می‌تواند سبب مهار آپوپتوز و تسهیل فرآیند تومورزایی گردد (۲۹). در مطالعه هریکاک تیمار کاتچین هیدرات موجب افزایش بیان آنزیم‌های استیل کولین ترانسفراز و نیتریک اکسید سنتتاز القائی و کاهش سطح واسطه‌های التهابی نظیر *TNF-α* و *IL-1β* شد. این مطالعه مشخص کرد که کاتچین هیدرات در جلوگیری از تخریب حافظه و بهبود استرس اکسیداتیو مؤثر است که با مطالعه حاضر هم‌خوانی دارد (۳۰). فولن و همکاران در مطالعه‌ای بیان کردند که کورکومین قادر است آپاپتوز را در سلول‌های سرطانی از طریق تمام مسیرهای آپاپتوزی (*ER stress pathway & Extrinsic*) القا کند که با مطالعه حاضر هم‌خوانی دارد (۳۱). مطالعه صورت گرفته به وسیله شیانگ نشان دادند که کاتچین هیدرات باعث القاء آپوپتوز وابسته به *P53* و *کاسپاز* در سلول‌های سرطان پستان انسانی می‌شود (۳۲).

پیشنهاد می‌شود تأثیر کورکومین و کاتچین بر سایر ژن‌های دخیل در آپوپتوز و تأثیر کاتچین و کورکومین در سایر رده های سلولی سرطانی و تأثیر سایر مواد حاصل میکروبیوتیک‌های رده سلولی *Ca-Ski* و تأثیر کاتچین و کورکومین بر روی سلول‌های سرطانی در نمونه‌های بالینی بررسی شود.

نتیجه‌گیری

کاتچین می‌تواند باعث افزایش بیان *BCL2* در سلول‌های سرطانی شود که می‌توان جهت ایجاد یک

REFERENCES

1. Hong S, Cheng S, Songock W, Bodily J, Laimins LA. Suppression of microRNA 424 levels by human papillomaviruses is necessary for differentiation-dependent genome amplification. *J Virol* 2017; 91(24): e01712-17.
2. Babazadeh M, Pourali L, Attaran N, Nikfarjam Z, Masoudi T, Salehi M. Demographic survey of 600 patients with gynecologic cancers in Mashhad, Iran in 1985-2012. *IJOGI* 2016; 19(3): 1-8.
3. Almasi-Hashiani A, Farahmand M. Trend of incidence rate for female genital cancers based on cancer registry data in Fars province during 2003-2009. *Feyz* 2012; 16(4): 353-60.
4. Li BH, Zhou JS, Ye F, Cheng XD, Zhou CY, Lu WG, Xie X. Reduced miR-100 expression in cervical cancer and precursors and its carcinogenic effect through targeting PLK1 protein. *Eur J Cancer* 2011; 47(14): 2166-74.
5. Martinez I, Gardiner AS, Board KF, Monzon FA, Edwards RP, Khan SA. Human papillomavirus type 16 reduces the expression of microRNA-218 in cervical carcinoma cells. *Oncogene* 2008; 27(18): 2575-82.
6. Deftereos G, Corrie SR, Feng Q, Morihara J, Stern J, Hawes SE, Kiviat NB. Expression of mir-21 and mir-143 in cervical specimens ranging from histologically normal through to invasive cervical cancer. *PloS One* 2011; 6(12): e28423.
7. Liu C, Lin J, Li L, Zhang Y, Chen W, Cao Z, et al. HPV16 early gene E5 specifically reduces miRNA-196a in cervical cancer cells. *Scientific reports. Sci Rep* 2015; 5: 7653.
8. Lozupone CA, Stombaugh JI, Gordon JI, Jansson JK, Knight R. Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature* 2012; 489(7415): 220-30.
9. Shishodia G, Shukla S, Srivastava Y, Masaldan S, Mehta S, Bhambhani S, Sharma S, et al. Alterations in microRNAs miR-21 and let-7a correlate with aberrant STAT3 signaling and downstream effects during cervical carcinogenesis. *Mol Cancer* 2015; 14: 116.
10. Tan C, Dlugosz PJ, Peng J, Zhang Z, Lapolla SM, Plafker SM, et al. Autoactivation of the apoptosis protein Bax increases mitochondrial membrane permeability and is inhibited by Bcl-2. *J Biol Chem* 2006; 281(21): 14764-75.
11. Senanayake SPJN. Green tea extract: Chemistry, antioxidant properties and food applications - A review. *J Funct Foods* 2013; 5(4): 1529-41.
12. Crespy V, Williamson G. A review of the health effects of green tea catechins in in vivo animal models. *J Nutr* 2004; 134(12): 3431-40.
13. Dürst M, Gissmann L, Ikenberg H, Zur Hausen H. A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. *Proceedings of the National Academy of Sciences. Proc Natl Acad Sci USA* 1983; 80(12): 3812-5.
14. Rafaela Macedo Mendes de OLIVEIRA. Quantification of catechins and caffeine from green tea (*Camellia sinensis*) infusions, extract, and ready-to-drink beverages. *Ciênc Tecnol Aliment Campinas* 2012; 32(1): 163-6.
15. Bosch FX. Human papillomavirus: science and technologies for the elimination of cervical cancer. *Expert Opin Pharmacother* 2011; 12(21): 2189-204.
16. Bergstrom R, Sparen P, Adami HO. Trends in cancer of the cervix uteri in Sweden following cytological screening. *Br J Cancer* 1999; 81: 159-66.
17. Sattari SH, Ahmadizadeh CH. The study of expression of *PTEN* and *AKT1* genes in co-culturing of HT29 colon cancer cell line with *Streptococcus thermophilus*. *Feyz* 2019; 22(6): 624-31.
18. Harima Y, Harima K, Shikata N, Oka A, Ohnishi T, Tanaka Y. Bax and Bcl-2 expressions predict response to radiotherapy in human cervical cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 1998; 124: 503-10.
19. Oltvai ZN, Millman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 1993; 74: 609-19.
20. Gillet G, Brun G. Viral inhibition of apoptosis. *Trends Microbiol* 1996; 4: 312-7.
21. Dimitrakakis C, Kymionis G, Diakomanolis E, Papaspyrou I, Rodolakis A, Arzimanoglou I, et al. The possible role of p53 and bcl-2 expression in cervical carcinomas and their premalignant lesions. *Gynecol Oncol* 2000; 77: 129-36.
22. Chang KC, Su IJ, Tsai ST, Shieh DB, Jin YT. Pathological features of betel quid-related oral epithelial lesions in Taiwan with special emphasis on the tumor progression and human papillomavirus association. *Oncology* 2002; 63(4): 362-9.
23. Uehara T, Kuwashima Y, Izumo T, Kishi K, Shiromizu K, Matsuzawa M. Expression of the proto-oncogene bcl-2 in uterine cervical squamous cell carcinoma: its relationship to clinical outcome. *Eur J Gynaecol Oncol* 1995; 16(6): 453-60.

24. Nicholson DW, Thornberry NA. Apoptosis. Life and death decisions. Science 2003; 299(5604): 214-5.
25. Green PS, Leeuwenburgh C. Mitochondrial dysfunction is an early indicator of doxorubicin-induced apoptosis. Biochim Biophys Acta 2002; 1588(1): 94-101.
26. Bedner E, Li X, Kunicki J, Darzynkiewicz Z. Translocation of Bax to mitochondria during apoptosis measured by laser scanning cytometry. Cytometry 2000; 41(2): 83-8.
27. Wu X, Deng Y. Bax and BH3-domain-only proteins in p53-mediated apoptosis. Front Biosci 2002; 7: d151-6.
28. Sinicrope FA, Cleary KR, Stephens LC, Lee JJ, Levin B. bcl-2 and p53 oncoprotein expression during colorectal tumorigenesis. Cancer Res 1995; 55(2): 237-41.
29. Trusheva B, Trunkova D, Bankova V. Different extraction methods of biologically active components from propolis. Suppression of microRNA 424 levels by human papillomaviruses is necessary for differentiation-dependent genome amplification. J Virol 2017; 91(24): e01712-17.
30. Hricak H, Gatsonis C, Coakley FV, Snyder B, Reinhold C, Schwartz LH, et al. Early invasive cervical cancer: CT and MR imaging in preoperative evaluation—ACRIN/GOG comparative study of diagnostic performance and interobserver variability. Radiology 2007; 245(2): 491-8.
31. Follen M, Levenback CF, Iyer RB, Grigsby PW, Boss EA, Delpassand ES, et al. Imaging in cervical cancer. Cancer 2003; 98(20): 28-38.
32. Xiang LP, Wang A, Ye JH, Zheng XQ, Polito CA, Lu JL, et al. Suppressive Effects of Tea Catechins on Breast Cancer. Nutrients 2016; 8: 458-72.

The Effect of Catechin Metabolites Derived from Intestinal Microbiota on Ca SKi Cell Proliferation

Khojaste E¹, Ahmadizadeh CH^{1*}

Department of Bioogy, Ahar Branch, Islamic Azad university, Ahar , Iran

Received: 20 Des 2019

Accepted: 27 Jan 2020

Abstract

Background & aim: Cervical cancer is the second leading cause of death in women in Iran. Papillomavirus infection is the most important risk factor for developing cervical cancer. Ca SKi cell is a human cervical carcinoma cell that attaches the papillomavirus type 16 to its genome. Catechin is a phenol and a secondary metabolite of a plant. The aim of this study was to determine the effect of catechin metabolites derived from intestinal microbiota on the proliferative capacity of Ca SKi cell line.

Methods: In the present in vitro experimental study, catechin metabolites were extracted from fecal samples containing intestinal microbiota by HPLC method and cell line was treated with different concentrations of catechin for 24 and 48 hours. The cytotoxic effects of Ca SKi bacterial cell extract were investigated by MTT assay. After RNA extraction and cDNA preparation, the expression of *bax*, *bcl2* gene in Ca SKi cell line was examined by Real Time PCR. Data were analyzed using one-way analysis of variance

Results: No significant associaton was obseerved with increasing *bax* gene expression and the effective dose of catechin in the first 72 hours ($p > 0.05$), but with increasing dose effect, a significant increase in *bax* gene expression was seen. The results indicated that the expression of *bcl2* gene was significantly related to the increase in the effective dose of catechin in the first 72 hours. This change was decreasing and had a direct relationship with the effective dose.

Conclusion: Catechin may increase the expression of *BCL2* in cancer cells, which could be used as a treatment as well as prevention of cervical cancer and *bax* gene as a prognosis in cervical cancer to develop a new therapeutic effect.

Keywords: Catechin, Intestinal Microbiota, Ca Ski Cell Line

Corresponding author: Ahmadizadeh CH, Department of bioogy, Ahar Branch, Islamic Azad university, Ahar, Iran

Email: dr_ahmadizadeh@yahoo.com

Please cite this article as follows:

Khojaste E, Ahmadizadeh CH. The Effect of Catechin Metabolites Derived from Intestinal Microbiota on Ca SKi Cell Proliferation. Armaghane-danesh 2020; 25(5): 657-670.