

Original Article

Differential Proteomics analysis (2D) of prostate cancer cell lines under the treatment of natural antioxidant Oleuropein

Zahra Rakhshidan¹, Mohammad Zaefizadeh^{2*}, Bahare Pahlavan³

¹Department of Biology, Faculty of Sciences, Ahar Branch, Islamic Azad University, Ahar, Iran

²Department of Biology, Faculty of Sciences, Ardabil Branch, Islamic Azad University, Ardabil, Iran

³Department of Surgery, Faculty of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

*Corresponding author; E-mail: mzaefi@gmail.com, mzaefi@iauardabil.com

Received: 14 November 2017 Accepted: 25 February 2018 First Published online: 18 November 2019

Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2019;41(5):56-64

Abstract

Background: Prostate cancer is the most common cancer in men. Identification of cancer nature, progress and the mechanism of its inhibition have been always scientific important issues. The aim of this study was to analyze the effect of olives Oleuropein particles on protein expression levels in prostate cancer cell line, LNCap.

Methods: Survival test (MTT) has been applied in 8 concentrations of Oleuropein: 19, 39, 78, 156, 312, 625, 1250, and 2500 in LNCap cell line, as well differential comparative proteomics analyses has been performed. Two dimensional electrophoresis results in relation to differential proteins have been identified by MS- MALDI-TOF-TOF approach, as their aligns have been recognized in Mascot Database.

Results: Survival test demonstrates that olive Oleuropein controlled LNCap cells growth and increased their roundness. LNCap cells have most been controlled in 625ppm concentration. *GSTP1* and *DMNT1* proteins have been identified as differential proteins in Oleuropein treated samples. Where comparing to controls, *DMNT1* had been downregulated. On the other hand *GSTP1* had been upregulated in 625 ppm Oleuropein treated samples.

Conclusion: Oleuropein may be effective for inhibition of prostate cancer cells in LNCap cell line, by affecting protein expression, antioxidant genes expression, some transcriptional factors expression in relation with cells leading toward apoptosis direction, and metastasis activity reduction.

Keyword: Prostate Cancer, Oleuropein, Proteomics, Differential Protein Expression

How to cite this article: Rakhshidan Z, Zaefizadeh M, Pahlavan B. [Differential Proteomics analysis (2D) of prostate cancer cell lines under the treatment of natural antioxidant Oleuropein]. Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2019;41(5):56-64. Persian.

مقاله پژوهشی

آنالیز پروتئومیکس افتراقی (دوبعدی) رده سلولی سرطانی پروستات تحت تاثیر آنتی اکسیدان طبیعی اولئوروپین زیتون

زهرا رخشیدن^۱، محمد ضعیفی زاده^{۲*}، بهاره پهلوان^۳

^۱ گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، واحد اهر، دانشگاه آزاد اسلامی، اهر، ایران
^۲ گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، واحد اردبیل، دانشگاه آزاد اسلامی، اردبیل، اردبیل، ایران
^۳ گروه جراحی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران
 * نویسنده مسؤل: ایمیل: mzaefi@gmail.com و mzaefi@iauardabil.com

دریافت: ۱۳۹۶/۸/۲۳ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۲/۶ انتشار برخط: ۱۳۹۸/۸/۲۷
 مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی- درمانی تبریز. آذر و دی ۱۳۹۸؛ ۴۱(۵): ۵۶-۶۴

چکیده

زمینه: سرطان پروستات شایع ترین سرطان بدخیم در مردان است. شناخت ماهیت و روند سرطان و مکانیزم‌های مهار آن همواره از موضوعات مهم و مطرح در علم می باشد. هدف از این پژوهش بررسی مکانیزم اثر اولئوروپین موجود در عصاره زیتون بر روی میزان بیان پروتئین‌های رده سلولی سرطانی پروستات LNCap می باشد.

روش کار: آزمون زنده مانی (MTT) در ۸ سطح اولئوروپین ppm ۲۵۰۰ و ۱۲۵۰ و ۶۲۵، ۳۱۲، ۱۵۶، ۷۸، ۳۹ و ۱۹ در رده سلولی LNCap، در قالب طرح CRD اعمال و آنالیز پروتئومیکس مقایسه‌ای افتراقی انجام شد. نتایج الکتروفورز دو بعدی برای پروتئین‌های افتراقی از طریق MS- MALDI-TOF-TOF و Align آن‌ها در Mascot Database مورد شناسایی قرار گرفتند.

یافته‌ها: نتایج آزمون زنده مانی نشان می دهد اولئوروپین زیتون می تواند رشد سلول‌های سرطانی LNCap را کنترل و میزان گردشگی سلول‌ها را افزایش دهد. بیشترین میزان این کنترل رشد در غلظت ۶۲۵ ppm بوده است که در این دز بیشترین القای اپاپتوز اتفاق افتاده بود. پروتئین‌های *DMNT1* و *GSTP1* به عنوان پروتئین‌های افتراقی در اثر تیمار با اولئوروپین نسبت به شاهد شناسایی شدند، به طوری که با اعمال تیمار ۶۲۵ ppm اولئوروپین پروتئین *DNMT1* نسبت به نمونه شاهد کاهش بیان (*Down Regulate*) و *GSTP1* افزایش بیان (*Up Regulate*) داشت.

نتیجه گیری: اولئوروپین از طریق اعمال تغییر بر بیان پروتئین‌ها، افزایش بیان ژن‌های آنتی اکسیدان، بیان برخی فاکتورهای رونویسی، هدایت سلول‌ها به مسیر اپاپتوز و کاهش فعالیت‌های متاستازی، در مهار سلول‌های سرطانی پروستات رده LNCap موثر بوده است.

کلید واژه ها: سرطان پروستات، اولئوروپین، پروتئومیکس، پروتئین‌های افتراقی.

نحوه استناد به این مقاله: رخشیدن ز، ضعیفی زاده م، پهلوان ب. آنالیز پروتئومیکس افتراقی (دوبعدی) رده سلولی سرطانی پروستات تحت تاثیر آنتی اکسیدان طبیعی اولئوروپین زیتون. مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی- درمانی تبریز. ۱۳۹۸؛ ۴۱(۵): ۵۶-۶۴

حق تألیف برای مؤلفان محفوظ است.

این مقاله با دسترسی آزاد توسط دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی- درمانی تبریز تحت مجوز کرییتیو کامنز (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>) منتشر شده که طبق مفاد آن هرگونه استفاده تنها در صورتی مجاز است که به اثر اصلی به نحو مقتضی استناد و ارجاع داده شده باشد.

مقدمه

سرطان پروستات یکی از شایع‌ترین سرطان‌های تشخیص داده شده در مردان است. از نظر تعداد موارد تشخیصی دومین و ششمین رتبه منجر به مرگ را در بین سرطان‌های مردان دارد. بیش از نیمی از موارد و مرگ‌ها در کشورهای پیش‌تر توسعه یافته اتفاق می‌افتد (۱). عوامل متعددی خطر ابتلا به این بیماری را افزایش می‌دهند. این فاکتورها شامل افزایش سن، نژاد و وراثت می‌باشد. همچنین فاکتورهای محیطی از قبیل رژیم غذایی و التهاب، و نیز تغییرات جغرافیایی در پاتوزن سرطان پروستات نقش دارند. بسیاری از فاکتورهای شیمی درمانی مانند الکسین، فلوتامید و نیلاندرول به صورت گسترده‌ای در درمان این بیماری مورد استفاده قرار می‌گیرند. با این حال، عوارض جانبی نامطلوب مانند بی‌اختیاری ادرار و مشکلات جنسی در سرطان پروستات می‌تواند میزان سودمندی شیمی درمانی را کاهش دهد (۱، ۲). لذا جستجو برای یافتن ترکیباتی با عوارض جانبی کم یا بدون عوارض جانبی که از پیشرفت سرطان جلوگیری می‌کند و محافظت در برابر اثرات بیولوژیکی ناشی از عوامل شیمی درمانی در مقایسه با عواملی که در حال حاضر مورد استفاده است یکی از بزرگ‌ترین دغدغه‌های دانشمندان است. مطالعات اخیر نشان داده‌اند که مکمل‌های غذایی، مانند ویتامین E، ویتامین D، سویا، چای سبز، زردچوبه، سبزیجات و میوه‌جات و یا عصاره غنی از ترکیبات پلی‌فنولیک، نقش مهمی در پیشگیری از سرطان پروستات بازی می‌کنند (۲). این بیماری با سبک زندگی غربی وابسته به یک رژیم غذایی حاوی چربی بالا، گوشت قرمز و فراورده‌های لبنی در ارتباط است (۳). هم‌چنین در برخی مطالعات دخالت کلسیم (۳) و اسیدالفالینولیک (۴) در این مورد به اثبات رسیده است. در مقابل، اثرات محافظتی برخی رژیم‌های غذایی مانند کسانی که در آسیا به مقدار زیادی دانه‌های سویا که حاوی استروژن گیاهی است مصرف می‌کنند نسبت داده شده است که اثر پیشگیرانه بر روی سرطان پروستات دارند (۵). هم‌چنین نشان داده شده است مصرف لیکوپن از محصولات گوجه‌فرنگی به عنوان یک آنتی‌اکسیدان به منظور کاهش خطر ابتلا به سرطان پروستات موثر است (۴). در بعضی از مطالعات دیگر اثر پیشگیرانه و درمانی آنتی‌اکسیدان‌های پلی‌فنلی چای سبز شامل کاتچین و اپی‌کاتچین بر روی سرطان پروستات نشان داده شده است (۴) و نهایتاً رژیم غذایی حاوی سلنیوم و ویتامین E در دست بررسی می‌باشد که هر دو ماده آنتی‌اکسیدان هستند و سبب افزایش سیستم ایمنی بدن و القاء آپوپتوز در سلول‌های سرطانی می‌شوند (۴). اولئورپین ترکیبی با فرمول $C_{25}H_{23}O_{13}$ و وزن مولکولی ۵۴۰ (واحد) دارای خواص بیولوژیک آنتی‌اکسیدانی بوده و قابلیت مهار کردن رادیکال آزاد را دارا می‌باشد. اولئورپین چندین خاصیت دارویی شامل خاصیت‌های آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی، آنتی‌آدرورژنیک، ضدسرطان، ضد میکروب، ضد ویروس، ضد پیری و

حفاظت از پوست می‌باشد. این ماده یک عامل قدرتمند آنتی‌اکسیدان و ضدگرزایی می‌باشد، که مستقیماً از طریق مختل ساختن رشته‌های اکتین در سلول‌ها عمل می‌کند؛ بنابراین به‌عنوان یک ترکیب قوی ضدسرطان می‌باشد. اولئورپین از تکثیر و پخش رشته‌های توموری پیشرفته در روش واکنش به مقدار دارو جلوگیری می‌کند (۴). این ماده یک ترکیب غیرسمی با خواص مفید متعدد می‌باشد، جالب توجه این‌که اولئورپین رشد، تحرک و مهاجم سلولی را مهار می‌کند. هم‌چنین که باعث گرد شدن سلول می‌شود، پدیده‌ای که به اختلال اسکلت سلولی اکتین مرتبط شده است (۳). تکمیل پروژه ژنوم انسانی سبب جهشی در استفاده از فن‌آوری‌های ژنومی و پروتئومی برای شناسایی مارکرها به منظور تشخیص زود هنگام سرطان با هدف مولکولی شده است.

پروتئومیکس عبارت از مطالعه و بررسی پروتئوم موجود زنده در مقیاس زیاد می‌باشد. بر عکس ژنوم، پروتئوم یک مجموعه‌ی پویا از پروتئین‌هاست که نشان دهنده‌ی برنامه‌ی ژنتیکی ذاتی سلول و تاثیر فوری محیط می‌باشد (۵، ۶). بنابراین پروتئوم نمایش واقعی تری از وضعیت بیولوژیکی سلول را در مقایسه با ژنوم فراهم می‌کند، پس پروتئوم بیشتر از ژنوم برای ارزیابی حضور بیماری، پیشرفت بیماری و پاسخ به درمان مفید است (۶). پروتئومیکس یک روش علمی برای سنجش همه انواع پروتئین در یک سلول یا بافت می‌باشد (۷). در طول ترانسفورماسیون یک سلول به یک سلول سرطانی تغییرات مجزایی در سطح پروتئین اتفاق می‌افتد این تغییرات شامل تغییر در بیان، دیفرانسیل اصلاح پروتئین، تغییر در فعالیت‌های خاص و لوکالیزه شدن نایجا می‌باشد. محققان برای شناسایی و درک این تغییرات مطالعات پروتئومیکس سرطان را پیشنهاد کرده‌اند (۸).

از آنجایی که افراد مختلف دارای اطلاعات ژنتیکی متفاوتی هستند، لذا بیان پروتئینی مختلفی خواهند داشت. از این رو یکی از کاربردهای پروتئومیکس این است که با تعیین پروتئوم هر شخص، بتوان داروی اختصاصی تری برای درمان مؤثر هر فرد طراحی کرد (۹). کشف بیومارکرهای نوین برای تشخیص سرطان پروستات به تعیین بدخیم بودن سرطان پروستات در معاینات بعد از درمان و پیش‌بینی نتایج پس از درمان‌های اختصاصی، کمک‌کننده است. از آنجا که اغلب سرطان‌های پروستات ناشی از ترانسفورماسیون بدخیم سلول‌های ترشحی تمایز یافته می‌باشند، اپیتلیوم پروستات می‌تواند در گسترش بیماری نوع بدخیم و خوش خیم دخالت داشته باشد. سرطان پروستات در مراحل اولیه خود چندین علامت دارند. با این حال، زمانی که اندازه‌ی آن‌ها به طور قابل توجهی افزایش یافت و به مراحل پیشرفته‌تر رسید، روش‌های درمانی مؤثر اندکی در دسترس هست. این وضعیت نامطلوب، ضرورت استفاده از رویکردهای پروتئوم برای یافتن بیومارکرهای جدید به‌ویژه در

نمونه‌ها با خط رگرسیون و ضریب تبیین (R^2) و مقدار اولیه استاندارد تعیین گردید.

استخراج پروتئین: ۷۵۰ میکرولیتر بافر استخراج پروتئین به ازای ۱ میلیون سلول اضافه شد. پس از هموژنیزه کردن نمونه و قرار دادن آن به مدت ۲۵ الی ۶۰ دقیقه در اولتراسونیک در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، سانتریفیوژ به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۰۰۰۰ rpm و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انجام شد. مایع رویی حاوی پروتئین‌ها به میکروتیوپ جدید انتقال داده شد.

الکتروفورز تک‌بعدی SDS-PAGE. محلول‌ها و بافرهای لازم شامل محلول استوک آکریل‌امید، بافر ژل پایین، بافر ژل بالا، بافر الکترو، بافر نمونه (۵X)، پرسولفات آمونیوم ۱۰ درصد و TEMED ۱۰ درصد می‌باشد. برای انجام الکتروفورز قالب ژل به تانک الکتروفورز متصل و ولتاژ در نیم ساعت اول بر روی ۵۰ و در بقیه زمان الکتروفورز روی ۷۰ ولت تنظیم شد.

یک حجم بافر نمونه ۵X به چهار حجم نمونه جهت آماده‌سازی اضافه شده ۱۵ میکرولیتر از هر نمونه دورن چاهک‌ها ریخته شد. برای رنگ‌آمیزی ژل با کوماسی آبی R-250 مورد استفاده قرار گرفت.

الکتروفورز دوبعدی: برای تهیه ژل در بعد اول یا ایزوالکتریک فوکوسینگ (IEF) از ژل‌های نواری (IPG) دارای طول ۱۸ سانتی‌متر با رنج pH در محدوده بین ۳-۱۰ استفاده شد. برای شروع الکتروفورز دوبعدی آبدی ژل‌های نواری خشک بر مبنای ۱۰۰۰ میکروگرم در استریپ در بافر آبدی (اوره، بروموفنیل‌بلو، آمفولیت، DTT، CHAPS)، و در مجموع به میزان ۳۵۰ میکرولیتر بافر آبدی (Rehydration Buffer) صورت گرفت.

ایزوالکتروفوکوسینگ با استفاده از دستگاه Gehealthcare ETTAN IPG Phor 3 Amersham IEF ۱۸ سانتی‌متری در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد انجام شد. برای الکتروفورز در بعد دوم جهت متعادل‌سازی استریپ‌ها، نوارها در محلول متعادل کننده SDS-PAGE طی دو مرحله قرار داده شد: مرحله اول متعادل‌سازی به مدت ۲۰ دقیقه در بافر تریس ۰/۰۵ مولار با pH معادل ۸/۸ و حاوی SDS ۴ درصد (W/V)، اوره ۶ مولار، دی‌تیوتریتول (DTT) یک درصد (W/V) و گلیسرول ۳۰ درصد (W/V) و مرحله بعدی متعادل‌سازی به مدت ۲۰ دقیقه دیگر در همان محلول که حاوی یدواستامید ۵ درصد (W/V) به جای DTT. پس از این مرحله و قبل از استفاده از هر یک از دو محلول فوق برموفنیل‌بلو جهت ایجاد رنگ آبی اضافه گردید. در نهایت بافرهای متعادل کننده جهت متعادل‌سازی نوارهای IEF استفاده شدند. نوار IEF که در بافر متعادل کننده به تعادل رسیده بود بر روی ژل متراکم کننده قرار داده شد و پس از برقراری جریان، الکتروفورز در ولتاژ ثابت انجام گردید. ولتاژ در نیم ساعت اول ۱۰۰ و در بقیه زمان الکتروفورز ۷۰ ولت بود. بعد

مراحل اولیه بدخیمی و نیز درک مکانیسم‌های مولکولی پیشرفت تومور را خاطر نشان می‌سازد (۱۰).

با توجه به این که محصول برخی ژن‌ها می‌تواند در مهار یا کنترل سرطان‌ها نقش داشته باشد و وجود آنتی اکسیدان‌ها به‌عنوان یک محرک در بیان برخی ژن‌ها مطرح گردیده است (۱۱)، در مطالعه حاضر بر روی ترکیب گیاهی و آنتی اکسیدانی اولئوروپین تمرکز گردید که این ترکیب در گونه‌های مربوط به خانواده زیتون یافت می‌شود. هدف از این پژوهش، مطالعه آنالیز پروتئومیکس افتراقی سلول‌های سرطانی تحت تاثیر آنتی اکسیدان طبیعی اولئوروپین در رده سلولی سرطانی پروستات (LNCap) می‌باشد.

روش کار

در این مطالعه حاضر از رده سلولی LNCap تهیه شده از انستیتو پاستور استفاده گردید. این سلول‌ها از نوع Adherent می‌باشد و در موقع کشت دادن به کف فلاسک چسبیده و رشد می‌کند. این سلول‌ها را می‌توان در محیط کشت RPMI1640 که حاوی ۱۰٪ FBS می‌باشد کشت داد و هر دو الی سه روز یکبار محیط کشت آن را تعویض نمود. سلول‌های LNCap بعد از دفریز کردن در بن‌ماری ۳۷ درجه سانتی‌گراد، در فلاسک‌های حاوی محیط کشت RPMI 1640 حاوی ۱۰ درصد FBS و ۱ درصد پنی‌سیلین-استرپتومایسین در انکوباتور با رطوبت ۹۰ و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به همراه ۵ درصد دی‌اکسیدکربن کشت داده شد. برای ارزیابی میزان تکثیر از روش (2-(4,5Dimethylthiazol-3-MTT Bromide)-2,5-Diphenyltetrazolium YI) استفاده شد. پس از ۲۴ ساعت تیمار با ۹ غلظت مختلف عصاره الئوروپین (۳۹، ۷۸، ۱۵۶، ۳۱۲، ۶۲۵، ۱۲۵۰، ۲۵۰۰، ۵۰۰۰ ppm)، محیط داخل هر چاهک خالی و مجدداً به هر چاهک ۱۸۰ μl محیط بدون FBS به همراه ۲۰ μl محلول MTT (۵ میلی‌گرم MTT در یک میلی‌لیتر PBS با pH= ۷/۲) اضافه شده به مدت ۲-۳ ساعت انکوبه شد. سپس محیط داخل چاهک خالی شده و به هر چاهک ۲۰۰ میکرولیتر DMSO اضافه شده به مدت ۱۰ دقیقه تکان داده شد تا فورمازون تولید شده توسط سلول‌های زنده در DMSO کاملاً حل شود. OD نمونه در ۵۴۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

روش تهیه الئوروپین: جهت استانداردسازی مقدار mg ۰/۰۰۱ از ماده استاندارد اولئوروپین با مقدار ۰/۰۰۱ mg KBr و پنج استاندارد داخلی با غلظت‌های مختلف (۱۰۰، ۵۰، ۲۵، ۱۲/۵ و ۶/۲۵) در درجه حرارت محیط و با کمک دستگاه پرس‌کننده قرص‌ها تهیه شده و در طیف‌های بین ۴۰۰۰-۶۰۰ نانومتر توسط دستگاه FTIR خوانده شدند. طیف‌های به دست آمده از نمونه استاندارد با پیک‌های اولئوروپین حاصل از FTIR مقایسه و عدد مربوط به هر پیک تأیید و تعیین و نمودار رگرسیونی برای هر یک از طیف‌ها ترسیم شد. مقادیر اولئوروپین موجود در

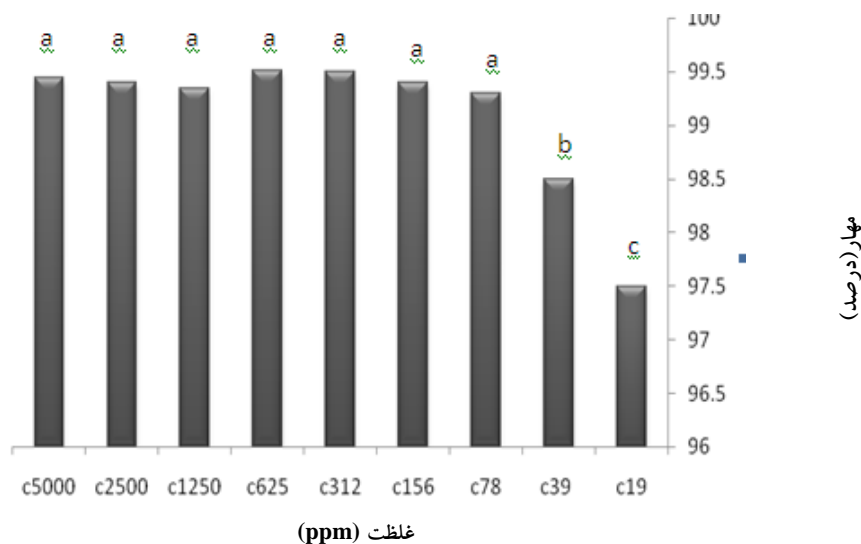
اولئوروپین اختلاف معنی داری ($Pvalue \leq 0/001$) وجود دارد. بدین معنی که غلظت‌های اولئوروپین از لحاظ کنترل رشد سلول‌های سرطانی LNCap متفاوت عمل کردند. مقایسه ی میانگین میزان کنترل رشد (پس از ۲۴ ساعت) توسط غلظت‌های اولئوروپین به روش دانکن در سطح احتمال ۵ درصد (شکل ۱) نشان داد که بیشترین کنترل سلول‌های سرطانی زمانی اتفاق می‌افتد که میزان غلظت به کار رفته اولئوروپین $625 \mu\text{g/ml}$ بوده باشد. هرچند که تفاوت آماری با غلظت‌های $2500 \mu\text{g/ml}$ ، 5000 ، 312 و 156 ندارد. یعنی در این سطح کنترل افزایش غلظت تا سطح ۸ برابر معنی دار نبوده است. غلظت‌های ۱۹ و 39 میکروگرم در میلی‌لیتر حداقل کنترل را بر روی رشد سلول‌های سرطانی LNCap داشته‌اند. غلظت ۱۹ میکروگرم در میلی‌لیتر در گروه C و غلظت 39 میکروگرم در میلی‌لیتر در گروه b و بقیه غلظت‌ها در گروه a قرار می‌گیرند. نکته قابل توجه این‌که حتی اعمال حداقل غلظت اولئوروپین یعنی $19 \mu\text{g/ml}$ در حدود ۹۸٪ کنترل بر روی سلول‌های سرطانی LNCap نشان داده است که این کنترل بسیار اهمیت دارد.

از اتمام الکتروفورز، ژل از قالب شیشه‌ای جدا شده و به روش کوماسی بلو G250 رنگ‌آمیزی گردید. همه مراحل مربوط به الکتروفورز دویبعی و جداسازی اسپت‌های مورد نظر در آزمایشگاه مجهز و مخصوص مرکز ملی زیست فناوری و مهندسی ژنتیک ایران انجام گرفت.

از نرم‌افزار SPSS برای مطالعه آماری داده‌های MTT برای مقایسه اختلاف معنی دار بین گروه‌ها (غلظت) از لحاظ OD در سطح احتمال کمتر از ۱٪ از آزمون LSR استفاده شد. بررسی ارجحیت غلظت‌ها از لحاظ OD توسط آزمون دانکن مورد بررسی قرار گرفت. و از معادله‌ی رگرسیون جهت تعیین درصد خطی بودن نمودار و میزان R2 استفاده شد. برای آنالیز نتایج الکتروفورز دویبعی از نرم‌افزار Melani استفاده شد اسپت‌های افتراقی بوسیله MALDI TOF TOF MS مورد شناسایی قرار گرفت و با استفاده از MASSCOT میزان همخوانی بررسی شد.

یافته‌ها

بر اساس نتایج آزمون زنده‌مانی به روش MTT، تجزیه واریانس برای غلظت‌های متفاوت اولئوروپین (۱۹، ۳۹، ۷۸، ۱۵۶، ۳۱۲، ۶۲۵، ۱۲۵۰، ۲۵۰۰ و 5000 ppm) پس از ۲۴ ساعت از لحاظ کنترل رشد سلول‌های LNCap نشان داد که بین غلظت‌های



(حروف نامشابه نشانگر اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۵٪)

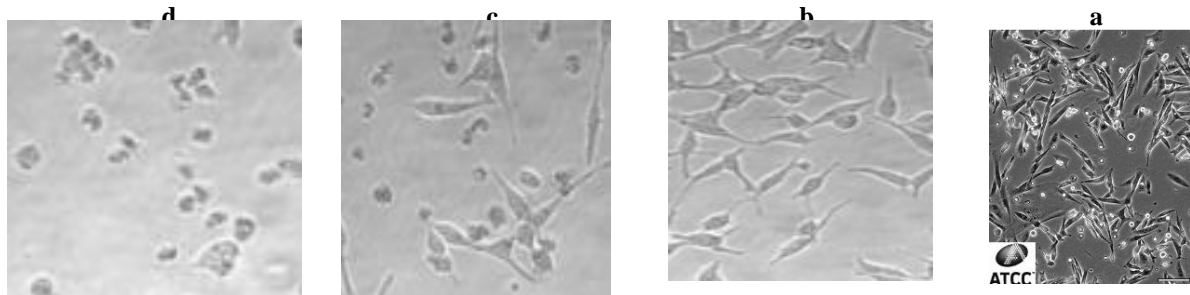
شکل ۱: نتایج مقایسه میانگین میزان کنترل رشد سلول‌های سرطانی در غلظت‌های متفاوت اولئوروپین پس از ۲۴ ساعت اعمال تیمار به روش دانکن در سطح احتمال ۵٪

طریق آزمون T-تست مورد مقایسه قرار گرفت. پس از جستجوی نقاط توسط نرم افزار و حذف برخی خطاهای موجود در انتخاب اسپات‌ها تعداد ۸۹ اسپات شناسایی شد که ۳۶ مورد مربوط به نمونه شماره ۱ (نمونه شاهد که اعمال تیمار اولئوروپین بر روی آن صورت نگرفته بود) و ۵۳ مورد مربوط به نمونه شماره ۲ (نمونه تیمار شده با دوز ۶۲۵ ppm اولئوروپین) بود. لازم به ذکر است که محدوده گسترش اسپات‌ها در یک طرف ژل بیشتر بود که این منطقه در محدوده ۴-۴/۵ Pi واقع شده است. مطالعه و مقایسه اسپات‌ها میان دو نمونه شاهد و نمونه تیمار شده با اولئوروپین وجود پروتئین‌هایی با بیان متفاوت را نشان داد.

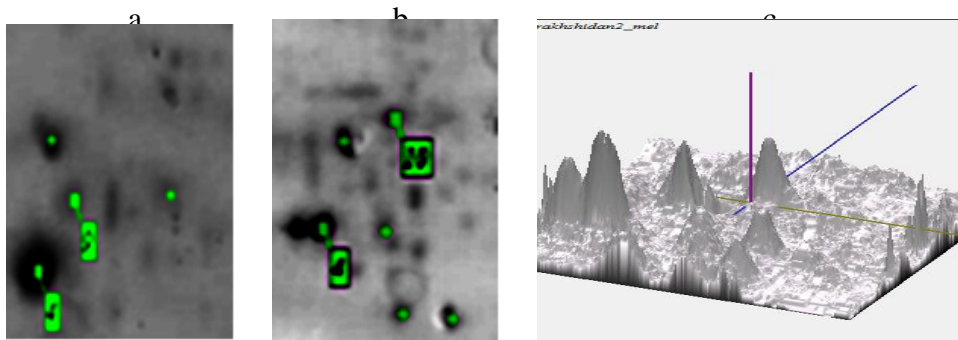
از میان اسپات‌ها اسپات شماره ۱۰ با بیان بالا در نمونه تیمار شده و عدم بیان در نمونه شاهد مشاهده گردید (شکل ۳). در هم‌ردیفی ms حاصل از ms مالدی تاف تاف پروتئین حاضر با $Score = 130$ با احتمال $P < 0.05$ پروتئین *GSTP1_HUMAN* شناسایی شد. این پروتئین یک پروتئین انسانی است که pI آن ۵/۴۳ و وزن مولکولی آن ۲۳۵۶۹ برآورد شده است. میزان همخوانی آن از نظر سکونس ۶۱٪ بود. این پروتئین در حالت تیمار با ۶۰۰ ppm اولئوروپین بیان بالایی نسبت به نمونه شاهد داشت و در شاهد بیان نشده بود.

تصاویر میکروسکوپی "invert" در شرایط نرمال و نیز غلظت‌های مختلف تیمار اولئوروپین (شکل ۲) درج شده است. در حالت نرمال محیط کشت، شکل سلول‌ها (شکل b۲) کاملاً شبیه سل‌لاین LNCap استاندارد منتشر شده توسط سایت آمریکایی ATCC بوده (شکل a۲) و اشکال سلول‌ها گوشه‌دار و زاویه‌دار بوده است. با اعمال تیمارها ضمن کنترل رشد سلول‌های سرطانی پس از اعمال ۲۴ ساعت، اشکال سلول‌ها به صورت گرد تمایل شده و القای آپوپتوز در آن‌ها نشان دهنده‌ی کنترل رشد سلول‌های مربوطه است با توجه به مشاهده سلول‌های تیمار نشده و مقایسه مورفولوژی آن‌ها با سلول‌های تیمار شده تفاوت مورفولوژی قابل رویت می‌باشد (شکل c۲)، با افزایش غلظت اولئوروپین افزایش القای آپاپتوزیس در سلول‌ها بیشتر شده (شکل d۲)، کاهش حجم، متراکم شدن و تغییر شکل دیواره قابل مشاهده است.

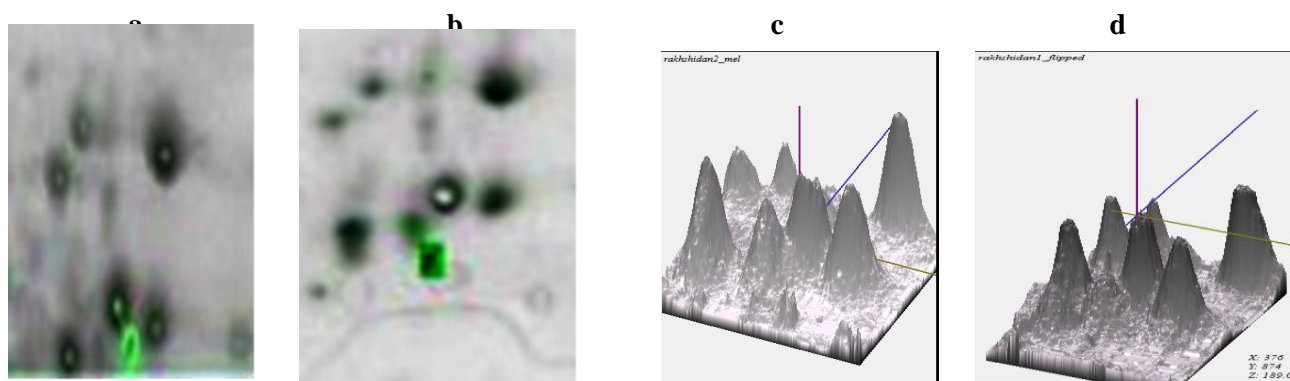
الکتروفورز دوبعدی در چهار سطح از غلظت تیمار اولئوروپین انجام شد. این ژل‌ها با استفاده از دستگاه GS-800 Calibrated Densitometer (BioRad) اسکن شدند. سپس از مقایسه تصاویر بدست آمده، میانگین مساحت اسپات به عنوان شاخص بیان پروتئین‌ها در دو نمونه با استفاده از نرم‌افزار Melani، محاسبه و از



شکل ۲: سلول‌های سرطانی LNCap در حالت استاندارد (a) و بدون اعمال اولئوروپین (b)، اعمال ۲۰۰ ppm اولئوروپین (c) و اعمال ۶۲۵ ppm اولئوروپین (d)



شکل ۳: اسپات (*GSTP1_HUMAN*) ۱۰ در ژل الکتروفورز ۲ بعدی از نمونه تیمار شده با اولئوروپین b و شاهد a و نحوه بیان سه‌بعدی آن c



شکل ۴- اسپات ۳ (DNMT1_HUMAN) در ژل الکتروفورز ۲ بعدی از نمونه تیمار شده با اولئوروپین **b** و شاهد **a** و نحوه بیان سه بعدی آن **c** در تیمار شده و نحوه بیان سه بعدی آن **d** در تیمار نشده

روی سلول‌های MCF-7 با بیش‌بیانی Her2، بقای سلول سرطان سینه را کاهش می‌دهد. اولئوروپین تکثیر سلولی آدنوکارسینومای سینه انسان (MCF7)، کارسینومای مثانه و اندوتلیال مویرگی مغز گاوی را مهار می‌کند (۱۰-۱۴) هم‌چنین Kimura نشان داد تاثیرات پیشگیرانه‌ی عصاره ی برگ زیتون و اولئوروپین روی آسیب پوستی مزمن ناشی از UV و سرطان و رشد تومور ممکن است موجب مهار بیان VEGF, MMP-2, MMP-9, MMP-13 و از طریق یک کاهش در سطوح COX-2 گردد (۱۷). در مطالعه حاضر، الکتروفورز دوبعدی، وجود اسپات‌های پروتئینی متفاوتی را در دو نمونه فاقد تیمار و پس از اعمال تیمار اولئوروپین، نشان می‌دهد. بیان برخی از پروتئین‌ها پس از اعمال تیمار اولئوروپین افزایش پیدا کرده و بیان برخی از پروتئین‌ها پس از اعمال تیمار کاهش پیدا کرده است. این امر نشانگر این است که اولئوروپین با مکانیسم‌های متفاوتی بیان برخی ژن‌ها را تحت تاثیر قرار می‌دهد و این تغییر سلول‌های سرطانی پروستات را در جهت القاء آپوپتوز یا در جهت نرمال شدن سلول‌های سرطانی پیش می‌برد. اسپات‌های پروتئینی شناسایی شده به وسیله الکتروفورز دوبعدی در رده سلولی سرطانی پروستات LNCap که در اثر اعمال تیمار اولئوروپین متفاوت بودند. مطالعه و مقایسه اسپات‌ها میان دو نمونه شاهد و نمونه تیمار شده با اولئوروپین وجود پروتئین‌هایی با بیان متفاوت را نشان داد. از میان این اسپات‌ها، اسپات‌های شماره ۱۰ نسبت به نمونه شاهد Up-regulated و اسپات پروتئینی شماره ۳، که در نمونه تیمار شده نسبت به نمونه شاهد Down-Regulated شده بود. با توجه به نتایج به دست آمده از Maldi Tof Tof اسپات شماره ۱۰ ژن GSTP1 شناسایی شد. این ژن در نمونه تحت تیمار قرار گرفته با اولئوروپین نسبت به نمونه شاهد Up-regulated شده در حالی که در نمونه شاهد که سلول‌های سرطانی بدون تیمار با ماده اولئوروپین بود، بیان نشده بود. به نظر می‌آید که اولئوروپین سبب بیان این ژن شده است. آنزیم گلوکوتایون-اس-ترانسفراز خانواده بزرگی از آنزیم‌های فاز دو می‌باشد (با جرم مولکولی 23-30 KD)

اسپات پروتئینی شماره ۳ در نمونه تیمار شده با اولئوروپین نسبت به نمونه شاهد Down-regulated شده بود (شکل ۴). در align ms حاصل از ms مالدی تاف تاف، این پروتئین با Score= ۱۷۱، با احتمال $P < 0.05$ پروتئین DNMT1_HUMAN شناسایی شد. این پروتئین یک پروتئین انسانی است که pI آن ۷/۹۹ و وزن مولکولی آن ۱۸۵۳۸۸ برآورد شده است. میزان همخوانی آن از نظر سکونس ۵۰٪ بود. این پروتئین در حالت تیمار با اولئوروپین نسبت به نمونه شاهد کاهش بیان داشت. به نظر می‌رسد که اولئوروپین باعث کاهش بیان این پروتئین شده است.

بحث

طبق نتایج آزمون MTT، اولئوروپین توانسته به میزان ۹۹٪ رشد سلول‌های سرطانی را کنترل نماید. به طوری که موثرترین غلظت کنترلی اولئوروپین ۶۲۵ $\mu\text{g/ml}$ بود، هرچند که با غلظت ۲۵۰۰ $\mu\text{g/ml}$ تفاوت چندانی نداشته است. اولئوروپین حتی در غلظت بسیار کم ۱۹ $\mu\text{g/ml}$ نیز توانسته اثر مهاری خود را به میزان ۹۸٪ در محیط *in vitro* اعمال کند. اولئوروپین این کنترل رشد سلول‌های سرطانی را، از طریق افزایش و یا کاهش بیان برخی از ژن‌ها انجام می‌دهد. نتایج مطالعه حاضر با نتایج مطالعات محققان دیگر همخوانی داشت. در مطالعه مشابه دیگری اثر بازدارندگی اولئوروپین بر روی رده سلولی سرطان سینه MCF7 به اثبات رسیده است (۱۱) Hassan و Menendez گزارش نمودند، اولئوروپین سبب کاهش بیان انکوژن Her2 می‌شود که در ایجاد بدخیمی نقش دارد (۱۲، ۱۳) و نیز به دلیل عدم وجود یا وجود تاثیرات سمی بسیار کم و دسترسی زیستی خوب آن، چندین مرحله از پیشرفت سرطان را مورد هدف قرار می‌دهد (۱۰). این نتیجه می‌تواند ناشی از اثر القای اپاپتوتیک اولئوروپین بر سلول‌های سرطانی پروستات باشد. Hanrahan, Menendez و Goulas نشان دادند که اولئوروپین قوی‌ترین ترکیب فنولی است که با تاثیرات توموریدیکال (انهدام سلول‌های سرطانی) قوی بر

کاهش بیان ژن DNMT1 امکان متیل گذاری کاهش یافته و احتمالاً ژن های سایلنس شده مجدداً بیان خواهد شد. نتایج به دست آمده از مطالعه ما نیز این مسئله را تایید می کند. کاهش بیان DNMT1 در نتایج حاصل از مطالعات ما نشان می دهد که امکان متیل گذاری بر روی سیتوزین جزایر CpG در تقسیم های بعدی کاهش می یابد و امکان برگشت ژن های خاموش شده از طریق متیلاسیون وجود دارد، بطوریکه ژن خاموش شده GST که متیله شدن آن مارکر سرطان پروستات می باشد پس از اعمال ۲۴ ساعت اولئوروپین بطور معنی دار افزایش بیان نشان داده است و این دلیلی بر ادعای فوق است.

نتیجه گیری

بر اساس نتایج مطالعه حاضر، اولئوروپین در سلول های سرطانی LNCap پروستات باعث مهار آن شده است. این مهار در مسیرهای القاء آپوپتوز و نیز کاهش متاستاز صورت گرفته است. همچنین مصرف اولئوروپین و مطالعه تاثیر آن در پروتئین های بیانی از طریق آنالیز پروتئومیکس دوبعدی نشان داد که بیان پروتئین GSTP1 در اثر مصرف اولئوروپین نسبت به نمونه شاهد افزایش و بیان پروتئین DNMT1 در اثر مصرف اولئوروپین نسبت به نمونه شاهد کاهش یافته است، که توجه کننده مکانیسم های مهارتی تاثیر بر مراحل سرطان، استرس اکسیداتیو، تغییر وضعیت هورمونی، اصلاح مسیرهای انتقال سیگنال دهی سلولی، تنظیم بیان ژن از طریق هیپرمتیلاسیون و هیپومتیلاسیون و نفوذ در سیستم ایمنی می باشد.

قدردانی

این مقاله نتیجه پایان نامه کارشناسی ارشد خانم زهرا رخشیدن به شماره ۲۲۰۳۰۵۰۲۹۴۱۰۱ می باشد. بدین وسیله از زحمات مسئولین آزمایشگاه ژنتیک مولکولی دانشگاه آزاد اسلامی اردبیل خانم مریم اسمعیل زاده و حسینعلی شیخی به خاطر همکاری در اجرای پروژه و خانم یاسمین پهلوان دانشجوی دکتری پزشکی مولکولی بابت ویراستاری علمی مقاله حاضر، نهایت سپاس گذاری را داریم.

ملاحظات اخلاقی

ملاحظات اخلاقی شامل نمی شود.

منابع مالی

منابع مالی ندارد.

منافع متقابل

منافع متقابلی از تالیف یا انتشار این مقاله وجود ندارد.

مشارکت مؤلفان

ز.م.ض و ب.پ: طراحی، اجرا و تحلیل نتایج مطالعه را بر عهده داشت. هر سه نویسنده مقاله را تالیف نموده و نسخه نهایی آن را خوانده و تایید کرده اند.

که در سم زدایی ترکیبات خارجی زیستی نقش دارد. ژن GST به شش دسته شامل ایزوفرم های آلفا-موچی-تتا-سیگما و زتا تقسیم می شود. اگر چه پلی مورفیسم لوکوس در هر شش کلاس ژن های خانواده GST شناسایی شده است، اما بیشترین پلی مورفیسم ها در لوکوس ژن های GSTT1 و GSTM1 که به ترتیب روی کروموزوم ۲۲ و ۱ قرار دارند، متمرکز شده است. ژن های کلاس GSTM به صورت یک خوشه ژنی متشکل از ژن های GSTM1 تا GSTM5 در ناحیه کروموزوم P133 1 قرار گرفته اند (۲۶). محققان در پژوهشی که در مورد تاثیر لیکوپن بر روی رده سلولی سرطانی پروستات گزارش کردند که در میان گلوکوتایون اس ترانسفرازها نوع GSTP1 و GSTO1 دچار تنظیم افزایشی شدند (۱۸).

نتایج بدست آمده از Maldi Tof Tof در مطالعه نشان داد که بیان نسبی ژن DNMT1 که مربوط به اسپات شماره ۳ بود در نمونه شاهد، نسبت به سلول سرطانی با اعمال تیمار افزایش داشته است، این ژن در سلول های سرطانی پروستات در تیمار با اولئوروپین مهار شده است. متیلاسیون DNA شناخته شده ترین مارکر اپی ژنتیک به شمار می رود (۱۹). متیلاسیون DNA توسط خانواده ای از آنزیم ها به نام DNA متیل ترانسفرازها (DNMTs) و با استفاده از S-آدنوزیل متیونین (SAM)، به عنوان کوسوبسترا انجام می پذیرد. در این فرآیند SAM عموماً به عنوان دهنده ی گروه متیل نقش ایفاء می نماید، چراکه این ترکیب از نظر شیمیایی دارای گروه های متیل مناسب برای متیلاسیون DNA RNA، هیستون ها، ناقلین عصبی، فسفولیپیدهای غشایی، پروتئین ها و مولکول های کوچک متعدد می باشد (۲۰). ژن DNMT1 بر روی کروموزوم ۱۹ انسان قرار دارد. نقش این ژن استقرار و تنظیم الگوهای بافت خاصی از سیتوزین است. الگوی متیلاسیون نابجا با برخی از تومورهای انسانی و توسعه اختلال ها مرتبط است (۲۲-۲۱). بررسی اثرات اپی ژنتیکی اولئوروپین بر روی ژن DNMT1 نشان می دهد که پس از تعیین غلظت مناسب اولئوروپین برای تیمار رده های سلولی LNCap و مقایسه میزان بیان ژن DNMT1 با نمونه های فاقد تیمار می توان گفت که اولئوروپین خاصیت مهارکنندگی DNMT1 را با ایجاد هیپومتیلاسیون جزایر CPG در پروموتور این ژن انجام می دهد و سبب احیای بیان ژن های سرکوبگر توموری که حین سرطانی خاموش شده اند، می شود. این یافته با یافته های محققان دیگر همخوانی دارد (۱۲ و ۱۳).

در مطالعه قبلی ما (۱۹) پژوهشی در مورد نقش اولئوروپین در بیان ژن DNA متیل ترانسفراز در رده سلولی سرطانی پروستات انجام دادیم. در این پژوهش غلظت های مختلف نانو اولئوروپین بر روی میزان بیان ژن DNMT1 با استفاده از روش Real time PCR بررسی گردید. نتایج نشان داد که بیان نسبی ژن DNMT1 با اعمال تیمار ۳۰ ppm نانو اولئوروپین در رده سلولی سرطانی پروستات به طور معنی دار کاهش یافته بود. بدیهی است که با

References

1. Hee Lee C, Jin Jeong S, Sun-Mi Y, JiHyun K, HyoJung L, Kwang Seok A, et al. Down-regulation of phosphoglucosyltransferase 3 mediates sulfuraphane-induced cell death in LNCaP prostate cancer cells. *Proteome Science* 2010; **8**: 67-75. doi: 10.1186/1477-5956-8-67.
2. Yaşam B, Orhan D, Meltem Ç, SenemCeren K. Abdurrahman Mithat, Bozdayand Fulya Yücesan. Effect of Turkish propolis extracts on proteome of prostate cancer cell line. *Proteome Science* 2011; **9**: 74-85. doi: 10.1186/1477-5956-9-74
3. Chan J M, Stampfer M J, Ma J, Gann PH, Gaziano J M, Giovannucci E L. Dairy products, calcium, and prostate cancer risk in the Physicians' Health Study. *Am J Clin Nutr* 2001; **74**: 549-554. doi: 10.1093/ajcn/74.4.549
4. Armstrong B, Doll R. Environmental factors and cancer incidence and mortality in different countries, with special reference to dietary practices. *Int J Cancer* 1975; **15**: 617-631. doi: 10.1002/ijc.2910150411
5. Lippman S M, Goodman P J, Klein E A, Parnes H L, Thompson I M. Designing the Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial (select). *J Natl Cancer Inst* 2005; **97**: 94-102.
6. Aparicio Gallego G, Díaz Prado S, Jiménez Fonseca P, García Campelo R, Cassinello Espinosa J, Antón Aparicio L.M. Review: Green Tea Polyphenols in Chemoprevention of Prostate Cancer: Preclinical and Clinical Studies. *Clin Transl Oncol* 2007; **9**(11): 694-702. doi: 10.1007/s12094-007-0126-0
7. Venter J C, Adams M D, Myers E W, Li P W, Mural R J, Sutton G G. The sequence of the human genome. *Science* 2001; **291**(5507): 1304-1351. doi: 10.1016/s0002-9394(01)01077-7
8. Zamanian-Azodi M, Rezaie-Tavirani M, Heydari-Kashal S, Kalantari S, Dailian S, Zali H. Proteomics analysis of MKN45 cell line before and after treatment with Lavender aqueous extract. *Gastroenterology Hepatol Bed Bench* 2011; **5**: 42-51.
9. Rozek W, Ciborowski P S. Proteomics and Genomics. *Neuroimmune Pharmacology, Springer* 2008; **2**: 725-741.
10. Pooladi M, Sobhi S, Khaghani R A, Hashemi M, Moradi A, Zali A R. The Investigation of Heat Shock Protein (HSP70) Expression Change in Human Brain Astrocytoma Tumor. *Iran J Cancer Prevent* 2013; **6**: 6-11.
11. Hashemi M, Eskandari-Nasab E, Fazaeli A, Taheri M, Rezaei H, Mashhadi M. Association between polymorphisms of glutathione S-transferase genes (*GSTM1*, *GSTP1* and *GSTT1*) and breast cancer risk in a sample Iranian population. *Biomarkers in medicine* 2012. doi: 10.2217/bmm.12.61
12. Hassan Z K, Elamin M H, Daghestani M H, Omer S A, Al-Olayan E M, Elobeid M A. Oleuropein induces anti-metastatic effects in breast cancer. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 2012; **13**(9): 4555-4559. doi: 10.7314/apjcp.2012.13.9.4555
13. Menendez J A, Vazquez-Martin A, Colomer R, Brunet J, Carrasco-Pancorbo A, Garcia V. TabAnti-HER2 (erbB-2) oncogene effects of phenolic compounds directly isolated from commercial Extra-Virgin Olive Oil (EVOO). *BMC Cancer* 2008; **8**: 377. doi: 10.1186/1471-2407-8-377
14. Menendez J A, Vazquez-Martin A, Oliveras-Ferraro C, Garcia-Villalba R, Carrasco-Pancorbo A, Fernandez-Gutierrez A, et al. Extra-virgin olive oil polyphenols inhibit HER2 (erbB-2)-induced malignant transformation in human breast epithelial cells: relationship between the chemical structures of extra-virgin olive oil secoiridoids and lignans and their inhibitory activities on the tyrosine kinase activity of HER2. *International journal of oncology* 2009; **34**(1): 43-51. doi: 10.3892/ijo_00000127
15. Menendez J A, Vazquez-Martin A, Colomer R, Brunet J, Carrasco-Pancorbo A, Garcia-Villalba R. Olive oil's bitter principle reverses acquired autoresistance to trastuzumab (Herceptin™) in HER2-overexpressing breast cancer cells. *BMC Cancer* 2007; **7**: 80. doi: 10.1186/1471-2407-7-80
16. Hanrahan K, O'Neill A, Principe M, Bugler J, Murphy L, Fabre A, et al. The role of epithelial-mesenchymal transition drivers ZEB1 and ZEB2 in mediating docetaxel-resistant prostate cancer. *Mol Oncol* 2016; **6**: 120-131. doi: 10.1002/1878-0261.12030
17. Goulas V, Exarchou V, Troganis A N, Psomiadou E, Fotsis T, Briasoulis E, et al. Phytochemicals in olive-leaf extracts and their antiproliferative activity against cancer and endothelial Cells. *Mol Nutr Food Res* 2009; **53**: 600-608 doi: 10.1002/mnfr.200800204
18. Kimura Y, Sumiyoshi M. Olive leaf extract and its main component oleuropein prevent chronic ultraviolet B radiation-induced skin damage and carcinogenesis in hairless mice. *J Nutr* 2009; **139**: 2079-2086. doi: 10.3945/jn.109.104992
19. Dehgani M, Vahidi S, Hagirossadat B B, Shargoddini M, Sheykha M. Examination the frequency distribution of GST1 genes deletion in varicocele men and its relation with sperm parameters. *Yazd Shahid Sadoogi Medical Unive* 2011; **2**(3): 350-360. (Persian)
20. Xi Qiu, Yang Y, Avani V, Michael A. Effects of Lycopene on Protein Expression in Human Primary Prostatic Epithelial Cells. *Cancer Prev Res* 2013; **6**: 419-446. doi: 10.1158/1940-6207.capr-12-0364
21. Zaefi Zadeh M, Alivand M, Mohammad Ganji Sh. Investigation of Methyl withdraws probability from silenced genes promoter region through prostate cancer element by means of olive Oleoresin. Ardebil Azad Unive. *Investigation assistance area* 2013; **8**: 25-31. (Persian)
22. Zamani M. [Polymeric Nonocorcomin effects on long non-coding RNA expression of MEG3, miR-29a and miR-185 genes in human cancer cell lines]. *Tarbiat modarres unive* 2011. (Persian)