

افزایش بیان ژن CD82 در رده سلولی PC-3 سرطان پروستات تیمار شده با سیلیبینین

محمدجواد مختاری^{۱*}، محمدعلی شکرگزار^۲، نسرین معتمد^۳، عظیم اکبرزاده^۴، مجید مؤمنی^۵، احمد رضا کامیاب^۱، رزیتا عدالت^۶، شهرام آذری^۷، امیر امان‌زاده^۸

- ۱- دانشجوی دکتری تخصصی، گروه زیست‌شناسی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
- ۲- دانشیار، بانک سلولی ایران، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
- ۳- دانشیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده زیست‌شناسی، پردیس علوم، دانشگاه تهران، تهران، ایران
- ۴- استاد، بخش پالوت بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
- ۵- کارشناس ارشد، گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
- ۶- کارشناس ارشد، بخش ویروس‌شناسی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
- ۷- دانشجوی دکتری تخصصی، بانک سلولی ایران، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
- ۸- دکتری حرفه‌ای دامپزشکی، بانک سلولی ایران، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

پذیرش مقاله: ۸۹/۰۵/۰۶

دریافت مقاله: ۸۹/۰۳/۰۲

چکیده

هدف: سرطان پروستات یکی از شایع‌ترین سرطان‌ها در کشورهای پیشرفته است. در بیشتر موارد مرگ و میر ناشی از سرطان به خاطر پیشرفت متاستازی است، از این‌رو جلوگیری از فرآیند متاستازی ضرورت دارد. سیلیبینین نوعی ترکیب فلاوونوئیدی است که تکثیر سلولی را مهار می‌کند و سبب مرگ سلول‌های سرطان پروستات انسانی می‌شود. در این مطالعه بیان ژن CD82 در سلول‌های PC-3 تیمار شده با غلظت‌های افزایشی سیلیبینین ارزیابی شد که می‌تواند منجر به افقی تازه در درمان سرطان پروستات باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه سلول‌های PC-3 با غلظت‌های متفاوت سیلیبینین به مدت ۲۴ ساعت تیمار شدند. LD₅₀ تعیین، RNA با استفاده از تریزول استخراج و سپس cDNA سنتز شد. آغازگرهای اختصاصی برای ژن‌های CD82 و GAPDH با استفاده از نرم‌افزار اختصاصی طراحی شد. میزان بیان ژن CD82 نسبت به ژن GAPDH در غلظت‌های مختلف سیلیبینین با استفاده از روش بسیار حساس Real-Time PCR کمی بررسی شد.

نتایج: بیان ژن CD82 در سلول‌های PC-3 تیمار شده با غلظت‌های ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میکروگرم در هر میلی‌لیتر سیلیبینین در مدت ۲۴ ساعت، به ترتیب به میزان $1/97 \pm 0/26$ ($P < 0/05$)، $3/00 \pm 0/26$ ($P < 0/01$) و $3/48 \pm 0/43$ ($P < 0/01$) افزایش یافت.

نتیجه‌گیری: نتایج حاصل از Real-Time PCR کمی نشان داد که سیلیبینین احتمالاً می‌تواند سبب کاهش متاستازی در سلول‌های PC-3، از طریق افزایش بیان ژن مهارکننده متاستاز CD82 شود.

کلیدواژگان: سیلیبینین، CD82، سرطان پروستات، متاستازی، Real-Time PCR

۱- مقدمه

پروستات به شکل غده‌ای کوچک در زیر مثانه قرار گرفته و بخش بالایی مجرای ادراری را در بر می‌گیرد. در کشورهای توسعه یافته، سرطان پروستات دومین سرطان رایج (بعد از سرطان پوست) و دومین سرطان مرگ‌آور (بعد از سرطان ریه) در مردان است. از هر شش مرد یک نفر به این سرطان مبتلا می‌شود [۱]. با افزایش شیوع و مرگ و میر ناشی از سرطان پروستات و نقصان روش‌های شیمی‌درمانی و پرتودرمانی در فرم‌های پیشرفته این سرطان، نیاز به شیوه‌های جدیدی برای کنترل این سرطان احساس می‌شود. پیشرفت سرطان در یک دوره طولانی مدت، به‌ویژه سرطان پروستات که در جمعیت میانسالی یا پیر دیده می‌شود، نشان‌دهنده این است که تغییرات ژنتیکی و اپی‌ژنتیکی زیادی برای رشد و پیشرفت سرطان پروستات لازم است. بنابراین ترکیباتی مانند کمپروپونشن‌ها (Chemoprevention) که باعث مهار یا به تأخیر انداختن یک یا چند مرحله از مراحل پیشرفت سرطان می‌شود به‌طور مؤثر می‌تواند باعث کاهش سرطان شود [۲]. این ترکیبات به‌صورت طبیعی یا مصنوعی وجود دارند که با هدف مهار، ایجاد وقفه یا تغییر دادن فرآیندهای ایجاد سرطان استفاده می‌شود. ویژگی این ترکیبات، غیرسمی بودن آن‌ها (آثار سمی کم)، مصرف خوراکی، پایین بودن هزینه و دسترسی آسان برای عموم است. بسیاری از کمپروپونشن‌ها دارای مکانیسم‌های عمل چندگانه هستند [۳]. سیلیمارین (Silymarin) یک فلاوونوئید پلی‌فنولیک است که از دانه‌های گیاه خارمریم (سیلیبیوم مارینوم: *Silybum marianum*) استخراج می‌شود و به‌طور عمده از سیلیبینین (Silibinin) (تا ۹۰ درصد) و مقدار کمی از ترکیبات دیگر از جمله ایزوسیلیبین (Isosilibinin)، دهیدروسیلیبین (Dehydrosilibinin)، سیلیدیانین (Silidianin)، سیلیکرسیتین (Silicristin) و تاکسی‌فولین (Taxifolin) تشکیل شده است. در حدود سه دهه است که سیلیمارین و سیلیبینین در کشورهای اروپایی به‌صورت بالینی به‌عنوان ترکیبات ضد سمی کبد استفاده می‌شود. مطالعات سال‌های اخیر نشان می‌دهد که

سیلیبینین پتانسیل ضد سرطانی علیه بسیاری از سرطان‌های بافت پوششی (Epithelial) از جمله سرطان پروستات دارد؛ البته مکانیسم عمل آن به‌طور کامل شناخته نشده است [۴-۶]. علاوه بر این اثر ضد سرطانی سیلیبینین بر رده‌های سلولی سرطان‌های دیگری از جمله ریه [۷]، کلون [۸]، مثانه [۹]، پوست [۱۰] و دهانه رحم [۱۱] هم مشاهده شده است. اخیراً مطالعات روی اثر ضد سرطانی سیلیبینین رشد چشمگیری داشته که نشان‌دهنده اهمیت این موضوع است [۵].

متاستاز (Metastasis) سرطان علت اصلی مرگ بیماران سرطانی است [۱۲]. در حالی که تومور اولیه توسط جراحی و رادیو درمانی قابل ریشه‌کن کردن است، درمان فرم‌های متاستازی به سبب پراکنده شدن در سرتاسر بدن مشکل است و در نهایت منجر به مرگ بیمار می‌شود. از جمله آنزیم‌هایی که در فرایند متاستازی شرکت می‌کند MMPها (Matrix Metalloproteinase) است که ماتریکس خارج سلولی را تجزیه می‌کند [۱۳]. از طرف دیگر، بیش از بیست ژن مانند nm23 (NME1)، کادهرنین E (E-cadherin)، KiSS1، BrMS1، MKK4 و CD82 شناسایی شده که مهار کننده‌های فرایند متاستازی است [۱۴، ۱۵]. این پروتئین ابتدا در سلول‌های T شناسایی شد. محصول ژن CD82 یک پروتئین ترانس‌ممبران (Transmembrane) نوع III متعلق به ابرخانواده تتراسپنین (Tetraspanin) است که در اتصالات سلولی نقش دارد [۱۶]. پروتئین CD82 با برخی از پروتئین‌های غشایی نظیر $\alpha 4\beta 1$ ، CD4، CD8، CD19 و مولکول‌های MHC (Major Histocompatibility Complex) و برخی از مولکول‌های انتقال پیام داخل سلولی نظیر پروتئین کیناز C و فسفاتیدیل اینوزیتول ۴-کیناز میان‌کنش دارد. بنابراین به‌عنوان واسطه‌ای در انتقال علائم (Signals) خارج سلولی به داخل سلولی عمل می‌کند [۱۷، ۱۸]. بیان این ژن در رده‌های سلولی مشتق شده از سرطان پروستات در مقایسه با بافت طبیعی پروستات کاهش می‌یابد [۱۹]. همچنین گزارش شده است که بیان ژن CD82 طی پیشرفت سرطان پروستات در انسان و سرطان‌های دیگری از جمله پانکراس [۲۰]، ریه [۲۱]، مثانه

RPMI1640 حاوی ۱۰ تا ۲۰ درصد سرم جنین گاوی (Fetal Bovine Serum: FBS)، دو میلی‌مولار گلوتامین، دو گرم در لیتر بی‌کربنات، ۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر پنی‌سیلین (Penicillin) و ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر استرپتومایسین (Streptomycin) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در یک اتمسفر مرطوب با غلظت پنج درصد CO_2 کشت شد [۳۰].

۲-۲- آنکوباسیون سلول‌ها با سیلیسین و تعیین LD_{50}

غلظت منبع اصلی سیلیسین (Sigma, USA)، ۱۰۰ میلی‌گرم در هر میلی‌لیتر در دی‌متیل سولفوکسید (Dimethyl Sulfoxide: DMSO) بود که از آن غلظت‌های مختلف (۰ میکروگرم در هر میلی‌لیتر، ۱۰۰ میکروگرم در هر میلی‌لیتر، ۱۵۰ میکروگرم در هر میلی‌لیتر، ۲۰۰ میکروگرم در هر میلی‌لیتر) در محیط کشت RPMI-1640 تهیه شد. با استفاده از فرمول‌های زیر میزان سمیت و بقای سلولی محاسبه شد. سپس میزان LD_{50} سیلیسین در مدت زمان ۲۴ ساعت با استفاده از نرم‌افزار Pharm (Pharmacologic calculation system statistical package, Springer-Verlag, USA) محاسبه شد.

[۲۲]، کبد [۲۳]، معده [۲۴]، سینه [۲۵]، کلورکال (Colorectal Cancer) [۲۶]، تخمدان [۲۷]، مری [۲۸] و سرطان دهانه رحم [۲۹] کاهش می‌یابد.

استفاده از داروهای گیاهی در کشور ایران سابقه طولانی دارد. گیاه خارمریم گیاه بومی ایران است و در اکثر مناطق شمالی، مرکزی و جنوبی ایران رویش دارد. در این مطالعه خواص ضد سرطانی سیلیسین به‌عنوان یکی از ترکیبات گیاه خارمریم بررسی شد. هدف محققان حاضر از مطالعه گذشته و مطالعه حاضر، بررسی اثر سیلیسین بر چسبندگی، مهاجرت و تهاجم سلول‌های PC-3 (Human prostate adenocarcinoma) از طریق تنظیم بیان ژن CD82 بود. علت انتخاب رده سلولی PC-3 رفتار تهاجمی بیشتر در مقایسه با رده‌های سلول‌های DU145 و LNCaP سرطان پروستات است.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- کشت سلول

رده سلولی PC-3 از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه شد (NCBI, C427). این سلول‌ها، در محیط کشت

$$100 \times \frac{\text{میانگین جذب سلول‌های تیمار شده با سیلیسین}}{\text{میانگین جذب سلول‌های تیمار نشده با سیلیسین}} - 1 = \text{درصد سمیت سلولی}$$

$$\text{درصد سمیت سلولی} = 100 - \text{درصد بقا سلولی}$$

سانتریفوژ (Eppendorf 5804R, Germany) شد. بخش آبی بالایی با ۵۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول مخلوط شد و پس از مدت زمان ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با سرعت $12000 \times g$ سانتریفوژ شد. سپس اتانول ۷۵ درصد به رسوب RNA اضافه شد. در ادامه، سانتریفوژ به‌مدت پنج دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با سرعت $7500 \times g$ صورت گرفت تا RNA شسته شود. در مرحله آخر RNA در آب DEPC (Diethylpyrocarbonate) حل شد.

۲-۳- استخراج RNA

برای استخراج RNA، دو میلی‌لیتر ترایزول (Trizol) (Invitrogen, USA) به فلاسک‌های حاوی سلول‌های PC-3 تیمار شده با غلظت‌های متفاوت سیلیسین اضافه و نمونه‌ها ۵ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس میزان ۴۰۰ میکرولیتر کلروفرم به هر نمونه افزوده شد و پس از تکان دادن شدید و سه دقیقه قرار گرفتن در دمای اتاق، به‌مدت ۱۵ دقیقه با سرعت $12000 \times g$ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد

۲-۴- ارزیابی خلوص و کیفیت RNA استخراج شده

در این مرحله مقدار و خلوص RNA استخراج شده با استفاده از فتونانومتر (IMPLEN GmbH, Germany) تعیین شد. نسبت جذب نوری RNA (Optical Density: OD) در طول موج‌های ۲۶۰ نانومتر به ۲۸۰ نانومتر و ۲۶۰ نانومتر به ۲۳۰ نانومتر سنجش شد. از نمونه‌هایی که نسبت OD ۲۶۰/۲۸۰ نانومتر میان ۱/۸ تا ۲/۲ و نسبت OD ۲۶۰/۲۳۰ میان ۱/۷ تا ۱/۹ داشتند برای سنتز cDNA استفاده شد.

۲-۵- ساخت DNA مکمل (cDNA)

مولکول‌های DNA مکمل با کیت 1st Strand cDNA Synthesis (Roche, Germany) ساخته شد. مخلوط واکنش شامل یک میکروگرم RNA، دو میکرولیتر بافر واکنش، چهار میکرولیتر MgCl₂ (۲۵ میلی‌مولار)، دو میکرولیتر مخلوط داکسی نوکلئوتید تری فسفات (۱۰ میلی‌مولار)، دو میکرولیتر آغازگر الیگو داکسی تیمین (۱/۶ میکروگرم، 0.04 A₂₆₀units)، یک میکرولیتر مهارکننده آنزیم RNase (۵۰ واحد)، ۰/۸ میکرولیتر آنزیم رونوشت‌بردار معکوس AMV (Arteriovenous Malformation) (۲۰ واحد) و آب استریل (تا حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر) بود. سپس برنامه دمایی- زمانی به صورت ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه، ۴۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ دقیقه، ۹۹ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه و ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انجام شد.

۲-۶- الکتروفورز با ژل آگارز (Agarose Gel Electrophoresis)

ابتدا ژل آگارز یک و نیم درصد [یک و نیم گرم پودر آگارز در ۱۰۰ میلی‌لیتر بافر ۰/۵X TBE (Tris-Borate-EDTA)] مخلوط با رنگ اتیدیوم بروماید (Ethidium Bromide) آماده شد، سپس محصولات تکثیر شده ژن هدف و مرجع طی Real-Time PCR روی ژل آگارز بارگذاری و الکتروفورز شد. این مرحله برای تأیید

تکثیر قطعات اختصاصی هر ژن و عدم حضور محصولات غیراختصاصی و جفت شدن آغازگرها انجام شد.

۲-۷- طراحی آغازگرها

در این مطالعه ژن CD82 واقع بر کروموزوم ۱۱ (۱۱p۱۱،۲) و ژن GAPDH (Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase) واقع بر کروموزوم ۱۲ (۱۲p۱۳) به ترتیب به عنوان ژن هدف و ژن مرجع انتخاب شد. سپس توالی ژن‌ها از سایت <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> گرفته شد و با نرم افزار Primer Express (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) نسخه ۳/۰ برای ژن‌های مورد مطالعه آغازگرهای (Primers) اختصاصی طراحی شد. توالی آغازگرهای جلویی و برگشتی ژن هدف CD82 به صورت:

5' ACGTGGGCACAGGCAGAA 3' :جلویی
3' TGACTTTGATACAGGCTGAGCC 5' :برگشتی

و برای ژن مرجع GAPDH به صورت:

5' ACACCCACTCCTCCACCTTTG 3' :جلویی
5' TCCACCACCCTGTTGCTGTAG 3' :برگشتی

بود. صحت توالی آغازگرها و اطمینان از عدم اتصال آن‌ها به توالی‌های غیراختصاصی در بخش‌های دیگر ژنوم، BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) انجام شد.

۲-۸- Real-Time RT-PCR

در این مطالعه از دستگاه Real-Time PCR مدل ABI 7300 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA.) با بسته نرم افزاری SDS (Sequence Detection System) (نسخه ۱، ۲، ۳) استفاده شد. برنامه زمانی- گرمایی دستگاه در سه مرحله انجام شد. مرحله اول که منجر به واسرشته شدن (Denaturation) مولکول‌های cDNA و فعال شدن آنزیم پلیمرز می‌شود به صورت ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه، مرحله دوم ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه و ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه برای ۴۰ چرخه متوالی و

رقت‌های متوالی برای آغازگرها و DNA استاندارد به همراه واکنش فاقد cDNA الگو (No Template Control)، برای هر ژن در پلیت ۹۶ خانه‌ای انجام شد.

$$100 \times [1 - (-1/\text{SLOPE})] = \text{درصد کارایی واکنش تکثیری}$$

(SLOPE: شیب منحنی استاندارد)

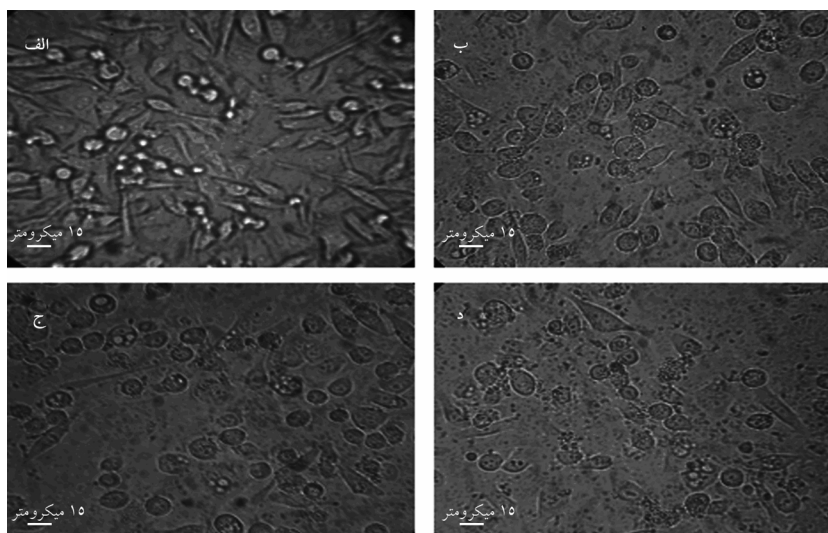
سپس برای هر واکنش PCR یک منحنی تکثیر (Amplification Curve) رسم شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها براساس مقایسه چرخه آستانه انجام شد. در این مطالعه، اختلاف چرخه‌های آستانه به‌دست آمده از نمونه‌های مورد آزمایش (سلول‌های تیمار شده با سیلیبین) و نمونه‌های کنترل (سلول‌های تیمار نشده با سیلیبین) محاسبه و با استفاده از فرمول $\Delta\Delta C_t$ ، نسبت ژن هدف به ژن مرجع از طریق $2^{-\Delta\Delta C_t}$ محاسبه شد.

۲-۹- تجزیه و تحلیل‌های آماری

نتایج به‌دست آمده در این مطالعه براساس حداقل سه تکرار استوار است که با گرفتن میانگین و محاسبه انحراف معیار میزان تغییرات محاسبه شد. آزمون مقایسه‌ای مورد استفاده Student's t-test بود و ($P < 0.05$) معنی‌دار در نظر گرفته شد.

مرحله نهایی برای ترسیم منحنی ذوب (Melting Curve) به‌صورت ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۵ ثانیه، ۶۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ ثانیه و ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۵ ثانیه انجام شد. واکنش‌های Real-Time PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر به صورت تکرار سه‌تایی در پلیت‌های ۹۶ خانه انجام شد. ترکیبات هر واکنش شامل ۱۲/۵ میکرولیتر مخلوط اصلی واکنش PCR حاوی سایبرگرین (Applied Biosystems, (SYBR-Green PCR Master Mix (Warrington, UK)، یک میکرولیتر (۴۰۰ نانومولار) از آغازگرهای جلویی و برگشتی اختصاصی هر ژن، ۵ میکرولیتر cDNA (۱۰۰ نانوگرم) و مابقی آب مقطر دوبار تقطیر اضافه شد تا به حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر رسید.

برای ترسیم منحنی استاندارد (Standard Curve) از رقت‌های متوالی cDNA استاندارد به‌صورت غلظت‌های ۳۷/۵، ۷۵، ۱۵۰، ۳۰۰ و ۶۰۰ نانوگرم در میکرولیتر استفاده شد. منحنی استاندارد براساس لگاریتم غلظت cDNA (محور افقی) و چرخه آستانه یا (C_t) محور عمودی برای هر ژن ترسیم شد. دامنه غلظت بهینه cDNA الگو و میزان بازده PCR (PCR Efficiency) براساس منحنی استاندارد برای هر ژن تعیین شد. واکنش‌های



شکل ۱ ریخت‌شناسی سلول‌های PC-3 که با غلظت‌های صفر میکروگرم در هر میلی‌لیتر، ۱۰۰ میکروگرم در هر میلی‌لیتر، ۱۵۰ میکروگرم در هر میلی‌لیتر، ۲۰۰ میکروگرم در هر میلی‌لیتر سیلیبین در مدت ۲۴ ساعت تیمار و به‌ترتیب با حروف الف تا د مشخص شده است.

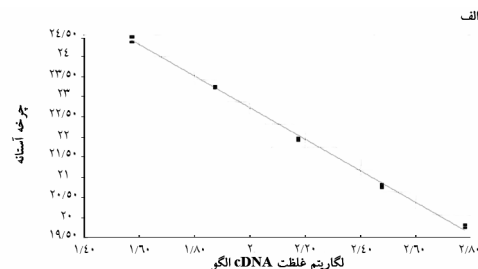
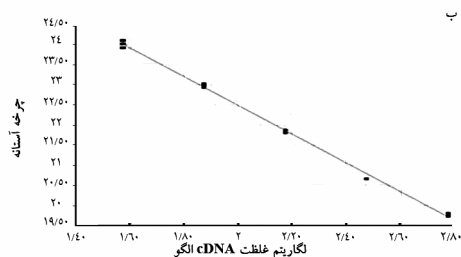
۳- نتایج

۳-۱ تیمار سلول‌های PC-3 با سیلیبیین

نتایج اولیه نشان داد که مقادیر DMSO کمتر- مساوی ۰/۱ درصد (حجمی/حجمی) اضافه شده به محیط کشت تأثیری در رشد و تکثیر سلول ندارد [۳۰]. در شکل ۱ ریخت‌شناسی سلول‌های PC-3 که با غلظت‌های صفر میکروگرم در هر میلی‌لیتر، ۱۰۰ میکروگرم در هر میلی‌لیتر، ۱۵۰ میکروگرم در هر میلی‌لیتر و ۲۰۰ میکروگرم در هر میلی‌لیتر سیلیبیین در مدت ۲۴ ساعت تیمار شده‌اند (شکل ۱)، به ترتیب بیانگر بقای سلولی ۱۰۰، ۵۴/۴، ۵۰ و ۳۷/۰۸ درصد است. بنابراین LD₅₀ سیلیبیین،

۳-۲ رسم منحنی استاندارد و محاسبه کارایی PCR

پس از ترسیم منحنی استاندارد برای ژن‌های GAPDH و CD82، دامنه مقدار مناسب cDNA الگو ۷۵ تا ۶۰۰ نانوگرم به دست آمد. شیب منحنی استاندارد برای ژن GAPDH و CD82 به ترتیب ۳/۳۱- و ۳/۳۶- محاسبه شد (نمودار ۱). میزان کارایی واکنش تکثیر با استفاده از شیب منحنی استاندارد برای ژن GAPDH برابر ۹۸/۴ درصد و کارایی واکنش ژن CD82 برابر ۱۰۰ درصد به دست آمد.



نمودار ۱ نمودار منحنی استاندارد ژن‌های مرجع (الف) و CD82 (ب) با رقت‌های ۳۷/۵، ۷۵، ۱۵۰، ۳۰۰ و ۶۰۰ نانوگرم در میکرولیتر cDNA الگو

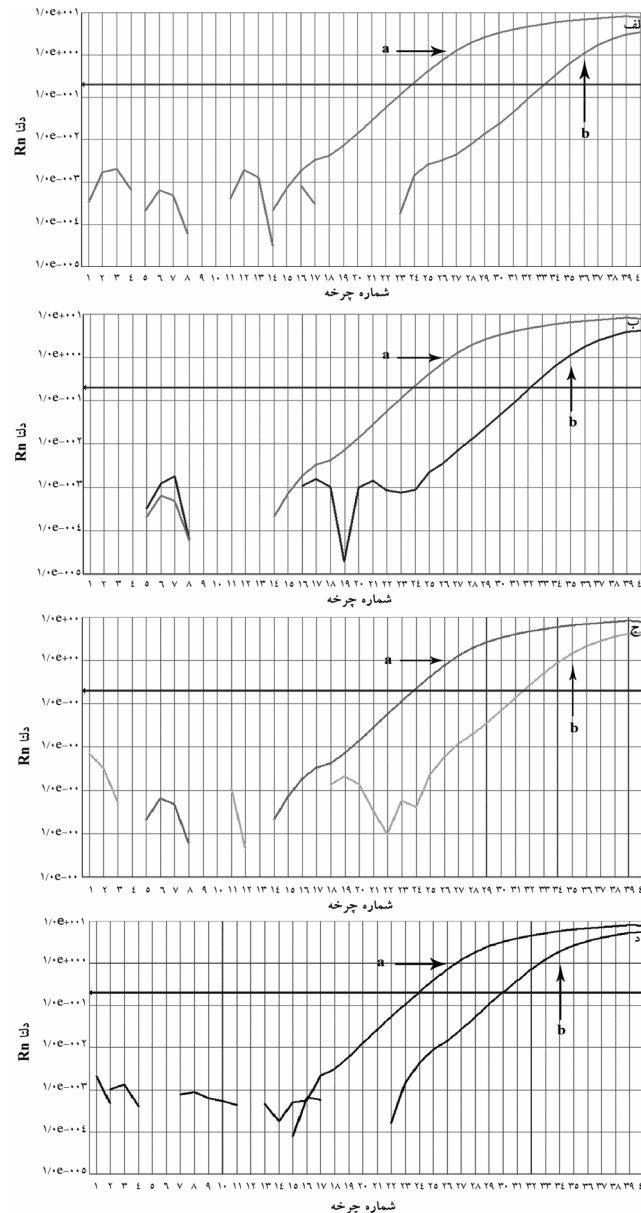
۳-۳ تجزیه و تحلیل داده‌های Real-Time PCR

با استفاده از منحنی‌های تکثیری

در نمونه‌های کنترل و تیمار شده با غلظت‌های متفاوت سیلیبیین چرخه آستانه ژن مرجع جابه‌جایی بسیار ناچیز و نامحسوس داشت؛ اما چرخه آستانه ژن CD82 با افزایش غلظت جابه‌جا شد که بیانگر تغییر در میزان بیان این ژن است. در نمونه کنترل (نمودار ۲، الف)، چرخه آستانه ژن GAPDH (a) و ژن CD82 (b) به ترتیب برابر با ۲۳/۸۳ و ۳۳/۱۳ است. چرخه آستانه ژن مرجع (GAPDH) در تمامی نمونه‌های تیمار شده با سیلیبیین برابر با نمونه کنترل است. در نمونه تیمار شده با غلظت، ۱۰۰ میکروگرم در هر میلی‌لیتر سیلیبیین (نمودار ۲، ب) چرخه آستانه ژن CD82 برابر با ۳۲/۱۵ است؛ اختلاف

چرخه آستانه ژن مرجع و ژن CD82 در نمونه کنترل با نمونه تیمار شده با غلظت ۱۰۰ میکروگرم در هر میلی‌لیتر سیلیبیین، $0.98 / \Delta\Delta C_t = -0.98$ محاسبه شد که بیانگر افزایش بیان ژن CD82 به میزان $0.26 \pm 1/97$ برابر نسبت به نمونه کنترل است ($P < 0.05$). در نمونه تیمار شده با غلظت ۱۵۰ میکروگرم در هر میلی‌لیتر سیلیبیین (نمودار ۲، ج)، میزان چرخه آستانه ژن CD82 برابر با ۳۱/۵۶ و اختلاف آن با ژن مرجع در نمونه کنترل و نمونه تیمار شده با این غلظت برابر ۱/۵۹ $\Delta\Delta C_t = -1.59$ است که بیانگر افزایش بیان ژن CD82 به میزان $0.26 \pm 3/00$ برابر نسبت به نمونه کنترل است ($P < 0.01$). در نمونه تیمار شده با غلظت ۲۰۰ میکروگرم در هر میلی‌لیتر سیلیبیین (نمودار ۲، د)، چرخه آستانه ژن CD82 برابر با ۲۹/۹۵ است؛ اختلاف چرخه

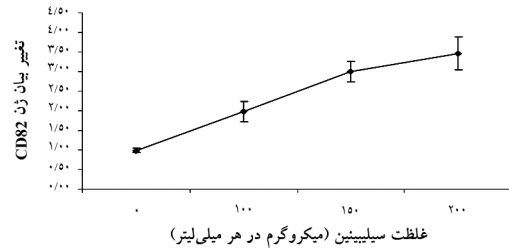
آستانه ژن مرجع و ژن CD82 در نمونه کنترل با نمونه تیمار شده با غلظت مورد نظر $1/80$ ($\Delta\Delta C_T = -1/80$) محاسبه شد که بیانگر افزایش بیان ژن CD82 به میزان $3/48 \pm 0/43$ برابر نسبت به نمونه کنترل است ($P < 0/01$). نمودار ۳ منحنی تغییر بیان ژن CD82 در سلول‌های PC-3 تیمار شده با غلظت‌های متفاوت سیلیبینین را نشان می‌دهد.



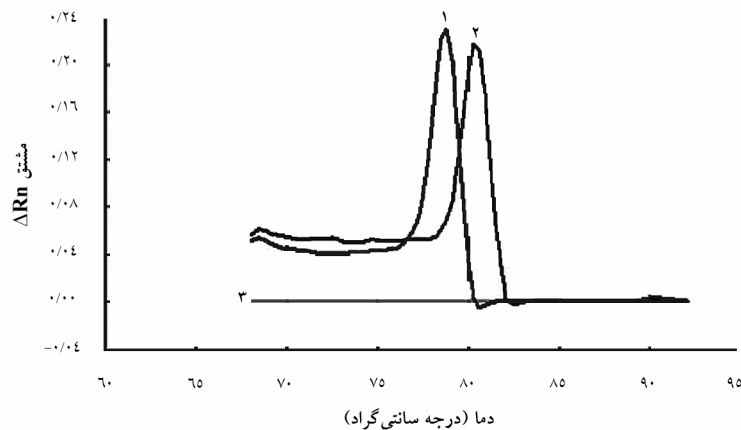
نمودار ۲ منحنی‌های تکثیر ژن‌های GAPDH (a) و CD82 (b) در تیمار با غلظت‌های متفاوت سیلیبینین؛ (الف) در نمونه کنترل، چرخه آستانه ژن GAPDH و ژن CD82 به ترتیب برابر با $23/83$ و $33/13$ است. چرخه آستانه ژن مرجع (GAPDH) در تمامی نمونه‌های تیمار شده با سیلیبینین برابر با نمونه کنترل است. (ب) در نمونه تیمار شده با غلظت 100 میکروگرم در هر میلی‌لیتر سیلیبینین، چرخه آستانه ژن CD82 برابر با $32/15$ است. (ج) در نمونه تیمار شده با غلظت 150 میکروگرم در هر میلی‌لیتر سیلیبینین، چرخه آستانه ژن CD82 برابر با $31/56$ است. (د) در نمونه تیمار شده با غلظت 200 میکروگرم در هر میلی‌لیتر سیلیبینین، چرخه آستانه ژن CD82 برابر با $29/95$ است.

۳-۴- تجزیه و تحلیل منحنی ذوب و ژل الکتروفورز

تکثیر اختصاصی قطعات ژنی مورد نظر، عدم جفت شدن آغازگرها و عدم تکثیر قطعات غیراختصاصی برای هر ژن با استفاده از منحنی ذوب تعیین شد (نمودار ۴). همچنین محصولات PCR هر ژن الکتروفورز شد. نتایج حاصل، تکثیر اختصاصی قطعات مورد نظر را تأیید نمود (شکل ۲).



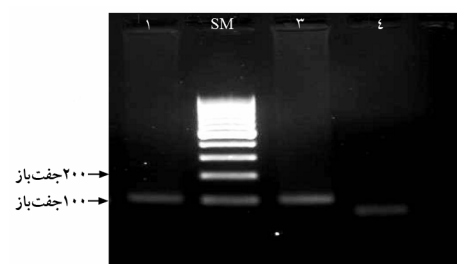
نمودار ۴ منحنی تغییر بیان ژن CD82 در سلول‌های PC-3 تیمار شده با غلظت‌های متفاوت سیلیسین؛ در غلظت‌های ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر سیلیسین ژن CD82 به ترتیب 1.47 ± 0.26 ، 3.00 ± 0.26 و 3.48 ± 0.43 برابر نسبت به کنترل افزایش بیان مشاهده می‌شود.



نمودار ۵ منحنی ذوب ژن‌های CD82 و GAPDH؛ (۱) الگوی منحنی ذوب ژن GAPDH در دمای ۷۸/۸ درجه سانتی‌گراد، (۲) الگوی منحنی ذوب ژن CD82 در دمای ۸۰/۳ درجه سانتی‌گراد، (۳) الگوی منحنی ذوب واکنش بدون cDNA الگو [نمونه کنترل بدون الگو (Non Template Control: NTC)]، در این واکنش علامت فلورسانس به صورت خطی است که بیانگر عدم تکثیر، عدم جفت شدن آغازگرها و فقدان باند غیراختصاصی است.

۴- بحث

در بسیاری از سرطان‌ها بعد از درمان و جراحی، امکان ایجاد توده اولیه وجود دارد. بنابراین ترکیباتی که فرآیند متاستازی را مهار کنند از اهمیت به‌سزایی برخوردار است. سیلیسین یک ترکیب آنتی‌اکسیدانی است که سلول‌های کبد را در برابر هرگونه آسیب نابود کننده حاد یا مزمن، محافظت می‌کند. علاوه بر این، در کاهش کلسترول خون، افزایش سیستم ایمنی بدن و کاهش عوارض جانبی بیماران سرطانی که تحت شیمی درمانی هستند، مؤثر است. در مطالعه رده‌های سلولی طبیعی مشاهده شده است که سیلیسین تأثیری بر بقای آن‌ها ندارد [۳۱، ۳۲].



شکل ۲ الکتروفورز محصولات تکثیری ژن‌های CD82 و GAPDH روی ژل آگارز ۱/۵ درصد؛ چاهک ۱ محصول تکثیری ژن GAPDH را نشان می‌دهد. طول قطعه تکثیری ۱۰۹ جفت‌باز است. چاهک ۳ محصول تکثیری ژن CD82 را نشان می‌دهد. طول قطعه تکثیری ۱۰۰ جفت‌باز است. چاهک ۴ واکنش بدون الگو را نشان می‌دهد که بیانگر عدم تکثیر و جفت شدن آغازگرها است. چاهک SM نشانگرهای اندازه (Size Markers) با اندازه ۱۰۰ جفت‌بازی را نشان می‌دهد.

فرآیند متاستازی یک فرآیند پیچیده ژنتیکی است که ژن‌های زیادی در آن نقش دارد. در میان همه تغییرات ژنتیکی، غیرفعال شدن ژن‌های مهار کننده متاستازی یکی از مهم‌ترین فاکتورهاست که در شکل‌گیری فرم متاستازی نقش دارد. تاکنون اثر سیلیمارین و سیلیبین بر تعدادی از ژن‌ها که در فرآیند متاستازی نقش دارند، مطالعه شده است. سیلیمارین بیان MMP-2 را در سلول‌های (Human Umbilical HUVEC Vein Endothelial Cell) کاهش می‌دهد [۳۳]. بیان MMP-2 در بسیاری از تومورهای بدخیم زیاد می‌شود. این پروتئین در رابطه با متاستاز، تهاجم و رگ‌زایی در سلول‌های HUVEC نقش دارد. بنابراین سیلیمارین می‌تواند فرآیند رگ‌زایی را مهار کند. همچنین تیمار سلول‌های A549 با غلظت‌های مختلف سیلیبین، سمیت سلولی را القا نمی‌کند ولی به‌طور معنی‌داری مهاجرت و چسبندگی سلولی را کاهش می‌دهد. همچنین بیان ژن‌های MMP-2 و u-PA (Urokinase Plasminogen Activator) در اثر تیمار با سیلیبین در سلول‌های A549 کاهش پیدا می‌کند در حالی که بیان TIMP (Tissue Inhibitor Matrix Metalloproteinase) افزایش می‌یابد [۳۴]. تاکنون مطالعه‌ای در مورد اثر سیلیبین بر بیان ژن CD82 صورت نگرفته است. مطالعات محدودی در رابطه با اثر فلاونوئیدهای گیاهی، مانند سیلیبین روی تغییرات بیان ژن‌های مهار کننده متاستازی از جمله؛ کادهرین E (E-cadherin) صورت گرفته است. مشخص شده که سیلیبین بیان ژن کادهرین E را در سلول‌های سرطانی پروستات افزایش می‌دهد [۳۵]. در تحقیقات دیگری مشخص شد که جنیستین (Genistein)، ترکیبی فلاونوئیدی موجود در سویا، بیان کادهرین E را در سلول‌های پوششی پستان افزایش می‌دهد [۳۶]. همچنین نشان داده شده که لوتئین (Luteolin) از طریق افزایش بیان پروتئین کادهرین E، سبب مهار تهاجم سلول‌های PC-3 می‌شود [۳۷]. در مطالعه قبلی محققان حاضر، سیلیبین به‌طور مشخصی سبب کاهش بقا، چسبندگی و مهاجرت سلول‌های PC-3 شد [۳۰]. در مطالعه حاضر تغییر بیان این پروتئین در سطح mRNA بررسی شد و باید در مطالعات آینده، بیان آن در سطح پروتئین مورد ارزیابی قرار گیرد.

در اثر پیرایش متناوب دو واریته از ژن CD82 ایجاد می‌شود. واریته ۱، پروتئین طویل‌تری حاوی ۲۶۷ آمینواسید را کد می‌کند، در حالی که واریته ۲، ناحیه ۸۴ نوکلئوتیدی در اگزون ۷ را از دست داده است. پروتئین CD82 در بسیاری از بافت‌های انسانی بیان می‌شود. این پروتئین از یک سمت به مولکول‌های سطحی سلول‌های دیگر و از طرف دیگر با پروتئین‌های انتقال پیام داخل سلولی ارتباط دارد. CD82 در فرایندهای تکثیر، تحرک سلولی و مهار بلوغ $\beta 1$ اینتگرین‌ها نقش دارد. $\beta 1$ اینتگرین قطبیت و تحرک سلول‌های پوششی را با کاهش بیان کادهرین و کاتنین (Catenin) و فعال کردن Rac1 و RhoA انجام می‌دهد [۳۸]. با توجه به نقش سیلیبین در کاهش مهاجرت سلول‌های PC-3، بیان ژن CD82 در سلول‌های PC-3 تیمار با غلظت‌های مختلف سیلیبین بررسی شد. بیان پایین CD82 در فرم‌های متاستازی سرطان پروستات به‌خاطر جهش در این ژن نیست [۳۹]. به‌عبارتی در مراحل اولیه شکل‌گیری تومور بیان CD82 در سلول‌های پروستات طبیعی است و کاهش مشاهده نمی‌شود. یافته‌های مطالعه حاضر نشان داد که سیلیبین بیان ژن CD82 را در سلول‌های PC-3 افزایش می‌دهد که احتمالاً بیانگر کاهش مهاجرت سلول‌های تیمار شده با سیلیبین است. از آنجایی که CD82 منجر به مهار بلوغ $\beta 1$ اینتگرین‌ها می‌شود [۴۰] این امکان وجود دارد که کاهش چسبندگی سلول‌های تیمار شده با سیلیبین به‌خاطر اثر پروتئین CD82 در بلوغ $\beta 1$ اینتگرین‌ها باشد. نتایج حاصل و نتایج قبلی نشان دادند که احتمالاً سیلیبین سبب کاهش متاستازی سرطان پروستات به‌استخوان از طریق کاهش چسبندگی، مهاجرت و افزایش بیان ژن CD82 می‌شود.

پیشرفت سرطان یک فرآیند چند بخشی، چندین ژنی و چند فاکتوری است. بنابراین آثار ضد سرطانی هر ترکیب به طبیعت سلول، تعداد سلول‌ها و فرآیندهای سلولی-مولکولی مرتبط با آن ترکیب بستگی دارد.

۵- تشکر و قدردانی

کلیه هزینه‌های این تحقیق از محل بودجه تحقیقاتی مصوب در

بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تأمین شده است که بدین وسیله از

زحمات و مساعدت‌های انجام شده سپاسگزاری می‌شود.

۶- منابع

- [1] Noori Dalooi MR, Molecular genetic, diagnosis, prevention and gene therapy in prostatic cancer: review article. TUMJ 2009; 67(1): 1-14.
- [2] Molinié B, Georgel P. Genetic and epigenetic regulations of prostate cancer by genistein. Drug News Perspect 2009; 22(5): 247-54.
- [3] Tsao AS, Kim ES, Hong WK. Chemo-prevention of cancer. CA Cancer J Clin 2004; 54(3): 150-80.
- [4] Singh RP, Agarwal R. Prostate cancer chemoprevention by silibinin: bench to bedside. Mol Carcinog 2006; 45(6): 436-42.
- [5] Gazák R, Walterová D, Kren V. Silybin and silymarin--new and emerging applications in medicine. Curr Med Chem 2007; 14(3): 315-38.
- [6] Deep G, Singh RP, Agarwal C, Kroll DJ, Agarwal R. Silymarin and silibinin cause G1 and G2-M cell cycle arrest via distinct circuitries in human prostate cancer PC3 cells: a comparison of flavanone silibinin with flavanolignan mixture silymarin. Oncogene 2006; 25(7): 1053-69.
- [7] Mateen S, Tyagi A, Agarwal C, Singh RP, Agarwal R. Silibinin inhibits human nonsmall cell lung cancer cell growth through cell-cycle arrest by modulating expression and function of key cell-cycle regulators. Mol Carcinog 2010; 49(3): 247-58.
- [8] Agarwal C, Singh RP, Dhanalakshmi S, Tyagi AK, Tecklenburg M, Sclafani RA, Agarwal R. Silibinin upregulates the expression of cyclin-dependent kinase inhibitors and causes cell cycle arrest and apoptosis in human colon carcinoma HT-29 cells. Oncogene 2003; 22(51): 8271-82.
- [9] Tyagi A, Agarwal C, Harrison G, Glode LM, Agarwal R. Silibinin causes cell cycle arrest and apoptosis in human bladder transitional cell carcinoma cells by regulating CDKI-CDK-cyclin cascade, and caspase 3 and PARP cleavages. Carcinogenesis 2004; 25(9): 1711-20.
- [10] Mohan S, Dhanalakshmi S, Mallikarjuna GU, Singh RP, Agarwal R. Silibinin modulates UVB-induced apoptosis via mitochondrial proteins, caspases activation, and mitogen-activated protein kinase signaling in human epidermoid carcinoma A431 cells. Biochem Biophys Res Commun 2004; 320(1): 183-9.
- [11] Kim KW, Choi CH, Kim TH, Kwon CH, Woo JS, Kim YK. Silibinin inhibits glioma cell proliferation via Ca²⁺/ROS/MAPK-dependent mechanism in vitro and glioma tumor growth in vivo. Neurochem Res 2009; 34(8): 1479-90.
- [12] Björndahl M, Cao R, Nissen LJ, Clasper S, Johnson LA, Xue Y, Zhou Z, Jackson D, Hansen AJ, Cao Y. Insulin-like growth factors 1 and 2 induce lymphangiogenesis in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A 2005; 102(43): 15593-8.
- [13] Hojilla CV, Mohammed FF, Khokha R. Matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors direct cell fate during cancer development. Br J

- Cancer 2003; 89(10): 1817-21.
- [14] Nguyen DX, Massagué J. Genetic determinants of cancer metastasis. *Nat Rev Genet* 2007; 8(5): 341-52.
- [15] Yoshida BA, Sokoloff MM, Welch DR, Rinker-Schaeffer CW. Metastasis-suppressor genes: a review and perspective on an emerging field. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92(21): 1717-30.
- [16] Hemler ME. Specific tetraspanin functions. *J Cell Biol* 2001; 155(7): 1103-7.
- [17] Zhang XA, Lane WS, Charrin S, Rubinstein E, Liu L. EWI2/PGRL associates with the metastasis suppressor KAI1/CD82 and inhibits the migration of prostate cancer cells. *Cancer Res* 2003; 63(10): 2665-74.
- [18] Zhang XA, Bontrager AL, Hemler ME. Transmembrane-4 superfamily proteins associate with activated protein kinase C (PKC) and link PKC to specific beta(1) integrins. *J Biol Chem* 2001; 276(27): 25005-13.
- [19] Protzel C, Kakies C, Kleist B, Poetsch M, Giebel J. Down-regulation of the metastasis suppressor protein KAI1/CD82 correlates with occurrence of metastasis, prognosis and presence of HPV DNA in human penile squamous cell carcinoma. *Virchows Arch* 2008; 452(4): 369-75.
- [20] Yang JM, Peng ZH, Si SH, Liu WW, Luo YH, Ye ZY. KAI1 gene suppresses invasion and metastasis of hepatocellular carcinoma MHCC97-H cells in vitro and in animal models. *Liver Int* 2008; 28(1): 132-9.
- [21] Guo C, Liu QG, Zhang L, Song T, Yang X. Expression and clinical significance of p53, JunB and KAI1/CD82 in human hepatocellular carcinoma. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2009; 8(4): 389-96.
- [22] Ai X, Zhang X, Wu Z, Ma X, Ju Z, Wang B, Shi T. Expression of KAI1/CD82 and MRP-1/CD9 in transitional cell carcinoma of bladder. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 2007; 27(1): 79-82.
- [23] Mu Z, Wang H, Zhang J, Li Q, Wang L, Guo X. KAI1/CD82 suppresses hepatocyte growth factor-induced migration of hepatoma cells via upregulation of Sprouty2. *Sci China C Life Sci* 2008; 51(7): 648-54.
- [24] Joshi B, Li L, Nabi IR. A role for KAI1 in promotion of cell proliferation and mammary gland hyperplasia by the gp78 ubiquitin ligase. *J Biol Chem* 2010; 285(12): 8830-9.
- [25] Christgen M, Bruchhardt H, Ballmaier M, Krech T, Länger F, Kreipe H, Lehmann U. KAI1/CD82 is a novel target of estrogen receptor-mediated gene repression and downregulated in primary human breast cancer. *Int J Cancer* 2008; 123(10): 2239-46.
- [26] Lee JK, Yoon TM, Seo DJ, Sun EG, Bae JA, Lim SC, Choi YD, Lee JH, Joo YE, Kim KK. KAI1 COOH-terminal interacting tetraspanin (KITENIN) expression in early and advanced laryngeal cancer. *Laryngoscope* 2010; 120(5): 953-8.
- [27] Liu FS, Dong JT, Chen JT, Hsieh YT, Ho ES, Hung MJ. Frequent down-regulation and lack of mutation of the KAI1 metastasis suppressor gene in epithelial ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol* 2000; 78(1): 10-5.
- [28] Miyazaki T, Kato H, Shitara Y, Yoshikawa M,

- Tajima K, Masuda N, Shouji H, Tsukada K, Nakajima T, Kuwano H. Mutation and expression of the metastasis suppressor gene KAI1 in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer* 2000; 89(5): 955-62.
- [29] Liu FS, Chen JT, Dong JT, Hsieh YT, Lin AJ, Ho ES, Hung MJ, Lu CH. KAI1 metastasis suppressor gene is frequently down-regulated in cervical carcinoma. *Am J Pathol* 2001; 159(5): 1629-34.
- [30] Mokhtari MJ, Motamed N, Shokrgozar MA. Evaluation of silibinin on the viability, migration and adhesion of the human prostate adenocarcinoma (PC-3) cell line. *Cell Biol Int* 2008; 32(8): 888-92.
- [31] Das SK, Mukherjee S, Vasudevan DM. Medicinal properties of milk thistle with special reference to silymarin: an overview. *NPR* 2008; 7(2): 182-92.
- [32] Singh RP, Agarwal R. A cancer chemopreventive agent silibinin, targets mitogenic and survival signaling in prostate cancer. *Mutat Res* 2004; 555(1-2): 21-32.
- [33] Singh RP, Dhanalakshmi S, Agarwal C, Agarwal R. Silibinin strongly inhibits growth and survival of human endothelial cells via cell cycle arrest and downregulation of survivin, Akt and NF-kappaB: implications for angioprevention and antiangiogenic therapy. *Oncogene* 2005; 24(7): 1188-202.
- [34] Chu SC, Chiou HL, Chen PN, Yang SF, Hsieh YS. Silibinin inhibits the invasion of human lung cancer cells via decreased productions of urokinase-plasminogen activator and matrix metalloproteinase-2. *Mol Carcinog* 2004; 40(3): 143-9.
- [35] Singh RP, Raina K, Sharma G, Agarwal R. Silibinin inhibits established prostate tumor growth, progression, invasion, and metastasis and suppresses tumor angiogenesis and epithelial-mesenchymal transition in transgenic adenocarcinoma of the mouse prostate model mice. *Clin Cancer Res* 2008; 14(23): 7773-80.
- [36] Su Y, Simmen RC. Soy isoflavone genistein upregulates epithelial adhesion molecule E-cadherin expression and attenuates beta-catenin signaling in mammary epithelial cells. *Carcinogenesis* 2009; 30(2): 331-9.
- [37] Zhou Q, Yan B, Hu X, Li XB, Zhang J, Fang J. Luteolin inhibits invasion of prostate cancer PC3 cells through E-cadherin. *Mol Cancer Ther* 2009; 8(6): 1684-91.
- [38] Lee JH, Seo YW, Park SR, Kim YJ, Kim KK. Expression of a splice variant of KAI1, a tumor metastasis suppressor gene, influences tumor invasion and progression. *Cancer Res* 2003; 63(21): 7247-55.
- [39] Akita H, Iizuka A, Hashimoto Y, Kohri K, Ikeda K, Nakanishi M. Induction of KAI-1 expression in metastatic cancer cells by phorbol esters. *Cancer Lett* 2000; 153(1-2): 79-83.
- [40] Jee BK, Lee JY, Lim Y, Lee KH, Jo YH. Effect of KAI1/CD82 on the beta1 integrin maturation in highly migratory carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 359(3): 703-8.