Medical Journal
of
Tabriz University of Medical Sciences

Original Article

The Effect of deinoxanthin Isolated from Radioactivity-Resistant Bacteria on Expression of *Bcl-2* Gene in Hela Cell Line

Mahsa Kavousi[1*], Hesam Bagheri[2]

[1]Department of Biology, East Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
[2]MS of Genetic, Department of Biology, East Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
*Corresponding author; E-mail: mkavoosi@iauet.ac.ir

Received: 10 Jun 2019 Accepted: 14 Jul 2019 First Published online: 17 April 2021
Med J Tabriz Uni Med Sciences. 2021;43(1):84-91

Abstract

Background: After breast cancer, uterine cervical neoplasms is the most common cancer in women. It is believed that genetic factors are effective in developing cancer. Bcl-2 is a well-known anti-apoptosis gene that increases cell viability without stimulating effect on cellular proliferation. Today it attempts to use natural compounds to control or treat diseases. Carotenoids are one of these compounds. Deinoxanthin is a carotenoid isolated from Deinococcus radiodurans. Since this bacterium has a unique ability to withstand radiation, and radiation is a well-known cause of cancer carotenoid synthesized by bacterium is worthwhile. The aim of study is evaluating the effect of deinoxanthin on the expression of Bcl-2 in Hela cell line.

Methods: Active culture of bacteria was purchased from Genetic and Biological Reserve of Iran then deinoxanthin was extracted. Hela was prepared of Pasteur Institute of Iran and cultured. Cells were divided into two treatment and control groups. Deinoxanthin was affected on the treatment group and its toxicity was measured using MTT. Real-time PCR was used to measure gene expression. RNA was extracted from two groups and cDNA was made.

Results: Real-time PCR showed the anti-apoptotic expression of Bcl-2 decreased by ۴۸۵/ and given that p-value of ۰۵/۰ was (p-value=0) this decrease is significant.

Conclusion: Regarding the results of Real-time PCR it can be concluded deinoxanthin extract has an inhibitory effect on the uterine cancer cell line has an inhibitory effect after 48 hours and the amount of anti-apoptotic expression of Bcl-2 has significantly decreased (p-value=0).

Keywords: Uterine cervical neoplasms, Deinoxanthin, Bcl-2, Real-time PCR, MTT Assay

How to cite this article: Kavousi M, Bagheri H. [The Effect of deinoxanthin Isolated from Radioactivity-Resistant Bacteria on Expression of Bcl-2 Gene in Hela Cell Line]. Med J Tabriz Uni Med Sciences. 2021;43(1):84-91. Persian.

© 2021 The Author. This is an Open Access article published by Tabriz University of Medical Sciences under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

مقاله پژوهشی

تاثیر دینوگزانتین جداسازی شده از باکتری‌های مقاوم به رادیواکتیو برمیزان بیان ژن Bcl-۲ در رده سلولی Hela

مهسا کاوسی [۱*]، حسام باقری [۲]

[۱] گروه زیست شناسی، واحد تهران شرق، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
[۲] کارشناس ارشد ژنتیک، گروه زیست شناسی، واحد تهران شرق، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
[*] نویسنده مسؤول؛ ایمیل: mkavoosi@iauet.ac.ir

دریافت: ۱۳۹۸/۳/۲۰ پذیرش: ۱۳۹۸/۴/۲۳ انتشار برخط: ۱۴۰۰/۱/۲۸
مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز. ۱۴۰۰؛۴۳(۱)۸۴-۹۱

چکیده

زمینه: سرطان دهانه رحم بعد از سرطان پستان شایع‌ترین سرطان در زنان است. باور بر این است که عوامل ژنتیکی در بروز سرطان نقش دارند. Bcl-۲ ژن شناخته شده ضد آپوپتوز است که بدون اثر تحریکی بر تکثیر سلولی سبب افزایش مدت زمان حیات سلول می‌شود. امروزه تلاش می‌شود که از ترکیبات طبیعی برای کنترل یا درمان بیماری‌ها استفاده شود. کارتنوئیدها یکی از این ترکیبات هستند. دینوگزانتین یک نوع کاروتنوئید جداسازی شده از باکتری *Deinococcus radiodurans* است. از آنجایی که این باکتری توانایی منحصر به فردی در مقاومت به پرتو دارد و پرتوها از عوامل شناخته شده بروز سرطان هستند، کارتنوئید تولید شده توسط این باکتری ارزشمند است. مطالعه حاضر با هدف بررسی میزان تاثیر دینوگزانتین روی میزان بیان ژن Bcl-۲ در رده سلولی Hela انجام گرفت.

روش‌کار: کشت فعال باکتری از مرکز ذخایر زیستی و ژنتیکی ایران خریداری و دینوگزانتین استخراج شد. Hela از انستیتو پاستور ایران تهیه و کشت داده شد. سلول‌ها به دو گروه تیمار و کنترل تقسیم شدند. دینوگزانتین روی گروه تیمار تاثیر داده شده و سمیت آن با MTT assay سنجیده شد. برای سنجش میزان بیان ژن از Real-time PCR استفاده شد. RNA از سلول‌های دو گروه استخراج و cDNA ساخته شد.

یافته‌ها: با انجام Real-time PCR مشخص شد که میزان بیان ژن ضد آپوپتوزی Bcl-۲ به میزان ۴/۸۵ کاهش پیدا کرد و با توجه به اینکه p *value* است (p- *value*=۰) این کاهش معنی‌دار است.

نتیجه‌گیری: با توجه به نتیجه حاصل از Real-time PCR ، عصاره دینوگزانتین روی رده سلولی سرطان رحم بعد از ۴۸ ساعت تاثیری بازدارنده داشته و میزان بیان ژن ضد آپوپتوزی Bcl-۲ تحت تاثیر عصاره به طور معنی‌داری کاهش داشته است (p- *value*=۰).

کلید واژه‌ها: سرطان دهانه رحم، Deinoxanthin، *rBcl*-۲ ، Real-time PCR ، MTT assay

نحوه استناد به این مقاله: کاوسی م، باقری ح. تاثیر دینوگزانتین جداسازی شده از باکتری‌های مقاوم به رادیواکتیو برمیزان بیان ژن Bcl2-۲ در رده سلولی Hela. مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز. ۱۴۰۰؛۴۳(۱):۸۴-۹۱

حق تالیف برای مولف محفوظ است.
این مقاله با دسترسی آزاد توسط دانشگاه علوم پزشکی تبریز تحت مجوز کریتیو کامنز (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0) منتشر گردیده 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

بر اساس مطالعه نیاکان و همکاران (۱) سرطان دهانه رحم در تمام دنیا شایع بوده و دومین سرطان مرگ‌آور در بانوان است. شیوع ابتلا در جوامع مختلف متفاوت است. بیش از ۹۰ درصد ضایعات دهانه رحم به علت ویروس پاپیلومای انسانی است ولی اطلاعات کمی در ارتباط با نقش ژنوم ویروس و شناسایی سریع انواع متفاوت آن در دست است. خداکرمی و همکاران (۲) معتقدند که سرطان دهانه رحم در ایران نسبت به برخی از کشورهای جهان شیوع کمتری دارد، به طوری که بر اساس گزارش مرکز ملی ثبت سرطان وزارت بهداشت ایران، درسال ۲۰۰۹ میزان شیوع آن ۲/۱۷ مورد در هر صد هزار نفر بوده و رتبه یازدهم را در بین کل سرطان‌های زنان ایرانی تشکیل داده و البته نسبت به گزارش سال ۲۰۰۸ که این سرطان رتبه سیزدهم را داشت، کمی افزایش نشان می‌دهد. بر اساس مطالعه آلن و همکاران (۳) بیشتر تغییرات مولکولی در تومورهای تیپ ۱، مشتمل بر ایجاد جهش در BRAF و KRAS است. مسیر RAF، MEK، ERK و RAS در انتقال سیگنال رشد و تکثیر به هسته اهمیت زیادی دارند و جهش در BRAF و KRAS موجب فعال شدن این مسیر و تراریختی می‌شود. بیشتر تغییرات مولکولی در تومورهای تیپ۲، مربوط به جهش در P_{53} است. لاخانی و همکاران (۴) معتقدند که ۵۰ تا ۸۰ درصد تومورهای سروز کارسینومای پیشرفته، در P_{53} جهش دارند که در مراحل اولیه رخ می‌دهد. این یافته از مطالعه روی تومورهای اولیه سروز کارسینومای تخمدان زنانی به دست آمده که برای پیشگیری، تخمدان‌های آن‌ها را خارج کرده بودند و از نظر ژن *BRCA* هتروزیگوت بودند. این نتیجه نشان داد که جهش در *BRCA* فرد را مستعد ابتلا به سرطان تخمدان می‌کند. بروز جهش در *BRCA-1* و ۲- *BRCA* اشکال متفاوتی را در بافت سرطانی تخمدان ایجاد می‌کنند. این نوع سرطان همراه الگوی غالب از نوع سروزی و آندومتروئیدی بوده و معمولا با درجه بالا است. گوستاوسون و همکاران (۵) با انجام آنالیزهای جامع در مورد تنظیم میزان بیان ژن‌های آپوپتوزی تایید کردند که ژن‌های خانواده Bcl-۲ در فرآیند مرگ سلولی نقش دارند. چنگ و همکاران (۶) معتقدند که *BAX* در سیتوپلاسم سلول‌های طبیعی وجود دارد و به هنگام تحریک آپوپتوز به میتوکندری منتقل شده و به عنوان یک آغازگر مسیر آپوپتوز عمل می‌کند. بر اساس مطالعه اندو و همکاران (۷) رابطه بین *BAX* و Bcl-۲ از عوامل مهم در این فرآیند است. در این مطالعه نشان داده شد که با وجود بیان ژن *BAX*، Bcl-۲ از انتقال BAX به میتوکندری ممانعت می‌کند. تیان و همکاران (۸) عقیده دارند که امروزه توجه به ترکیبات طبیعی برای درمان بیماری‌ها افزایش یافته است. یکی از این ترکیبات کارتنوئیدها هستند که از سلول در برابر رادیکال‌های آسیب‌رسان اکسیژن محافظت می‌کنند. بنا به مطالعه اسکر و همکاران (۹) خصوصیات ضد سرطانی برخی کاروتنوئیدها به اثر آنتی‌اکسیدانی آن‌ها نسبت داده می‌شود که از اتصال رادیکال‌های آزاد اکسیژن به سلول‌ها ممانعت می‌کنند. دینوگزانتین یک کتوکاروتنوئید منحصر به فرد است که توسط *Deinococcus radiaodurans*، یکی از مقاوم‌ترین موجودات به پرتو تولید می‌شود. این باکتری رنگدانه قرمز و غیرفتوسنتزی مقاوم در برابر پرتوهای یونیزان دارد. در مطالعه هونگ (۱۰) نشان داده شد که آنتی‌اکسیدان‌های سلولی علاوه بر استراتژی کارآمد و دقیق ترمیم DNA، نقش مهمی در ایجاد مقاومت به تشعشع در این باکتری دارند. از میان آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی، کاروتنوئیدها و در بین آن‌ها دینوگزانتین، فعالیت قوی‌تری از نظر جمع‌آوری گونه‌های اکسیژن فعال دارد. در مطالعه کریسکو و همکاران (۱۱) غیرفعال شدن گونه‌های فعال اکسیژن به ویژه رادیکال‌های هیدروکسیل تحت تاثیر کاروتنوئیدهای حاصل از این باکتری مقاوم به اشعه ایکس بررسی شد. نتایج نشان داد که با افزایش غلظت پراکسید هیدروژن ترکیب کاروتنوئیدها در سویه‌های باکتری تغییر می‌کند. هنگامی که زمان انکوباسیون افزایش می‌یابد اکثر کاروتنوئیدها به میزان قابل توجهی کم می‌شوند. این مطالعه، به منظور بررسی میزان تاثیر آنتی‌اکسیدان دینوگزانتین که یک ترکیب طبیعی است، روی سلول‌های سرطانی طراحی شد. میزان بازدارندگی دینوگزانتین استخراج شده از باکتری *Deinococcus radiaodurans* در رشد رده سلولی هلا با روش MTT بررسی و میزان بیان ژن Bcl-۲ با Real-time PCR سنجیده شد.

روش کار

شرایط لازم برای رشد باکتری و تولید پیگمان در دمای محیط فراهم شد. ابتدا سرم سالین که حاوی ۹ گرم NaCl در ۱۰۰۰ میلی لیتر آب مقطر دوبار تقطیر است تهیه شد. با سرم سالین باکتری را در چندین مرحله کاملا از روی محیط کشت شستشو دادیم و با ۹۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. محلول رویی که شامل سرم سالین بود دور ریخته شد. مخلوطی حاوی ۱۴۰۰ میکرولیتر استون و ۴۰۰ میکرولیتر متانول تهیه شده و به رسوب باکتری اضافه و ورتکس شد. این محلول به مدت ۷۲-۲۴ ساعت درون انکوباتور لرزان قرار داده شد تا پیگمان‌های باکتری از رسوب باکتری جدا شوند. بعد از گذشت دو یا سه روز محلول به مدت ده دقیقه با ۵۰۰۰ دور در دقیقه و دمای ۸ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. در کنار شعله محلول رنگی رویی به یک میکروتیوب جدید انتقال یافت و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. دوباره به رسوب با مقادیر یاد شده استون و متانول

اضافه و این مرحله بار دیگر تکرار شد. سپس رقت‌های مختلف از دینوگزانتین تهیه شد. برای بررسی تاثیر رقت‌های مختلف دینوگزانتین بر میزان رشد سلول‌های سرطانی، رده سلولی هلا از انستیتو پاستور ایران تهیه و پاساژ داده شد. ۱۰۰ میکرولیتر از سلول‌ها (۱۰ هزار سلول) در ظرف کشت ۹۶ خانه در محیط RPMI ۱۶۴۰، حاوی ۱۰ درصد سرم کشت داده شدند. سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد CO_2 انکوبه شدند. برای بررسی تاثیر دینوگزانتین روی بقای رده سلولی هلا از MTT Assay استفاده شد. برای تیمار سلول‌ها و بررسی میزان بیان ژن‌های مورد نظر، باید IC_{50} را بدست آورد. بنابراین تاثیر چندین غلظت مختلف از دینوگزانتین روی سلول‌ها با MTT Assay بررسی شد. معرف MTT یک نمک تترازولیوم زرد رنگ است که میتوکندری سلول‌های فعال از نظر متابولیکی آن را جذب کرده و در اثر فعالیت آنزیم‌های دهیدروژناز، بلور فورمازان بنفش رنگ تولید می‌شود که در حلال مناسب حل شده و میزان رنگ تولید شده با اسپکتروفتومتری اندازه‌گیری می‌شود. برای هر نوع سلولی باید با رسم منحنی استاندارد خطی، رابطه متناسبی از تعداد سلول و رنگ تولید شده محاسبه شود. ۱۰۰µl از سلول‌ها در ظرف کشت ۹۶ خانه در محیط کشت، حاوی ۱۰٪ سرم کشت داده شدند. سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ °C و ۵٪ CO_2 انکوبه شدند. از هر کدام از رقت‌های دینوگزانتین به چاهک‌های جداگانه به صورت ۳ تکرار اضافه شدند. انکوباسیون به مدت ۴۸ ساعت ادامه یافت. ۲۰µl از محلول رنگ MTT به هر چاهک اضافه کرده و به مدت ۴ ساعت انکوباسیون ادامه یافت. مایع رویی حذف شده و ۱۰۰µl از DMSO به هر چاهک اضافه شد. بعد از پیپتاژ، جذب در طول موج ۵۷۰ nm با ELISA Reader خوانده شد. سپس با توجه به اینکه برای هر غلظت دینوگزانتین و همچنین برای کنترل، سه بار تست تکرار شده بود لذا از سه جذب حاصل میانگین گرفته شد و به کمک فرمول زیر درصد تاثیر دینوگزانتین روی مرگ سلولی در هر غلظت تعیین شد.

$$\left(\frac{\overline{\text{OD}}\text{treated}}{\overline{\text{OD}}\text{ untreated}}\right) \times ۱۰۰ = \textit{the \% inhibition}$$

در نهایت با رسم منحنی نقطه‌ای در نرم افزار Excel و تعیین بهترین خط ممکن و با کمک فرمول خط، میزان غلظتی از دینوگزانتین که IC_{50} برای آن دوره زمانی (۴۸ ساعت) محاسبه و ۲۹/۱۷ mg/ml حاصل شد (نمودار ۱). پس از ترسیم نمودار و به کمک فرمول بهترین خط، میزان IC_{50} دینوگزانتین در دوره زمانی ۴۸ ساعت بدست آمد. پس از تیمار با عصاره، RNA با روش RNX-Plus استخراج شد. برای استخراج RNA از کیت BIOZOL Total RNA Extraction Reagent شرکت بیوفلاکس (شرکت تکنولوژی بیوئر) استفاده شد. خلوص و غلظت RNA استخراج شده توسط c Spectrophotometer (Nano Drop Technologies, Nano Drop ۲۰۰۰ Wilmington, DE, USA) بررسی شد که طول موج ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر برای تمام نمونه‌ها بین ۱/۹– ۱/۷ بود. کیفیت RNA توسط ژل آگارز ۱/۵ ٪ بررسی شد. حضور باندهای RNA ریبوزومی S ۱۸ و S ۲۸ نشان‌دهنده سالم و دست نخورده بودن RNA بود. نمونه‌ها با کیفیت عالی، حداقل اسمیر را در بالا، بین و پایین باندهای یادشده داشته و شدت باند S ۲۸ تقریبا دو برابر شدت باند S ۱۸ بود. فقدان باندهای واضح S ۱۸ و S ۲۸ نشان‌دهنده تجزیه نمونه RNA توسط آنزیم RNase بود، بخصوص اینکه حالت اسمیر محدود به بخش تحتانی ژل باشد. برای تولید cDNA از کیت Revert Aid First Stand cDNA Synthesis Kit شرکت ترموساینتیفیک استفاده شد. مواد لازم برای تولید cDNA، Random Hexamer ۴۰ میکرومولار به حجم 1µl، Oligo dt ۱۰۰ میکرومولار به حجم µl ۱ و dNTP ۱۰ میلی مولار به حجم µl ۱ است که با هم مخلوط شدند. ۵۰ ng/µl از RNA به هر لوله افزوده و ۵ دقیقه در ۶۵ °C و بعد بلافاصله در یخ قرار داده شد. پس از حدود دو دقیقه مخلوط واکنش با مقادیر آب فاقد نوکلئاز به حجم µl ۴/۵، M-MuLV buffer۱۰ X به حجم µl ۲، M-MuLV ۲۰۰ واحد در میکرولیتر به حجم µl 0.5 تهیه و به هر لوله به مقدار µl ۷ از این مخلوط اضافه شد به طوری که حجم نهایی مخلوط µl ۲۰ شد. واکنش به مدت ۶۰ دقیقه در ۴۲ °C قرار داده شد. برای غیر فعال کردن آنزیم MMULV، محلول به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پرایمرهای پژوهش حاضر با نرم‌افزارهای Gene runner و Allele ID طراحی شد. توالی mRNA ژن‌های مورد نظر از مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی (NCBI) به دست آمد و اتصال صحیح پرایمرها به توالی مربوطه بررسی شد. با برنامه Blast در NCBI اتصال پرایمرها به توالی‌های دیگر بررسی شد. با حصول اطمینان از صحت پرایمرها، به شرکت ماکروژن سفارش داده شد. پرایمرها با آب مقطر استریل به حجم مورد نظر (۱۰۰pmol/µl) رسید و رقت یک دهم از هر پرایمر تهیه و در دمای ۲۰ °C– نگهداری شد. توالی پرایمرهای بررسی شده در جدول ۱ آمده است. تست PCR برای هر تکرار در نمونه‌های تیمار و کنترل به طور جداگانه برای بررسی ژن‌های *β-Actin* و *Bcl-2* انجام شد. با شیب خط منحنی به دست آمده و رابطه زیر بازده واکنش برای هر پرایمر محاسبه شد.

بازده واکنش=E شیب خط منحنی=Slope

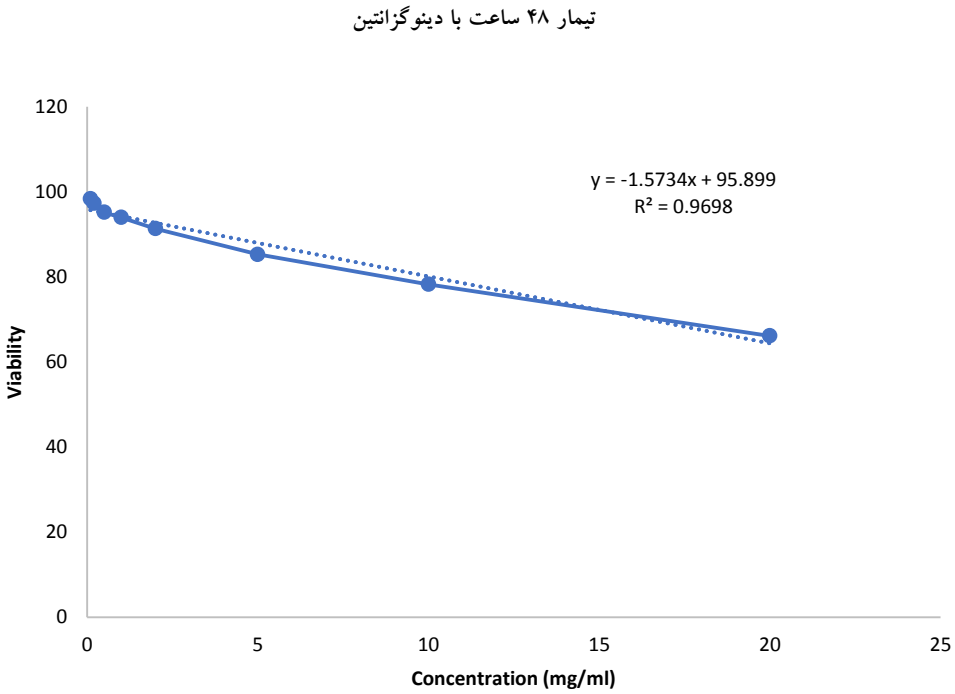
$$E=۱۰^{(-۱/slope)}-۱$$

ترکیب بالا به آرامی مخلوط و چرخانده شد و پروتکل ترموسایکلر با دستگاه Thermocycler convergent-Great Bratin انجام شد. قبل از انجام واکنش Real time PCR، نیاز بود که کارایی پرایمرها بررسی شده و منحنی استاندارد رسم شود. ابتدا از

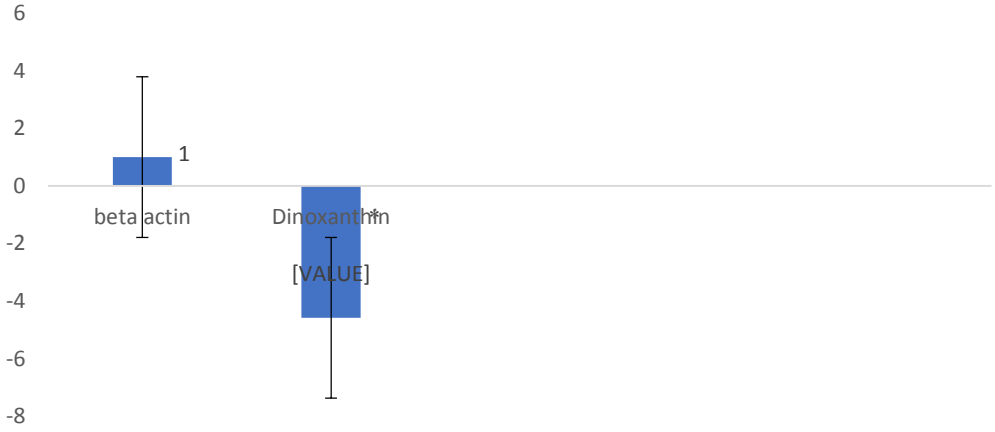
cDNA های هر گروه رقت‌های ۱ به ۱، ۱ به ۵، ۱ به ۲۵ و ۱ به ۱۲۵ تهیه شد (۷۵ ng/µl، ۱۵، ۳ و ۰/۶). سپس واکنش Real time PCR به صورت دو بار تکرار، برای این رقت‌ها همراه با هر کدام از پرایمرها به صورت جداگانه، انجام شد. سپس، بر اساس مقادیر به دست آمده Ct در هر کدام از غلظت‌ها، منحنی استاندارد برای هر پرایمر رسم شد. درون هر میکروتیوب مواد لازم اضافه شد. تکثیر ژن‌ها صورت گرفته و تعیین کمیت نسبی در آن با اندازه-گیری میزان افزایش نور فلوروسانس در اثر اتصال سایبر گرین با دستگاه Real-time PCR system (Applied ۷۵۰۰ABI Biosystems Inc., Foster City, CA, USA) انجام شد. سپس با ΔΔCt میزان بیان ژن محاسبه شد.

یافته‌ها

سلول‌های هلا با غلظت‌های مختلف عصاره دینوگزانتین در غلظت‌های متوالی طی مدت ۴۸ ساعت تیمار و سپس RNA سلول‌ها استخراج شد. به منظور کسب اطمینان از عدم تجزیه RNA استخراج شده، کیفیت نمونه‌های RNA به کمک الکتروفورز ژل آگارز و کمیت آن‌ها با اسپکتروفتومتری بررسی شد. در بررسی ژل دو باند ۱۸S و ۲۸S RNA ریبوزومی به وضوح مشاهده شد که بیانگر عدم تجزیه RNA است. در بررسی با اسپکتروفتومتری نیز نسبت جذب در ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر ۳۸۰ ng/µl به دست آمد که نشان‌دهنده درجه خلوص بالای RNA و نیز آغشتگی کم آن با پروتئین و DNA ژنومی است. در کل این نتیجه حاکی از آن است که RNA استخراجی می‌تواند با اطمینان در مراحل بعدی تحقیق استفاده شود. قبل از انجام Real time PCR ضروری است که عملکرد پرایمرهای طراحی شده با Conventional PCR ارزیابی شوند. این کار با استفاده از سایت NCBI و نرم‌افزار Primer-BLAST انجام شد. سپس واکنش PCR با پرایمرهای یادشده انجام شد. با بررسی منحنی ذوب ژن‌ها می‌توان گفت که هیچ آلودگی در نمونه‌های تکثیریافته وجود نداشته است. برای اطمینان از عملکرد صحیح پرایمرها و محصول PCR ، از آنالیز منحنی ذوب استفاده شد. منحنی‌های مربوط به ژن‌های بتااکتین و *Bcl-2* بصورت جداگانه و تک بودند که نشان می‌دهد باند غیراختصاصی ایجاد نشده است و دمای نشان داده شده در این منحنی معادل دمای محاسبه‌شده در نرم‌افزار است. در نهایت، نتایج با نرم‌افزار REST نسخه ۲۰۰۹ آنالیز شد. اندازه‌گیری میزان بیان ژن‌های مورد نظر به صورت Relative (نسبی) بود. در واقع میزان بیان ژن هدف به نسبت میزان بیان ژن رفرنس محاسبه شده است. با توجه به اینکه $P<0.05$ ، نتیجه به دست آمده معنی‌دار است و می‌توان با اطمینان گفت که بیان ژن *Bcl-2* به مقدار ۴/۵۸ کاهش یافته است. میزان بیان ژن *Bcl-2* گروه نمونه در اثر تیمار با دینوگزانتین به نسبت ۴/۵۸- کاهش داشته است که با توجه به این که $P<0.05$ ، نتیجه به دست آمده معنی‌دار است (نمودار ۲).



نمودار ۱: نمودار IC_{50} در تیمار ۴۸ ساعت با دینوگزانتین IC_{50}= ۲۹/۱۷ mg/ml



نمودار ۲: میزان بیان ژن *Bcl-2* در تیمار سلول‌های هلا با عصاره باکتری

جدول ۱: پرایمرهای استفاده شده در تحقیق

Gene	Forward	Reverse
β-Actin	۵′-TCCTCCTGAGCGCAAGTAC-۳′	۵′- CGGTGGACGATGGAGGGGCC-۳′
Bcl-۲	۵′- ATTGGGAAGTTTCAAATCACG -۳′	۵′- CAGTCTACTTCCTCTGTGATGTGT -۳′

جدول ۲: نتیجه مربوط به تغییرات بیان ژن *Bcl-2* در مواجهه با دینوگزانتین

Gene	Type	Reaction Efficiency	Expression	Std. Error	۹۵.C.I ٪	P(H ۱)	Result
β-Actin	REF	۱	۰/۶۶۶	۰/۵۵۶ –۰/۷۷۱	۰/۵۳۴ –۰/۸۹۰	۰/۰۵۸	
Bcl-2	TRG	۱	۰/۱۴۵	۰/۱۰۵ –۰/۱۸۱	۰/۰۹۷ –۰/۱۹۹	۰/۰۰۰	DOWN

بحث

زابوتار و همکاران (۱۲) معتقدند که آپوپتوز، مرگ برنامه‌ریزی شده یاخته است که در چند یاخته به وقوع می‌پیوندد. پروتئین *Bcl-2* در غشا میتوکندری و شبکه آندوپلاسمیک جای گرفته و می‌تواند نقش القا و مهار آپوپتوز را ایفا کنند. برخی از اعضای این خانواده در مهار و برخی دیگر در القا آپوپتوز نقش دارند. نسبت عوامل القاکننده و مهارکننده و توازن بین آن‌ها تعیین‌کننده مسیر آپوپتوز یا بقای سلول زنده است. پروتئین *Bcl-2* به عنوان یک پروتوانکوژن در سلول‌های زایا در تنظیم فرآیند آپوپتوز سلولی دخالت می‌نماید. به این صورت که این پروتئین، به طور کلی در مهار آپوپتوز سلولی نقش دارد. در صورت کاهش میزان بیان ژن مربوط به پروتئین *Bcl-2* ، فرآیند آپوپتوز توسط فعال شدن سایر انکوژن‌ها از قبیل $P_{۵۳}$ شروع می‌شود. با در نظر گرفتن نقش کاسپازها در سلول‌های مختلف، مطالعات نشان داده‌اند که *Bcl-2* با مهار سنتز و تولید کاسپازها نیز می‌تواند فرآیند آپوپتوز را مهار نماید. در واقع پروتئین‌های *Bcl-2* موجود در دیواره میتوکندری‌ها با جلوگیری از رها شدن سیتوکروم C مانع تشکیل آپوپتوزوم و راه افتادن آبشار کاسپازی می‌شوند. با توجه به مطالعه آکسوی و همکاران (۱۳) از *Bcl-2* نمی‌توان به عنوان مارکر پیشگویی‌کننده پیش‌آگهی استفاده کرد. هرچند در میکروکارسینومای پاپیلاری با پیش آگهی بهتر، بیان *Bcl-2* کاهش داشته است ولی از نظر مثبت شدن ارتباط بیان *Bcl-2* که در پیش آگهی تومور کاربرد دارد رابطه معنی‌دار نبوده است. با توجه به نتایج این تحقیق میزان بیان ژن *Bcl-2* در سلول‌های تیمار شده با عصاره دینوگزانتین، نسبت به ژن مرجع *β-Actin* در رده سلولی سرطانی هلا به طور معنی‌داری کاهش یافته است. در مطالعه بومیناتان و همکاران (۱۴) و در پژوهشی از تیان و همکاران (۱۵) نشان داده شد که اثر آنتی‌اکسیدانی دینوگزانتین به ساختار

شیمیایی آن بستگی دارد که دارای یک پیوند دوگانه مزدوج گسترده و یک گروه هیدروکسیل در موقعیت C–۱ است. داینوکوکوس رادیودورانس به گونه‌های اکسیژن فعال بسیار مقاوم است. اثر آنتی‌اکسیدانی دینوگزانتین در این باکتری با استفاده از جهشی هدفمند در ژن فیتون سنتتاز، برای جلوگیری از تولید کاروتنوئید و با ارزیابی میزان بقای سلول‌ها در تنش‌های محیطی بررسی شد. یافته‌ها نشان داد که اثر آنتی‌اکسیدانی قوی‌تر دینوگزانتین، به مقاومت باکتری داینوکوکوس رادیودورانس کمک می‌کند. در مطالعه چوی و همکاران (۱۶) اثر دینوگزانتین در ممانعت از رشد سه نوع سلول سرطانی کارسینومای کبد انسان، پروستات و کولون در غلظت‌های ۱۰۰μm ،۸۰ ،۴۰ ،۲۰ بررسی شد. این مطالعه برای تعیین تاثیر دینوگزانتین بر زنده بودن سلول‌های سرطانی انسان و آپوپتوز انجام شد که در نهایت موثر بودن این ترکیب را نشان داد. نتیجه تحقیق حاضر نیز نشان داد که میزان بیان ژن *Bcl-2* در سلول‌های تیمار شده با عصاره دینوگزانتین، نسبت به ژن مرجع *β-Actin* در رده سلولی سرطانی هلا به طور معنی‌داری کاهش یافته است. در مطالعه شکفته و همکاران (۱۷) تاثیر عصاره سه گونه از جنس فرفیون ایرانی روی میزان بیان ژن *Bcl-2* در رده سلول سرطانی بررسی شد. نتیجه نشان داد که میزان بیان ژن به طور معنی‌داری کاهش و آپوپتوز افزایش یافته است. نتیجه این تحقیق نیز نشان داد که میزان بیان ژن *Bcl-2* در سلول‌های تیمار شده با عصاره دینوگزانتین، به طور معنی‌داری کاهش یافته است. تحقیق آریکان و همکاران (۱۸) در مورد تاثیر عصاره ریشه گون روی رده سلولی هلا و سنجش میزان بیان ژن *Bcl-2* نشان داد که تحت تاثیر عصاره، در رده سلولی آپوپتوز القا شده و میزان بیان ژن کاهش معنی‌داری می‌یابد و با نتیجه تحقیق ما همخوانی دارد و در تحقیق حاضر نیز کاهش بیان معنی‌داری در اثر استفاده از دینوگزانتین دیده شد. مطالعه خزایی و همکاران (۱۹) در مورد تاثیر عصاره پیاز بر میزان بیان ژن *Bcl-2* در رده سلولی سرطان کبد نشان داد میزان بیان ژن *Bcl-2* به طور معنی‌داری کاهش یافته است. نتیجه تحقیق حاضر نیز نشان داد که میزان بیان ژن *Bcl-2* در رده سلولی هلا تحت تاثیر دینوگزانتین کاهش معنی‌داری داشته است.

نتیجه‌گیری

در تحقیق حاضر، با مقایسه میزان بیان ژن *Bcl-2* در گروه سلول‌های تیمار شده با عصاره دینوگزانتین به مدت ۴۸ ساعت و گروه تیمار نشده، مشخص شد که بیان ژن *Bcl-2* نسبت به ژن مرجع *β-Actin* در سلول‌های تیمار شده، به طور معنی‌دار ($P<0.05$) و به مقدار ۴/۸۵ برابر کاهش داشته است. این یافته می‌تواند به مطالعات آینده در خصوص درمان هدفمند سرطان دهانه رحم کمک کند. همچنین، پتانسیل استفاده از ترکیبات کارتنوئیدی را آشکارتر می‌کند.

قدردانی

این مقاله از پایان‌نامه کارشناسی ارشد رشته ژنتیک دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شرق به شماره ثبت ۲۸۳۳۰۵۵۴۹۵۲۰۲۳ در تاریخ ۹۷/۴/۲۰ استخراج شده و هیچ حامی مالی نداشته است و به هزینه شخصی دانشجو انجام شده است. نگارندگان مقاله از تمام کسانی که در این تحقیق ما را یاری کردند سپاسگزاری می‌کنند.

ملاحظات اخلاقی

این مطالعه شامل ملاحظات اخلاقی نمی‌شود.

منابع مالی

این تحقیق حامی مالی نداشته است.

منافع متقابل

بین نویسندگان هیچ گونه تعارض منافع وجود ندارد.

مشارکت مؤلفان

م. کاوسی طراحی و تحلیل نتایج مطالعه و ح. باقری اجرا را عهده داشتند. م. کاوسی مقاله را نگاشته و ح. باقری نسخه نهایی آن را خوانده‌است. مقاله مورد تایید نویسندگان است. ویراستاری متن فارسی و خلاصه انگلیسی مقاله توسط م. کاوسی انجام شده است.

References

1. Niakan M, Garshasbi A, Nadoshan M. In cancer lesions (HPV), the diagnosis of human papillomavirus Cervix with molecular hybridization. Journal of Reproduction and Infertility 2001;1(3):18-22. [Persian]
2. Khodakarami N, Farzaneh F, Yavari P, Khayamzadeh M, Taheripanah R, Akbari. ME. The New Guideline for Cervical Cancer Screening in Low Risk Iranian Women. The Iranian Journal of Obstetrics Gynecology and Infertility 2014;17(95):8-17. [Persian]
3. Allen CT, Lewis JS Jr, El-Mofty SK, Haughey BH, Nussenbaum B. Human papillomavirus and oropharynx cancer: biology, detection and clinical implications. Laryngoscope. 2010 Sep;120(9):1756-72. doi: 10.1002/lary.20936. PMID: 20669304.
4. Lakhani SR, Manek S, Penault-Llorca F, Flanagan A, Arnout L, Merrett S, et al. Pathology of ovarian cancers in BRCA1 and BRCA2 carriers. Clin Cancer

Res. 2004 Apr 1;10(7):2473-81. doi: 10.1158/1078-0432.ccr-1029-3. PMID: 15073127.
5. Gustavsson M, Wilson MA, Mallard C, Rousset C, Johnston MV, Hagberg H. Global gene expression in the developing rat brain after hypoxic preconditioning: involvement of apoptotic mechanisms? Pediatr Res. 2007 Apr;61(4):444-50. doi: 10.1203/pdr.0b013e3180332be4. PMID: 17515869.
6. Cheng G, Wei L, Zhi-Dan S, Shi-Guang Z, Xiang-Zhen L. Atorvastatin ameliorates cerebral vasospasm and early brain injury after subarachnoid hemorrhage and inhibits caspase-dependent apoptosis pathway. BMC Neurosci. 2009 Jan 21;10:7. doi: 10.1186/1471-2202-10-7. PMID: 19159448; PMCID: PMC2651177.
7. Endo H, Kamada H, Nito C, Nishi T, Chan PH. Mitochondrial translocation of p53 mediates release of cytochrome c and hippocampal CA1 neuronal death after transient global cerebral ischemia in rats. J Neurosci. 2006 Jul 26;26(30):7974-83. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0897-06.2006. PMID: 16870742; PMCID: PMC6674216.
8. Tian B, Hua Y. Carotenoid biosynthesis in extremophiles Deinococcus-Thermus bacteria. Trends Microbiol. 2010 Nov;18(11):512-20. doi: 10.1016/j.tim.2010.07.007. Epub 2010 Sep 9. PMID: 20832321.
9. Asker D, Beppu T, Ueda K. Unique diversity of carotenoid-producing bacteria isolated from Miassa. *A radioactive site in Japan* 2007;77(2): 383-92. doi: 10.1007/s00253-007-1157-8
10. Hong-fong JI. Insight into the strong Antioxidant Activity of Deinoxanthin, a unique carotenoid in Deinococcus radiodurans. *Cancer* 2010; 11(11): 4506-10. doi: 10.3390/ijms11114506.
11. Krisko A, Radman M. Biology of extreme radiation resistance: the way of Deinococcus radiodurans. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2013 Jul 1;5(7):a012765. doi: 10.1101/cshperspect.a012765. PMID: 23818498; PMCID: PMC3685888.
12. Czabotar PE, Lessene G, Strasser A, Adams JM. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. Nat Rev Mol Cell Biol. 2014 Jan;15(1):49-63. doi: 10.1038/nrm3722. PMID: 24355989.
13. Aksoy M, Giles Y, Kapran Y, Terzioglu T, Tezelman S. Expression of bcl-2 in papillary thyroid cancers and its prognostic value. Acta Chir Belg. 2005 Nov-Dec;105(6):644-8. doi: 10.1080/00015458.2005.11679794. PMID: 16438077.
14. Boominathan M, Mahesh A. Seaweed carotenoids for cancer therapeutics. In Handbook of anticancer drugs from marine origin 2015;pp:185-203. Springer, Cham. doi: 10.1007/978-3-319-07145-9_10.
15. Tian B, Xu Z, Sun Z, Lin J, Hua Y. Evaluation of the antioxidant effects of carotenoids from Deinococcus radiodurans through targeted mutagenesis, chemiluminescence, and DNA damage analyses. Biochim Biophys Acta. 2007 Jun;1770(6):902-11. doi: 10.1016/j.bbagen.2007.01.016. Epub 2007 Feb 9. PMID: 17368731.
16. Choi YJ, Hur JM, Lim S, Jo M, Kim DH, Choi JI. Induction of apoptosis by deinoxanthin in human cancer cells. Anticancer Research. 2014 Apr 1;34(4):1829-35.
17. Shekofteh N, Ghafourian Boroujerdnia M, Khosravi N, Kalantar K, Malek-Hosseini S, Namdari H, et al. Apoptosis-inducing effect of the hexane extracts from three native Iranian Euphorbia plants. International Journal of Cancer Management. 2017 Nov 30;10(11).
18. Arıcan GO, Çakır O, Arıcan E, Kara T, Dağdeviren O, Arı S. Effects of Geven root extract on proliferation of HeLa cells and bcl-2 gene expressions. African Journal of Biotechnology. 2012;11(18):4296-304.
19. Khazaei S, Esa NM, Ramachandran V, Hamid RA, Pandurangan AK, Etemad A, et al. In vitro Antiproliferative and Apoptosis Inducing Effect of Allium atroviolaceum Bulb Extract on Breast, Cervical, and Liver Cancer Cells. Front Pharmacol. 2017 Jan 31;8:5. doi: 10.3389/fphar.2017.00005. PMID: 28197098; PMCID: PMC5281556.