

## اثر رزوراترول بر بیان برخی از ژن‌های درگیر در اپی ژنتیک در سل لاین‌های Mcf-7 و MDA-MB-453 سرطان پستان

حدیث احمدی‌راد<sup>۱</sup>، محمدرضا حاجی‌زاده<sup>۲\*</sup>، مهدی محمودی<sup>۳</sup>، محمدرضا میرزایی<sup>۴</sup>،  
فهیمة محمدیان شهربابکی<sup>۵</sup>، مصطفی سلطانی نژاد<sup>۶</sup>

### چکیده

مقدمه: سرطان پستان، یکی از شایع‌ترین سرطان‌ها در بین زنان است. الگوی نادرست بیان ژن‌های درگیر در اپی ژنتیک، مثل DNMT-1، APOBEC3B و TET-1 می‌تواند باعث پیشرفت سرطان پستان شود. رزوراترول جزو فلاوونوئیدهای طبیعی است که خاصیت آنتی‌اکسیدانی و ضدسرطانی آن در مطالعات دیگر گزارش شده است. در این مطالعه تأثیر ماده رزوراترول بر بیان ژن‌های مورد اشاره، در دو سل لاین سرطان پستان مورد بررسی قرار گرفت. روش بررسی: این یک مطالعه تجربی است که در محیط آزمایشگاهی صورت گرفته است در طی این مطالعه سلول‌های دو رده سلولی شامل MCF-7 و MDA-MB-453 در فلاسک‌های جداگانه شامل گروه کنترل و گروه‌های تیمار شده با دو غلظت 25 و 100 میکرومولار ماده رزوراترول به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شدند، سپس RNA استخراج و پس از تبدیل به cDNA بیان ژن‌های DNMT-1، APOBEC3B و TET-1 توسط تکنیک Real time مورد بررسی قرار گرفت. نتایج: نتایج نشان داد که رزوراترول پس از ۲۴ ساعت موجب کاهش بیان ژن DNMT-1 و APOBEC3B و افزایش بیان TET-1 در هر دو رده سلولی در مقایسه با گروه کنترل می‌شود. نتیجه‌گیری: با توجه به اثرات رضایت بخش ماده رزوراترول پس از ۲۴ ساعت تیمار روی سلول‌های سرطان پستان، احتمالاً اثرات ضد سرطانی آن از طریق تغییرات اپی ژنتیک اعمال می‌شود، البته جهت نظر قطعی بررسی‌های بیشتری لازم است.

واژه‌های کلیدی: رزوراترول، بیان ژن، اپی ژنتیک، Mcf-7 و MDA-MB-453، سرطان پستان

۱- کارشناسی ارشد بیوشیمی بالینی، گروه بیوشیمی بالینی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان

۲- استادیار بیوشیمی بالینی، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات پزشکی مولکولی دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان

۳- استادیار بیوشیمی بالینی، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات پزشکی مولکولی دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان

۴- استادیار، گروه آموزشی ژنتیک، مرکز تحقیقات پزشکی مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان

۶- دانشجو پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان

\* (نویسنده مسئول): تلفن: ۳۴۳۴۳۳۹۶۶۰، پست الکترونیکی: hajizadehus@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۱۲/۱۹

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۲/۲۰

## مقدمه

سرطان یکی از مسائل مهم بهداشت و درمان در سراسر دنیاست (۱). در جهان، سالانه بیش از یک میلیون سرطان تشخیص داده می‌شود و ۶۰۰ هزار نفر در اثر ابتلا به آن می‌میرند در ایران نیز از لحاظ بار بیماری‌ها مقام سوم و از لحاظ علت مرگ با نسبت ۴ در صد هزار نفر، پنجمین مقام را دارد (۲).

سرطان پستان یکی از شایع‌ترین انواع سرطان است که هر ساله باعث مرگ‌ومیر فراوانی در بین زنان می‌شود (۳،۴).

سرطان پستان، حاصل رشد خارج از مهار و بدخیم توده‌های سلول اپیتلیایی پوشاننده مجاری یا لوبول‌های بافت پستان در زنان (و در موارد نادر در مردان) است. این بدخیمی‌ها، حدود ۳۳٪ انواع سرطان زنان را تشکیل می‌دهد و میزان شیوع آن در جمعیت عمومی کشورهای مختلف جهان، بین ۸٪ تا ۱۰٪ در محدوده سنی ۴۰ تا ۴۴ سال برآورد شده است (۵) این سرطان تقریباً از هر ۸ زن، یک نفر را مبتلا می‌کند و دومین علت مرگ زنان در اثر سرطان است (۶). تاکنون برخی از عوامل به‌عنوان عوامل مساعدکننده بروز سرطان پستان شناخته شده‌اند که برخی از مهم‌ترین آن‌ها عبارت‌اند از: عوامل توارثی (ژن BRCA1) رژیم غذایی شامل: غذاهای پرچرب، حیوانی اشباع‌شده و اشباع‌نشده، مصرف گوشت گاو و خوک، مصرف هورمون (مصرف استروژن)، چاقی، شیردهی، یائسگی و پرتوتابی (۵).

توارث اپی ژنتیک بیان‌کننده حالات متفاوت فنوتیپی است که قابل توارث بوده ولی در توالی DNA هیچ تغییری مشاهده نمی‌شود این مطلب بدان معنی است که دو فرد با داشتن توالی یکسان در یک لوکوس خاص، فنوتیپ‌های متفاوتی دارند. فرد دیگر بیان نمی‌شود. این‌گونه واکنش‌ها توسط برخی از آنزیم‌ها مثل، APOBEC3B و DNMT-1 و TET-1 کاتالیز می‌شوند.

متیلاسیون DNA می‌تواند یکی از دلایل پدیده اپی ژنتیک باشد یعنی علی‌رغم اینکه دو نسخه یک ژن توالی کاملاً یکسانی دارد به دلیل اختلاف در میزان بازهای متیله شده یکی از ژن‌ها بیان شده در حالی که دیگری بیان نمی‌شود. غیرفعال شدن

یکی از کروموزوم‌های X در پستانداران ماده به دلیل متیلاسیون بازهای سیتوزین است. در کروموزوم X غیرفعال بازهای سیتوزین در توالی‌های 3-CpG-<sup>5</sup> متیله شده است در حالی که در کروموزوم X فعال این بازها کمتر متیله شده‌اند (۷-۹).

APOBEC3B (A3B: APO Lipoprotein b editing complex)

نقش مهمی سرطان پستان است که عامل ایجاد آن جهش C به T است. پردازش اضافی بازها توسط A3B باعث نقل و انتقال نسخه‌ها و ایجاد شکست در DNA می‌شود. مطالعه بیان ژن نشان داد که این آنزیم در برخی از بافت‌های توموری به ویژه سرطان پستان بیش از حد بیان می‌شود سرطان پستان است که عامل ایجاد آن جهش C به T است. پردازش اضافی بازها توسط A3B باعث نقل و انتقال نسخه‌ها و ایجاد شکست در DNA می‌شود. مطالعه بیان ژن نشان داد که این آنزیم در برخی از بافت‌های توموری به ویژه سرطان پستان بیش از حد بیان می‌شود (۷).

در میان تغییرات اپی ژنتیک می‌توان به متیلاسیون اشاره کرد. این واکنش توسط آنزیم DNMT (DNA Methyltransferase) کاتالیز می‌شود که سیتوزین موجود در جزایر CPG ناحیه پرموتور را به 5-متیل سیتوزین تبدیل می‌کند (۷،۱۲).

خانواده TET-1 (ten-eleven translocation) در پستانداران شامل سه عضو TET-1-2، TET-1-3 و TET-1 است. آنزیم TET-1 با دخالت چند آنزیم دیگر سیتوزین متیله را دمتیله می‌کند این پروتئین‌ها می‌توانند اکسیداسیون 5-متیل سیتوزین را کاتالیز کرده و مشتقات آن را مانند هیدروکسی متیل سیتوزین تولید کنند که در نهایت به دمتیلاسیون DNA منجر می‌شود (۱۳،۱۴). تحقیقات جدید کاهش چشمگیر بیان ژن‌های TET-1 و متعاقباً 5 mhC را در سرطان‌های سینه، کبد، ریه، پانکراس و پروستات گزارش کرده است (۱۵) متیلاسیون DNA در طی تکامل ضروری است اما متیلاسیون نا به جای آن (هایپرمتیلاسیون و هیپومتیلاسیون) با افزایش ابتلا به سرطان در ارتباط است (۱۶). به هر حال نقش دقیق این ژن‌ها در سرطان روشن نیست و نیاز به مطالعات بیشتری دارد.

جایی که یکی از مکانیسم‌هایی که در افزایش و کاهش بیان ژن اثر دارد مسئله اپی ژنتیک است، در این پژوهش ابتدا میزان بیان ژن APOBEC3B در cell line‌های سرطان پستان در حضور و عدم حضور ماده رزوراترول انجام شد و در مرحله بعدی بیان برخی دیگر از ژن‌های دخیل در اپی ژنتیک شامل TET-1 و DNM-1 مورد بررسی قرار گرفت.

### روش بررسی

سلول‌های مورد مطالعه

در این پروژه از دو رده سلولی تومور پستان شامل MCF-7 (حساس به استروژن) و MDA-MB-453 مقاوم به استروژن که فاقد گیرنده استروژن است) استفاده شد. سل‌ل‌های مورد نظر از شرکت انستیتو پاستور ایران تهیه شدند. سپس هر کدام از سل‌ل‌ها به طور جداگانه به فلاسک ۲۵ سانتی‌متر مربعی انتقال و پس از رشد در محیط کشت RPMI 164 پاساژ داده شدند. برای پاساژ سلول‌ها، ابتدا محیط کشت تخلیه شد و سلول‌ها با ۱۰ میلی‌لیتر از محلول PBS مورد شستشو قرار گرفتند. سپس یک میلی‌لیتر تریپسین ۰/۰۵ درصد برای جدا شدن سلول‌ها از ته فلاسک به آن اضافه شد. برای اطمینان از جداسازی سلول‌ها، فلاسک در زیر میکروسکوپ برده و سلول‌ها را مشاهده کردیم و محتویات فلاسک درون فالكون ۱۵ ریخته و سپس مقدار ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت که حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی FBS و آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین و استرپتوماسین Pen/Strep بود، اضافه گردید و در دور rpm ۱۲۰۰ به مدت ۳ دقیقه سانتریفیوژ و توده سلولی در ته فالكون جمع و محیط کشت رویی دور ریخته شد. سپس سلول‌ها، به فلاسک‌های ۲۵ سانتی‌متری جدید برای پاساژ انتقال یافتند.

تخلیص mRNA از سلول و سنتز cDNA

استخراج Total RNA سلولی

با استفاده از کیت تخلیص RNA (Pars tous) ساخت کشور ایران مطابق با پروتکل آن انجام گرفت. صحت RNA استخراج‌شده با روش الکتروفورز در آگاروز یک درصد و رنگ‌آمیزی با Green Viewer DNA و مشاهده سه باند RNA

یکی از مهم‌ترین محدودیت‌های داروهای سرطانی ایجاد مقاومت سلول‌ها سرطانی در برابر دارو است که این عمل ممکن ذاتی و یا در طول درمان اتفاق بیفتد امروزه داروهای گیاهی به علت عدم عوارض جانبی نسبت به داروهای شیمیایی، نظر بسیاری از دانشمندان را به خود جلب کرده‌اند (۱۸).

گیاهان زیادی مشخص شده که در درمان سرطان کاربرد دارند که ۶۰ درصد آن‌ها به صورت طبیعی مصرف می‌شوند (۱۹). تقویت توان ضداکسایشی با استفاده از مکمل‌های گیاهی و طبیعی از جمله شیوه‌های مقابله با استرس اکسیداتیو است. (۲۰) رزوراترول دارای خواص آنتی‌اکسیدانی بوده و در پیشگیری و بهبود بسیاری از بیماری‌ها مفید است (۲۱). رزوراترول در ۷۰ نوع ماده گیاهی وجود دارد. پوست و آب انگور غنی‌ترین منبع حاوی رزوراترول است. این ماده یک فیتوآلکسین (Phytoalexin) است که برای دفاع از انگور در برابر اشعه ماوراءبنفش، ویروس‌ها، باکتری‌ها و قارچ‌ها تولید می‌شود (۲۲).

رزوراترول در پوست انگور به خصوص انگور قرمز به علت داشتن مواد آنتی‌اکسیدانی باعث جلوگیری از اکسیداسیون کلسترول و LDL می‌شود. اثربخشی این ماده بر روی بیماران قلبی و سرطانی از ویتامین‌های A و E بیشتر است. این مکمل برای افراد در معرض استرس مفید بوده و از پیری پوست جلوگیری می‌کند (۸). فیتوفنول رزوراترول از دسته شبه فلاون‌ها است که از لحاظ شیمیایی با فرمول C<sub>14</sub>H<sub>12</sub>O<sub>3</sub> و با وزن ملکولی 228 جزء گروه ترکیباتی به نام استیلین (Stilbene) قرار می‌گیرد. این گروه مواد به دلیل ساختار شیمیایی خود، توانمندی بسیار بالایی در مهار رادیکال‌های آزاد دارند. از آن جایی که رزوراترول هیچ‌گونه اثرات سمی و عوارض جانبی برای بدن نداشته و در خوراکی‌های طبیعی نیز وجود دارد انتخاب خوبی به منظور دفع رادیکال‌های آزاد موجود در بافت‌ها است (۲۳).

تحقیقات متعددی نشان دادند که بیان ژن APOBEC3B در سل‌ل‌ها و بافت‌های سرطانی افزایش یافته است، اما دلیل و مکانیسم این افزایش در پارهای از ابهام است (۲۴) و از آن

کشت داده شدند و پس از گذشت ۲۴ ساعت ۳ فلاسک به عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شد. همچنین ۳ فلاسک با غلظت ۱۰۰ میکرومولار از ماده رزوراترول تیمار شدند. پس از گذشت ۲۴ ساعت تعداد ۱۰۰۰۰۰ سلول از هر فلاسک کشت سلولی جدا و RNA از سلول‌ها استخراج و cDNA ساخته شد لازم به ذکر است که این آزمایش برای هر نمونه ۶ بار تکرار و اطلاعات به دست آمده از این مطالعه وارد چک لیست شدند.

اطلاعات چک لیست‌ها پس از جمع‌آوری توسط نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۱۸ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت میزان تغییرات فاکتورهای بیوشیمیایی به صورت <<انحراف معیار ± میانگین>> گزارش شد. به منظور مقایسه میزان بیان ژن APOBEC3B، DNMT-1 و TET-1 در سل‌لاین‌های MCF-7 و MDA-MB-453 سرطان پستان در حضور و عدم حضور و ۱۰۰ میکرومولار از ماده رزوراترول از آزمون آ two-sample t-test Independent استفاده شد و سطح معنی‌داری در این آزمون‌ها ۰/۰۵ است. این طرح پژوهشی دارای کد اخلاق IR.RUMS.REC.1394.231 می‌باشد.

### نتایج

در این مطالعه بیان سه ژن APOBEC3B، DNMT\_1 و TET-1 در دو رده سلولی سرطان پستان که به مدت ۲۴ ساعت در معرض ماده رزوراترول قرار گرفتند مورد بررسی قرار گرفت و از آزمون Independent two-sample t-test در این مطالعه استفاده شد.

در این مطالعه نشان داد که میانگین بیان ژن APOBEC3B در سل‌لاین سرطانی MCF-7 پس از ۲۴ ساعت تیمار با غلظت‌های ۲۵ و ۱۰۰ میکرومولار به صورت معنی‌داری کاهش پیدا کرد و همچنین تفاوت زیاد آن در غلظت ۱۰۰ میکرومولار مشاهده شد ( $p=0/001$ ).

همچنین در این پژوهش مشاهده شد که میانگین بیان ژن APOBEC3B در سل‌لاین MDA-MB-453 پس از ۲۴ ساعت تیمار با غلظت‌های ۲۵ و ۱۰۰ میکرومولار به صورت معنی‌داری کاهش پیدا می‌کند که سطح معنی‌داری هر دو غلظت با هم یکسان بود ( $p=0/027$ ).

با دستگاه ژل داگ مورد بررسی قرار گرفت (۲۵).

ابتدا RNA با استفاده از کیت (Pars tous) به cDNA تبدیل شد. برای سنتز cDNA، در مرحله اول مقدار ۳ میکرولیتر RNA تام، ۱ میکرولیتر Random hexamer، ۲ میکرولیتر oligo dt، ۴ میکرولیتر DEPC در دستگاه ترموسایکلر (از شرکت Bio-Rad مدل ۱۰۰۰ C) برنامه 70cDNA به مدت ده دقیقه قرار دادیم و سپس آن را از دستگاه خارج و مدت ۲ دقیقه خنک شد و در مرحله دوم میزان ۱۰ میکرولیتر RT MIX به مخلوط اضافه کرده و به دستگاه برنامه 42cDNA داده و در نهایت بعد از ۶۰ دقیقه cDNA ساخته شد.

پرایمرها توسط نرم‌افزار oligo طراحی شد و توالی پرایمرها به شرح زیر بود:

APOBEC3B:

F: GCACCGCACGCTAAAGGAG

R: CACAGAGAAGATTCTTAGCCTCGT

DNMT-1:

F: CCGACGATGTCCGCAGG

R: TTAGCCAGGTAGCCCTCCTC

TET-1:

F: CTTTGGGCTCAGGACACACT

R: CTCAGGGGCTAATGGGAACC

B.ACTIN:

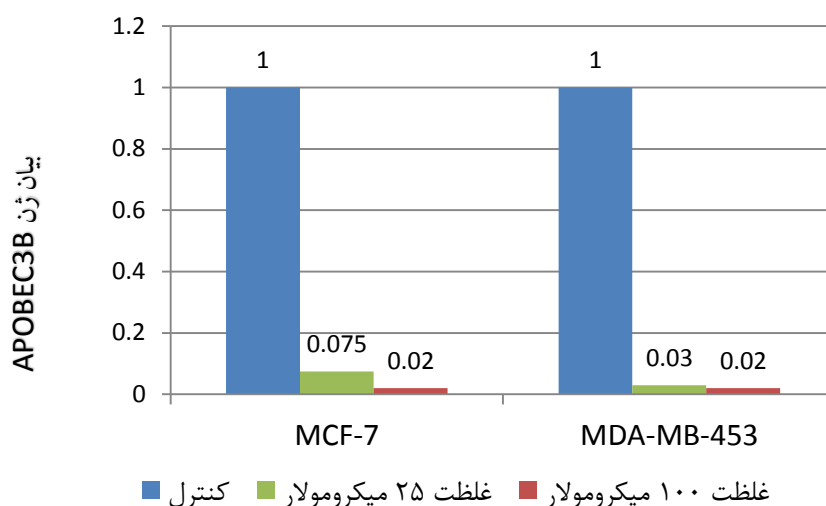
F: CTGGGCATGGAGTCCTGTG

R: CTTCATTGTGCTGGGTGCCA

۳ میکرولیتر از cDNA سنتز شده را به همراه ۲ میکرولیتر پرایمر، ۱۰ میکرولیتر آنزیم DNA Taq پلیمرز و ۵ میکرولیتر DNase free مخلوط کردیم و در دستگاه RT-PCR (از شرکت Bio-Rad مدل CFX96) قرار دادیم.

برای پایش هر مرحله از سایبر گرین (شرکت Genet Bio) استفاده شد. غلظت مورد نظر نسبت به غلظت ژن بتا-اکتین گزارش شد. از بتا-۲-اکتین به عنوان استاندارد داخلی مورد استفاده قرار گرفت (۲۶).

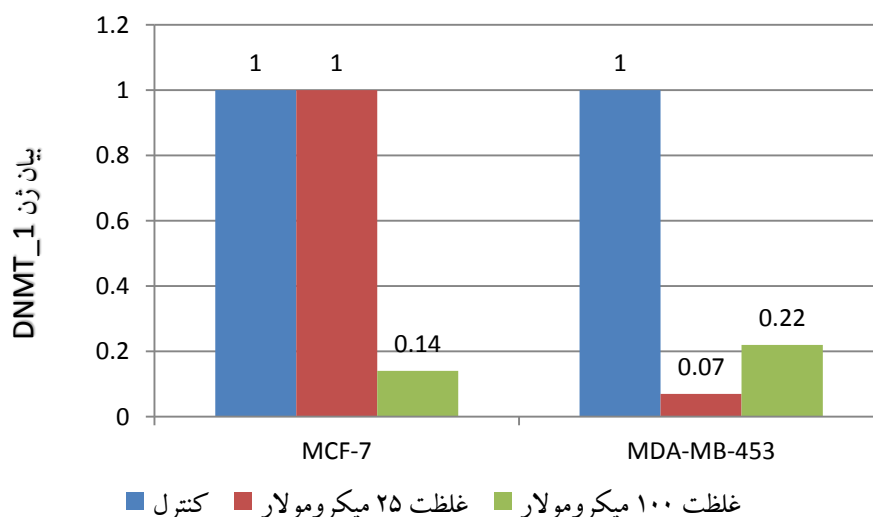
در این مطالعه سلول‌های مورد نظر در ۹ فلاسک جداگانه



نمودار ۱: مقایسه میانگین بیان ژن APOBEC3B در غلظت‌های مختلف ماده رزوراترول در سل‌های MCF-7 و MDA-MB-453

میانگین بیان ژن DNMT-1 در سل‌های MDA-MB-453 در تیمار با هر دو غلظت رزوراترول پس از ۲۴ ساعت به صورت معنی‌داری کاهش یافت که این سطح معنی‌داری در هر دو غلظت یکسان بود ( $p=0/00$ ).

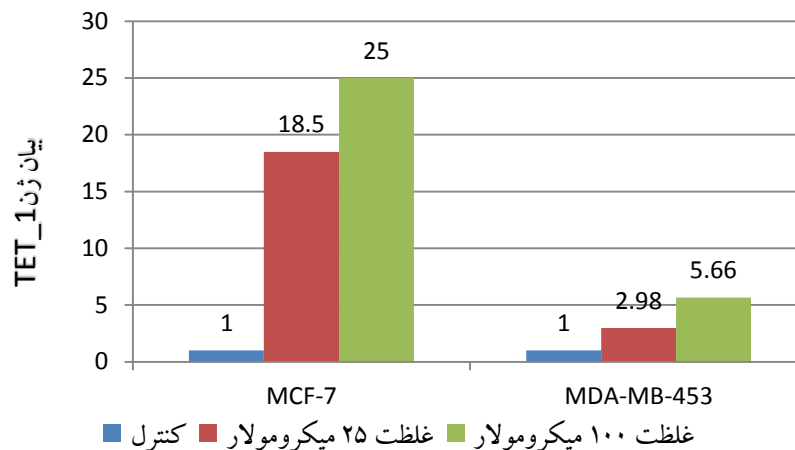
میانگین بیان ژن DNMT-1 در سل‌های MCF-7 در تیمار با رزوراترول تغییر زیادی مشاهده نشد در حالی که در همین شرایط با غلظت ۱۰۰ میکرومولار میانگین بیان این ژن به صورت معنی‌داری کاهش یافت ( $p=0/04$ ).



نمودار ۲: مقایسه میانگین بیان ژن DNMT-1 در غلظت‌های مختلف ماده رزوراترول در سل‌های MCF-7 و MDA-MB-453

میانگین بیان ژن TET-1 در سل‌های سرطانی MDA-MB-453 بعد از ۲۴ ساعت تیمار با غلظت‌های ۲۵ و ۱۰۰ میکرومولار از رزوراترول افزایش یافت و بیشترین سطح تغییرات معنی‌داری آماری آن مربوط به غلظت ۱۰۰ میکرومولار بود ( $p=0/04$ ).

میانگین بیان ژن TET-1 در سل‌های سرطانی MCF-7 بعد از ۲۴ ساعت تیمار با غلظت‌های ۲۵ و ۱۰۰ میکرومولار از رزوراترول افزایش یافت و بیشترین سطح تغییرات معنی‌داری آن مربوط به غلظت ۱۰۰ میکرومولار بود ( $p=0/00$ ).



نمودار ۳. مقایسه میانگین بیان ژن TET-1 در غلظت‌های مختلف ماده رزوراترول در سل‌های MCF-7 و MDA-MB-453

### بحث

TET-1 در رده MCF-7 تغییر معنی‌داری نداشت، اما در رده MDA-MB-453 افزایش معنی‌دار نشان داد.

در پژوهش Burns و همکاران که بر بروی میزان بیان ژن APOBEC3B انجام شده به این نتیجه رسیدند که این ژن در بسیاری از سلول‌های سرطانی به ویژه سرطان پستان بیش از اندازه بیان می‌شود و منبع احتمالی جهش‌های سوماتیک درگیر در سرطان است (۷).

Sieuwertس و همکاران مشاهده کردند که افزایش سطح بیان ژن APOBEC3B در افراد مبتلا به سرطان پستان که از نظر گیرنده استروژنی مثبت هستند با پیش‌آگهی بد همراه است می‌توان نتیجه گرفت که کنترل بیان آن احتمالاً به کاهش جهش سیتوزین به تیمین و متعاقباً کاهش ابتلا به سرطان کمک می‌کند (۳۲).

Rhee و همکاران در تحقیقی مشاهده کردند DNMT-1 ژن دیگری است که در اپی‌ژنتیک دخیل است و به عنوان مسئول اکثر متیلاسیون ژنوم انسانی و متیلاسیون غیرعادی در سرطان‌ها در نظر گرفته می‌شود (۳۳).

Won و همکاران در تحقیقی مشاهده کردند که بیوفلانوئیدها باعث مهار آنزیم DNMT می‌شوند. این محققان دریافتند که فلاوونوئیدها می‌توانند درجه متیلاسیون ژنوم را تغییر دهند (۳۴). Link و همکاران پیرامون اثرات مفید پلی‌فنول‌ها بر تغییرات

سرطان پستان یکی از شایع‌ترین سرطان‌ها در بین زنان است. در طی چند دهه اخیر با وجود کاهش میزان مرگ‌ومیر ولی میزان بروز این سرطان افزایش یافته است (۲۷). اگرچه آنتی‌بادی‌های منو کلونال در درمان این بیماری مؤثر است اما مقاومت سلول‌ها در برابر رادیوتراپی و شیمی‌درمانی باعث افزایش میزان مرگ‌ومیر می‌شود؛ بنابراین ارائه راه‌کارهای جدید برای درمان سرطان پستان مهم و کاربردی است (۲۸). رزوراترول یک ترکیب پلی‌فنلی، ضدقارچ و ضدباکتری است که نقش مهمی نیز در مهار سرطان پستان ایفا می‌کند (۲۹). این ماده ضدسرطانی از طریق تحریک آپوپتوز، مهار چرخه سلولی و همچنین ایجاد تغییرات اپی‌ژنتیکی در کاهش بیان ژن DNMT-1 و همچنین کاهش متیلاسیون ژن‌های مهمی از جمله BRCA-1 می‌شود (۳۰، ۳۱).

در این مطالعه اثر رزوراترول بر چندین ژن درگیر در اپی‌ژنتیک مانند DNMT-1، APOBEC3B و TET-1 در سل‌های سرطان پستان با استفاده از تکنیک Real-time PCR بررسی گردید. نتایج نشان داد که تیمار با رزوراترول پس از ۲۴ ساعت موجب کاهش بیان ژن APOBEC3B در رده سلولی MCF-7 و MDA-MB-453 شد. همچنین میزان بیان ژن DNMT-1 پس از ۲۴ ساعت در هر دو رده به طور معنی‌داری کاهش یافته است. بررسی‌های ۲۴ ساعته نشان داد که بیان ژن

داد که این ماده مؤثر می‌تواند باعث کاهش رشد سلول‌های سرطانی شود.

### نتیجه گیری

با توجه به اثبات پتانسیل ضد سرطان رزوراترول در رده‌های سلولی سرطانی متفاوت، نتایج مطالعه حاضر این است که فلاونوئید طبیعی قادر است بیان ژن‌های دآمیناز و متیل ترانسفراز را دست‌خوش تغییر کند. با توجه به نقش بالای آنزیم‌های APOBEC3B و DNMT-1 در پیشرفت سرطان پستان و کاهش بیان ژن این آنزیم‌ها پس از ۲۴ ساعت تیمار با رزوراترول، می‌توان پیشنهاد داد که این ماده ممکن است دارای خواص پیشگیری‌کننده یا درمان‌کننده (از طریق کاهش جهش‌های سوماتیک و متیلاسیون) علیه این نوع سرطان باشد. همچنین افزایش بیان ژن TET-1 پس از ۲۴ ساعت نیز نقش احتمالی ماده رزوراترول در بهبود سرطان را تایید می‌کند.

### سپاسگزاری

مقاله فوق نتیجه طرح تحقیقاتی مصوب دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان است. بدین‌وسیله از حمایت مالی معاونت محترم پژوهشی دانشگاه و همچنین از اساتید محترم گروه بیوشیمی بالینی دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان که در انجام این طرح ما را یاری کردند تشکر به عمل می‌آورم.

اپی ژنتیک شامل متیلاسیون DNA و هیستون‌ها مطالعه کردند و به این نتیجه رسیدند که فلاونوئیدها باعث کاهش متیلاسیون و بیان DNMT-1 و در نتیجه کاهش پیشرفت سرطان می‌شود (۳۵).

در مطالعه‌ای که ما انجام دادیم میانگین بیان این ژن در مدت تیمار ۲۴ ساعت در غلظت‌های مختلف در هر دوسل لاین MCF-7 و MDA-MB-453 کاهش یافته بود.

TET آنزیم دیگری است که در اپی ژنتیک نقش دارد و باعث دمتیلاسیون ژنوم می‌شود. بنا بر مطالعات انجام شده توسط Tahiliani و همکاران تمامی اعضای خانواده TET دارای توانایی ساختن 5hmC هستند، اما تنها بیان بیش از حد TET-1 و TET-2 سبب کاهش میزان متیلاسیون می‌شود هر چند که مطالعات زیادی در رابطه با بیان این ژن‌ها در سرطان انجام نشده است (۳۶،۳۷)، یک تحقیق جدید که توسط Yang و همکاران صورت گرفت، کاهش چشمگیر بیان ژن‌های TET-1 و 5hmC را در سرطان‌های سینه، کبد، ریه، پانکراس و پروستات گزارش کرده است (۳۸). با توجه به مطالعات صورت گرفته احتمالاً تحریک بیان این ژن می‌تواند به کاهش متیلاسیون و متعاقباً به کاهش رشد سرطان کمک کند در مطالعه ما نیز میانگین بیان TET در هر دو سل لاین سرطانی پستان که در معرض رزوراترول بودند افزایش یافت که می‌توان این احتمال

### References:

- 1- Rajaei fard A, Tabatabaee H, Moghimi B, Zeighami B, Safaei A, Tabei Z. *Checking Cases of esophageal cancer in Fars Province (2001-2006)*. J Kermanshah Med Sci uni 2009; 13(1): 65-73. [persian]
- 2- Holt CL, Kyles A, Wiehagen T, Casey C. *Development of a spiritually based breast Cancer educational booklet for African-American women*. Cancer Control 2003; 10(5): 37-44.
- 3- Howell A, Sims AH, Ong KR, Harvie MN, Evans DG, Clarke RB, et al. *Mechanisms of Disease prediction and prevention of breast cancer cellular and molecular interactions*. Nat Clin Pract Oncol 2005; 2(12): 635-46.
- 4- Varangot M, Barrios E, Sónora C, Aizen B, Pressa C, et al. *Clinical evaluation of a panel FNA markers in the detection of disseminated tumor cells in patients with operable breast cancer*. Oncol Rep 2005; 14(2):

- 537-45.
- 5- Brunicardi FCh. (2005). *Schwartz's principles of surgery*. 8th ed. New York: McGraw-Hill. 654-9.
  - 6- Lehto US, Ojanen M, DybaiT, Aromaa A, kellokumpu-Lehtinen P. *Baseline psychosocial predictors of survival in localised breast cancer*. British J Cancer 2006; 94(9): 1245-52.
  - 7- Burns MB, Lackey L, Carpenter MA, Rathore A, Land AM, Leonard B, et al. *APOBEC3B is an enzymatic source of mutation in breast cancer*. Nature 2013; 494(7437): 366-70.
  - 8- Tan L, Shi YG. *TET-1 family proteins and 5-hydroxymethylcytosine in development and disease*. Development 2012; 139(11): 1895-902.
  - 9- Chahwan R, Wontakal SN, Roa S. *Crosstalk between genetic and epigenetic information through cytosine deamination*. Trends in genetics 2010; 26(10): 443-8.
  - 10- Lackey L, Demorest ZL, Land AM, Hultquist JF, Brown WL, Harris RS. *APOBEC3B and AID have similar nuclear import mechanisms*. J molecular biology 2012; 419(5): 301-14.
  - 11- Ooms M, Krikoni A, Kress AK, Simon V, Münk C. *APOBEC3A, APOBEC3B, and APOBEC3H haplotype 2 restrict human T-lymphotropic virus type 1*. J virology 2012; 86(11): 6097-6108.
  - 12- Almeida L, Custodio A, Pinto G, Santos M, Almeida J, Clara C, et al. *Polymorphisms and DNA methylation of gene TP53 associated with extra-axial brain tumors*. Genet Mol Res 2009; 8(1): 8-18.
  - 13- Guo JU, Su Y, Zhong C, Ming G, Song H. *Hydroxylation of 5-methylcytosine by TET-11 promotes active DNA demethylation in the adult brain*. Cell 2011; 145(3): 423-34.
  - 14- Popp C, Dean W, Feng S, Cokus SJ, Andrews S, Pellegrini M, et al. *Genome-wide erasure of DNA methylation in mouse primordial germ cells is affected by AID deficiency*. Nature 2010; 463(7284): 1101-5.
  - 15- Yang H, Liu Y, Bai F, Zhang J, Ma S, Liu J, et al. *Tumor development is associated with decrease of TET-1 gene expression and 5-methylcytosine hydroxylation*. Oncogene 2013; 32(5): 663-9.
  - 16- Yang AS, Estécio MR, Doshi K, Kondo Y, Tajara EH, Issa JPJ. *A simple method for estimating global DNA methylation using bisulfite PCR of repetitive DNA elements*. Nucleic acids research 2004; 32(3): 20-38.
  - 17- Gordanian B, Behbahani M, Carapetian J, Fazilati M. *In vitro evaluation of cytotoxic activity of flower, leaf, stem and root extracts of five Artemisia species*. Research in Pharmaceutical Sci 2014; 9(2): 91-96.
  - 18- Hoffman E. *Cancer and the search for selective biochemical inhibitors*. 2th ed. Boca Raton. CRC Press; 2007
  - 19- Dai J, Mumper RJ. *Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties*. Molecules 2010; 15: 7313-52.
  - 20- Frankel EN, Waterhous AL, Kinsella JE. *Inhibition of human LDL oxidation by resveratrol*. Lancet 1993; 341(8852): 1103-4.
  - 21- Wadi Poor M. *Proceedings of the nurses in Isfahan* 2009; 7(12): 76-8. [persion]

- 22- Xu Q, Si LY. *Resveratrol role in cardiovascular and metabolic health and potential mechanisms of action*. Nutr Res 2012; 32(9): 648-58.
- 23- Dong H, Ren H. *New progression in the study of protecties of resveratrol in anticardiovascular disease*. Bratisl Lek Listy 2004; 105(5-6): 225-29.
- 24- Lackey L, Demorest ZL, Land AM, Hultquist JF, Brown WL, Harris RS. *APOBEC3B and AID have similar nuclear import mechanisms*. J molecular biology 2012; 419(5): 301-14.
- 25- Abolhassani A, Riazi GH, Azizi E, Amanpour S, Muhammadnejad S, Haddadi M, et al. *FGF10: Type III Epithelial Mesenchymal Transition and Invasion in Breast Cancer Cell Lines*. J Cancer 2014; 5(7): 537.
- 26- Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, et al. *Primer3 new capabilities and interfaces*. Nucleic acids 2012; 40(15): e115.
- 27- Jaenisch R and Bird A. *Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals*. Nat Genet 2003; 33: 245-54.
- 28- Ward C, Langdon SP, Mullen P, Harris AL, Harrison DJ, Supuran CT, et al. *New strategies for targeting the hypoxic tumour microenvironment in breast cancer*. Cancer treatment reviews 2013; 39(2): 171-9.
- 29- Malekyian Fini E, Shavandi N, Saremi A. *Effect of short-term Resvin supplementation on total antioxidant capacity ,super oxide dismutase, and creatine kinase in elite women volleyball players*. Iranian J Nutrition Sciences & Food Technology 2013; 8(3): 79-86.
- 30- Casanova F, Quarti J, da Costa DCF, Ramos CA, da Silva JL, Fialho E. *Resveratro chemosensitize breast cancer cells to melphalan by cell cycle arrest*. J cellular biochemistry 2012; 113(8): 2586-96.
- 31- Qin W, Zhu W, Sauter E. *Resveratrol induced DNA methylation in ER+ breast cancer*. AACR 2005; 46(9): 2750
- 32- Sieuwerts Am, Burns M, Look M, Meijer-Van Gelder M, Schlicker A, Heidemann M, et al. *Abstract S6-05: High levels of APOBEC3B, a DNA deaminase and an enzymatic source of C-to-T transitions, are a validated marker of poor outcome in estrogen receptor-positive breast cancer*. Cancer Res 2013;73(24 ); 60- 8.
- 33- Rhee I, Jair K-W, Yen R-WC, Lengauer C, Herman JG, Kinzler KW, et al. *CpG methylation is maintained in human cancer cells lacking DNMT\_1*. Nature 2000; 404(6781): 1003-7.
- 34- Lee WJ, Shim J-Y, Zhu BT. *Mechanisms for the inhibition of DNA methyltransferases by tea catechins and bioflavonoids*. Molecular pharmacology 2005; 68(4): 1018-30.
- 35- Link A, Balaguer F, Goel A. *Cancer chemoprevention by dietary polyphenols: promising role for epigenetics*. Biochemical pharmacology 2010; 80(12): 1771-92.
- 36- Ito S, Shen L, Dai Q, Wu SC, Collins LB, Swenberg JA, et al. *Tet proteins can convert 5-methylcytosine to 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine*. Science 2011; 333(6047): 1300-3.

- 37- Tahiliani M, Koh KP, Shen Y, Pastor WA, Bandukwala H, Brudno Y, et al. *Conversion of 5-methyl cytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1*. Science 2009; 324(5929): 930-5.
- 38- Yang H, Liu Y, Bai F, Zhang J, Ma S, Liu J, et al. *Tumor development is associated with decrease of TET-1 gene expression and 5-methylcytosine hydroxylation*. Oncogene 2013; 32(5): 663-9.

## Effect of resveratrol the expression of some genes involved epigenetic in breast cancer cell lines (MCF-7, MDA-MB-453)

Hadis Ahmadirad<sup>1</sup>, Mohammad Reza Hajizadeh<sup>2</sup>, Mehdi Mahmoodi<sup>3</sup>,  
Mohamadreza Mirzaee<sup>4</sup>, Fahime Mohammadain Shahrababaki<sup>5</sup>, Mostafa Soltaninejad<sup>6</sup>

<sup>1,5</sup> MSc in clinical Biochemistry, University of Medical Sciences, Rafsanjan, Iran

<sup>2</sup> Department of Clinical Biochemical, Molecular Medicine Research Center, Medical School, Rafsanjan University of Medical Sciences, Rafsanjan, Iran

<sup>3</sup> Department of Clinical Biochemical, Medical School, Rafsanjan University of Medical Sciences, Rafsanjan, Iran

<sup>4</sup> Department of Genetic, Molecular Medicine Research Center, Medical School, Rafsanjan University of Medical Sciences, Rafsanjan, Iran

<sup>6</sup> Rafsanjan University of Medical Sciences, Rafsanjan, Iran

**Received:** 9 May 2016

**Accepted:** 9 Mar 2017

### Abstract

**Introduction:** Breast cancer is one of the most common cancers among women. The wrong pattern gene expression involved in Epigenetic such as APOBEC3B, DNMT-1 and TET-1 can cause the progress breast cancer. According to the previous studies, resveratrol is a natural Flavonoid, which has recent studies have shown antioxidant and anti-cancer properties.

**Methods:** In this study, the effect of 25 and 100  $\mu$ M concentrations of resveratrol on two types of cell line (MCF-7, MDA-MB-453) was investigated. Then, after 24 hours treatment of cells, mRNA was extracted and turned to cDNA. Finally, genes expression of APOBEC3B, DNMT-1 and TET-1 were determined by Real time technique.

**Results:** The results showed that resveratrol decreased APOBEC3B and DNMT-1 gene expression but TET-1 gene expression was increased following treatment by resveratrol in both cell lines compared to the control group and it also increased in expression of TET-1 in both of cell lines compared with the control group.

**Discussion:** Considering the satisfactory effects of resveratrol after 24 hours of treatment on breast cancer cells, its anticancer effects are likely to be exerted through epigenetic changes, although more definitive studies are needed.

**Keywords:** Resveratrol, Gene expression, Epigenetics, Cell lines, Breast cancer, MCF-7, MDA-MB-453

#### This paper should be cited as:

Hadis Ahmadirad, Mohammad Reza Hajizadeh, Mehdi Mahmoudi, Mohamadreza Mirzaee, Fahime Mohammadain Shahrababaki, Mostafa Soltaninejad. **Effect of resveratrol the expression of some genes involved epigenetic in breast cancer cell lines (MCF-7, MDA-MB-453).** J Shahid Sadoughi Univ Med Sci 2017; 25(7): 526-36.

\*Corresponding author: Tel: 3434339660, email: hajizadehus@yahoo.com