

اثر همزمان عصاره‌ی میوه‌ی بلوط و سیس پلاتین بر روی چرخه‌ی سلولی، آپوپتوز و بیان ژن‌های کلیدی *P21*, *MMP2*, *CDK2* در رده‌ی سلولی سرطان معده

مریم مهدی ساسان^۱، حمید گله‌داری^۱، سید منصور سید نژاد^۱، سالار اندرزی^۱، محمدرضا حجاری^۱

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: هدف از انجام این مطالعه، بررسی اثر عصاره‌ی میوه بلوط و ترکیب آن با داروی شیمی‌درمانی سیس پلاتین بر روی رده‌ی سلولی آدنو کارسینوم معده AGS و همچنین ارزیابی تأثیر آن بر چرخه‌ی سلولی، آپوپتوز، متاستاز و بیان ژن‌های کلیدی *P21*, *CDK2* و *MMP2* بود.

روش‌ها: اثرات سیتوتوکسیک عصاره‌ی میوه بلوط و ترکیب آن با سیس پلاتین بر رده‌ی سلولی AGS سرطان معده ۴۸ ساعت پس از تیمار با استفاده از روش MTT بررسی شد. پس از استخراج RNA و سنتز cDNA، با استفاده از Real-Time PCR تغییرات بیان ژن‌های *CDK2*, *P21* و *MMP2* مورد بررسی قرار گرفت. همچنین به بررسی چرخه‌ی سلولی و آپوپتوز جهت بررسی اثر این ترکیبات به روش فلوسایتومتری پرداخته شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که استفاده‌ی همزمان عصاره‌ی میوه بلوط و سیس پلاتین، پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون، موجب تأثیرات بیشتر آپوپتوز و مرگ سلولی و مهار متاستاز و همچنین کاهش بیان *MMP2* نسبت به استفاده سیس پلاتین به تنهایی می‌باشد. علاوه بر این ترکیب فوق باعث توقف چرخه‌ی سلولی در فاز G1 و کاهش فاز S می‌شود. از طرفی فعالیت *CDK2/cyclin E* به واسطه‌ی افزایش سطح بیان ژن *P21*، کاهش می‌یابد.

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد ترکیب عصاره‌ی میوه بلوط و سیس پلاتین می‌تواند با افزایش بیان ژن‌هایی که نقش سرکوبگر تومور دارند، مثل *P21* و کاهش بیان *CDK* منجر به مهار رشد شوند. از سوی دیگر با کاهش بیان ژن‌هایی مثل *MMP2* از مهاجرت سلول‌ها جلوگیری می‌کند. همچنین باعث مهار رشد سلول‌های سرطانی از طریق القاء آپوپتوز می‌گردد و این اثر قابل مقایسه با اثر سیس پلاتین به تنهایی می‌باشد.

واژگان کلیدی: سرطان معده؛ مهارکننده‌ی تومور؛ بلوط؛ سیس پلاتین؛ آپوپتوز؛ ژن

ارجاع: مهدی ساسان مریم، گله‌داری حمید، سید نژاد سید منصور، اندرزی سالار، حجاری محمدرضا. اثر همزمان عصاره‌ی میوه‌ی بلوط و سیس پلاتین بر روی چرخه‌ی سلولی، آپوپتوز و بیان ژن‌های کلیدی *P21*, *MMP2*, *CDK2* در رده‌ی سلولی سرطان معده. مجله دانشکده پزشکی اصفهان

۱۴۰۲؛ ۴۱ (۷۴۸): ۱۱۳۹-۱۱۲۸

متعددی با این سرطان مرتبط هستند. یکی از مهم‌ترین عوامل خطر مرتبط با سرطان معده، عفونت با هلیکوباکتر پیلوری و ویروس اپشتین بار (Epstein-Barr) EBV است (۵). رژیم غذایی که شامل افزایش نمک، غذاهای دودی، نیترات‌ها، نیتريت‌ها و آمین‌های ثانویه می‌باشند، نقش مهمی در افزایش خطر سرطان معده دارند (۶). اگرچه عمدتاً سرطان معده به‌صورت تک‌گیر اتفاق می‌افتد، حدود ۱۰ درصد از موارد، سابقه‌ی خانوادگی را نشان می‌دهد (۷). تقریباً ۱۰ درصد از موارد سرطان معده در خانواده‌ها و ۱ تا ۳ درصد موارد به دلیل سندرم سرطان ارثی (Hereditary diffuse gastric cancer) HDGC

مقدمه

سرطان، دومین علت اصلی مرگ‌ومیر در جهان پس از بیماری‌های قلبی - عروقی است (۱). سرطان معده (Gastric Cancer)، پنجمین نوع شایع سرطان و سومین علت اصلی مرگ‌ومیر ناشی از سرطان در سراسر جهان است (۲). با وجود کاهش شیوع جهانی سرطان، سرطان معده همچنان مسئول ۳ تا ۱۰ درصد از مرگ‌ومیر ناشی از سرطان می‌باشد (۳). سرطان معده ناشی از ترکیبی از عوامل محیطی و تجمع تغییرات ژنتیکی خاص است. با وجود روند کاهشی در سراسر جهان، پیشگیری از سرطان معده باید در اولویت باقی بماند (۴). عوامل خطر

۱- گروه زیست‌شناسی، دانشکده‌ی علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

نویسنده‌ی مسؤول: محمدرضا حجاری؛ گروه زیست‌شناسی، دانشکده‌ی علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

انستیتو پاستور تهران تهیه و کشت داده شد. سلول‌ها در فلاسک کشت T25 و محیط کشت (RPMI (Gibco, Germany) به همراه ۱۰ درصد سرم جنین گاو (FBS) (Gibco, Germany) و 100 U/ml از پنی‌سیلین G و 1 mg/ml استرپتومایسین (Gipco, Germany)، (پن استرپ) رشد داده شدند. سلول‌ها در معرض ۵ درصد دی‌اکسید کربن و ۹۵ درصد هوای مرطوب و در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد در فلاسک T25 جهت رشد و تکثیر قرار داده شدند.

برای تهیه‌ی عصاره‌ی میوه‌ی بلوط، پس از جداسازی پوسته‌های آن، میوه پودر شد و برای گرفتن عصاره از روش سوکسله استفاده گردید. در این روش به ازای هر ۱۰ گرم از پودر میوه‌ی بلوط، ۲۰۰ سی‌سی حلال که شامل آب و اتانول است اضافه و در دستگاه سوکسله ریخته شد. حلال از عصاره‌ها جدا شد و سپس محلول به کمک دستگاه Rotavapor از عصاره‌ها جدا و محلول به دست آمده پس از ۴۸ ساعت صاف و در دمای حدود ۳۵-۴۰ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شد تا آب و الکل آن تبخیر شود. پس از تغلیظ، مایع استخراج شده در یخچال نگهداری شد (۱۴).

تیمار سلول‌ها: اثر عصاره‌ی میوه‌ی بلوط و سیس پلاتین (ساخت شرکت آمریکایی Abcam)، به صورت جداگانه و همزمان باهم بر روی این سلول‌ها بررسی شد. به این منظور ابتدا بقای سلولی با روش شمارش سلولی با تریپان بلو محاسبه گردید. سپس به میزان ۵۰۰۰ سلول در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه کشت داده شد. به منظور تیمار سلول‌ها و اطمینان از چسبیدن سلول‌ها به کف چاهک‌ها، برای مدت ۲۴ ساعت سلول‌ها در دمای ۳۷ درجه، رطوبت ۹۵ درصد و CO_2 به میزان ۵ درصد نگهداری شدند. عصاره‌ی میوه‌ی بلوط در غلظت‌های ۲۰، ۴۰، ۸۰، ۱۲۰ و ۱۶۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و سیس پلاتین در غلظت‌های ۳، ۶، ۱۲، ۲۴ میکرومولار مورد استفاده قرار گرفت. بعد از طی بازه‌ی زمانی مشخص ۴۸ ساعته میزان بقای سلولی با آزمون MTT، ارزیابی شد. جهت بررسی تیمار ترکیبی سیس پلاتین و عصاره‌ی میوه‌ی بلوط در غلظت ۵۰ IC به دست آمده از هر دو دارو، سلول‌ها به ۳ گروه برای تیمار تقسیم‌بندی شدند. به هم‌هی گروه‌ها غلظت‌های ۳۵، ۷۰، ۱۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره‌ی بلوط تیمار شدند، سپس به هر یک از گروه‌ها یک غلظت خاص از سیس پلاتین زده شد (گروه یک رقت ۶، گروه دو رقت ۱۲ و گروه سه رقت ۲۴ میکرومولار) و سپس سلول‌ها به مدت ۴۸ ساعت نگهداری شدند. سپس تست MTT جهت به دست آوردن CI گروه‌های تیمار با استفاده از نرم‌افزار CompuSyn01 انجام شد.

آزمون MTT ۴۸ ساعت بعد از تیمار دارویی، محیط کشت از چاهک‌های پلیت‌های ۹۶ خانه حذف شد و به هر چاهک ۳۰ میکرولیتر محلول MTT زرد رنگ اضافه گردید و به مدت

هستند (۶). نوع دیگر ادنوکارسینوم معده، پولیپ آدنوماتوز خانوادگی (Familial adenomatous polyposis) FAP است که یک بیماری ارثی و در درجه اول بیماری اتوزومال غالب با ایجاد آدنوم و کارسینوم کولورکتال می‌باشد. بیماران مبتلا به FAP همچنین ممکن است به‌طور ثانویه دچار سرطان دوازدهه، نئوپلازی معده و تیروئید و همچنین تومورهای دسموئید شوند (۸).

سه داروی مبتنی بر پلاتین وجود دارد که در کل جهان برای درمان سرطان استفاده می‌شود: سیس پلاتین، کربوپلاتین و آگزالی پلاتین. چهار داروی پلاتینیوم نیز وجود دارد که دارای تأییدیه نظارتی به صورت کشورهای فردی هستند: هپتاپلاتین (کره)، لوباپلاتین (چین)، میری پلاتین (ژاپن) و نداپلاتین (ژاپن) (۹). سیس پلاتین خواص سیتوتوکسیک خود را از طریق واکنش با DNA اعمال می‌کند که در نهایت به آپوپتوز برگشت‌ناپذیر ختم می‌شود. سیس پلاتین در درجه اول با سایت‌های N7 پورین در تعامل است (۱۰).

بلوط، دارای حدود ۵۰ گونه که در نواحی معتدل و نیمه گرمسیری نیمکره‌ی شمالی گسترده شده است. میوه‌ی این درخت یکی از منابع غنی از کربوهیدرات، اسیدآمین، چربی و استرول‌های مختلف بوده است. میوه‌ی بلوط علاوه بر ترکیبات تغذیه‌ای حاوی مقادیر قابل توجهی از ترکیبات فعال بیولوژیکی می‌باشد که از آن جمله می‌توان به تانن، گالیک اسید، الاجیک اسید گالولیل یا هگزاهیدروکسیدی فنویل اشاره کرد که تمامی این ترکیبات دارای خواص آنتی‌اکسیدانی هستند (۱۱). تحقیقات اخیر زیست‌پزشکی مرتبط با پلی‌فنل‌ها و فعالیت آنتی‌اکسیدانی تعدادی از گیاهان و غذاها نشان می‌دهند که پلی‌فنول‌ها مانند فلاونوئیدها، تانن‌ها و پروآنتوسیانیدین‌ها در برابر توسعه سرطان، بیماری‌های قلبی-عروقی، دیابت، پوکی استخوان و بیماری‌های عصبی نقش محافظتی دارند (۱۲).

در این مطالعه اثرات مهار عصاره‌ی استخراج شده از میوه‌ی بلوط به صورت تیمار هم‌زمان با داروی سیس پلاتین، بر رشد، مهاجم و متاستاز سلول‌های سرطانی معده همراه با القای آپوپتوز و نیز توقف چرخه‌ی سلولی مورد بررسی قرار گرفت. با وجود مطالعات صورت گرفته بر روی اثر عصاره‌ی الکلی بلوط بر روی سلول‌های سرطانی (۱۳)، اثر این میوه بر روی سرطان معده آشکار نمی‌باشد. در این مطالعه بر آن بودیم تا به بررسی اثر ضد سرطانی عصاره‌ی میوه‌ی بلوط و مقایسه‌ی آن با استفاده از داروی سیس پلاتین بپردازیم.

روش‌ها

کشت سلول: رده‌ی سلولی سرطان معده AGS از بانک سلولی

از ته فلاسک، سلول‌ها با تریپسین جدا و با سرعت ۱۱۰۰ rpm در دقیقه سانتریفیوژ شدند. سپس دو مرتبه با PBS شستشو داده شدند. برای لیز کردن سلول‌ها به آن‌ها ۱ میلی‌لیتر محلول استخراج RNase (سیناژن، ایران) سرد اضافه شد و بر اساس پروتکل مربوطه استخراج صورت پذیرفت. کیفیت و کمیت RNA استخراج شده با استفاده از دستگاه نانودراپ و ژل الکتروفورز تعیین شد. بررسی غلظت و خلوص نمونه استخراج شده با استفاده از جذب نوری در طول موج‌های ۲۶۰ نانومتر، ۲۸۰ نانومتری ۲۳۰ نانومتر انجام شد.

ساخت DNA مکمل (cDNA): مولکول‌های DNA مکمل با کیت شرکت پیشگام ایران ساخته شد. مخلوط واکنش شامل یک میکروگرم RNA، ۵ میکرو لیتر، بافر x ۵ و ۰/۵ میکرو لیتر آغازگر واکنش (dNTP)، ۰/۵ میکرو لیتر آغازگر شش نوکلئوتیدی تصادفی، دو میکرو لیتر مخلوط داکسی نوکلئوتید تری‌فسفات (۱۰ میلی‌مولار) یک میکرو لیتر مهارکننده‌ی آنزیمی RNase، یک میکرو لیتر آنزیم رونوشت‌بردار معکوس M-MuLV و آب مقطر دو بار تقطیر (تا حجم نهایی ۱۳/۵ میکرو لیتر) بود. سپس برنامه‌ی دمایی-زمانی به صورت ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه (برای اتصال آغازگر)، ۴۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۶۰ دقیقه (ساخت cDNA) ۷۰ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، (غیرفعال شدن رونوشت‌بردار معکوس) و ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انجام شد. واکنش با استفاده از دستگاه Bio-Ra.PCR iCycler Thermal Cycler (d آمریکا) صورت گرفت.

طراحی پرایمرها: در این مطالعه ژن‌های *P21, MMP2, CDK2* مورد بررسی قرار گرفتند. ژن *GAPDH* به‌عنوان کنترل داخلی انتخاب شد. برای طراحی پرایمر اختصاصی برای ژن‌های مورد نظر ابتدا با استفاده از سایت NCBI توالی نوکلئوتیدی مربوط به رونوشت‌های ژن‌های مورد مطالعه به دست آمد و سپس، محل مناسب به صورت آنلاین و به‌وسیله‌ی نرم‌افزار *Oligo7* محل‌یابی شد. با کمک نرم‌افزار *Primer BLAST* از سایت NCBI و شرایط اختصاصی بودن پرایمر بررسی شد. برای ستنز به شرکت پیشگام در ایران سفارش داده و پرایمرها برای استفاده در واکنش *Real Time PCR* با آب تزریقی رقیق‌سازی و به غلظت ۱۰ میکرومولار (μM) رسیدند (جدول ۱).

Real-time RT-PCR: از آزمون PCR در زمان حقیقی (*Real-time PCR*)، بر پایه‌ی رنگ *SyberGreen* به منظور ارزیابی بیان ژن‌های مورد مطالعه استفاده شد. برنامه‌ی زمانی-گرماهی دستگاه در سه مرحله انجام شد. مرحله‌ی اول که منجر به واسرشت شدن مولکول‌های cDNA و فعال شدن آنزیم پلیمرز می‌شود به‌صورت ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله‌ی دوم ۹۵ درجه‌ی

۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه در شرایط استاندارد انکوبه شد که در این مدت کریستال‌های فورمازان که در آب نامحلول‌اند شکل گرفت. پس از ۴ ساعت، ۱۲۰ میکرو لیتر *DMSO* محلول به هر چاهک اضافه شد. کریستال‌های نامحلول به‌صورت محلول درآمدند. در نهایت جذب نوری محلول به‌دست آمده در طول موج ۵۷۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر خوانده شد.

در مرحله‌ی بعد با توجه به *IC50* داروها، ترکیبی از دو دارو در غلظت‌های مختلفی تهیه شد و اثر ضد سرطانی آن‌ها نیز توسط روش *MTT* مورد سنجش قرار گرفت و اثرات سیتوتوکسیک و آنتاگونیسم داروها با نرم‌افزار *compusyn1.0* بررسی گردید و به دست آمد.

آزمون ترمیم زخم Wound healing assay: در این پژوهش، جهت بررسی تأثیر داروی سیس پلاتین و عصاره‌ی بلوط و ترکیب این دو با یکدیگر بر روی قابلیت مهاجرت سلول‌های سرطانی *AGS*، از آزمون ترمیم زخم استفاده شد. به این منظور، تعداد ۸۰۰۰۰ سلول، در هر چاهک پلیت ۱۲ خانه ریخته شد و پس از گذشت ۲۴ ساعت و اتصال سلول‌ها به کف هر چاهک، هم‌زمان با تعویض محیط کشت کامل با محیط کشت حاوی غلظت‌های مختلف داروی سیس پلاتین و عصاره‌ی میوه‌ی بلوط؛ با استفاده از سر سمپلر، خراشی در کف پلیت داده شد. پس از گذشت ۴۸ ساعت، گروه‌های تیمار شده و کنترل در زیر میکروسکوپ بررسی و تعداد سلول‌های مهاجرت کرده به فضای خالی ایجاد شده در اثر خراش، بررسی شد.

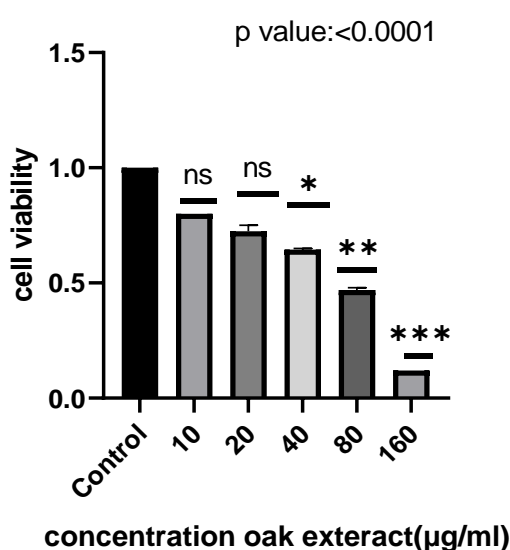
آنالیز چرخه‌ی سلولی و آپوپتوز با روش فلوسایتومتری: در این مطالعه به منظور بررسی تأثیر این دو ماده بر سلول‌های *AGS*، ابتدا سلول‌ها با غلظت‌های $12 \mu\text{M}$ (*IC50*) سیس پلاتین و $70 \mu\text{g/ml}$ (*IC50*) عصاره‌ی بلوط و غلظت ترکیبی از هر دو داروی سیس پلاتین و عصاره‌ی بلوط با غلظت ۷۰/۱۲ به صورت جداگانه تیمار شدند و سپس تأثیر این دو دارو بر چرخه‌ی سلولی و آپوپتوز از طریق روش فلوسایتومتری و از طریق مورد بررسی قرار گرفت. ارزیابی سلول‌های آپوپتوتیک و نکروتیک به روش رنگ‌آمیزی *Annexin V-FITC/PI* از مرسوم‌ترین و مهم‌ترین روش‌ها برای بررسی مکانیزم اثربخشی داروها و سموم است. در این آزمون با استفاده از رنگ‌آمیزی سلول‌ها با *Annexin FITC* و درصدی از سلول‌ها که پس از تیمار با ترکیب مورد نظر، زنده بوده و یا وارد فازهای آپوپتوز و نکروز به‌عنوان دو مکانیزم مرگ سلولی شده‌اند، مشخص می‌شود (۱۵).

استخراج RNA: ابتدا به تعداد ۵۰۰۰ سلول *AGS*، در فلاسک‌های *T25* ریخته شد، بعد از ۲۴ ساعت با غلظت *IC50* به‌دست آمده سیس پلاتین و *IC50* به‌دست آمده عصاره‌ی میوه‌ی بلوط و غلظت *CI* از ترکیب دو دارو تیمار شدند و پس از مدت زمان ۴۸ ساعت استخراج RNA انجام شد. برای جداسازی سلول‌ها

جدول ۱. پرایمرهای مورد استفاده

gen	Annealing temperature		Primer sequence	Size	GC	PCR product length
MMP2	59.46	F	5'-CCTCAGAGCCACCCCTAAAG-3'	20	60	160
	60.32	R	5'CACCAGTGGCCCTCTTGAGAC-3'	20	60	
P21	60.20	F:	5'- TGGAGACTCTCAGGGTCGAAA -3'	21	52.38	165
	60.32	R:	5'- CGGCGTTTGGAGTGGTAGAA -3'	20	55	
CDK2	60.81	F	5- ATGGACGGAGCTTGTATCGC -3'	21	52.38	105
	60.68	R	5'- CTGGCTTGGTCACATCCTGG -3'	20	60	
GAPDH	58.82	F	5'- CAGCCTCAAGATCATCAGCAATG-3'	20	55	100
	58.14	R	-3' 5-CATGAGTCCTTCCACGATACCA	20	55	

همچنین برای تیمار ترکیبی دو دارو، نتایج به دست آمده بیانگر سینرژیسم بودن اثر داروی ترکیبی به ازای افزایش دوز داروها می باشد.



شکل ۱. درصد زنده ماندن سلول‌های سرطانی AGS برای غلظت‌های آزمایش شده از عصاره میوه بلوط پس از ۴۸ ساعت

پس از تیمار سلول‌های AGS با سیس پلاتین و عصاره میوه بلوط در زمان ۴۸ ساعت با استفاده از نرم افزار GraphPad prism9 میزان IC₅₀ محاسبه گردید. میزان IC₅₀ برای سیس پلاتین ۱۲ میکرومولار و برای عصاره میوه بلوط ۷۰ میکروگرم بر میلی لیتر به دست آمد.

آنالیز چرخه سلولی با روش فلوسیتومتری: با توجه به نمودارهای به دست آمده می توان چنین نتیجه گرفت که هر کدام از این داروها به تنهایی باعث افزایش میزان فاز G1 Sub و کاهش فاز S در سیکل سلولی می شوند. همچنین در گروهی که ترکیب دو دارو به کار رفته است شاهد افزایش نسبت فاز G1 به فاز G2 هستیم که می تواند به عنوان arrest در این فاز در نظر گرفته شود. همچنین دوز ترکیبی سیس پلاتین یعنی دوز ۱۲ میکرو مولار به همراه عصاره بلوط یعنی

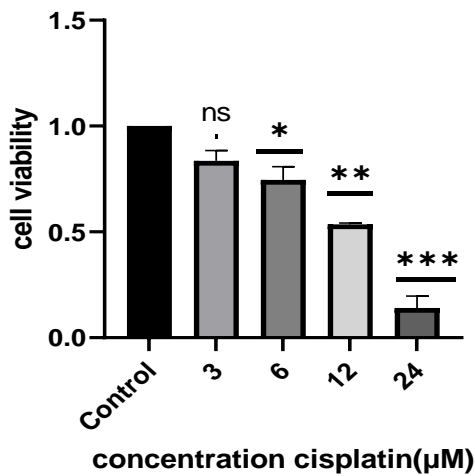
سانتی گراد به مدت ۱۵ ثانیه و ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه برای ۴۰ چرخه متوالی و مرحله نهایی برای ترسیم منحنی ذوب به صورت ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ ثانیه، ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه و ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ انجام شد. واکنش‌های Real-time PCR در حجم نهایی ۱۰ میکرو لیتر به صورت تکرار دوتایی انجام شد. در هر واکنش ۵ میکرو لیتر SYBR-Green PCR Master Mix، یک میکرو لیتر پرایمر رفت و یک میکرو لیتر پرایمر برگشت اختصاصی هر ژن، یک میکرو لیتر cDNA و مابقی آن آب مقطر دوبار تقطیر اضافه شد تا به حجم نهایی ۱۰ میکرو لیتر رسید.

در این مطالعه، ارزیابی کارایی تکثیر ژن کنترل داخلی (GAPDH) و ژن‌های مورد مطالعه ضروری بود. به منظور اعتبارپذیری بودن کاربرد فرمول فوق ضروری است که کارایی تکثیر ژن هدف و ژن کنترل داخلی تقریباً برابر باشد. بدین منظور اقدام به رسم منحنی استاندارد log مقادیر استاندارد رقت سازی شده هر ژن (log input) در برابر مقادیر Ct گردید. بدین ترتیب که یک نمونه از محصولات cDNA با انتخاب و رقت‌های ۱، ۱۰، ۱۰۰، ۱/۱ و ۱/۱۰ جهت هر ژن تهیه گردید. مقادیر میانگین Ct رقت‌های مختلف در دو بار تکرار محاسبه شد. کارایی تکثیر ژن هدف و ژن کالیبراتور با استفاده از فرمول $E = -1 + 10^{-(1/\text{slope})}$ محاسبه گردید. در این فرمول E برابر با کارایی تکثیر است.

یافته‌ها

نتایج حاصل از محاسبه بقای سلولی تیمار با سیس پلاتین و عصاره میوه بلوط: تیمار سلول‌های AGS با غلظت‌های متفاوت سیس پلاتین و عصاره میوه بلوط حاکی از آن است که داروی سیس پلاتین در غلظت‌های بین ۶ تا ۲۴ میکرومولار قابلیت کشندگی معنی دار برای سلول‌ها دارد و عصاره میوه بلوط در غلظت‌های بین ۴۰ تا ۸۰ میلی گرم قابلیت کشندگی معنی دار برای سلول‌ها دارد؛ لازم به ذکر است بقای سلولی برای گروه شاهد ۱۰۰ درصد در نظر گرفته شد. نتایج حاصل از تیمار در شکل ۱ و ۲ نشان داده شده است.

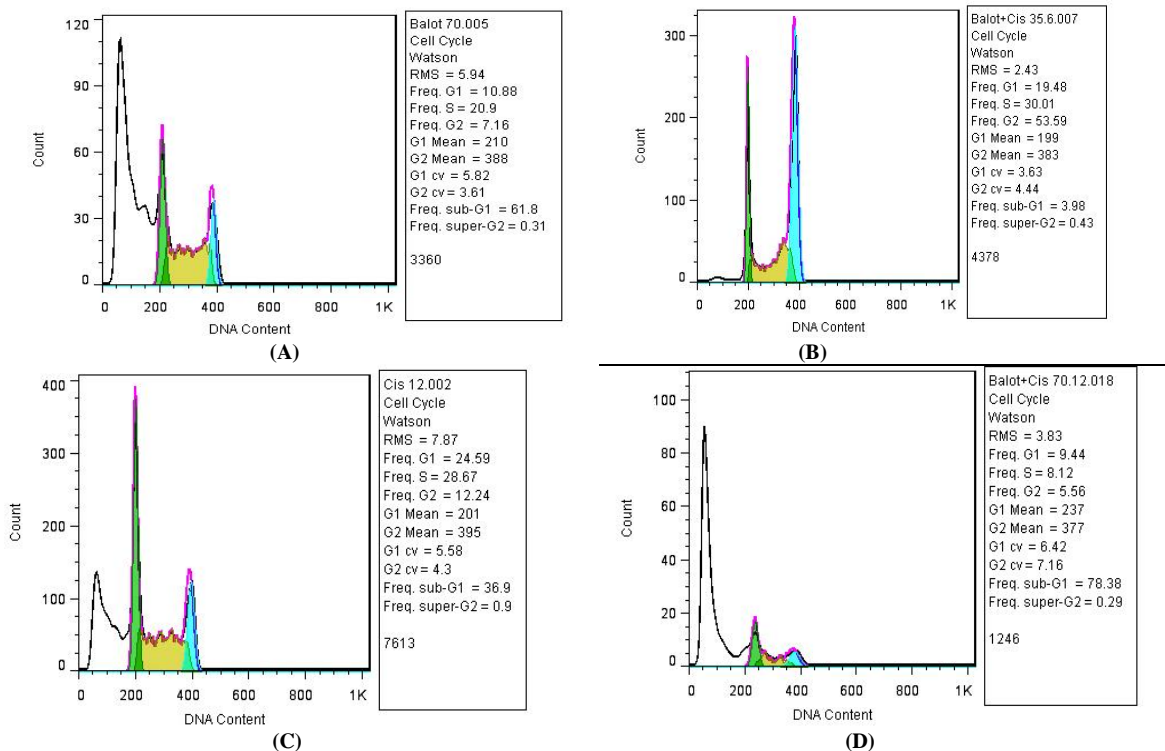
p value: <0.0001



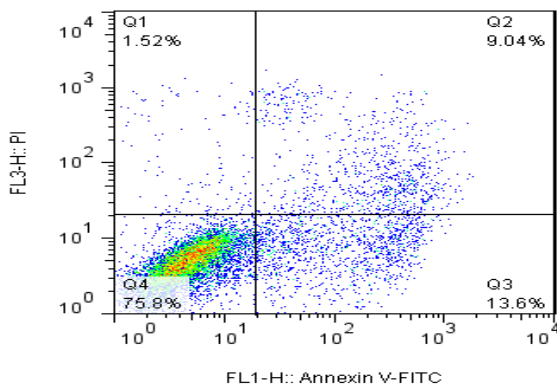
شکل ۲. درصد زنده‌مانی سلول‌های سرطانی AGS برای غلظت‌های آزمایش شده از سیس پلاتین پس از ۴۸ ساعت

دوز ۷۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، اثر کشندگی خیلی بالایی را ایجاد می‌کند که مقدار آن از حالت تیمار به تنهایی با دارو و یا عصاره بیشتر است (شکل ۳).

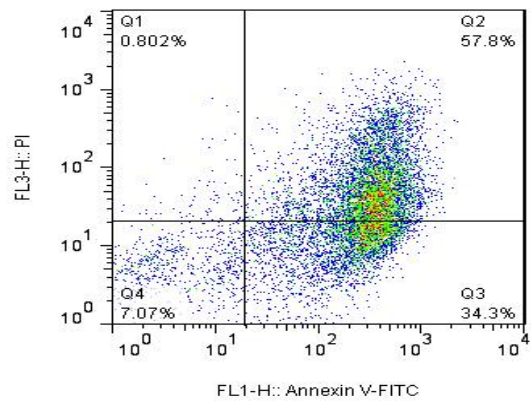
آنالیز آپوتوز با روش فلوسایتومتری توسط بررسی Annexin/FITC در این مطالعه، تأثیر غلظت‌های ۱۲ µM، سیس پلاتین و ۷۰ µg/ml عصاره‌ی بلوط و غلظت ترکیبی از هر دو داروی سیس پلاتین و عصاره‌ی بلوط با غلظت ۷۰/۱۲ بر آپوتوز از طریق فلوسایتومتری مورد بررسی قرار گرفت و نتایج طبق نمودارهای شکل (۷-۴) به دست آمد. در نمودارهای حاصل از بررسی Annexin V/FITC سلول‌های نکروزه (Q1) و سلول‌های مرده (Q2) و سلول‌های در حال آپوتوز (Q3) سلول‌های زنده (Q4) می‌باشند. بررسی آزمون انکسین نشان داد، نوع مرگی که ایجاد شده، غالباً از نوع آپوتوز می‌باشد. با توجه به نتایج به‌دست آمده نسبت به نمونه‌ی کنترل، شاهد اثرات القاگر آپوتوز توسط سیس پلاتین و عصاره‌ی میوه‌ی بلوط بر سلول‌ها بودیم که این اثر در دوز ترکیبی این دو دارو مشهودتر بود و این می‌تواند نشان‌دهنده‌ی اثر سینرژیسمی این دو دارو در ترکیب با یکدیگر باشد (شکل ۴).



شکل ۳. نمونه‌ی نرمال (A)، تیمار با عصاره‌ی بلوط ۷۰ میکرومولار (B)، تیمار با سیس پلاتین ۱۲ میکرو مولار (C)، تیمار ترکیبی سیس پلاتین و عصاره‌ی بلوط ۱۲/۷۰ (D). می‌توان چنین نتیجه گرفت که هر کدام از این داروها به‌تنهایی باعث افزایش میزان Sub G1 می‌شوند که معرف مرگ یا آپوتوز است؛ اما در گروهی که ترکیب دو دارو به‌کار رفته، شاهد افزایش مقدار بیشتر در پیک Sub G1 هستیم که می‌تواند به‌عنوان arrest در این فاز در نظر گرفته شود. درحالی که دوز ترکیبی سیس پلاتین یعنی دوز ۱۲ میکرو مولار به همراه عصاره‌ی بلوط یعنی دوز ۷۰ mg، اثر کشندگی خیلی بالایی را ایجاد می‌کند که مقدار آن از حالت به‌تنهایی دارو و عصاره بیشتر است. این اثر نشان‌دهنده‌ی اثر سینرژیسم دو دارو مورد استفاده می‌باشد.

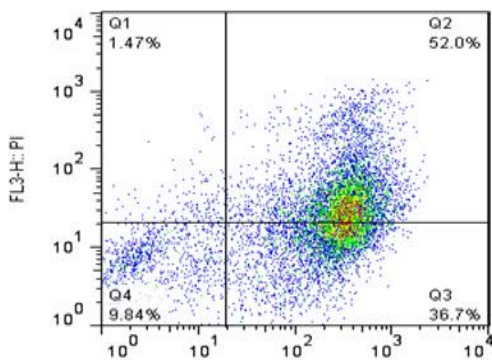


(A)



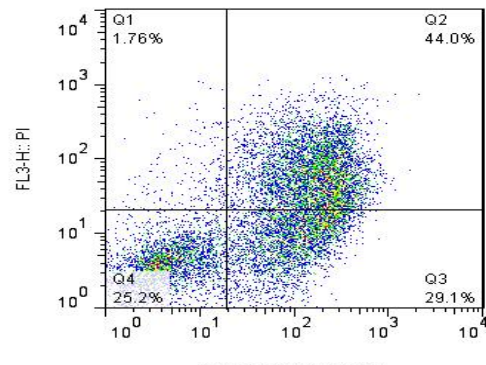
(B)

Balot+Cis 70.12-T.031
FSC-H, SSC-H subset
10099



(C)

Balot 70-T.032
FSC-H, SSC-H subset
9687



(D)

Cis 12-T.026
FSC-H, SSC-H subset
11910

شکل ۴. نمونه‌ی نرمال (A) نمونه‌ی تیمار شده ترکیبی سیس پلاتین و بلوط ۷۰/۱۲ پس از ۴۸ ساعت. ۹۲ درصد سلول‌ها در فاز آپوتوز می‌باشند و تنها ۰/۸ درصد سلول‌ها در فاز نکروز و مابقی سلول‌ها در فاز زنده هستند و این نشان‌دهنده‌ی القاء آپوتوز توسط ترکیب این دو دارو است. (B) نمونه‌ی تیمار با غلظت ۷۰ میلی‌گرم بلوط پس از ۴۸ ساعت. ۸۸ درصد سلول‌ها در فاز آپوتوز می‌باشند و تنها ۱/۴ درصد سلول‌ها در فاز نکروز هستند. (C) نمونه‌ی تیمار شده با غلظت ۱۲ میکرو مولار سیس پلاتین پس از ۴۸ ساعت. ۷۴ درصد سلول‌ها در فاز آپوتوز و تنها ۱/۷ درصد سلول‌ها در فاز نکروز و مابقی سلول‌ها در فاز زنده می‌باشند و این نشان‌دهنده‌ی القاء آپوتوز توسط سیس پلاتین است (D).

نشان‌دهنده‌ی اثر سینرژسمی ترکیب این دو دارو می‌باشد (شکل ۵).

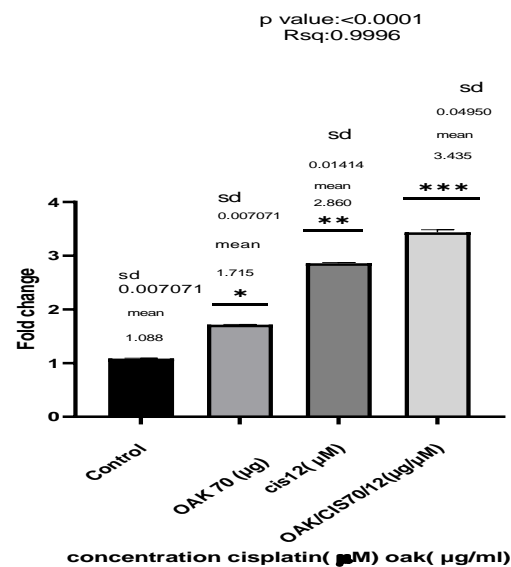
بررسی تغییر بیان ژن CDK2. نتایج نشان‌دهنده‌ی کاهش بیان نسبی ژن CDK2 در نمونه‌های تیمار شده با غلظت ۷۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره بلوط و کاهش بیان نسبی آن در نمونه‌های تیمار شده با ۱۲ میکرو مولار سیس پلاتین و همچنین کاهش بیان نسبی آن در نمونه‌های تیمار ترکیبی این دو غلظت (۷۰/۱۲) از هر دو دارو نسبت به کنترل می‌باشد (شکل ۶).

بررسی بیان ژن‌ها

بررسی تغییر بیان ژن P21. نتایج نشان‌دهنده‌ی افزایش بیان نسبی P21 در نمونه‌های تیمار شده با غلظت ۷۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره بلوط و همچنین افزایش بیان نسبی در نمونه‌های تیمار شده با ۱۲ میکرو مولار سیس پلاتین و همچنین افزایش بیان نسبی در نمونه‌های تیمار ترکیبی این دو غلظت از هر دو دارو نسبت به کنترل می‌باشد که این افزایش بیان در غلظت ترکیبی بیشتر مشاهده شد و

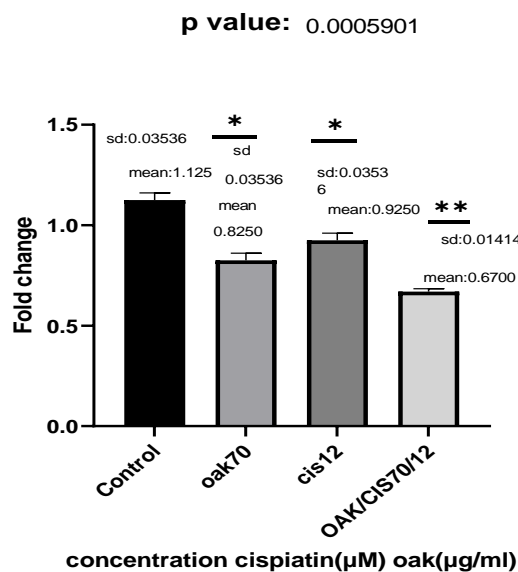
بررسی اثر تیمار داروها بر قابلیت مهاجرت سلول‌های AGS با استفاده از مدل ترمیم زخم: در این مطالعه تأثیر غلظت‌های (IC₅₀) ۱۲ μM سیس پلاتین و (IC₅₀) ۷۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره بلوط و غلظت ترکیبی از هر دو داروی سیس پلاتین و عصاره بلوط با غلظت ۷۰/۱۲ بر مهاجرت سلول‌های AGS مورد بررسی قرار گرفت. پس از گذشت ۴۸ ساعت از تیمار سلول‌ها با غلظت‌های ذکر شده؛ تعداد سلول‌های مهاجرت کرده به ناحیه‌ی زخم در ۴ ناحیه‌ی میکروسکوپی مختلف با استفاده از نرم‌افزار Image J محاسبه شدند و در مقایسه با کنترل مورد بررسی قرار گرفتند.

بررسی داده‌های حاصل از شمارش سلول‌های مهاجرت کرده به فضای زخم نشان‌دهنده‌ی تفاوت معنی‌دار در قابلیت مهاجرت سلول‌های AGS دریافت‌کننده‌ی تیمارهای مختلف در مقایسه با سلول‌های کنترل است. نتایج نشان از مهار معنادار مهاجرت سلول‌های سرطانی در غلظت‌های (IC₅₀) ۱۲ میکرو مولار سیس پلاتین و (IC₅₀) ۷۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره بلوط و ترکیب این دو دارو در غلظت‌های ۷۰/۱۲ نسبت به نمونه کنترل دارد (اشکال ۱۱-۸).

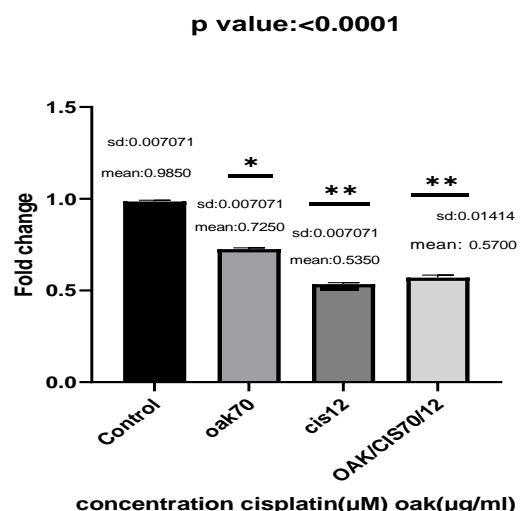


شکل ۵. نمودار بیان نسبی P21 در نمونه‌های تیمار شده AGS و نمونه‌ی کنترل (OAK = بلوط؛ cis* = سیس پلاتین)

بررسی تغییر بیان ژن MMP2 نتایج نشان‌دهنده‌ی کاهش بیان نسبی ژن MMP2 در نمونه‌های تیمار شده با غلظت ۷۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره بلوط و کاهش بیان نسبی این ژن در نمونه‌های تیمار شده با ۱۲ میکرو مولار سیس پلاتین و همچنین کاهش بیان نسبی آن در نمونه‌های تیمار ترکیبی این دو غلظت از هر دو دارو نسبت به کنترل می‌باشد. این کاهش بیان در نمونه‌ی تیمار شده‌ی ترکیبی مشهودتر می‌باشد که تأییدکننده‌ی اثر سینرژیستی ترکیب دو دارو می‌باشد (شکل ۷).



شکل ۷. نمودار بیان نسبی MMP2 در نمونه‌های تیمار شده AGS و نمونه‌ی کنترل (OAK = بلوط؛ cis* = سیس پلاتین)



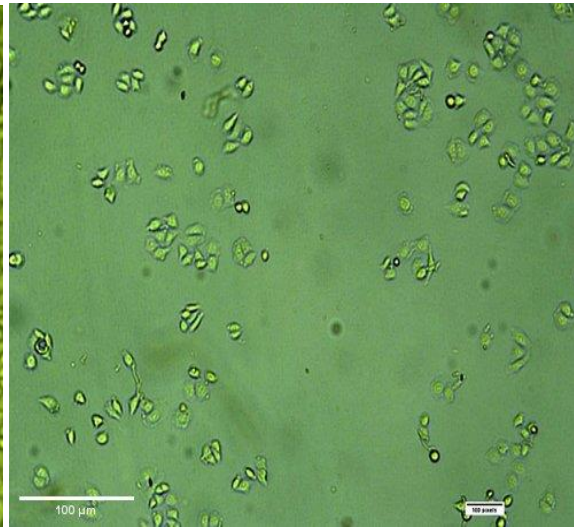
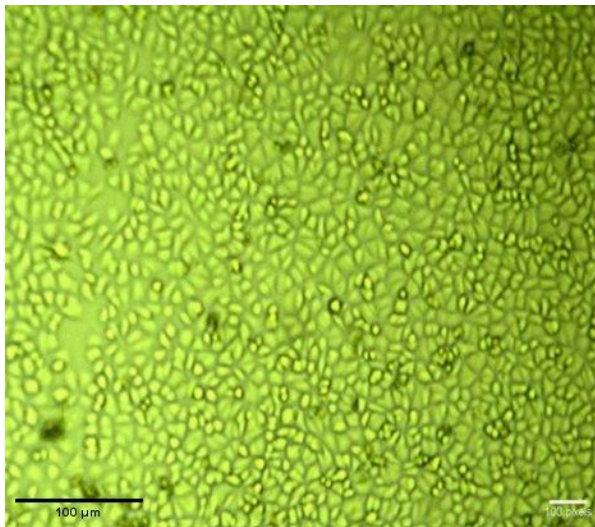
شکل ۶. نمودار بیان نسبی CDK2 در نمونه‌های تیمار شده AGS و نمونه‌ی کنترل (OAK = بلوط؛ cis* = سیس پلاتین)

بحث

نتایج حاصل از این مطالعه بیانگر اثر کشندگی عصاره‌ی میوه بلوط بر سلول‌های سرطان معده AGS می‌باشد، به نحوی که بر اساس

زنده‌مانی سلول‌ها نسبت به گروه شاهد مشاهده شد.

داده‌های حاصل از MTT، در غلظت‌های غیر سمی این ماده کاهش

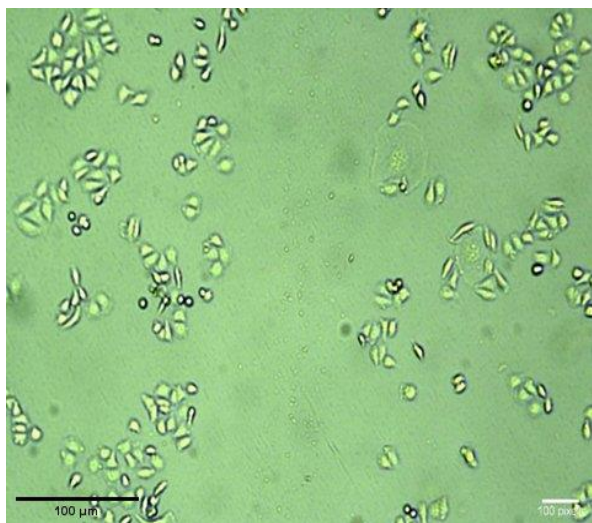
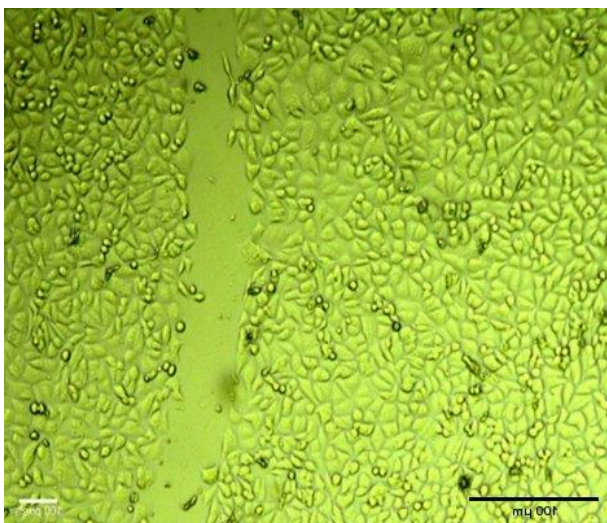


شکل ۸. عکس سمت راست، نمونه‌ی کشت سلول AGS به عنوان نمونه‌ی کنترل بدون تیمار در ساعت (۰) و عکس سمت چپ، ۴۸ ساعت بعد (بدون تیمار) بررسی سلول‌های مهاجرت کرده به فضای زخم نشان‌دهنده‌ی قابلیت مهاجرت سلول‌های AGS بدون دریافت تیمار در مقایسه با سلول‌های کنترل است (بزرگمایی ۴×).

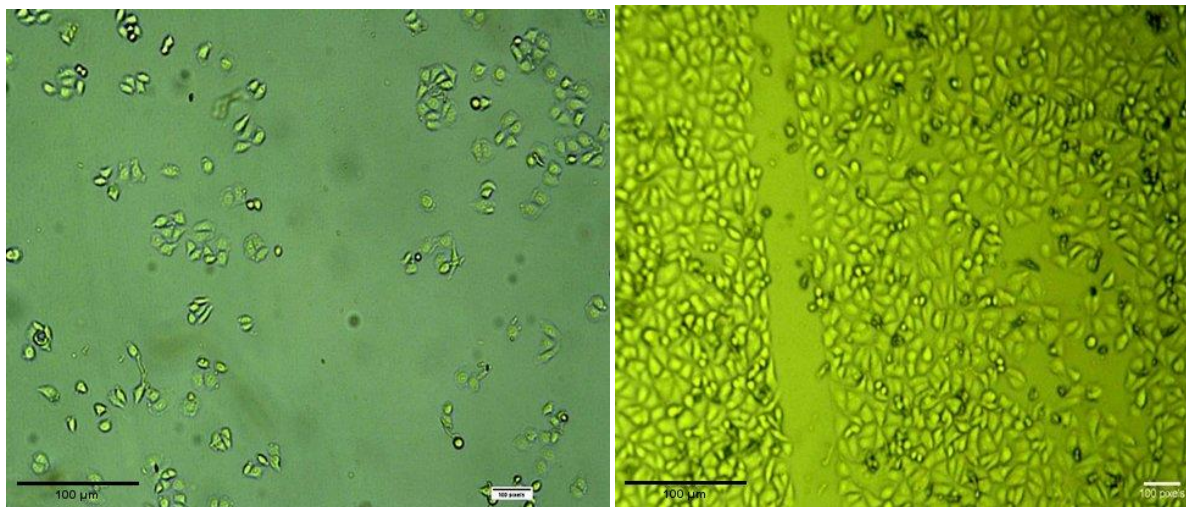
رشد و تکثیر سلول‌های AGS، سرطان معده انسان از طریق القای اثرات سایتوتوکسیک و آپوپتوز جلوگیری می‌کند. بر اساس نتایج به دست آمده، مشخص شد که ترکیب عصاره‌ی میوه‌ی بلوط با سیس پلاتین می‌تواند در یک روش وابسته به دوز باعث کاهش Cell Viability در سلول‌های آدنوکارسینوما معده (AGS) گردد که این اثر قابل مقایسه با سیس پلاتین به تنهایی می‌باشد. به علاوه ترکیب عصاره‌ی میوه‌ی بلوط و داروی سیس پلاتین در دوز مناسب باعث توقف چرخه‌ی سلولی در فاز G1 و Sub G1 و کاهش فاز S می‌شود.

با افزایش غلظت عصاره‌ی میوه‌ی بلوط و رسیدن به غلظت‌های کشنده، کاهش زنده‌مانی سلول‌های رده‌ی سلولی AGS به صورت وابسته به دوز مشاهده می‌شود. اثرات سایتوتوکسیک القا شده بر سلول‌های AGS توسط عصاره‌ی میوه‌ی بلوط وابسته به غلظت و زمان تیمار سلول‌ها بودند و هرچه غلظت تیمار زیادتر بود، زیستایی کاهش بیشتری نشان داد.

همچنین بر اساس داده‌های حاصل از MTT، افزایش کشندگی وابسته به دوز دیده شد که نشان‌دهنده‌ی سمیت و خاصیت کشندگی این ماده می‌باشد. عصاره‌ی میوه‌ی بلوط، از



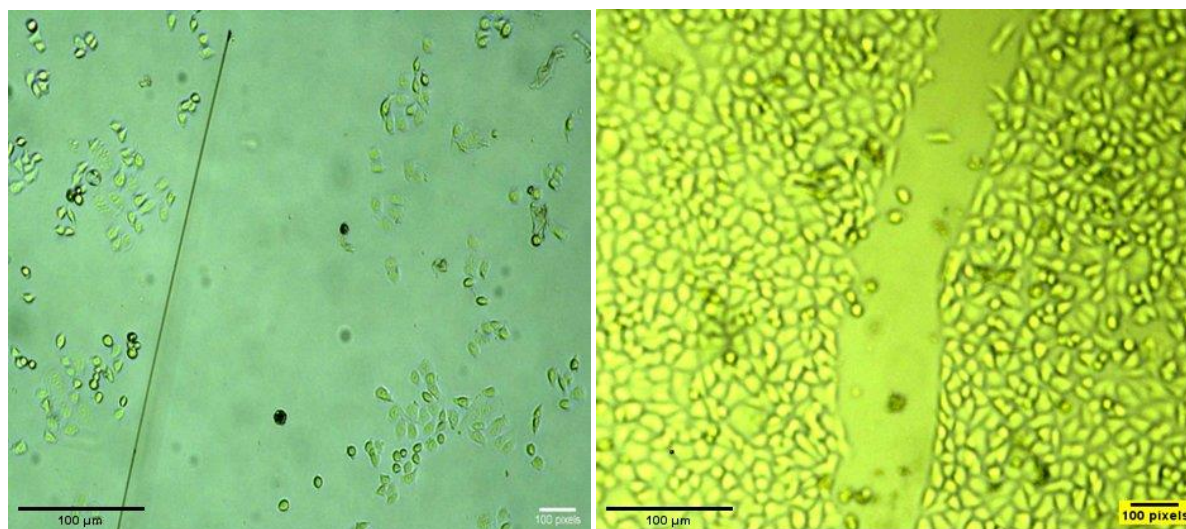
شکل ۹. عکس سمت راست، تیمار با غلظت (IC₅₀) ۱۱۲m سیس پلاتین ساعت (۰) و عکس سمت چپ، ۴۸ ساعت بعد از تیمار بررسی سلول‌های مهاجرت کرده به فضای زخم نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در قابلیت مهاجرت سلول‌های AGS دریافت‌کننده تیمار در مقایسه با سلول‌های کنترل است. نتایج، نشان از مهار معنادار مهاجرت سلول‌های سرطانی در غلظت (IC₅₀) ۱۲ میکرومولار سیس پلاتین (بزرگنمایی ۴×)



شکل ۱۰. عکس سمت راست، تیمار با غلظت (IC₅₀) ۷۰mg عصاره میوه بلوط ساعت (۰) و عکس سمت چپ ۴۸ ساعت بعد از تیمار بررسی سلول‌های مهاجرت کرده به فضای زخم نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در قابلیت مهاجرت سلول‌های AGS دریافت‌کننده تیمار در مقایسه با سلول‌های کنترل است. نشان از مهار معنادار مهاجرت سلول‌های سرطانی در ۷۰ میلی‌گرم عصاره میوه بلوط (بزرگنمایی ۴×)

میلی لیتر ۴۸ ساعت پس از تیمار؛ ۸۸ درصد سلول‌ها در فاز آپتوز و تنها ۱/۴ درصد سلول‌ها در فاز نکروز و مابقی سلول‌ها در فاز زنده قرار داشتند و این نشان‌دهنده القاء آپتوز توسط عصاره میوه بلوط می‌باشد. نمونه تیمار شده با غلظت ۱۲ میکرومولار سیس پلاتین یعنی غلظت (IC₅₀)، ۴۸ ساعت پس از تیمار نشان داده شده که ۷۴ درصد سلول‌ها در فاز آپتوز می‌باشند و تنها ۱/۷ درصد سلول‌ها در فاز نکروز و مابقی سلول‌ها در فاز زنده می‌باشند؛ و این نشان‌دهنده القاء آپتوز توسط سیس پلاتین می‌باشد.

همچنین ترکیب این دو ماده فعالیت *CDK2/cyclin E* را با افزایش سطح پروتئین *P21* کاهش داده است. به طوری که شاهد اثرات سیس پلاتین و عصاره میوه بلوط بر مرگ سلولی (آپتوز) بودیم که این اثر در دوز ترکیبی این دو دارو مشهودتر بود و این می‌تواند نشان‌دهنده اثر سینرژیک این دو دارو در ترکیب با یکدیگر باشد. بررسی آپتوز نشان داد که نمونه‌ی نرمال بدون تیمار، حدود ۷۶ درصد سلول‌ها در فاز زنده می‌باشند و همچنین تیمار سلول‌ها با عصاره میوه بلوط در غلظت (IC₅₀) یعنی ۷۰ میکروگرم بر



شکل ۱۱. عکس سمت راست، تیمار ترکیبی با غلظت ۷۰mg عصاره بلوط و ۱۱۲m سیس پلاتین ساعت (۰) و عکس سمت چپ، ۸ ساعت بعد از تیمار بررسی سلول‌های مهاجرت کرده به فضای زخم نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در قابلیت مهاجرت سلول‌های AGS دریافت‌کننده تیمار در مقایسه با سلول‌های کنترل است. نتایج، نشان از مهار معنادار مهاجرت سلول‌های سرطانی در ترکیب این دو دارو در غلظت‌های ۷۰/۱۲ نسبت به نمونه کنترل دارد (بزرگنمایی ×۴)

سلولی NSCL (NCL_H460) سلول‌های سرطانی ریه، دارای فعالیت ضد متاستازی و آپوپتوز می‌باشد که در این بین میزان این فعالیت در بوتولین جدا شده از برگ گیاه بالاتر از سایر مواد جدا شده بود (۱۶). Moradi و همکاران در سال ۲۰۱۶ در مطالعه‌ای بیان کردند که عصاره‌ی خام اتیل الکل بلوط، باعث افزایش مرگ سلول‌های سرطانی از طریق القا زودرس آپوپتوز می‌شود. همچنین اثربخشی این ماده را بر روی سلول‌های HDFs&AGS&Hella در شرایط آزمایشگاهی بررسی نمودند و مشاهده کردند که پس از MTT assay و ارزیابی فلوسایتومتری، در سلول‌های سرطانی تکثیر از طریق آپوپتوز اولیه مهار می‌گردد (۱۳).

پژوهش حاضر اولین مطالعه‌ای است که به بررسی اثرات عصاره‌ی میوه بلوط به همراه ترکیب داروی معمول سیس پلاتین پرداخته است. مشخص شد که بسیاری از ترکیبات گیاهی، رشد سلول‌های توموری را با توقف چرخه‌ی سلولی و القای مرگ برنامه‌ریزی شده مهار می‌نمایند. به‌عنوان مثال، فلاووپیریدول به واسطه‌ی مکانیسم‌های مختلفی از قبیل مهار انواع CDKها قادر به توقف چرخه‌ی سلولی می‌باشند. مشاهده شد که ترکیب این دو ماده از طریق مکانیسم‌های ملکولی مختلف باعث تحریک آپوپتوز، توقف چرخه‌ی سلولی و مهار مهاجرت و نیز مهار تکثیر سلول‌های سرطانی می‌شوند. در واقع بخشی از اثرات دارویی این ترکیب را نیز می‌توان به مهار تکثیر سلولی و القای مرگ برنامه‌ریزی شده سلول نسبت داد.

نتیجه‌گیری

به نظر می‌رسد ترکیب عصاره‌ی میوه بلوط و سیس پلاتین می‌تواند با افزایش بیان ژن‌هایی که نقش سرکوبگر تومور دارند، مثل P21 و کاهش بیان CDKها منجر به مهار رشد شوند. از سوی دیگر با کاهش بیان ژن‌های ماتریکس متالوپروتینازها مثل MMP2 از مهاجرت سلول‌ها و متاستاز جلوگیری می‌کند. همچنین باعث کاهش رشد و مهار رشد سلول‌های سرطانی از طریق القای آپوپتوز می‌گردد و این اثر قابل مقایسه با اثر سیس پلاتین به‌تنهایی می‌باشد.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی به شماره‌ی پژوهانه‌ی SCU.SB1401.12468* رشته‌ی ژنتیک مصوب شورای پژوهش طرح‌های علوم پایه در دانشگاه شهید چمران اهواز می‌باشد و با حمایت‌های مالی و معنوی این دانشگاه انجام شده است.

تیمار ترکیبی سیس پلاتین و بلوط ۷۰/۱۲ در غلظت (IC₅₀) دو دارو، ۸ ساعت پس از تیمار نشان داد که ۹۲ درصد سلول‌ها در فاز آپوپتوز می‌باشند و تنها ۰/۸ درصد سلول‌ها در فاز نکروز و مابقی سلول‌ها در فاز زنده می‌باشند و این نشان‌دهنده‌ی القای آپوپتوز توسط این دو دارو است. در مقایسه با تیمار سلول‌ها به‌تنهایی تیمار ترکیبی اثر قوی‌تری بر القای آپوپتوز ایجاد کرده که این می‌تواند نشان‌دهنده‌ی اثر سینرژیسمی دو دارو با یکدیگر در حالت ترکیبی باشد. طبق نتایج به‌دست آمده در هر سه تیمار، میزان سلول‌ها در فاز تأخیری، Q2 (مرگ) آپوپتوز بیشتر بوده است. همچنین نتایج حاصل از آزمون ترمیم زخم حاکی از امکان مهار قابلیت مهاجرت سلولی و احتمالاً به دنبال آن مهار فرایند متاستاز توسط سیس پلاتین در غلظت ۱۲ میکرومولار و عصاره‌ی میوه بلوط در غلظت ۷۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر می‌باشد. این اثر مهارتی در حالت ترکیبی این دو ماده باهم نیز دیده شد. نتایج به‌دست آمده در این زمینه نشان داد که این اثر مهارتی از طریق کاهش بیان MMP2 (ماتریکس متالو پرو تیناز ۲)، القاء شده است.

در این مطالعه، با بررسی بر روی بیان ژن‌ها؛ نتایج حاصل نشان از افزایش بیان نسبی معنادار ژن P21 در تیمار با عصاره‌ی میوه بلوط و سیس پلاتین هر کدام به‌تنهایی در غلظت IC₅₀ و تیمار ترکیبی داروها و کاهش بیان ژن‌های MMP2 و CDK2 در تیمار با عصاره‌ی میوه بلوط و سیس پلاتین هر کدام به‌تنهایی در غلظت IC₅₀ و تیمار ترکیبی داروها دارد.

در سال‌های اخیر مطالعات گسترده‌ای بر روی تأثیرات درمانی داروهای غیر شیمیایی و گیاهی در زمینه‌ی انواع سرطان‌ها انجام گرفته است. کاربرد گیاهان دارویی به‌جای داروهای صنعتی در سال‌های اخیر به دلیل کم بودن عوارض جانبی و تنوع ترکیبات مؤثره گیاهی افزایش یافته است. گرایش به استفاده از داروهای شیمیایی و سنتزی به ویژه در طی سال‌های اخیر روبه افزایش بود و ترکیبات شیمیایی به‌دست آمده از گیاهان، فرصت‌های مهمی را جهت پیدا کردن داروهای جدید با منشأ طبیعی فراهم آورده است.



در سال ۱۳۹۴ طی مطالعه‌ای کریمی و همکاران عنوان کردند که میوه بلوط به‌واسطه‌ی داشتن مقادیر زیادی از ترکیبات فنولی دارای پتانسیل آنتی‌اکسیدانی بالایی است. همچنین نشان دادند که توانایی آنتی‌اکسیدانی‌ها در مهار اکسیداسیون وابسته به غلظت بود (۱۴).

در سال ۲۰۱۹ طی مطالعه‌ای که Zehra و همکاران بر روی برگ و پوسته درخت بلوط گونه Quercus incana داشتند، بیان کردند که ترکیبات جدا شده از پوسته و برگ درخت بلوط در برابر رده‌ی

References

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin* 2018; 68(1): 7-30.
2. Poorolajal J, Moradi L, Mohammadi Y, Cheraghi Z, Gohari-Ensaf F. Risk factors for stomach cancer: a systematic review and meta-analysis. *Epidemiol Health* 2020; 42 :e2020004.
3. Dicken BJ, Bigam DL, Cass C, Mackey JR, Joy AA, Hamilton SM. Gastric adenocarcinoma: review and considerations for future directions. *Ann Surg* 2005; 241(1): 27-39.
4. Sitarz R, Skierucha M, Mielko J, Offerhaus GJA, Maciejewski R, Polkowski WP. Gastric cancer: epidemiology, prevention, classification, and treatment. *Cancer Manag Res* 2018; 10: 239-48.
5. Sun K, Jia K, Lv H, Wang S-Q, Wu Y, Lei H, et al. EBV-positive gastric cancer: Current knowledge and future perspectives. *Front Oncol* 2020; 10: 583463.
6. Quadri HS, Smaglo BG, Morales SJ, Phillips AC, Martin AD, Chalhoub WM, et al. Gastric adenocarcinoma: a multimodal approach. *Front Surg* 2017; 4: 42.
7. Choi YJ, Kim N. Gastric cancer and family history. *Korean J Intern Med* 2016; 31(6): 1042-53.
8. Ngamruengphong S, Boardman LA, Heigh RI, Krishna M, Roberts ME, Riegert-Johnson DL. Gastric adenomas in familial adenomatous polyposis are common, but subtle, and have a benign course. *Hered Cancer Clin Pract* 2014; 12(1): 4.
9. Oun R, Moussa YE, Wheate NJ. The side effects of platinum-based chemotherapy drugs: a review for chemists. *Dalton Trans* 2018; 47(19): 6645-53.
10. Tanida S, Mizoshita T, Ozeki K, Tsukamoto H, Kamiya T, Kataoka H, et al. Mechanisms of cisplatin-induced apoptosis and of cisplatin sensitivity: potential of BIN1 to act as a potent predictor of cisplatin sensitivity in gastric cancer treatment. *Int J Surg Oncol* 2012; 2012: 862879.
11. Rakić S, Petrović S, Kukić J, Jadranin M, Tešević V, Povrenović D, et al. Influence of thermal treatment on phenolic compounds and antioxidant properties of oak acorns from Serbia. *Food Chemistry* 2007; 104(2): 830-4.
12. Popović BM, Štajner D, Ždero R, Orlović S, Galić Z. Antioxidant characterization of oak extracts combining spectrophotometric assays and chemometrics. *ScientificWorldJournal* 2013; 2013: 134656.
13. Moradi M-T, Karimi A, Alidadi S. In vitro antiproliferative and apoptosis-inducing activities of crude ethyle alcohol extract of *Quercus brantii* L. acorn and subsequent fractions. *Chin J Nat Med* 2016; 14(3): 196-202.
14. Karimi M, Del Pisheh A, Qitasi S, Hatami AH. Investigating the effect of the alcoholic extract of the inner shell of the oak fruit (pair) on the plasma level of blood glucose after a meal in healthy and diabetic male rats [in Persian]. *J Ilam Univ Med Sci* 2015; 23(5): 193-202.
15. Maha Max. Evaluation of apoptotic and necrotic cells by Annexin V-FITC/PI staining method [in Persian]. Available from: URL: <https://mahamax.com/service/apoptose>.
16. Zehra B, Ahmed A, Sarwar R, Khan A, Farooq U, Ali SA, et al. Apoptotic and antimetastatic activities of betulin isolated from *Quercus incana* against non-small cell lung cancer cells. *Cancer Manag Res* 2019; 11: 1667-83.

Investigating the Simultaneous Effect of Oak Fruit Extract and Cisplatin on Cell Cycle, Apoptosis and, Expression of Key Genes *P21*, *MMP2*, *CDK2* in Gastric Cancer Cell Line

Maryam Mehdi Sasan¹, Hamid Galehdari¹, Seyed Mansour Seyed Nejad¹,
Salar Andarzi¹, Mohammadreza Hajjari¹

Original Article

Abstract

Background: The purpose of this research was to investigate the effect of oak fruit extract and its combination with chemotherapy drug cisplatin on AGS gastric adenocarcinoma cell line and also to evaluate its effect on cell cycle, apoptosis, and metastasis as well as the expression of key genes *P21*, *CDK2*, and *MMP2*.

Methods: Cytotoxic effects of oak fruit extract and its combination with cisplatin on gastric cancer AGS cell line 48 hours after treatment were investigated using the MTT method. Using Real-Time PCR, the expression changes of *P21*, *CDK2*, and *MMP2* genes were investigated. Cell cycle and apoptosis were also investigated by flow cytometry.

Findings: The results showed that oak fruit extract combined with cisplatin causes more effects of apoptosis and cell death and inhibition of metastasis, as well as reducing the expression of *MMP2* compared to the use of cisplatin alone after 48 hours of incubation. It also causes the cell cycle to stop in the Sub G1 phase and reduce the S phase. Also, the combination of these two substances has reduced the activity of *CDK2*/cyclin E by increasing the level of *P21* protein.

Conclusion: It seems that the combination of oak fruit extract and cisplatin can express genes that play a tumor suppressor role, such as *P21*, and reducing the expression of *CDKs* leads to growth inhibition. On the other hand, by reducing the expression of genes such as *MMP2*, it prevents cell migration. It also inhibits the growth of cancer cells by inducing apoptosis, and this effect is comparable to the effect of cisplatin alone.

Keywords: Acorn; Apoptosis; Cisplatin; Genes; Stomach Neoplasms; Tumor Suppressor

Citation: Mehdi Sasan M, Galehdari H, Seyed Nejad SM, Andarzi S, Hajjari M. **Investigating the Simultaneous Effect of Oak Fruit Extract and Cisplatin on Cell Cycle, Apoptosis and, Expression of Key Genes *P21*, *MMP2*, *CDK2* in Gastric Cancer Cell Line.** J Isfahan Med Sch 2024; 41(748): 1128-39.

1- Department of of Biology, School of Sciences, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

Corresponding Author: Mohammadreza Hajjari, Department of of Biology, School of Sciences, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran; Email: mohamad.hajjari@gmail.com