DOI: 10.22122/jims.v39i646.13750 Published by Vesnu Publications

مجله دانشکده پزشکی اصفهان سال سی و نهم/شماره‌ی ۶۴۶/هفته‌ی دوم دی ۱۴۰۰

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۹/۱۸ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۷/۸ تاریخ چاپ: ۱۴۰۰/۱۰/۱۴

بیان ژن‌های PTEN، CDK4 و mTOR و میزان تزاید سلولی در رده‌ی سلولی سرطان پستان (T47D) تحت تأثیر تیمار با عصاره‌ی هسته‌ی انگور

عاطفه مجیری[۱]، نیره ساجدی[۲]، مهدی نیکبخت[۳]، میترا سلیمانی[۴]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: سرطان پستان شایع‌ترین بدخیمی در زنان می‌باشد. Phosphatase and tensin homolog (PTEN) ژن سرکوب‌کننده‌ی تومور است که در سرطان پستان دچار کاهش بیان می‌گردد. این ژن یک فسفاتاز می‌باشد و با خاصیت لیپید فسفاتازی خود، یک فسفات را از PIP3 جدا و PIP2 را تولید می‌کند. بنابراین، منجر به مهار مسیر Phosphatidylinositol-3-kinase/AKT (PI3K/AKT) و توقف چرخه‌ی سلولی آن‌ها در فاز G1، افزایش آپوپتوز و کاهش تکثیر سلول‌های سرطانی می‌شود. ژن Mammalian target of rapamycin (mTOR) به وسیله‌ی Phospho-AKT فعال می‌گردد و افزایش بیان آن در بسیاری از سرطان‌ها مشاهده شده است. ژن Cyclin-Dependent Kinase 4 (CDK4) نیز به عنوان یک آنکوژن عمل می‌نماید و میزان بیان آن در انواع مختلف سرطان‌های انسانی از جمله سرطان پستان افزایش می‌یابد. عصاره‌ی هسته‌ی انگور (Grape seed extract یا GSE) منبع غنی از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی بسیار قوی می‌باشد و درمان با آن می‌تواند منجر به توقف چرخه‌ی سلولی و در نهایت، مانع پیشرفت سرطان گردد. هدف از انجام پژوهش حاضر، تعیین بیان ژن‌های PTEN، CDK4 و mTOR و میزان تزاید سلولی در رده‌ی سلولی سرطان پستان (T47D) تحت تأثیر تیمار با GSE بود.

روش‌ها: سلول‌های T47D خریداری و کشت داده شد و با ۶۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر GSE تیمار گردید. روش‌های Real time-polymerase chain reaction (Real time-PCR) و MTT جهت بررسی میزان زنده ماندن سلول‌ها و بیان ژن‌ها مورد استفاده قرار گرفت. روش Colony survival assay نیز به منظور بررسی تشکیل کلونی استفاده گردید.

یافته‌ها: میزان حیات سلولی در گروه تیمار به صورت معنی‌داری کمتر از گروه شاهد گزارش شد. بر اساس نتایج روش Real time-PCR، بیان نسبی ژن PTEN به طور معنی‌داری بیشتر از گروه شاهد بود و همچنین، از میزان بیان ژن‌های mTOR و CDK4 کاسته شد. میزان GI50 به دست آمده برای GSE، ۶۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به دست آمد.

نتیجه‌گیری: استفاده از GSE، می‌تواند به طور چشمگیری بیان ژن سرکوب‌کننده‌ی تومور PTEN را افزایش دهد و در نهایت، منجر به کاهش رشد سلول‌های سرطانی T47D شود. GSE باعث مهار تشکیل کلونی در این رده‌ی سلولی می‌شود.

واژگان کلیدی: PTEN؛ CDK4؛ mTOR؛ سرطان پستان؛ T47D؛ عصاره‌ی هسته‌ی انگور

ارجاع: مجیری عاطفه، ساجدی نیره، نیکبخت مهدی، سلیمانی میترا. **بیان ژن‌های PTEN، CDK4 و mTOR و میزان تزاید سلولی در رده‌ی سلولی سرطان پستان (T47D) تحت تأثیر تیمار با عصاره‌ی هسته‌ی انگور.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۴۰۰؛ ۳۹ (۶۴۶): ۷-۷۹۲.

مقدمه

سرطان پستان، شایع‌ترین بدخیمی در زنان محسوب می‌شود که در نتیجه‌ی تأثیر متقابل عوامل وراثتی و محیطی و همچنین، تغییرات ژنتیکی و اپی‌ژنتیکی ایجاد شده در سلول‌ها رخ می‌دهد (۱). رده‌ی سلولی T47D یک رده‌ی سلولی بدخیم در سرطان پستان و با متاستازهای شایع در ناحیه‌ی پلورا می‌باشد (۲). ژن Phosphatase and tension homolog (PTEN) مورد بررسی در پژوهش حاضر، یکی از مهم‌ترین ژن‌های سرکوب‌کننده می‌باشد که از طریق مهار چرخه‌ی سلولی و آپوپتوز

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم تشریحی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۲- استادیار، گروه علوم تشریحی، دانشکده‌ی پزشکی، واحد قم، دانشگاه آزاد اسلامی، قم، ایران

۳- استاد، گروه علوم تشریحی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۴- استادیار، گروه علوم تشریحی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

نویسنده‌ی مسؤول: میترا سلیمانی: استادیار، گروه علوم تشریحی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

Email: mitrasoleimani1@gmail.com

عمل می‌کند (۳).

PTEN یک فسفاتاز است و با خاصیت لیپید فسفاتازی خود، یک فسفات را از PIP3 جدا و PIP2 را تولید می‌نماید [PIP3 محصول عمده‌ی Phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) می‌باشد که توسط گیرنده‌های سلولی فعال می‌شود] و منجر به مهار مسیر PI3K/AKT می‌شود و بدین وسیله می‌تواند باعث توقف چرخه‌ی سلولی در فاز G1 و کاهش تکثیر سلول‌های سرطانی شود. جهش ژن PTEN، بیشتر فعالیت‌های آن را در برابر PIP3 قطع می‌کند. Mammalian target of rapamycin (mTOR) نیز یک سرین/ ترئونین کیناز می‌باشد که با فعالیت کینازی خود، در تنظیم رشد و تکثیر سلولی، بقای سلولی، رونویسی و سنتز پروتئین نقش دارد. افزایش بیان و فعالیت این کمپلکس در بسیاری از انواع سرطان‌ها مشاهده شده است. یکی از مسیرهای فعال شدن mTOR، مسیر PI3K/AKT می‌باشد (۴). آنزیم PI3K، PIP2 را به PIP3 فسفریله می‌کند و به نوبه‌ی خود منجر به فسفریلاسیون و فعال‌سازی AKT می‌گردد. AKT فعال، منجر به پیشرفت چرخه‌ی سلولی و رشد و بقای سلول‌های سرطانی می‌گردد (۵).

جهش، حذف و یا خاموش شدن PTEN که در بسیاری از سرطان‌ها اتفاق می‌افتد، منجر به فعال شدن AKT و در نتیجه، بیان mTOR می‌گردد (۶). Cyclin-Dependent Kinase 4 (CDK4) یکی از ژن‌های تنظیم‌کننده‌ی چرخه‌ی سلولی می‌باشد که به عنوان آنکوژن عمل می‌نماید؛ به طوری که میزان بیان آن در انواع مختلف سرطان‌های انسانی از جمله سرطان پستان افزایش می‌یابد و باعث تسریع در انتقال سلول از فاز G1 به فاز S می‌شود و بدین ترتیب، در افزایش تزاید سلولی ایفای نقش می‌نماید (۷).

با توجه به اهمیت رژیم‌های غذایی در پیشگیری و کنترل سرطان، اهمیت استفاده از ترکیبات طبیعی بیش از پیش احساس می‌شود. انگور هزاران سال است که مصارف دارویی و تغذیه‌ای دارد و عصاره‌ی هسته‌ی انگور (Grape seed extract یا GSE) از هسته‌ی آن استخراج می‌گردد (۸). GSE منبع غنی از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی بسیار قوی می‌باشد که با خنثی نمودن رادیکال‌های آزاد، از آسیب و مرگ سلولی ناشی از اثر این رادیکال‌ها جلوگیری می‌کند.

GSE به عنوان یک ترکیب گیاهی قوی، می‌تواند با تأثیر بر مسیرهای مختلف انتقال پیام، فرایندهای تکثیر و تمایز سلولی، آپوپتوز، آنژیوژنز و متاستاز را تحت تأثیر قرار دهد.

درمان با GSE به طور قابل توجهی بیان CDK4 را کاهش می‌دهد و منجر به مهار رشد و توقف چرخه‌ی سلولی در فاز G1/S یا G2/M می‌گردد. علاوه بر این، می‌تواند مسیر PI3K/AKT را مهار کند و با القای آپوپتوز و توقف چرخه‌ی سلولی، مانع پیشرفت سرطان شود (۹). GSE با افزایش فسفریلاسیون و افزایش بیان PTEN، منجر به کاهش فعالیت مسیر PI3K/AKT و به دنبال آن، کاهش رشد سلول‌ها و افزایش شاخص‌های پیش‌آپوپتوزی می‌شود (۱۰). در مطالعه‌ی حاضر، میزان بیان ژن‌های PTEN، CDK4 و mTOR و میزان تزاید سلولی در رده‌ی سلولی سرطان پستان (T47D) تحت تأثیر تیمار با GSE مورد بررسی قرار گرفت. لازم به ذکر است که در تحقیقات قبلی، اثر GSE بر روی این رده‌ی سلولی و ژن‌های مورد مطالعه، بررسی نشده است.

روش‌ها

تهیه‌ی دارو و رده‌ی سلولی: رده‌ی سلولی سرطانی T47D از انستیتو پاستور ایران و GSE از شرکت Sigma (C8031, C101، آمریکا) خریداری گردید و به آزمایشگاه کشت سلولی گروه علوم تشریحی انتقال یافت.

گروه‌های مورد استفاده: گروه ۱ شاهد: سلول‌های سرطانی T47D بدون تأثیر دارو

گروه ۲ شاهد Vehicle، Dimethyl sulfoxide (DMSO): سلول‌های سرطانی T47D با حلال DMSO به مدت ۴۸ ساعت

گروه ۳: سلول‌های سرطانی T47D با غلظت GI50 تعیین شده برای GSE به مدت ۴۸ ساعت

کشت سلول (Cell culture): سلول‌های رده‌ی سلولی سرطان پستان در محیط مناسب Dulbecco's Modified Eagle Medium-F12 (DMEM/F12) کشت داده شدند. این محیط حاوی ۱۰ درصد Fetal bovine serum (FBS)، ۲ میلی‌مول در لیتر گلوتامین ۱۰ درصد و استرپتومایسین- پنی‌سیلین ۱ درصد بود که در شرایط دمایی ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و ۵ درصد CO_2 نگهداری شد.

تهیه‌ی محلول استوک دارویی: ابتدا ۳ میلی‌گرم GSE در ۱۰ میکرولیتر DMSO استریل حل شد. سپس طی محاسباتی که بر اساس وزن مولکولی آن صورت گرفت، جهت رسیدن به دز مورد نظر، با مدیوم رقیق گردید.

روش GI50: غلظتی از دارو است که در مدت ۴۸ ساعت، باعث مهار ۵۰ درصدی رشد سلول‌های T47D می‌گردد. ۱۰ تا ۴۰ هزار سلول T47D در هر یک از چاهک‌های پلیت ۲۴ خانه‌ای به همراه ۱/۵ سی‌سی مدیوم کامل ریخته و تا چسبیدن سلول‌ها، در داخل انکوباتور قرار داده شد. جهت تعیین GI50 مورد نظر، از ۸ دز متفاوت شامل ۵، ۲۰، ۵۰، ۷۰، ۹۰، ۱۱۵، ۱۲۵ و ۱۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر دارو استفاده شد. سه گروه سلول، از هر دز تعیین شده دارو دریافت کردند و ۳ چاهک نیز به عنوان گروه شاهد، دارویی دریافت

نکردند. پس از گذشت ۴۸ ساعت، درصد سلول‌های زنده جهت انجام تکنیک GI50 با استفاده از روش MTT مورد ارزیابی قرار گرفت. منحنی درصد سلول‌های زنده بر اساس دز، ترسیم و میزان GI50 برای GSE محاسبه گردید.

تکنیک MTT: 10^4 سلول در پلیت‌های ۱۲ خانه‌ای کاشته شدند. پس از گذشت ۲۴ ساعت، مدیوم سلول‌ها تخلیه و دارو با دز مؤثر بر اساس GI50 به هر چاهک اضافه شد و سلول‌ها به مدت ۴۸ ساعت تحت تیمار قرار گرفتند. پس از آن، ۴۰ میکرولیتر محلول MTT به همراه ۴۰۰ میکرولیتر مدیوم خالص به هر یک از چاهک‌ها اضافه گردید و به مدت ۴ ساعت در انکوباتور قرار داده شد. مدیوم محلول به روش MTT تخلیه و DMSO به هر چاهک اضافه و به مدت ۲ ساعت در تاریکی و دمای اتاق انکوبه شد. پس از انجام عمل سوسپانسیون، ۱۰۰ میکرولیتر از محلول ایجاد شده از هر چاهک پلیت ۱۲ خانه‌ای برداشته و به چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای انتقال داده شد. میزان جذب نوری هر یک از چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای در طول موج ۵۷۰ نانومتر خوانده شد و درصد سلول‌های زنده به دست آمد.

تکنیک Colony survival assay: ۳ هزار سلول در هر یک از خانه‌های پلیت ۶ خانه‌ای که حاوی مدیوم بود، قرار داده شد تا سلول‌ها به کف پلیت بچسبند. یک گروه سلولی، ۶۰ میکروگرم دارو و گروه دیگر نیز DMSO دریافت نمود و یک گروه هم به عنوان شاهد، ماده‌ای دریافت نکرد. سپس به مدت ۱۲–۱۰ روز در انکوباتور قرار داده شد تا کلونی سلولی تشکیل دهند. پس از تخلیه‌ی محیط رویی پلیت‌ها، شستشو با Phosphate-buffered saline (PBS) انجام شد. سپس ۳۰۰ تا ۴۰۰ لاندا از پارافرمالدهید ۴ درصد در هر چاهک ریخته و پس از گذشت ۵ دقیقه، تخلیه گردید. در ادامه، سلول‌ها با کریستال ویولت ۱ درصد رنگ‌آمیزی شد و پس از گذشت ۱۵ دقیقه شستشو صورت گرفت.

تکنیک Real time-polymerase chain reaction (Real time-PCR): در مرحله‌ی نخست، RNA با استفاده از کیت RNA X plus (Qiagen, Hilden، آلمان)، از سلول‌های مورد نظر در شرایط استریل عاری از RNAase و مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده استخراج گردید. در ادامه، RNA سنتز شده با استفاده از کیت سنتز cDNA (Fermentas، آمریکا) و مطابق با دستورالعمل مربوط، به نسخه‌ی cDNA تبدیل شد. سپس با تکثیر DNA و با استفاده از پرایمرهای مورد نظر (جدول ۱) با به کارگیری SYBR Green، qPCR SuperMix به انجام رسید. در مطالعه‌ی حاضر، از بتا اکتین به عنوان کنترل اندوژنوس استفاده شد و از طریق دستگاه Real time-PCR، نتایج به صورت منحنی مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت. تمام آزمایش‌ها سه بار تکرار و میزان بیان ژن‌ها طبق فرمول محاسبه گردید.

جدول ۱. پرایمرهای مورد استفاده در تکنیک

(Real-time PCR) Real time-polymerase chain reaction

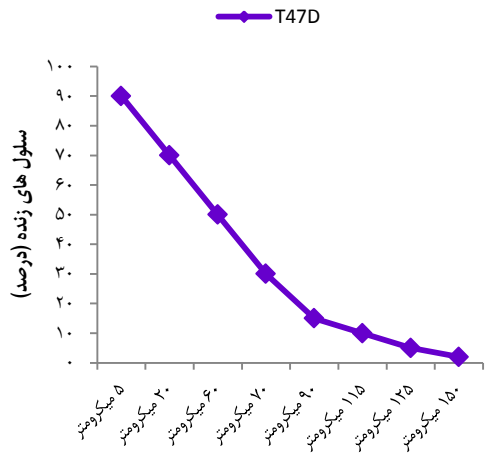
Primer ID	توالی Primer
PTEN-F	ACCAGTGGCACTGTTGTTTC
PTEN-R	TCCTCTGGTCCTGGTATGAAG
mTOR-F	TCCGAGAGATGAGTCAAGAGG
mTOR-R	TCCCACCTTCCACTCCTATG
CDK4-F	TCTTTGACCTGATTGGGCTG
CDK4-R	CCATCTCAGGTACCACCGAC
β-actin-F	GCACCACACCTTCTACAATG
β-actin-R	TGCTTGCTGATCCACATCTG

PTEN: Phosphatase and tensin homolog; mTOR: Mammalian target of rapamycin; CDK4: Cyclin Dependent Kinase 4

جهت مقایسه‌ی نتایج حاصل از آزمایش‌ها بر روی رده‌ی سلولی T47D، پس از تأثیر GSE طی ۴۸ ساعت، از آزمون One-way ANOVA در نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۲۰ (version 20, IBM Corporation, Armonk, NY) استفاده گردید. $P < ۰/۰۵$ به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

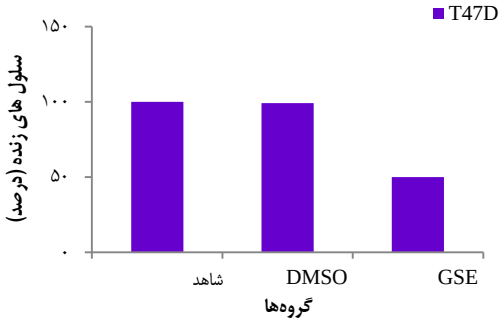
یافته‌ها

تکنیک GI50: شکل ۱ درصد سلول‌های زنده بر حسب دز دارویی را نشان می‌دهد. در تحقیق حاضر، دزها به صورت ۵، ۲۰، ۵۰، ۷۰، ۹۰، ۱۱۵، ۱۲۵ و ۱۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر انتخاب شد. دز مؤثر GSE طی مدت ۴۸ ساعت، ۶۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به دست آمد؛ به این معنی که GSE می‌تواند با میزان دز تعیین شده، ۵۰ درصد سلول‌های سرطانی را در مدت ۴۸ ساعت از بین ببرد.



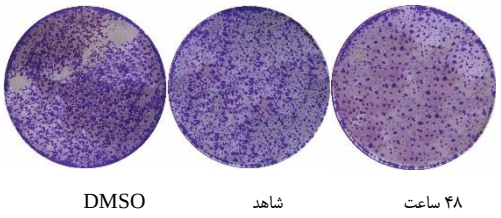
شکل ۱. GI50 جهت محاسبه‌ی دز Grape seed extract (GSE) بر روی رده‌ی سلولی T47D

نتایج تکنیک MTT: GSE در دز ۶۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بر اساس GI50، توانست باعث کاهش معنی‌دار درصد سلول‌های زنده در رده‌ی سلولی T47D شود ($P < ۰/۰۵$). تغییرات معنی‌داری در میزان درصد سلول‌های زنده‌ی نمونه‌هایی که در معرض DMSO قرار گرفتند، مشاهده نگردید (شکل ۲).



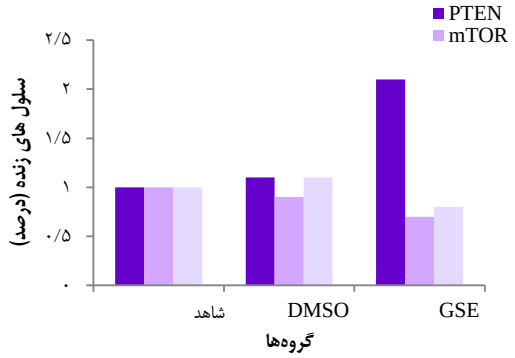
شکل ۲. بررسی و مقایسه‌ی درصد سلول‌های زنده در رده‌ی سلولی مورد بررسی به روش 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) در تیمار با Grape seed extract (GSE) و Dimethyl sulfoxide (DMSO) طی ۴۸ ساعت

نتایج تکنیک Colony survival assay: سلول‌های سرطانی T47D توانایی تولید مثل خود را با تشکیل کلونی حفظ می‌کنند، اما GSE توانست باعث مهار تشکیل کلونی در این رده‌ی سلولی شود (شکل ۳).



شکل ۳. نتایج تکنیک Colony survival assay جهت بررسی توانایی Grape seed extract (GSE) در جلوگیری از ایجاد کلونی

نتایج تکنیک Real time-PCR: بررسی اثر غلظت ۶۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر GSE بر اساس GI50 در زمان مورد بررسی بر روی میزان بیان mRNA و ژن‌های PTEN، CDK4 و mTOR در رده‌ی سلولی T47D، نشان داد که بیان ژن PTEN در گروه تیمار شده با GSE به طور معنی‌داری افزایش یافت (شکل ۴).



شکل ۴. نتایج روش Real time-polymerase chain reaction (Real-time PCR) پس از اثر Grape seed extract (GSE) طی ۴۸ ساعت بر روی میزان بیان ژن‌های Phosphatase and tensin homolog (PTEN)، Cyclin-Dependent Kinase 4 (CDK4) و mTOR (Mammalian target of rapamycin) در رده‌ی سلولی T47D

بحث

رده‌ی سلولی انتخاب شده در پژوهش حاضر، رده‌ی سرطانی T47D بود؛ چرا که این رده کاملاً تهاجمی و متاستاتیک می‌باشد و از طرف دیگر، مطالعات اندکی در مورد آن انجام شده است (۱۱). همچنین، در تحقیقات پیشین، اثر داروی GSE بر روی این رده‌ی سلولی بررسی نشده است. پژوهش‌های بسیاری نشان داده‌اند که عوامل تغذیه و رژیم غذایی، تأثیر مستقیم و مهمی بر روی مراحل مختلف سرطان از جمله ایجاد آن و پیشرفت رشد تومورها دارد (۹).

Dinicola و همکاران در مطالعه‌ی خود اثرات ضد توموری GSE را بر روی سرطان پستان بررسی نمودند و دریافتند که GSE با مختل کردن بیان بتاکتنین، از متاستاز سرطان پستان جلوگیری می‌کند. علاوه بر این، بیان شد که GSE سبب مهار رشد در رده‌های MCF7 و MDA-MB468 می‌گردد (۱۲). نتایج یک تحقیق دیگری نشان داد که GSE می‌تواند منجر به کاهش میزان حیات در سلول‌های سرطان پستان شود (۱۲). نتایج MTT در پژوهش حاضر نیز بیان‌کننده‌ی همین مسأله بود و میزان حیات در گروهی که با GSE تیمار شد، به میزان قابل توجهی کمتر از گروه شاهد گزارش گردید.

به منظور بررسی دز مؤثر GSE در مهار رشد سلول‌های سرطان پستان رده‌ی T47D، این سلول‌ها با دزهای متفاوت GSE مورد تیمار قرار گرفتند و نمودار GI50 ترسیم گردید. سپس نقطه‌ای از نمودار که معادل ۵۰ درصد مهار رشد بود، به عنوان دز مؤثر GSE در مهار رشد سلول‌های سرطان پستان رده‌ی T47D در نظر گرفته شد. دز به دست آمده برای مهار بر اساس روش GI50 برای GSE در تحقیق حاضر، ۶۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به دست آمد. بررسی نتایج رشد سلول‌های T47D به دنبال تیمار با دز مؤثر GSE نشان داد که GSE به میزان قابل

توجهی موجب کاهش رشد سلول‌های سرطانی پستان رده‌ی T47D می‌شود که با نتایج حاصل از پژوهش‌های دیگر (۱۳-۱۲) هم‌راستا می‌باشد. نتایج مطالعات Dinicola و همکاران (۱۲) و Kaur و همکاران (۱۳) بیانگر اثرات قابل توجه ضد تکثیری GSE می‌باشد.

در تحقیقی تأثیر GSE بر PTEN به عنوان ژن سرکوب‌کننده، بررسی و مشخص گردید که GSE می‌تواند فعالیت این ژن را افزایش دهد و به دنبال آن، فسفریلاسیون AKT را کاهش دهد (۱۰). نتایج پژوهش Mao و همکاران نشان داد که GSE می‌تواند بیان ژن CDK4 را کاهش دهد (۱۴) که با نتایج حاصل از روش Real-time PCR در مطالعه‌ی حاضر همخوانی داشت؛ به طوری که نتایج میزان بیان ژن PTEN در بررسی حاضر نشان داد که میزان بیان این ژن پس از تیمار با GSE، به طور معنی‌داری افزایش پیدا می‌کند، اما میزان بیان ژن‌های CDK4 و mTOR پس از تیمار با این ماده کاهش می‌یابد.

نتیجه‌گیری

تیمار با GSE طی ۴۸ ساعت، توانست میزان بیان ژن PTEN را افزایش دهد و در نهایت، با افزایش بیان این ژن، موجب مرگ سلول‌های سرطانی T47D شد. همچنین، از میزان بیان ژن‌های mTOR و CDK4 کاسته شد.

تشکر و قدردانی

پژوهش حاضر برگرفته از پایان‌نامه‌ی مقطع کارشناسی ارشد با شماره‌ی ۳۹۸۴۸۸، مصوب معاونت پژوهش و فن‌آوری دانشگاه علوم پزشکی اصفهان می‌باشد و با حمایت‌های این معاونت انجام گردید.

References

1. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. CA Cancer J Clin 2011; 61(2): 69-90.
2. Yu S, Kim T, Yoo KH, Kang K. The T47D cell line is an ideal experimental model to elucidate the progesterone-specific effects of a luminal A subtype of breast cancer. Biochem Biophys Res Commun 2017; 486(3): 752-8.
3. Vestey SB, Sen C, Calder CJ, Perks CM, Pignatelli M, Winters ZE. Activated Akt expression in breast cancer: Correlation with p53, Hdm2 and patient outcome. Eur J Cancer 2005; 41(7): 1017-25.
4. Easton JB, Houghton PJ. mTOR and cancer therapy. Oncogene 2006; 25(48): 6436-46.
5. LoPiccolo J, Blumenthal GM, Bernstein WB, Dennis PA. Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway: Effective combinations and clinical considerations. Drug Resist Updat 2008; 11(1-2): 32-50.
6. Moschetta M, Reale A, Marasco C, Vacca A, Carratu MR. Therapeutic targeting of the mTOR-signalling pathway in cancer: Benefits and limitations. Br J Pharmacol 2014; 171(16): 3801-13.
7. Santo L, Siu KT, Raje N. Targeting cyclin-dependent kinases and cell cycle progression in human cancers. Semin Oncol 2015; 42(6): 788-800.
8. Tyagi A, Tyagi A, Chan D, Agarwal C, Agarwal R. Grape seed extract sensitizes human breast carcinoma cells to chemotherapy agents-induced growth inhibition and apoptotic death via cytochrome c release and caspase activation pathway. Cancer Res 2006; 66(8 Suppl): 1283.
9. Dinicola S, Cucina A, Antonacci D, Bizzarri M. Anticancer effects of grape seed extract on human cancers: A review. J Carcinog Mutag 2014; S8: 005.
10. He Z, Chen AY, Rojanasakul Y, Rankin GO, Chen YC. Gallic acid, a phenolic compound, exerts anti-angiogenic effects via the PTEN/AKT/HIF-1alpha/VEGF signaling pathway in ovarian cancer cells. Oncol Rep 2016; 35(1): 291-7.
11. Yu S, Kim T, Yoo KH, Kang K. The T47D cell line is an ideal experimental model to elucidate the progesterone-specific effects of a luminal A subtype of breast cancer. Biochem Biophys Res Commun 2017; 486(3): 752-8.
12. Dinicola S, Pasqualato A, Cucina A, Coluccia P, Ferranti F, Canipari R, et al. Grape seed extract suppresses MDA-MB231 breast cancer cell migration and invasion. Eur J Nutr 2014; 53(2): 421-31.
13. Kaur M, Mandair R, Agarwal R, Agarwal C. Grape seed extract induces cell cycle arrest and apoptosis in human colon carcinoma cells. Nutr Cancer 2008; 60(Suppl 1): 2-11.
14. Mao JT, Lu QY, Xue B, Neis P, Zamora FD, Lundmark L, et al. A pilot study of a grape seed procyanidin extract for lung cancer chemoprevention. Cancer Prev Res (Phila) 2019; 12(8): 557-66.

DDOI: *10.22122/jims.v39i646.13750* *Published by Vesnu Publications*

Journal of Isfahan Medical School **Vol. 39, No. 646, 2nd Week, January 2022**

Received: 08.12.2020 Accepted: 30.09.2021 Published: 12.01.2022

Expression Assay of PTEN, CDK4, and mTOR Genes and Cell Proliferation in Breast Cancer Cell Line (T47D) under Grape Seed Extract Treatment

Atefeh Mojiri[1], Nayereh Sajedi[2], Mehdi Nikbakht[3], Mitra Soleimani[4]

Original Article

Abstract

Background: Breast cancer is a highly heterogeneous disease and the most common malignancy in women. Phosphatase and tensin homolog (PTEN) is a tumor suppressor gene that reduces in breast cancer. This gene is a phosphatase, and by its lipid phosphatase capacity separates a phosphate from PIP3, and produces PIP2. So, it tends to inhibition of phosphatidylinositol-3-kinase/AKT (PI3K/AKT) pathway and a break in its cellular cycle in phase G1, increase in apoptosis, and decrease in proliferation of cancer cells. The mammalian target of rapamycin (mTOR) gene is activated by phospho/AKT, and its expression increases in many cancers. The cyclin-dependent kinase 4 (CDK4) gene also acts as an oncogene and its expression increases in various types of human cancers, including breast cancer. Grape seed extract (GSE) is a reach source of natural antioxidants, and treatment with it can tend to inhibition of cell cycle and finally, inhibition of cancer progression. This study aimed to assess the expression of PTEN, CDK4, and mTOR genes and cell proliferation in breast cancer cell line (T47D) under GSE treatment.

Methods: T47D cells were purchased and cultured and treated with GSE of a concentration of 60 µg/ml. MTT and real time-polymerase chain reaction (PCR) methods were used to evaluate cell viability and gene expression. Colony survival assay method was used to assess colony formation.

Findings: The amount of cell life in the treatment group was significantly lower than the control group. Moreover, the results of real time PCR showed that the relative expression of PTEN gene was significantly higher than the control group, and also the expression of mTOR and CDK4 genes reduced.

Conclusion: The use of GSE can significantly increase the expression of PTEN tumor suppressor gene, and ultimately cause the death of T47D cancer cells.

Keywords: PTEN protein; Cyclin dependent kinase 4; mTOR protein; Breast cancer; Grape seed extract

Citation: Mojiri A, Sajedi N, Nikbakht M, Soleimani M. **Expression Assay of PTEN, CDK4, and mTOR Genes and Cell Proliferation in Breast Cancer Cell Line (T47D) under Grape Seed Extract Treatment.** J Isfahan Med Sch 2022; 39(646): 792-7.

1- Department of Anatomical Sciences, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
2- Assistant Professor, Department of Anatomical Sciences, School of Medicine, Qom Branch, Islamic Azad university, Qom, Iran
3- Professor, Department of Anatomical Sciences, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
4- Assistant Professor, Department of Anatomical Sciences, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
Corresponding Author: Mitra Soleimani, Assistant Professor, Department of Anatomical Sciences, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran; Email: mitrasoleimani1@gmail.com