ORIGINAL ARTICLE

Effect of Glycyrrhetinic Acid and Glycyrrhizic Acid on the Expression of CXCR4 in Epithelial Cells of Gastric Carcinoma

Kobra Mehdinejadiani[1],
Ali Jalili[2],
Mahmood Rafieian Kopaei[3],
Loghman Salimzadeh[4],
Shayesteh Mehdinejadiani[5],
Seyed Mohammad javad Mousavi[6],
Hedayatollah Shirzad[7]

[1]PhD Student in Immunology, Faculty of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[2] Associate Professor, Department of Immunology, Faculty of Medicine, Kordestan University of Medical Sciences, Kordestan, Iran
[3] Professor, Medicinal Plant Research Center, Faculty of Medicine, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran
[4] Lecturer, Department of Immunology, Faculty of Medicine, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran
[5] PhD Student in Reproductive Biology, Faculty of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[6] MSc Student in Immunology, Faculty of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[7] Professor, Department of Immunology, Cellular and Molecular Research Center, Faculty of Medicine, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran

(Received December 20, 2014 ; Accepted April 20, 2015)

Abstract

Background and purpose: Gastric cancer is one of the most common cancers and the second common cause of cancer death worldwide. Surgery is the only treatment for gastric cancer but about 50% percent of patients have inoperable tumors. For these patients, combined chemotherapy is the primary treatment which has some side effects. CXCR4 that is expressed on the surface of tumor cells plays a role in metastasis and chemotaxis of tumor cells to different tissues. Licorice compounds are known to have anticancer properties, so this study aimed at investigating their effects on the expression of CXCR4 receptor in gastric cancer AGS cells.

Materials and methods: In this experimental study, 106 cells were poured in all wells of 6 pieces plates and exposed to various concentrations of Glycyrrhetinic acid and Glycyrrhizic acid for 24 hours. The CXCR4 gene expression levels were determined by Real−Time PCR and the level of expression in the groups was compared using ANOVA and Dunntt's post hoc test in prism software. $P < 0.05$ was considered as statistically significant.

Results: The results showed a significant decrease in CXCR4 gene expression in cells exposed to acid Glycyrrhizic and acid Glycyrrhetinic at 24 hours compared with that of the control group. In fact, decreased expressions of CXCR4 reduced the rates of metastasis and chemotaxis

Conclusion: The compounds used in this study reduced the CXCR4 gene expression, so, they could be used as effective treatments for gastric cancer.

Keywords: Gastric carcinoma, Glycyrrhetinic acid, Glycyrrhizic acid, CXCR4

J Mazandaran Univ Med Sci 2015; 25(123): 149-158 (Persian).

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و پنجم شماره ۱۲۳ فروردین سال ۱۳۹۴ (۱۵۸-۱۴۹)

اثر ترکیبات گلیسیریتینیک اسید و گلیسیریزیک اسید مشتق از عصاره شیرین بیان بر بیان CXCR4 سلول های اپیتلیال کارسینومای معده

کبری مهدی نژادیانی[۱]
علی جلیلی[۲]
محمود رفیعیان کوپائی[۳]
لقمان سلیم زاده[۴]
شایسته مهدی نژادیانی[۵]
محمد جواد موسوی[۶]
هدایت الله شیرزاد[۷]

چکیده

سابقه و هدف: سرطان معده از رایج‌ترین سرطان‌هاست و دومین عامل مرگ و میر در میان مرگ ومیرهای ناشی از سرطان را به خود اختصاص می‌دهد. به طور رایج تنها راه درمان علاج‌پذیر سرطان معده جراحی می‌باشد. با این وجود، تقریبا نیمی از بیماران تومورهای غیر قابل جراحی دارند. برای این دسته از بیماران ترکیب شیمی درمانی به عنوان یک درمان اولیه استفاده می شود اما ترکیب شیمی درمانی از عوارض جانبی زیادی برخوردار است. CXCR4 که برسطح سلول‌های توموری بیان می شود نقشی شناخته شده در متاستاز و کموتاکسی سلول‌های توموری به بافت‌های مختلف دارد. از آن‌جایی که ترکیبات شیرین بیان دارای خاصیت ضدسرطانی هستند، این مطالعه با هدف بررسی اثر ترکیبات شیرین بیان بر روی بیان رسپتور CXCR4 رده سلولی AGS سرطان معده انجام شده است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی تعداد 10^6 سلول را در هر یک از چاهک‌های پلیت ۶ تایی ریخته و با ترکیبات گلیسیریتینیک اسید و گلیسیریزیک اسید با غلظت‌های مختلف به مدت ۲۴ ساعت مجاورت داده شد. میزان بیان ژن CXCR4 به روش Real-Time PCR بررسی و با استفاده از نرم افزار PRISM، آزمون آنالیز واریانس و آزمون تعقیبی دانت مورد بررسی قرار گرفت. $p< ۰/۰۵$ از لحاظ آماری معنی‌دار گزارش گردید.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که بیان ژن CXCR4 در سلول‌های مجاورت داده شده با گلیسیریتینیک اسید و گلیسیریزیک اسید در مدت زمان ۲۴ ساعت در مقایسه با گروه شاهد کاهش معنی داری داشته است. به عبارتی، می‌توان این گونه بیان نمود که همراه با کاهش بیان CXCR4 میزان متاستاز و کموتاکسی با توجه به نقش CXCR4 کاهش می‌یابد.

استنتاج: با توجه به کاهش میزان بیان ژن CXCR4 تحت تاثیر ترکیبات مذکور شاید بتوان از آن ها به عنوان ترکیب موثر درمانی در سرطان معده استفاده نمود.

واژه های کلیدی: کارسینومای معده، گلیسیریتینیک اسید، گلیسیریزیک اسید، CXCR4

مقدمه

سرطان معده یکی از رایج‌ترین سرطان هاست که به عنوان دومین سرطان شایع بعد از سرطان ریه شناخته شده است(۱). ازآن‌جایی که سرطان معده در مراحل اولیه اغلب بدون علایم بالینی است، ۸۰ تا ۹۰ درصد

مولف مسئول: هدایت الله شیرزاد – شهرکرد:رحمتیه، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، دانشکده پزشکی Email: shirzadeh@yahoo.com
۱. دانشجوی مقطع دکترای تخصصی ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهیدبهشتی، تهران، ایران
۲. دانشیار، گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران
۳. استاد، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران
۴. مربی، گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران
۵. دانشجوی مقطع PhD بیولوژی تولیدمثل، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۶. دانشجوی مقطع کارشناسی ارشد ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
۷. استاد، گروه ایمونولوژی، مرکز تحقیقات سلولی- مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران
تاریخ دریافت : ۱۳۹۳/۹/۲۹ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۳۹۳/۱۱/۱ تاریخ تصویب : ۱۳۹۴/۱/۳۱

بیماران در مراحل پیشرفته بیماری با متاستاز مجاور مراجعه می‌کنند. بر طبق مطالعات اپیدمیولوژی، شانس بقاء ۵ ساله در مراحل پیشرفته همراه با متاستاز، علی‌رغم انجام شیمی درمانی و درمان‌های تهاجمی مانند جراحی، بسیار ضعیف است(۲). متاستاز فرآیندی غیرتصادفی است و انواع خاصی از سرطان‌ها ترجیحاً به مناطق ویژه‌ای متاستاز می‌یابند ولی سایر انواع سرطان‌ها تمایل به متاستاز به ارگان‌های دوردست دارند. این فرآیند با رشد سلول‌های توموری در ناحیه ابتدایی شروع و سپس با ورود سلول‌های توموری به رگ‌های خونی و مجاری لنفاوی دنبال می‌شود تا زمانی که سلول های توموری به مناطق دوردست می‌رسند. سپس استقرار موفقیت‌آمیز سلول‌های توموری در ارگان‌های ویژه نیازمند تکامل چندین مرحله متوالی شامل چسبیدن سلول‌های توموری به سلول‌های اندوتلیال ارگان هدف، خروج از دیواره رگ‌های کوچک و مهاجرت به بافت هدف است یعنی جایی که سلول‌های توموری سرانجام متوقف شده و رشد می‌کنند. تمایل انتخابی به یک بافت خاص به وسیله توانایی سلول‌های توموری جهت انجام تمامی این مراحل تعیین می‌شود. فاکتورهای محیطی نه تنها رشد سلول‌های توموری را در محل متاستاز تقویت می‌کنند بلکه تعیین‌کننده بافتی هستند که توسط سلول‌های توموری برای متاستاز ترجیح داده می‌شود(۳، ۴). قدرتمندترین فاکتور در پیش آگهی این بیماری میزان سلول‌های متاستاز یافته به گره‌های لنفاوی است. تحقیقات نشان داده‌اند که میزان بقاء ۵ ساله در بیماران با ۱ تا ۶ گره لنفاوی درگیر در متاستاز حدود ۴۴٪ و در موارد درگیری بیش از ۱۵ گره لنفاوی حدود ۱۱ درصد خواهد بود. از زمان کار پاژت در بیش از یک صد سال پیش، دانشمندان دریافته‌اند که حرکت سلول‌های سرطانی تصادفی نیست و سرطان‌های مختلف، مقصدهای متفاوتی دارند که به تئوری دانه و خاک (Soil & Seed) معروف شد. بعدها تئوری دیگری به نام تئوری Homing بیان داشت که اندام‌های متفاوت توانایی‌های خاصی برای جذب سلول‌های سرطانی از طریق تولید فاکتورهای کموتاکتیک دارند. مولر و همکارانش در سال ۲۰۰۱ نشان دادند که مهاجرت طبیعی لکوسیت‌های خونی و متاستاز سرطان‌های سینه تقریباً از الگوی یکسانی پیروی می‌کنند(۶،۵). کموکاین‌ها بازیگرهای اصلی مهاجرت و Trafficking سلول‌های خونی و سرطانی هستند. از این میان، CXCL12 نقش بارزتری دارد. CXCL12 توسط بسیاری از سلول‌های استرومایی به خصوص سلول‌های مغز استخوان، کبد و صفاق ساخته می‌شود. هیپوکسی، آسیب بافتی و التهاب باعث افزایش بیان رسپتور CXCL12 (CXCR4) می‌شود(۷).

تحقیقات اخیر نشان داده است که کموکاین‌های معین و رسپتورهای آن‌ها، به ویژه CXCL12 و رسپتور آن CXCR4، نقشی حیاتی در رفتار سلول‌های سرطانی داشته و تکثیر، مهاجرت و بقای سلول های سرطانی را تعدیل می‌کنند. CXCR4 در سلول‌های اپیتلیال سرطانی مختلف بیان می‌شود که در بیولوژی تومور نقش دارد. اتصال CXCL12 به CXCR4 باعث متاستاز می‌گردد(۸). CXCR4 هم‌چنین می‌تواند باعث رگ زایی تومورها شده و به عنوان فاکتور رشد و بقا آن‌ها عمل کند(۹). هم‌چنین اتصال CXCL12 به CXCR4 مسیرهای پیام‌دهی مختلفی را آغاز می‌کند که باعث پاسخ‌های متفاوتی نظیر کموتاکسی، تکثیر و بقا، افزایش کلسیم درون سلولی و رونویسی ژن می‌شود(۱۰). تحقیقات موید آن است که بلوکه کردن مسیر CXCL12/CXCR4 می‌تواند به عنوان راه‌کاری برای درمان تومور مورد استفاده قرار گیرد. مطالعات اخیر توجه زیادی به استفاده از محصولات طبیعی در تقویت سیستم ایمنی(۱۲،۱۱)، درمان بیماری‌های صعب العلاج از جمله آلزایمر(۱۳)، آترواسکلروز(۱۵،۱۴)، دیابت(۱۷،۱۶)، برخی از بیماری‌های مربوط به گوارش(۱۹،۱۸) و سرطان(۲۱،۲۰) داشته است و نتایج تحقیقات اخیر امید زیادی برای پیشگیری و درمان این بیماری‌ها به وجود آورده است. در این رابطه می‌توان به ترکیبات حاصل از ریشه شیرین بیان اشاره نمود که

برای درمان بیماری‌های مختلف، از عفونت‌های میکروبی گرفته تا سرطان، مورد استفاده قرار می‌گیرد(۲۲،۷). این ترکیبات اکثرا فلاونوئیدهای مشتق شده از شیرین بیان هستند که دارای اثرات آنتی توموری می‌باشند(۲۳،۲۵)، اما مکانیسم دقیق اثر آنها شناخته شده نیست. هم‌چنین از آن‌جایی که تعامل بین CXCR4 و لیگاند آن، CXCL12، در رشد و متاستاز سلول‌های سرطانی نقش بسیار حیاتی دارد، در مطالعه حاضر اثر دو ترکیب فلاونوئیدی مشتق شده از شیرین بیان بر روی بیان رسپتور CXCL12 در سلول AGS سرطان معده مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

ترکیبات گلیسیریتینیک اسید[1] و گلیسیریزیک اسید[2] از شرکت سیگما و رده سلول سرطانی AGS از انستیتو پاستور ایران خریداری شدند. تعداد 10^6 سلول AGS در۳ میلی‌لیتر محیط کشت RPMI1640 حاوی FBS 10% موجود در هر چاهک از پلیت ۶ تایی ریخته شد و به مدت یک شب در انکوباتور CO_2دار نگه داری گردید. برای اثر دادن ترکیبات، غلظت‌های مختلف ۱، ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ میکرو مولار برای گلیسیریتینیک اسید و ۱، ۱۰ و ۱۰۰ میکرو مولار برای گلیسیریزیک اسید انتخاب شدند. ترکیبات با غلظت مذکور در مدیای کامل حل شده و به ترتیب ۰.۳ ، ۳، ۱۵ و ۳۰ میکرولیتر از آن‌ها به ۴ چاهک پلیت ۶ تایی مخصوص گلیسیریتینیک اسید و به ترتیب ۰/۳ ، ۳ و ۳۰ میکرولیتر از آن‌ها به ۳ چاهک پلیت ۶ تایی مخصوص گلیسیریزیک اسید اضافه شد و جهت کنترل مدیای کامل بدون دارو که حاوی ۰/۱ درصد DMSO بود، استفاده گردید. ترکیبات به مدت ۲۴ ساعت بر روی سلول‌ها انکوبه شدند. سپس استخراج RNA با استفاده از کیت Bioflux (Bioflux, Basel, Switzerland) انجام شد. برای بررسی غلظت RNA استخراج شده از اسپکتروفتومتر استفاده شد. برای این کار ۳ میکرو لیتر از RNA مورد نظر به ۹۷ میکرولیتر آب مقطر استریل افزوده و جذب آن در طول موج ۲۶۰ نانومتر توسط اسپکتوفتومتر خوانده شد.

$$C\ (ng/\mu l) = A_{۲۶۰} \times \varepsilon \times d$$

(C : غلظت، $A_{۲۶۰}$: جذب نوری در طول موج ۲۶۰nm، ε : ضریب خاموشی مولی، برای RNA=۴۰ ، d: ضریب رقت). بر اساس غلظت RNA به دست آمده مقدار لازم RNA برای واکنش RT-PCR استفاده شد. به منظور تبدیل mRNA به cDNA و استفاده از آن در واکنش PCR لازم است واکنش رونویسی معکوس صورت گیرد. برای این واکنش از کیت پارس توس (ایران) استفاده شد و با استفاده از پرایمر Random Hexamer واکنش RT PCR صورت گرفت. این پرایمر مخلوطی از انواع توالی‌های پرایمر تصادفی شش نوکلئوتیدی است که به نقاط مختلف RNA هدف اتصال می‌یابند و نقطه آغازی برای شروع کار آنزیم Reverse Transcriptase مهیا می‌کنند. در نتیجه تمام RNA های موجود به cDNA تبدیل می‌شوند. پرایمرهای ژن‌های مورد نظر با استفاده از نرم‌افزار Gene Runner طراحی و توسط BLAST ارزیابی گردید که در جدول شماره ۱ قابل مشاهده می‌باشد.

جدول شماره ۱: توالی‌های پرایمر برای qRT-PCR

Primer	Sequence	Product(bp)
CXCR4	S: ACAGTCAACCTCTACAGCAG A: ATCCAGACGCCAACATAGAC	۱۳۶
actinβ	S:AGATCATTGCTCCTCCTGAG A:CTAAGTCATAGTCCGCCTAG	۱۶۱

انجام Real–Time PCR در یک سیستم (Rotor-Gene ^{TM}6000, Corbett Life Science, Sydney Australia) با استفاده از رنگ SYBR GREEN انجام شد. برای نرمال‌سازی مقادیر کمی mRNA در نمونه‌های شاهد و آزمایش، از ژن β–اکتین به عنوان یک ژن رفرنس استفاده شد. قبل از انجام هر گونه PCR در

1. Glycyrrhetinic acid
2. Glycyrrhizic acid

دستگاه Real–Time و به منظور حصول اطمینان از عدم تشکیل باندهای غیراختصاصی در یک شرایط دمایی و غلظتی مطمئن ابتدا در دستگاه Thermocycler با استفاده از کیت RT (پارس توس) و master mix PCR (سیناژن) شرایط دمایی مناسب و شرایط غلظتی برای پرایمرها به دست آمد و سپس طبق این شرایط بهینه شده واکنش PCR در دستگاه Real-Time اجرا شد. محصولات PCR حاصل از مرحله اول (بهینه سازی) با الکتروفورز روی ژل آگارز ۲ درصد لود شدند.

شرایط مناسب بعد از چندین مرحله گرادیان دمایی (از ۵۲ تا ۶۵ درجه سانتی گراد) و گرادیان‌های غلظتی از DNA الگو و پرایمرها به دست آمد. سپس بعد از چندین مرحله واکنش PCR در دستگاه Real–Time، الگوی زمانی و غلظتی بالا به دست آمد که برای حصول اطمینان از عدم حضور باندهای غیراختصاصی از پروسه Melting Curve دستگاه و هم‌چنین از الکتروفورز در ژل آگارز ۲ درصد استفاده شد. جهت آنالیز کمی میزان بیان ژن CXCR4 در سلول‌های AGS روش‌های مختلفی وجود دارد. با توجه به ماهیت تحقیق که یک بررسی نسبی بیان بین دو گروه می‌باشد، برای تجزیه و تحلیل اطلاعات خام حاصل از quantitative Real-Time PCR از روش Pfaffl استفاده شد. در این روش تغییرات بیان یک ژن خاص تحت شرایط مختلف در مقایسه با یک ژن رفرنس بر اساس فرمول زیر قابل ارزیابی است.

Expression Ratio=E target (Ct Control-Ct Test) / E Reference (Ct Control-Ct Test)

در این فرمول، E معرف کارآیی PCR و Ct شماره چرخه ای است که در آن منحنی تغییرات میزان فلورسانس هر نمونه خط آستانه را قطع می‌کند. در زمان آنالیز نتایج به دست آمده، Ct هر یک از واکنش‌ها در معادله Pfaffl قرار داده شد. به این ترتیب میزان تغییر بیان ژن مورد نظر در گروه شاهد و گروه تیمار با ترکیبات مذکور به دست آمد.

یافته ها

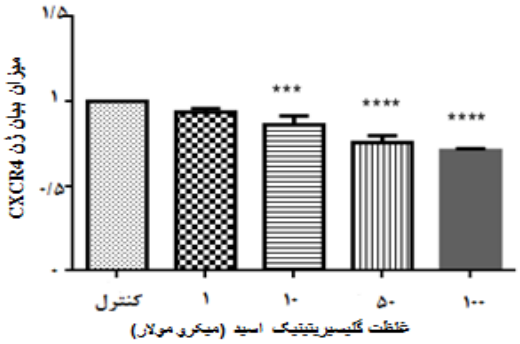
برای آنالیز کمی میزان بیان ژن‌ها توسط تکنیک Real–Time PCR ابتدا پارامتر کارایی (E: efficiency) و سیکلی که در آن میزان نشر فلورسنت از خط آستانه عبور می‌کند (Ct: threshold cycle) برای ژن CXCR4 در گروه مورد مطالعه به دست آمد. در مرحله بعد با استفاده از مقادیر عددی این پارامترها (جداول شماره ۲ و ۳) و معادله Pfaffl، میزان تغییرات بیان ژن مورد نظر به صورت نرمالایز شده محاسبه شد. نتایج Real-Time PCR برای بیان ژن CXCR4 نسبت به بتا اکتین در سلول‌های AGS پس از اثر گلیسیریتینیک اسید در ۲۴ ساعت (نمودار شماره ۱) نشان‌دهنده کاهش میزان بیان ژن CXCR4 نسبت به بتا اکتین در گروه تحت تاثیر با گلیسیریتینیک اسید نسبت به گروه شاهد بود (جدول شماره ۴)، که این تغییرات به لحاظ آماری معنی‌دار بوده است. بیش‌ترین کاهش ژن CXCR4 در غلظت‌های ۱۰۰ و ۵۰ میکرو لیتر است. در سه غلظت ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ میکرولیتر اختلاف معنی‌داری مشاهده شد ۰/۰۰۰۱ و ۰/۰۰۱، ۰/۰۵ >p.

جدول شماره ۲: .پارامترهای حاصل از روش Pffafl برای داروی گلیسیریتینیک اسید: این آزمایشات به صورت تریپلیکیت انجام شده است و نتایج هر سری در جدول زیر آمده است

غلظت های داروی گلیسیریتینیک اسید	نتایج معادله Pffafl در سری اول انجام آزمایش	نتایج معادله Pffafl در سری دوم انجام آزمایش	نتایج معادله Pffafl در سری سوم انجام آزمایش
۱ میکرو مولار	۹۶/۰	۹۲/۰	۹۳/۰
۱۰ میکرومولار	۹۰/۰	۸۸/۰	۸۰/۰
۵۰ میکرومولار	۸۰/۰	۰۷۵	۰۷۲
۱۰۰ میکرو مولار	۷۰/۰	۷۱/۰	۷۲/۰

جدول شماره ۳: پارامترهای حاصل از روش Pffafl برای داروی گلیسیریزیک اسید: این آزمایشات به صورت تریپلیکیت انجام شده است و نتایج هر سری در جدول زیر آمده است

غلظت های داروی گلیسیریزیک اسید	نتایج معادله Pffafl در سری اول انجام آزمایش	نتایج معادله Pffafl در سری دوم انجام آزمایش	نتایج معادله Pffafl در سری سوم انجام آزمایش
۱ میکرو مولار	۰/۹۹	۰/۹۵	۰/۹۷
۱۰ میکرومولار	۰/۸۸	۰/۹۰	۰/۸۱
۱۰۰ میکرو مولار	۰/۷۹	۰/۷۸	۰/۷۱



نمودار شماره ۱: میزان بیان ژن CXCR4 تحت تاثیر ترکیب گلیسیریتینیک اسید نسبت به بتا اکتین: همان طور که مشاهده می‌شود بیش‌ترین کاهش ژن CXCR4 در غلظت ۱۰۰ و ۵۰ میکرولیتر است، در سه غلظت ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ اختلاف معنی‌داری مشاهده می‌شود ۰/۰۰۰۱ و ۰/۰۰۱، ۰/۰۵> p

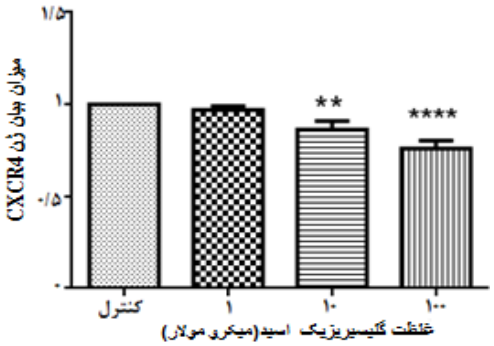
جدول شماره ۴: نسبت بیان ژن CXCR4 به بتا اکتین در گروه های مورد مطالعه نسبت به شاهد (تحت تاثیر داروی گلیسیر یتینیک اسید)

غلظت داروی گلیسیریتینیک اسید	نسبت بیان ژن CXCR4 در سلول های تیمار شده به تیمار نشده
۱ میکرومولار	۰.۹۳
۱۰ میکرومولار	۰.۸۶
۵۰ میکرومولار	۰.۷۵
۱۰۰ میکرومولار	۰.۷۱

نتایج Real–Time PCR برای بیان ژن CXCR4 نسبت به بتا اکتین در سلول‌های AGS پس از اثر داروی گلیسیریزیک اسید در ۲۴ ساعت (نمودار شماره ۲) نشان دهنده کاهش میزان بیان ژن CXCR4 نسبت به بتا اکتین در گروه تحت تاثیر گلیسیریزیک اسید قرار گرفته نسبت به گروه شاهد بود (جدول شماره ۵) که این تغییرات به لحاظ آماری معنی‌دار بوده است. بیشترین کاهش ژن CXCR4 در غلظت ۱۰۰ میکرومولار است. در دو غلظت ۱۰ و ۱۰۰ میکرومولار اختلاف معنی‌داری مشاهده شد ۰/۰۰۰۱ و ۰/۰۰۱، ۰/۰۵> p.

جدول شماره ۵: نسبت بیان ژن CXCR4 به بتا اکتین در گروه های مورد مطالعه نسبت به شاهد (تحت تاثیر داروی گلیسیر یزیک اسید)

غلظت داروی گلیسیریزیک اسید	نسبت بیان ژن CXCR4 در سلول های تیمار شده به تیمار نشده
۱ میکرومولار	۰.۹۷
۱۰ میکرومولار	۰.۸۶
۱۰۰ میکرومولار	۰.۷۶



نمودار شماره ۲: بیان ژن CXCR4 در سلول های AGS پس از اثرترکیب گلیسیریزیک اسید در ۲۴ ساعت نسبت به بتا اکتین : همان طور که مشاهده می شود بیش ترین کاهش ژن CXCR4 در غلظت ۱۰۰ میکرومولار است. در ۲ غلظت ۱۰ و ۱۰۰ میکرومولار اختلاف معنی داری مشاهده می شود۰/۰۰۰۱ و ۰/۰۰۱، ۰/۰۵> p

بحث

در مطالعه حاضر به نقش بارز برخی از مشتقات عصاره شیرین بیان یعنی گلیسیریتینیک اسید و گلیسیریزیک اسید بر روی میزان بیان CXCR4 در سلول‌های کارسینومای معده پی برده شد که نشان‌دهنده اهمیت ترکیبات گیاهی با عوارض جانبی کم‌تر در درمان بیماری‌ها ازجمله سرطان است. با توجه به این که کموکاین‌ها یک زیر خانواده از سایتوکاین‌های جاذب شیمیایی هستند که وجود آن‌ها در عبور و مرور لنفوسیت‌ها و حفظ عملکرد ایمنی حیاتی می‌باشد، در این مطالعه از یک ترکیب گیاهی استفاده شد که هدف آن رسپتور یکی از این کموکاین هاست(۲۷،۲۶). همان‌طور که گفته شد CXCL12 نیز یکی از کموکاین‌هایی است که در محل التهاب و عفونت مزمن تولید می‌شود و باعث مهاجرت سلول‌های ایمنی به محل آسیب می‌گردد. هیپوکسی، آسیب بافتی و التهاب باعث افزایش بیان رسپتورهای CXCL12 می‌شوند. مهم‌ترین رسپتور آن، CXCR4، در سطح بسیاری از سلول‌های التهابی و سرطانی بیان می‌شود و در مهاجرت سلول‌های ایمنی و متاستاز سلول‌های سرطانی نقش دارد(۲۸، ۲۹). با توجه به نقش میانکنش CXCL12/CXCR4 در

فرایندهای مختلف سلولی شامل مهاجرت, کموتاکسی، التهاب و متاستاز(۳۰، ۳۱)، میانکنش CXCL12/CXCR4 باعث فعال شدن مسیرهای زیادی شامل افزایش جریان کلسیم، فعال شدن مسیر MAPK/ERK-1/2، فعال شدن PI3K و Akt و در نتیجه فعال شدن NF-ĸB می‌شود. این مسیرها نقش مهمی را در بقاء و تکثیر سلولی ایفا می‌کنند. بنابراین، CXCR4 در فرایندهای مختلفی مانند توسعه تومور و متاستاز درگیر است و در این مطالعه به عنوان یک هدف مناسب بیان شده است(۳۲). مطالعات دیگری هم برخلاف مطالعه حاضر اا‌ز ماده‌ای تحت عنو عنوان TFF2 (Trefoil Factor 2) جهت فعال سازی CXCR4 استفاده کرده‌اند و شاهد افزایش پرولیفراسیون سلول‌های توموری بیان کننده CXCR4 بوده اند. به علاوه، TFF2 باعث القاء سیگنالینگ Ca در سلول های Jurkat از طریق CXCR4 می‌شود و در واقع به عنوان یک شبه کموکاین در مطالعه مذکور به کار برده شده است. با توجه به هدف مطالعه مذکور که پی بردن به نقش یک القاء کننده CXCR4 و هدف مطالعه حاضر که بلوکه کردن CXCR4 بود، می‌توان چنین نتیجه‌گیری نمود که CXCR4 نه تنها می‌تواند به عنوان یک هدف مناسب درمانی نقش ایفا کند بلکه یک رسپتور بسار مهم در سلول‌های توموری و التهابی محسوب می شود(۳۳). در مطالعه‌ای نشان داده شده است که CXCR4 در ۵۰ درصد از سرطان‌های معده یافت می‌شود. البته افزایش بیان CXCR4 اساساً در بیش‌تر سرطان‌ها وجود دارد، در حالی که CXCL12 در بافت‌های سالم بیش‌تر افزایش می‌یابد. از طرفی گزارش شده است که پیام رسانی محور CXCL12/CXCR4 در متاستاز سرطان پستان به گره‌های لنفی و متاستاز سرطان معده به گره‌های لنفی نقش دارد. هم‌چنین به نقش آن در سرطان کولورکتال، سرطان نازوفارنکس و سرطان تیروییید اشاره شده است. بیان بیش ازحد CXCR4 ممکن است یک ریسک فاکتور برای متاستاز به گره لنفی باشد. در نتیجه آنتاگونیست CXCR4 می‌تواند مانع از این رفتار کموتاکتیک سلول‌های سرطانی معده شود(۳۴). CXCR4 به عنوان یک هدف درمانی برای بررسی مداخلات درمانی جدید جهت جلوگیری از متاستاز سرطان معده مورد توجه می‌باشد. Gautam Sethi و همکاران نشان دادند که پلامباگین بیان CXCR4 را در رده‌های سلولی مختلف شامل سرطان معده، آدنوکارسیونومای ریه و سرطان سلول کلیوی سرکوب می‌کند. از طرفی، پلامباگین باعث کاهش بیان mRNA ژن CXCR4 در سرطان سینه و معده می‌شود و این می تواند دلیلی بر اثر و نقش بلوکه‌کننده‌ها باشد(۱۰). ترکیبات گلیسیریتینیک اسید و گلیسیریزیک اسید طیف وسیعی از اثرات ضد توموری را در مطالعات مختلف نشان داده‌اند. لذا این ترکیبات ممکن است به عنوان دسته ای از ترکیبات مهم در تولید داروهای ضد توموری در آینده مورد استفاده قرار گیرند. با توجه به این که تعداد زیادی از این ترکیبات رسپتورهای هسته‌ای یا غشایی را فعال یا غیر فعال می‌کنند(۴)، در این مطالعه چنین ترکیباتی مورد بررسی قرار گرفت. مولر و همکاران نشان دادند که CXCR4 به میزان قابل توجهی بر روی سلول‌های سرطان پستان انسان بروز می‌یابد. این گروه گزارش کردند که اتصال CXCR4 به CXCL12 موجب کموتاکسی و متاستاز سلول‌های توموری می‌شود. به علاوه، آن‌ها نشان دادند که خنثی سازی این مسیر به طور قابل توجهی موجب اختلال در متاستاز سلول های سرطانی پستان به گره های لنفی مجاور و ریه شده است(۳۵). همان‌طوری که در مطالعه‌ای سلول‌هایی را که تحت تاثیر گلیسیریزیک اسید قرار داده بودند با سلول‌های گروه دیگر بدون ترکیب مذکور مقایسه کردند و متوجه کاهش قوی تعداد ژن‌های پیش التهابی بعد از ۴ ساعت تحریک با آگونیست TLR9 شدند(۳۶). در این مطالعه نیز شاهد کاهش بیان CXCR4 تحت تاثیر ترکیبات گلیسیریزیک اسید و گلیسیریتینیک اسید در یک مقدار وابسته به دوز بودیم. متعاقب این کاهش، مسیر CXCL12/CXCR4

دچار اختلال شده و به نظر می‌رسد که نقش چشمگیری در کاهش کموتاکسی خواهد داشت، و به طبع آن متاستاز را نیز تحت تاثیر قرار خواهد داد. با توجه به یافته‌های حاصل از این مطالعه که حاکی از کاهش میزان بیان ژن CXCR4 بود و نظر به این که این ترکیبات (گلیسیریزیک اسید و گلیسیریتینیک اسید) گیاهی هستند و عوارض جانبی کم‌تری دارند، ترکیبات مذکور می توانند به عنوان راه‌کار درمانی در سرطان معده مورد استفاده قرار گیرند. این مطالعه در شرایط in vitro انجام شده است، لذا ل به منظور دستیابی به نتایج محسوس تر و در راستای کاربردی شدن نتایج لازم است مطالعاتی بر روی مدل‌های حیوانی انجام شود.

References

1. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Estimating the world cancer burden: Globocan 2000. Int J Cancer 2001; 94(2): 153-156.
2. Oliveira FJ, Ferrão H, Furtado E, Batista H, Conceição L. Early gastric cancer: Report of 58 cases. Gastric Cancer 1998; 1(1): 51-56.
3. Ooi YC, Tran P, Ung N, Thill K, Trang A, Fong BM, et al. The role of regulatory T-cells in glioma immunology. Clin Neurol Neurosurg 2014; 119: 125-132.
4. Safe SH, Prather PL, Brents LK, Chadalapaka G, Jutooru I. Unifying mechanisms of action of the anticancer activities of triterpenoids and synthetic analogs. Anticancer Agents Med Chem 2012; 12(10): 1211-1220.
5. Hashimoto-Tane A, Yokosuka T, Sakata-Sogawa K, Sakuma M, Ishihara C, Tokunaga M, et al. Dynein-driven transport of T cell receptor microclusters regulates immune synapse formation and T cell activation. Immunity 2011; 34(6): 919-931.
6. Treanor B, Depoil D, Bruckbauer A, Batista FD. Dynamic cortical actin remodeling by ERM proteins controls BCR microcluster organization and integrity. J Exp Med 2011; 208(5): 1055-1068.
7. Funakoshi-Tago M, Nakamura K, Tsuruya R, Hatanaka M, Mashino T, Sonoda Y, et al. The fixed structure of Licochalcone A by alpha, beta-unsaturated ketone is necessary for anti-inflammatory activity through the inhibition of NF-kappaB activation. Int Immunopharmacol 2010; 10(5): 562-571.
8. Meads MB, Hazlehurst LA, Dalton WS. The bone marrow microenvironment as a tumor sanctuary and contributor to drug resistance. Clin Cancer Res 2008; 14(9): 2519.
9. Meads MB, Hazlehurst LA, Dalton WS. The bone marrow microenvironment as a tumor sanctuary and contributor to drug resistance. Clin Cancer Res 2008;14(9): 2519-2526.
10. Kawai T, Malech HL. WHIM syndrome: congenital immune deficiency disease. Curr Opin Hematol 2009; 16(1): 20-26.
11. Manu KA, Shanmugam MK, Rajendran P, Li F, Ramachandran L, Hay HS, et al. Plumbagin inhibits invasion and migration of breast and gastric cancer cells by downregulating the expression of chemokine receptor CXCR4. Mol Cancer 2011; 10: 107.
12. Azadmehr A, Hajiaghaee R, Afshari A, Amirghofran Z, Refieian-Kopaei M, Darani HY, et al. Evaluation of in vivo immune response activity and in vitro anti-cancer effect by Scrophularia megalantha. J Med Plants Res 2011; 5(11): 2365-2368.
13. Shirzad H, Shahrani M, Rafieian-Kopaei M. Comparison of morphine and tramadol effects on phagocytic activity of mice

peritoneal phagocytes in vivo. Int Immunopharmacol 2009; 9(7-8): 968-970.

14. Rabiei Z, Rafieian-Kopaei M, Heidarian E, Saghaei E, Mokhtari S. Effects of Zizyphus jujube extract on memory and learning impairment induced by bilateral electric lesions of the nucleus Basalis of Meynert in rat. Neurochem Res 2014; 39(2): 353-360.
15. Khosravi-Boroujeni H, Mohammadifard N, Sarrafzadegan N, Sajjadi F, Maghroun M, et al. Potato consumption and cardiovascular disease risk factors among Iranian population. Int J Food Sci Nutr 2012; 63(8): 913-920.
16. Rafieian-kopaei M. Effects of Allium sativum on liver enzymes and atherosclerotic risk factors. J HerbMed Pharmacol 2013; 2(2): 23-28.
17. Baradaran A, Madihi Y, Merrikhi A, Rafieian-Kopaei M, Nasri H. Serum lipoprotein (a) in diabetic patients with various renal function not yet on dialysis. Pak J Med Sci 2013; 29(1): 354-357.
18. Mirhoseini M, Baradaran A, Rafieian-Kopaei M. Medicinal plants, diabetes mellitus and urgent needs. J Herb Med Pharmacol 2013; 2(2).
19. Sedighi M, Rafieian-kopaei M, Noori-Ahmadabadi M. Kelussia odoratissima Mozaffarian inhibits ileum contractions through voltage dependent and beta adrenergic Receptors. Life Sci J 2012; 9(4): 1033-1038.
20. Shirzad H, Kiani M, Shirzad M. Impacts of tomato extract on the mice fibrosarcoma cells. J HerbMed Pharmacol 2013; 2(1): 13-16.
21. Qiu J, Jiang Y, Xia L, Xiang H, Feng H, Pu S, et al. Subinhibitory concentrations of licochalcone A decrease alpha-toxin production in both methicillin-sensitive and methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolates. Letters in applied microbiology. 2010; 50(2): 223-229.
22. Shirzad H, Taji F, Rafieian-Kopaei M. Correlation between antioxidant activity of garlic extracts and WEHI-164 fibrosarcoma tumor growth in BALB/c mice. J Med Food 2011; 14(9): 969-974.
23. Yo YT, Shieh GS, Hsu KF, Wu CL, Shiau AL. Licorice and licochalcone-A induce autophagy in LNCaP prostate cancer cells by suppression of Bcl-2 expression and the mTOR pathway. J Agric Food Chem 2009; 57(18): 8266-8273.
24. Kim JK, Shin EK, Park JH, Kim YH, Park JH. Antitumor and antimetastatic effects of licochalcone A in mouse models. J Mol Med (Berl) 2010; 88(8): 829-838.
25. Rafi MM, Rosen RT, Vassil A, Ho CT, Zhang H, Ghai G, et al. Modulation of bcl-2 and cytotoxicity by licochalcone-A, a novel estrogenic flavonoid. Anticancer Res 2000; 20(4): 2653-2658.
26. Zlotnik A, Yoshie O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. Immunity 2000; 12(2): 121-127.
27. Pelchen-Matthews A, Signoret N, Klasse PJ, Fraile-Ramos A, Marsh M.Chemokine receptor trafficking and viral replication. Immunol Rev 1999; 168: 33-49.
28. Abroun S. Chemokines in homeostasis and cancers. Yakhteh Medical Journal 2008; 10(3): 155-166.
29. Libura J, Drukala J, Majka M, Tomescu O, Navenot JM, Kucia M, et al. CXCR4-SDF-1 signaling is active in rhabdomyosarcoma cells and regulates locomotion, chemotaxis, and adhesion. Blood 2002; 100(7): 2597-606.
30. Moser B, Wolf M, Walz A, Loetscher P. Chemokines: multiple levels of leukocyte

migration control. Trends Immunol 2004; 25(2): 75-84.

31. Taichman RS, Cooper C, Keller ET, Pienta KJ, Taichman NS, McCauley LK. Use of the stromal cell-derived factor-1/CXCR4 pathway in prostate cancer metastasis to bone. Cancer Res 2002; 62(6): 1832-1837.
32. Furusato B, Mohamed A, Uhlén M, Rhim JS. CXCR4 and cancer. Pathol Int 2010; 60(7): 497-505.
33. Dubeykovskaya Z, Dubeykovskiy A, Solal-Cohen J, Wang TC. Secreted trefoil factor 2 activates the CXCR4 receptor in epithelial and lymphocytic cancer cell lines. Journal of Biological Chemistry 2009; 284(6): 3650-3662.
34. Zhao BC, Wang ZJ, Mao WZ, Ma HC, Han JG, Zhao B, et al. CXCR4/SDF-1 axis is involved in lymph node metastasis of gastric carcinoma. World J Gastroenterol 2011; 17(19): 2389-2396.
35. Müller A, Homey B, Soto H, Ge N, Catron D, Buchanan ME, et al. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. Nature 2001; 410(6824): 50-56.
36. Schröfelbauer B, Raffetseder J, Hauner M, Wolkerstorfer A, Ernst W, Szolar OH. Glycyrrhizin, the main active compound in liquorice, attenuates pro-inflammatory responses by interfering with membrane-dependent receptor signalling. Biochem J 2009; 421(3): 473-482.