Journal of
Babol University of Medical Sciences
مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی بابل
e-ISSN: 2251-7170 p-ISSN: 1561-4107

The Effects of Genistein on Peroxiredoxin-4 and Oxidative Stress in Lung Cancer Cell Line A549

R. Farsiabi (MSc)[1], I. Khodadadi (PhD)[1], J. Karimi (PhD)[1], Gh. Shafiee (PhD)[*1]

1.Department of Clinical Biochemistry, School of Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, I.R.Iran.

***Corresponding Author: Gh. Shafiee (PhD)**
Address: Department of Clinical Biochemistry, School of Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, I.R.Iran.
Tel: +98 (81) 38380462. **E-mail:** g.r_shafiee@yahoo.com

Article Type

Research Paper

Received:
May 31st 2023
Revised:
Sep 5th 2023
Accepted:
Oct 23rd 2023

ABSTRACT

Background and Objective: Genistein is a substance from the group of isoflavones that has been reported to have anti-cancer properties in various cancers. This study was designed to investigate the effect of genistein on oxidative stress markers in lung cancer cell line A549.

Methods: In this experimental study, 0, 20, 40, 60, 80, and 100 µM genistein concentrations were used to treat A549 cells and then cell viability was measured by MTT assay after 24 and 48 hours. After selecting the IC50 dose and performing the treatment, TAC, TOS and CAT tests were measured manually and PRx4, SOD and GPx tests were measured by the kit.

Findings: The IC50 dose of genistein for A549 cells was 40 µM in 24 h. The 40 µM dose of genistein was significantly different for TAC compared with the control (0.05±0.01, 0.07±0.01 mmol/mg, respectively). However, it caused a significant increase in TOS (0.03±0.004, 0.01±0.002 mmol/mg, respectively) and OSI (0.57±0.08, 0.18±0.06, respectively) compared with the control group ($p<0.05$). Our results also showed that SOD (0.95±0.02, 2.56±0.19 UI/mg, respectively), CAT (0.45±0.11, 1.23±0.18 UI/mg, respectively) and PRXD4 (18.35±1.45, 42.83±3.75 pg/mg respectively) were significantly reduced in the treated groups compared to the control group ($p<0.05$). GPx was significantly reduced at a dose of 60 µM (85.28±4.36, 141.59±12.36 UI/mg, respectively) compared to the control group ($p<0.05$).

Conclusion: The results of the study showed that genistein reduces viability rate and induces oxidative stress in A549 cancer cells.

Keywords: *Genistein, Oxidative Stress, A549, Lung Neoplasms.*

Cite this article: Farsiabi R, Khodadadi I, Karimi J, Shafiee Gh. The Effects of Genistein on Peroxiredoxin-4 and Oxidative Stress in Lung Cancer Cell Line A549. *Journal of Babol University of Medical Sciences*. 2024; 26: e53.

[DOI: 10.22088/jbums.26.1.53]

Copyright © 2024 Babol University of Medical Sciences. Published by Babol University of Medical Sciences. This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International license (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/). Noncommercial uses of the work are permitted, provided the original work is properly cited.

Journal of
Babol University of Medical Sciences
مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی بابل
e-ISSN: 2251-7170 p-ISSN: 1561-4107

بررسی اثرات جنیستئین بر پراکسی ردوکسین-۴ و استرس اکسیداتیو در سلول A549 سرطانی ریه

رضا فرسیابی (MSc)[۱]، ایرج خدادادی (PhD)[۱]، جمشید کریمی (PhD)[۱]، غلامرضا شفیعی (PhD)[۱*]

۱. گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

نوع مقاله

مقاله پژوهشی

دریافت: ۱۴۰۲/۳/۱۰

اصلاح: ۱۴۰۲/۶/۱۴

پذیرش: ۱۴۰۲/۸/۱۰

چکیده

سابقه و هدف: جنیستئین ماده‌ای از گروه ایزوفلاونوئیدهاست که خاصیت ضد سرطانی آن در سرطان‌های مختلف گزارش شده است. این مطالعه به منظور بررسی اثر جنیستئین بر روی مارکرهای استرس اکسیداتیو در رده سلولی A549 سرطان ریه انجام شد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه مداخله‌ای، غلظت‌های ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰، ۱۰۰ میکرومولار جنیستئین برای تیمار سلول‌های سرطانی اپیتلیال ریه A549 مورد استفاده قرار گرفت و سپس بقای سلولی توسط تست MTT بعد از ۲۴ و ۴۸ ساعت مورد سنجش قرار گرفت. بعد انتخاب دوز IC50 و انجام تیمار تست‌های TAC، TOS و CAT به روش دستی و تست‌های PRx4، SOD و GPx توسط کیت مورد سنجش قرار گرفت.

یافته‌ها: دوز IC50 جنیستئین برای سلول‌های A549 ۴۰ میکرومولار در ۲۴ ساعت شد. دوز ۴۰ میکرومولار جنیستئین برای میزان TAC در مقایسه با گروه کنترل (به ترتیب ۰/۰۱±۰/۰۵، ۰/۰۱±۰/۰۷ میلی‌مول بر میلی‌گرم) تفاوت معنی‌داری ایجاد نکرد، اما باعث افزایش معنی‌دار TOS (به ترتیب ۰/۰۰۴±۰/۰۳، ۰/۰۰۲±۰/۰۱ میلی‌مول بر میلی‌گرم) و OSI (به ترتیب ۰/۰۸±۰/۵۷، ۰/۰۶±۰/۱۸) در مقایسه با گروه کنترل شد ($p<0/05$). همچنین نتایج ما نشان داد SOD (به ترتیب ۰/۰۲±۰/۹۵، ۰/۱۹±۲/۵۶ واحد بر میلی‌گرم) و CAT (به ترتیب ۰/۱۱±۰/۴۵، ۰/۱۸±۱/۲ واحد بر میلی‌گرم) و PRx4 (به ترتیب ۱/۴۵±۱۸/۳۵، ۳/۷۵±۴۲/۸۳ پیکوگرم بر میلی‌گرم) در گروه‌های تیمار شده در مقایسه با گروه کنترل کاهش چشمگیری داشتند ($p<0/05$). GPx فقط در دوز ۶۰ میکرومولار (به ترتیب ۴/۳۶±۸۵/۲۸، ۱۲/۳۶±۱۴۱/۵۹ واحد بر میلی‌گرم) نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری داشت ($p<0/05$).

نتیجه‌گیری: نتایج مطالعه نشان داد که جنیستئین باعث کاهش بقاء و القای استرس اکسیداتیو در سلول‌های سرطانی A549 می‌شود.

واژه‌های کلیدی: جنیستئین، استرس اکسیداتیو، A549، نئوپلاسم ریه.

استناد: رضا فرسیابی، ایرج خدادادی، جمشید کریمی، غلامرضا شفیعی. بررسی اثرات جنیستئین بر پراکسی ردوکسین-۴ و استرس اکسیداتیو در سلول A549 سرطانی ریه. مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی بابل. ۱۴۰۳؛ ۲۶: e۵۳.

[DOI: 10.22088/jbums.26.1.53]

▣ این مقاله مستخرج از طرح تحقیقاتی به شماره ۹۹۰۴۰۳۱۹۱۱ دانشگاه علوم پزشکی همدان می‌باشد.

* مسئول مقاله: دکتر غلامرضا شفیعی

آدرس: همدان، دانشگاه علوم پزشکی همدان، دانشکده پزشکی، گروه بیوشیمی بالینی. تلفن: ۰۸۱-۳۸۳۸۰۴۶۲

رایانامه: g.r_shafiee@yahoo.com

مقدمه

طبق گزارش سازمان بهداشت جهانی در سال ۲۰۱۸، سرطان ریه یکی از شایع‌ترین نوع سرطان در سراسر جهان است و بالاترین میزان مرگ و میر (۱/۷۶ میلیون مرگ) را در مقایسه با سایر تومورهای بدخیم دارد. آدنوکارسینوم ریه بیشتر در افراد بالای ۵۰ سال شایع است و سیگار کشیدن مهم‌ترین عامل خطر برای این بیماری است (۱). سرطان ریه به دو گروه اصلی سرطان ریه سلول کوچک (Small Cell Lung Cancer= SCLC) و سرطان ریه سلول غیر کوچک (Non-small cell lung cancer= NSCLC) طبقه بندی می‌شود که گروه دوم ۸۵٪ موارد را شامل می‌شود (۳و۲). استرس اکسیداتیو یکی از ویژگی‌های اصلی آسیب بافتی و سلولی است. بسیاری از مطالعات اهمیت نشانگرهای آنتی اکسیدان و پرو اکسیدان را در سرطان‌های مختلف نشان داده‌اند (۴). همچنین، نقش مفید رژیم غذایی غنی از آنتی اکسیدان در جلوگیری از بروز سرطان ثابت شده است. استرس اکسیداتیو زمانی رخ می‌دهد که بین سیستم آنتی اکسیدان/اکسیدان عدم تعادل وجود داشته باشد و سلول نتواند پرواکسیدان‌ها و رادیکال‌های آزاد را خنثی کند. این بدان معناست که با افزایش عوامل اکسید کننده، سیستم‌های دفاعی آنتی اکسیدانی برای برقراری تعادل آن‌ها کافی نیست (۱). گونه‌های اکسیژن فعال (Reactive Oxygen Species= ROS) کلاس اصلی رادیکال‌های تولید شده در سلول‌ها هستند و شامل رادیکال‌های هیدروکسیل، پرهیدروکسیل، پراکسیل و سوپراکسید و گونه‌های رادیکال غیر آزاد مانند اکسیژن تک و پراکسید هیدروژن هستند (۵). مطالعات اخیر نتایج متناقضی در مورد نقش ROS در سرطان‌ها نشان داده است. از یک سو، افزایش ROS با فعال سازی کاسپازها و غیر فعال کردن مسیرهای سیگنالینگ مختلف در برخی سرطان‌ها باعث سرکوب سرطان و آپوپتوز می‌شود (۱۰-۶). از سوی دیگر، یافته‌های تحقیقات متعددی نشان داده است که افزایش سطح ROS ممکن است به جهش زایی از طریق آسیب DNA منجر شود، به ویژه اگر تجمع آسیب DNA همراه با یک نقص سیستم ترمیم یا یک مسیر آپوپتوز باشد (۱۱). پرواکسیدان‌ها به طور مداوم در سلول‌های زنده تولید می‌شوند، بنابراین برخی از سیستم‌های دفاعی آنتی اکسیدانی برای مقابله با آن‌ها و جلوگیری از استرس اکسیداتیو مورد نیاز است. این سیستم‌های دفاعی حاوی آنتی اکسیدان‌هایی مانند ویتامین E ، ویتامین C و GSH و آنزیم‌های آنتی اکسیدانی مانند CAT، GPx و SOD هستند (۱۳و۱۲). آنزیم SOD با حذف رادیکال‌های سوپراکسید و تبدیل آن‌ها به پراکسید هیدروژن، استرس اکسیداتیو سلولی را تعدیل می‌کند. سپس، Gpx و CAT به ترتیب از طریق اکسیداسیون GSH و تولید آب، پراکسید هیدروژن را حذف می‌کنند (۱۴).

جنیستئین متعلق به گروه ایزوفلاونوئیدها با فرمول $C_{21}H_{20}O_{10}$ می‌باشد و در مواد غذایی رژیمی گیاهی مثل سویا یافت می‌شود (۱۵). آزمایشات و بررسی‌های بالینی متعدد نقش درمانی جنیستئین در سرطان‌های متفاوت را پیش بینی کرده‌اند. خاصیت ضد سرطانی جنیستئین در شرایط in vitro بر روی سرطان‌های سینه، کلورکتال و کبد بررسی شده است (۱۸-۱۶). در مورد اثر جنیستئین بر روی استرس اکسیداتیو در سرطان‌های مختلف نتایج ضد و نقیضی وجود دارد (۲۱-۱۹). این امر ما را به طراحی یک مطالعه (جدید) برای دستیابی به بینش در مورد تأثیر تیموکینون بر نشانگرهای استرس اکسیداتیو بر روی سلول‌های سرطانی ریه طراحی کرد تا احتمالاً مکانیسم ضد توموری تیموکینون را روشن کند. لذا هدف این مطالعه بررسی اثرات جنیستئین بر استرس اکسیداتیو با اندازه گیری فعالیت‌های آنزیم‌های TOS، TAC، PRX4، CAT، GPx و SOD می‌باشد.

مواد و روش ها

این مطالعه مداخله‌ای پس از تصویب کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی همدان با کد IR.UMSHA.REC.1399.257 انجام شد.

کشت سلولی: سلول‌های سرطانی اپیتلیال ریه A549 انسان (Human Non-Small Lung Cancer Cell Line) خریداری شده از موسسه پاستور (تهران، ایران). محیط کشت RPMI1640، FBS، ۰/۲۵٪ محلول تریپسین-EDTA و قرص‌های بافر فسفات سالین (PBS) از شرکت Life Technologies تهیه شد. DMSO (Dimethyl sulfoxide)، پنی سیلین، استرپتومایسین و تیموکوینون از شرکت Sigma-Aldrich تهیه شد. سلول‌های A549 در فلاسک‌های ۲۵ سانتی‌متر مربعی در محیط RPMI1640 حاوی ۱۰٪ سرم گاو جنین و ۱٪ پنی سیلین-استرپتومایسین (۱۰۰ واحد/میلی‌لیتر پنی سیلین و ۱۰۰ میکروگرم/میلی‌لیتر استرپتومایسین) کشت داده شدند. سلول‌های کشت شده در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در هوای مرطوب ۵٪ CO_2 رشد کردند.

سنجش MTT: زنده ماندی سلول‌ها با روش MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5- diphenyltetrazolium bromide) ارزیابی شد. به طور خلاصه، سلول‌ها با تراکم ۱×۱۰^{۴} در چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه کشت داده شدند و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با ۵٪ CO_2 انکوبه شدند. درمان با غلظت‌های مختلف تیموکینون (۰، ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰ و ۱۰۰ میکرومولار) انجام شد و سلول‌ها به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت انکوبه شدند. سپس، ۱۰ میکرولیتر MTT (۵ mg/ml) به هر چاهک اضافه شد و پلیت به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در تاریکی انکوبه شد تا توسط سوکسینات دهیدروژناز

[DOI: 10.22088/jbums.26.1.53]

میتوکندریایی فرمازان تشکیل شود. محتوای چاهک‌ها با ۱۰۰ میکرولیتر DMSO جایگزین شد و میزان جذب در ۵۷۰ نانومتر توسط دستگاه Sunrise Tecan, Switzerland اندازه گیری شد. میزان بازدارندگی با فرمول Inhibitory Rates (IR)= ۱ - ($OD_{treatment}$/ $OD_{control}$) × ۱۰۰ محاسبه شد.

آماده سازی لیزات: سلول‌ها تریپسینه شدند و پس از سانتریفیوژ سلول‌ها دو بار با PBS سرد شسته شدند. از کوکتل مهارکننده پروتئاز+ PBS برای تهیه سوسپانسیون سلولی استفاده شد. سپس لیزات‌های سلولی ۳ بار وارد چرخه فریز و دفریز شدند. سوسپانسیون در دور ۱۲۰۰۰ rpm به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد و مایع رویی در لوله‌ها جمع آوری شد و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره شد.

ظرفیت آنتی اکسیدانی تام (TAC): اندازه گیری TAC با روش دستی FRAP انجام شد. این مطالعه توانایی ترکیبات آنتی اکسیدانی نمونه را برای احیای کمپلکس Fe3±TPTZ به Fe2±TPTZ ارزیابی کرد. مخلوط واکنش شامل ۳۰۰ میکرولیتر معرف FARP (بافر استات ۳۰۰ میلی‌مولار، pH3.6، TPTZ 10 میلی‌مولار و کلرید آهن ۲۰ میلی‌مولار) و ۱۰ میکرولیتر نمونه در چاهک پلیت ۹۶ خانه ریخته شد و به مدت ۱۰ دقیقه در تاریکی در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. غلظت استانداردها ($1M\ FeSO_4$) و نمونه‌ها توسط اسپکتروفتومتر (Bell-Italy) در طول موج ۵۹۳ نانومتر اندازه گیری شد. سپس غلظت هر نمونه بر اساس منحنی استاندارد تعیین شد (۲۲).

وضعیت اکسیداتیو کل (TOS): TOS با استفاده از روش Ferric-Xylenol Orange (FOX) بر اساس اکسیداسیون یون‌های آهن فروس به یون‌های فریک مورد بررسی قرار گرفت که منجر به تولید یک مجموعه رنگی Ferric-Xylenol Orange می‌شود. مخلوط واکنش شامل ۱۰ µl نمونه و ۱۹۰ µl معرف FOX (۲۵۰ میکرومولار یون فروس، ۱۵۰ میکرومولار Xylenol Orange، ۱۰۰ میلی‌مولار سوربیتول و ۲۵ میلی مولار H_2SO_4 با pH ۱/۸) در چاهک پلیت ۹۶ خانه بود. H_2O_2 و PBS به ترتیب به عنوان استانداردها و بلانک مورد استفاده قرار گرفتند. جذب در ۵۶۰ نانومتر پس از ۱۰ دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق خوانده شد (۲۳). در نهایت، شاخص استرس اکسیداتیو (OSI) به عنوان درصد نسبت TOS به TAC تعریف شد.

فعالیت آنزیم GPx: فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز (GPx) با استفاده از کیت کیازیست آماده استفاده (تهران، ایران) تعیین شد که بر اساس کاهش H_2O_2 با اکسیداسیون گلوتاتیون، که به عنوان اهدا کننده الکترون عمل می‌کند، انجام شد. آنزیم GSH را به GSSG تبدیل کرد و GSH باقیمانده در محیط واکنش می‌تواند DTNB (5,5-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid)) را که رنگ زرد و در ۴۱۲ نانومتر جذب دارد تولید کند. تولید رنگ با فعالیت آنزیم رابطه معکوس داشت. در نهایت، فعالیت GPx به عنوان پروتئین U/mg گزارش شد.

فعالیت آنزیم SOD: فعالیت سوپراکسید دیسموتاز (SOD) با استفاده از کیت کیازیست آماده استفاده شد (تهران، ایران). در این روش از آنیون سوپراکسید برای تبدیل resazurin به resorufin استفاده شده و کروموژن تولید می‌شود. در نهایت، جذب کروموژن در ۴۲۰ نانومتر اندازه گیری شد و نتایج به صورت پروتئین U/mg گزارش شد.

فعالیت آنزیمCAT: فعالیت کاتالاز با استفاده از روش اسپکتروفتومتری توصیف شده توسط Hadwan و Abed اندازه گیری شد (۲۱). به طور خلاصه، ۱۰۰ میکرولیتر نمونه اضافه و با ۱ میلی‌لیتر معرف (۲۰ میلی‌مولار H_2O_2 در ۵۰ میلی‌مولار بافر سدیم فسفات، pH ۷/۴) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه انکوبه شد. سپس ۴ میلی‌لیتر آمونیوم مولیبدات (۳۲/۴میلی‌مولار) برای توقف واکنش اضافه شد. میزان جذب مخلوط مایل به زرد را می‌توان در ۳۷۴ نانومتر اندازه گیری کرد. فعالیت کاتالاز با فرمول Catalase Acctivity kU= 2.303/t * [log S0/S-M] * Vt/Vs محاسبه شد.

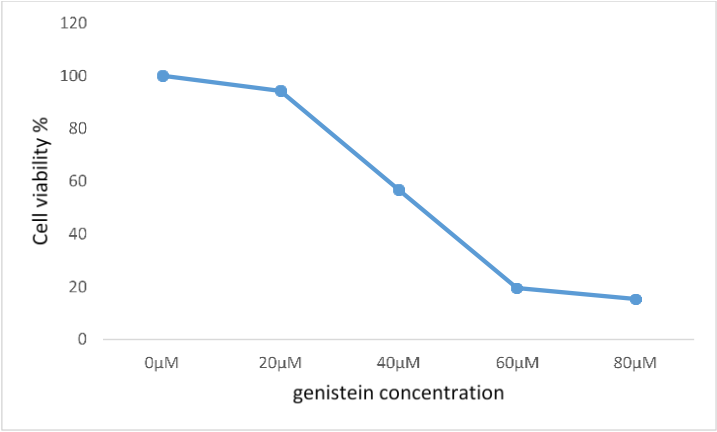
داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS ۱۶، مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و برای مقایسه تفاوت بین گروه‌ها از آزمون t استفاده شد. برای تجزیه و تحلیل تفاوت بین گروه‌ها از آزمون ANOVA یک طرفه و آزمون مقایسه چندگانه توکی کرامر استفاده شد. مقادیر به صورت Mean±SD نمایش داده شد و $p<۰/۰۵$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته ها

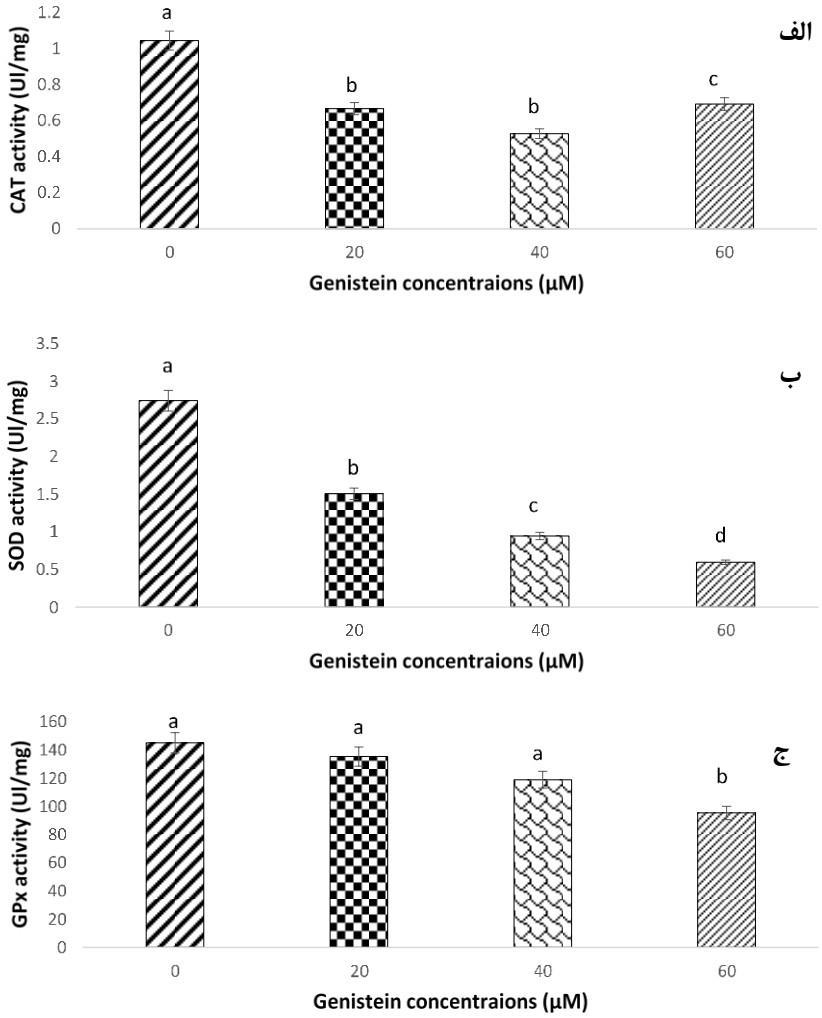
جنیستئین بقای سلول‌های A549 سرطان ریه را بعد از ۲۴ ساعت به صورت وابسته به دوز به طور معنی‌داری کاهش داد ($p<۰/۰۵$) (نمودار ۱). دوز IC50 جنیستئین بر روی سلول‌های A549 ۴۰ میکرومولار شد و مطالعه با بررسی اثرات دوز IC50 و دوزهای بالاتر و پایین‌تر از آن (۲۰ و ۶۰ میکرومولار) انجام شد.

فعالیت آنزیم کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز بعد از تیمار ۲۴ ساعته با جنیستئین در هر سه دوز ۲۰، ۴۰ و ۶۰ میکرومولار در مقایسه با گروه تیمار نشده کاهش چشمگیری پیدا کرد ($p<۰/۰۵$) اما بین گروه‌های تیمار شده با یکدیگر تفاوت معنی‌داری وجود نداشت (نمودار ۲-الف و ۲-ب). تیمار با جنیستئین فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز را فقط در دوز ۶۰ میکرومولار به صورت معنی‌دار کاهش داد ($p<۰/۰۵$) (نمودار ۲-ج).

[DOI: 10.22088/jbums.26.1.53]



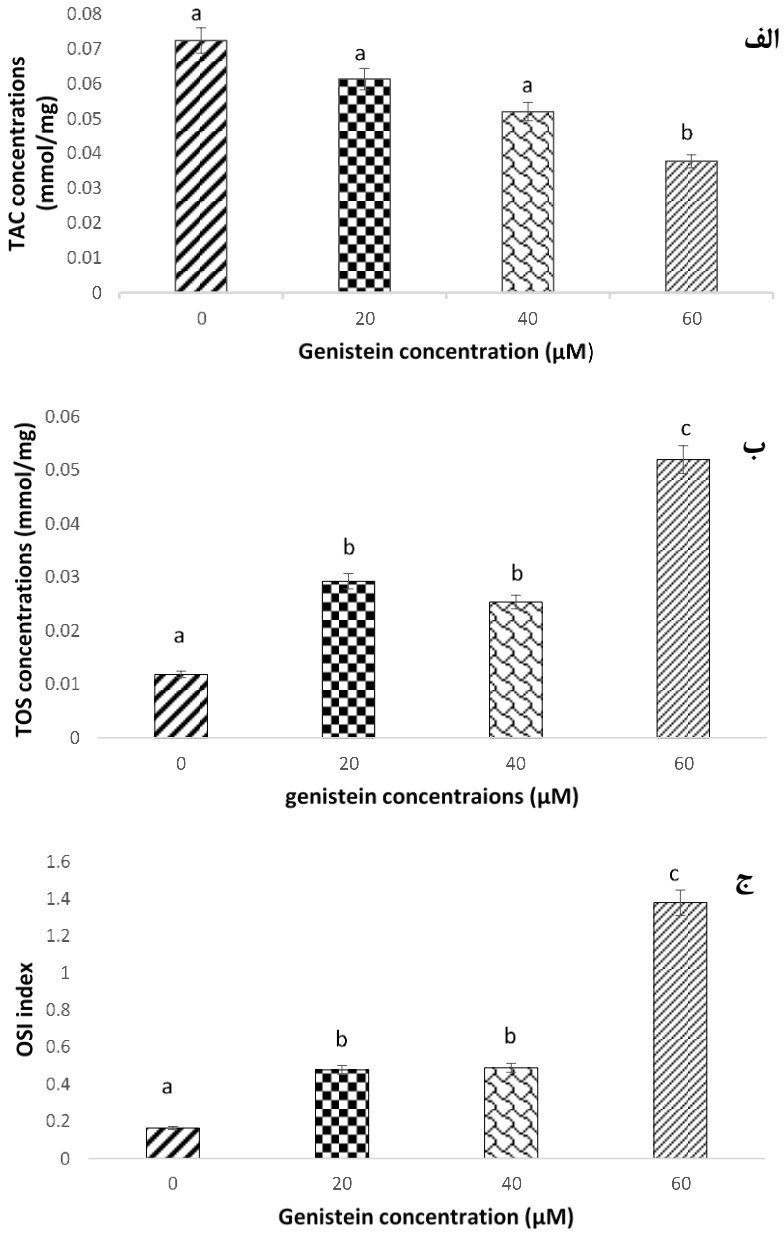
نمودار ۱. بقای سلول‌های رده A549 سرطان ریه بعد از تیمار ۲۴ساعته با دوزهای ۰، ۲۰، ۴۰، ۶۰ و ۸۰ میکرومولار جنیستئین



نمودار ۲. سنجش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی CAT، SOD و GPx بعد از تیمار ۲۴ ساعته با دوزهای ۲۰، ۴۰ و ۶۰ میکرومولار جنیستئین. الف) CAT، ب) SOD، ج) GPx. a: تفاوت معنی‌دار با گروه کنترل (p<۰/۰۵) و b: تفاوت معنی‌دار با گروه تیمار شده با دوز ۲۰ و ۴۰ میکرومولار

[DOI: 10.22088/jbums.26.1.53]

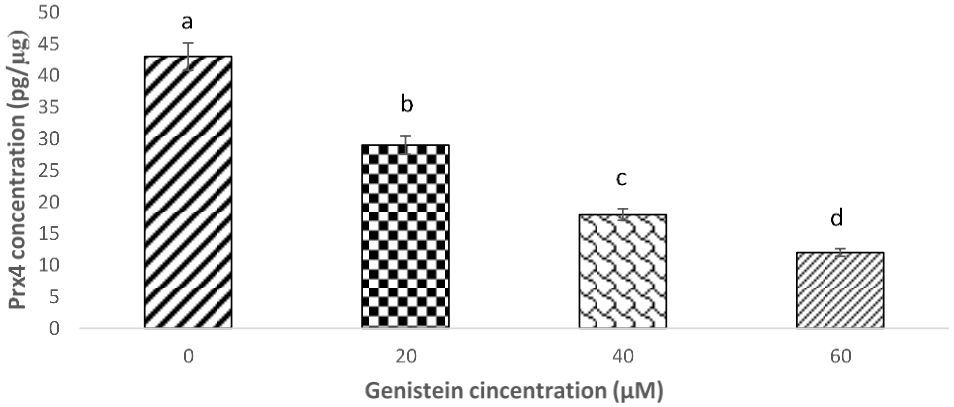
نتایج ما نشان داد که TOS در سلول‌های مواجه با جنیستئین در مقایسه با گروه کنترل افزایش یافته است. همچنین تفاوت معنی‌داری بین گروه دوز ۶۰ میکرومولار با ۲۰ و ۴۰ میکرومولار دیده شد (p<۰/۰۵) (نمودار ۳-الف)، در مقابل TAC به صورت وابسته به دوز کاهش یافت. این کاهش در دوز ۶۰ میکرومولار معنی‌دار بود (p<۰/۰۵) (نمودار ۳-ب). همچنین شاخص OSI نشان دهنده افزایش شرایط استرس اکسیداتیو در تمامی گروه‌های مواجه می‌باشد (نمودار ۳-ج).



نمودار ۳. سنجش میزان TAC، TOS و OSI بعد از تیمار ۲۴ ساعته با دوزهای ۲۰، ۴۰ و ۶۰ میکرومولار جنیستئین. الف) TOS، ب) TAC، ج) OSI. a: تفاوت معنی‌دار با گروه کنترل (p<۰/۰۵) و b: تفاوت معنی‌دار با گروه تیمار شده با دوز ۲۰ و ۴۰ میکرومولار

نتایج مربوط به پروتئین پنتراکسین ۴ نشان می‌دهد که کاهش وابسته به دوز معنی‌داری در میزان این پروتئین مشاهده می‌شود؛ به گونه‌ای که در دوزهای ۴۰ و ۶۰ میکرومولار جنیستئین اختلاف معنی‌داری با دوز ۲۰ میکرومولار و کنترل وجود دارد (p<۰/۰۵) (نمودار ۴).

[DOI: 10.22088/jbums.26.1.53]



نمودار ٤. سنجش میزان پنتراکسین ٤ بعد از تیمار ٢٤ ساعته با دوزهای ٢٠، ٤٠ و ٦٠ میکرومولار جنیستئین. a: تفاوت معنی‌دار با گروه کنترل (p<۰/۰۵) و b: تفاوت معنی‌دار با گروه تیمار شده با دوز ٢٠ و ٤٠ میکرومولار

بحث و نتیجه گیری

نتایج ما نشان داد مواجه با جنستین باعث کاهش بقای سلول و القای استرس اکسیداتیو در رده سلولی A549 می‌شود و به واسطه افزایش TOS و کاهش GPx، SOD ،CAT و TAC باعث القای استرس اکسیداتیو در سلول‌های A549 می‌شود. همچنین نتایج ما نشان داد که جنیستئین دارای اثرات پرواکسیداتیو در دوزهای پایین است. اثر ضد سرطانی جنیستئین در برخی سرطان‌ها نظیر پروستات (PCa)، تخمدان و کلون (DLD-1) مورد بررسی قرار گرفته است (۲۶-۲۴). TOS و TAC دو شاخص قابل اعتماد و دقیق هستند که بیشتر برای تعیین وضعیت استرس اکسیداتیو استفاده می‌شوند (۲۸و۲۷). Zhang و همکاران در سال ۲۰۱۹ با بررسی اثر جنیستئین بر روی رده سلولی HepG2 سرطان کبد نتایجی همسو با نتایج ما در رابطه با استرس اکسیداتیو به دست آوردند. آن‌ها گزارش کردند که با افزایش غلظت تیمار جنیستئین میزان گونه‌های فعال اکسیژن در این رده سلولی افزایش می‌یابد که این امر بیانگر القای استرس اکسیداتیو توسط جنیستئین می‌باشد (۲۹). همچنین اثر اکسیداتیو جنیستئین در برخی رده‌های سلولی دیگر نظیر Mia-PaCa2 (سرطان پانکراتیک) و MDA-MB-231 (سرطان سینه) گزارش شده است (۳۱و۳۰). در مقابل نتایج Raschke و همکاران نشان دهنده اثر آنتی اکسیدانی جنیستئین در سرطان پروستات است. این تفاوت در نتایج می‌تواند به دلیل تفاوت در رده‌های سلولی باشد (۳۲).

SOD، GPX و CAT آنزیم‌های اصلی آنتی اکسیدانی هستند که نقش مهمی در کاهش رادیکال‌های اکسیژن و وضعیت اکسیداتیو سلولی دارند. SOD رادیکال‌های سوپراکسید را به مولکول اکسیژن و پراکسید هیدروژن (H_2O_2) تبدیل می‌کند. سرانجام GPX و CAT پراکسید هیدروژن تولید شده را حذف می‌کنند تا از تبدیل آن به مواد مضر مانند رادیکال‌های هیدروکسیل توسط واکنش فنتون جلوگیری شود (۲۸). یافته‌های ما نشان داد که فعالیت SOD، GPX و CAT در سلول‌های تحت تیمار جنیستئین در مقایسه با سلول‌های تیمار نشده به میزان قابل توجهی کاهش می‌یابد. نتایج Prietsch و همکاران همسو با نتایج ما نشانگر کم شدن بیان ژن‌های آنزیم‌های آنتی اکسیدانی رده سلولی MCF-7 نظیر SOD در اثر مواجه با جنیستئین می‌باشد (۳۳). اما مطالعات مختلفی، مخالف نتایج ما هستند و افزایش فعالیت SOD، CAT و GPx را در رده‌های LNCaP، PC3 و HT29 بیان کرده‌اند (۳۵و۳۴و۲۰). این مطالعه نشان داد که درمان رده سلولی A549 با جنیستئین باعث ایجاد استرس اکسیداتیو در این سلول‌ها و کاهش بقای سلول‌های سرطانی می‌شود. به نظر می‌رسد که اثر متناقض جنیستئین احتمالاً به غلظت آن بستگی دارد. گزارش‌های مختلف در مورد اثرات پرواکسیدانی/آنتی‌اکسیدان جنیستئین ناشی از کاهش یا اکسیداسیون (کاهش-اکسیداسیون) آن است. برای بررسی بیشتر مکانیسم اثر این ماده، آزمایش‌های بیشتری برای اندازه‌گیری ROS و آپوپتوز سلولی و بررسی مسیرهای سیگنالینگ سرطان و ضد سرطان مورد نیاز است.

در این مطالعه جنیستئین استرس اکسیداتیو را در سلول‌های سرطانی ریه A549 القاء کرد. جنستئین TOS را افزایش داد و فعالیت TAC، PRDX4، SOD، GPX و CAT را با بیشترین اثرات پرواکسیدانی کاهش داد. این مطالعه جنیستئین را به عنوان یک عامل ضد سرطانی بالقوه در سلول‌های سرطانی ریه A549 پیشنهاد می‌کند.

[DOI: 10.22088/jbums.26.1.53]

تضاد منافع: نویسندگان هیچ گونه تضاد منافع احتمالی با توجه به تحقیق، تألیف و/یا انتشار این مقاله را اعلام نکردند.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی همدان به جهت حمایت مالی از تحقیق قدردانی می‌گردد.

[DOI: 10.22088/jbums.26.1.53]

References

1.Aybastıer Ö, Dawbaa S, Demir C, Akgün O, Ulukaya E, Arı F. Quantification of DNA damage products by gas chromatography tandem mass spectrometry in lung cell lines and prevention effect of thyme antioxidants on oxidative induced DNA damage. Mutat Res. 2018;808:1-9.

2.Samarghandian S, Azimi-Nezhad M, Farkhondeh T. Thymoquinone-induced antitumor and apoptosis in human lung adenocarcinoma cells. J Cell Physiol. 2019;234(7):10421-31.

3.Chan DC, Earle KA, Zhao TL, Helfrich B, Zeng C, Baron A, et al. Exisulind in combination with docetaxel inhibits growth and metastasis of human lung cancer and prolongs survival in athymic nude rats with orthotopic lung tumors. Clin Cancer Res. 2002;8(3):904-12.

4.Jrah-Harzallah H, Ben-Hadj-Khalifa S, Almawi WY, Maaloul A, Houas Z, Mahjoub T. Effect of thymoquinone on 1,2-dimethyl-hydrazine-induced oxidative stress during initiation and promotion of colon carcinogenesis. Eur J Cancer. 2013;49(5):1127-35.

5.Quiñonez-Flores CM, González-Chávez SA, Del Río Nájera D, Pacheco-Tena C. Oxidative Stress Relevance in the Pathogenesis of the Rheumatoid Arthritis: A Systematic Review. Biomed Res Int. 2016;2016:6097417.

6.Miao Z, Yu F, Ren Y, Yang J. d,l-Sulforaphane Induces ROS-Dependent Apoptosis in Human Gliomablastoma Cells by Inactivating STAT3 Signaling Pathway. Int J Mol Sci. 2017;18(1):72.

7.Chae IG, Kim DH, Kundu J, Jeong CH, Kundu JK, Chun KS. Generation of ROS by CAY10598 leads to inactivation of STAT3 signaling and induction of apoptosis in human colon cancer HCT116 cells. Free Radic Res. 2014;48(11):1311-21.

8.He H, Zhuo R, Dai J, Wang X, Huang X, Wang H, et al. Chelerythrine induces apoptosis via ROS-mediated endoplasmic reticulum stress and STAT3 pathways in human renal cell carcinoma. J Cell Mol Med. 2020;24(1):50-60.

9.Sun Q, Lu NN, Feng L. Apigetrin inhibits gastric cancer progression through inducing apoptosis and regulating ROS-modulated STAT3/JAK2 pathway. Biochem Biophys Res Commun. 2018;498(1):164-70.

10.Cockfield JA, Schafer ZT. Antioxidant Defenses: A Context-Specific Vulnerability of Cancer Cells. Cancers (Basel). 2019;11(8):1208.

11.Prasad S, Gupta SC, Tyagi AK. Reactive oxygen species (ROS) and cancer: Role of antioxidative nutraceuticals. Cancer Lett. 2017;387:95-105.

12.Mishra M, Jiang H, Wu L, Chawsheen HA, Wei Q. The sulfiredoxin-peroxiredoxin (Srx-Prx) axis in cell signal transduction and cancer development. Cancer Lett. 2015;366(2):150-9.

13.Backos DS, Franklin CC, Reigan P. The role of glutathione in brain tumor drug resistance. Biochem Pharmacol. 2012;83(8):1005-12.

14.Arab Sadeghabadi Z, Abbasalipourkabir R, Mohseni R, Ziamajidi N. Investigation of oxidative stress markers and antioxidant enzymes activity in newly diagnosed type 2 diabetes patients and healthy subjects, association with IL-6 level. J Diabetes Metab Disord. 2019;18(2):437-43.

15.Spagnuolo C, Russo GL, Orhan IE, Habtemariam S, Daglia M, Sureda A, et al. Genistein and cancer: current status, challenges, and future directions. Adv Nutr. 2015;6(4):408-19.

[DOI: 10.22088/jbums.26.1.53]

16.Qi W, Weber CR, Wasland K, Savkovic SD. Genistein inhibits proliferation of colon cancer cells by attenuating a negative effect of epidermal growth factor on tumor suppressor FOXO3 activity. BMC Cancer. 2011;11:219.
17.Hsieh CY, Santell RC, Haslam SZ, Helferich WG. Estrogenic effects of genistein on the growth of estrogen receptor-positive human breast cancer (MCF-7) cells in vitro and in vivo. Cancer Res. 1998;58(17):3833-8.
18.Gu Y, Zhu CF, Iwamoto H, Chen JS. Genistein inhibits invasive potential of human hepatocellular carcinoma by altering cell cycle, apoptosis, and angiogenesis. World J Gastroenterol. 2005;11(41):6512-7.
19.Hsiao YC, Peng SF, Lai KC, Liao CL, Huang YP, Lin CC, et al. Genistein induces apoptosis in vitro and has antitumor activity against human leukemia HL-60 cancer cell xenograft growth in vivo. Environ Toxicol. 2019;34(4):443-56.
20.Park CE, Yun H, Lee EB, Min BI, Bae H, Choe W, et al. The antioxidant effects of genistein are associated with AMP-activated protein kinase activation and PTEN induction in prostate cancer cells. J Med Food. 2010;13(4):815-20.
21.Park C, Cha HJ, Lee H, Hwang-Bo H, Ji SY, Kim MY, et al. Induction of G2/M Cell Cycle Arrest and Apoptosis by Genistein in Human Bladder Cancer T24 Cells through Inhibition of the ROS-Dependent PI3k/Akt Signal Transduction Pathway. Antioxidants (Basel). 2019;8(9):327.
22.Benzie IF, Szeto YT. Total antioxidant capacity of teas by the ferric reducing/antioxidant power assay. J Agric Food Chem. 1999;47(2):633-6.
23.Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. Clin Biochem. 2005;38(12):1103-11.
24.Chiyomaru T, Yamamura S, Fukuhara S, Yoshino H, Kinoshita T, Majid S, et al. Genistein inhibits prostate cancer cell growth by targeting miR-34a and oncogenic HOTAIR. PLoS One. 2013;8(8):e70372.
25.Gercel-Taylor C, Feitelson AK, Taylor DD. Inhibitory effect of genistein and daidzein on ovarian cancer cell growth. Anticancer Res. 2004;24(2B):795-800.
26.Zhang Y, Chen H. Genistein attenuates WNT signaling by up-regulating sFRP2 in a human colon cancer cell line. Exp Biol Med (Maywood). 2011;236(6):714-22.
27.Şen V, Bozkurt M, Söker S, Ece A, Güneş A, Uluca Ü, et al. The effects of pomegranate and carvacrol on methotrexate-induced bone marrow toxicity in rats. Clin Invest Med. 2014;37(2):E93-101.
28.Bahmani M, Ziamajidi N, Hashemnia M, Abbasalipourkabir R, Salehzadeh A. Human umbilical cord blood mesenchymal stem cell conditioned medium (hMSC-CM) improves antioxidant status in carbon tetrachloride-induced oxidative damage in rat. Iran J Sci Technol Trans A Sci. 2020;44(5):1327-35.
29.Zhang Q, Bao J, Yang J. Genistein-triggered anticancer activity against liver cancer cell line HepG2 involves ROS generation, mitochondrial apoptosis, G2/M cell cycle arrest and inhibition of cell migration. Arch Med Sci. 2019;15(4):1001-9.
30.Ullah MF, Ahmad A, Zubair H, Khan HY, Wang Z, Sarkar FH, et al. Soy isoflavone genistein induces cell death in breast cancer cells through mobilization of endogenous copper ions and generation of reactive oxygen species. Mol Nutr Food Res. 2011;55(4):553-9.

[DOI: 10.22088/jbums.26.1.53]

31.Bi YL, Min M, Shen W, Liu Y. Genistein induced anticancer effects on pancreatic cancer cell lines involves mitochondrial apoptosis, G_0/G_1cell cycle arrest and regulation of STAT3 signalling pathway. Phytomedicine. 2018;39:10-6.

32.Raschke M, Rowland IR, Magee PJ, Pool-Zobel BL. Genistein protects prostate cells against hydrogen peroxide-induced DNA damage and induces expression of genes involved in the defence against oxidative stress. Carcinogenesis. 2006;27(11):2322-30.

33.Prietsch RF, Monte LG, da Silva FA, Beira FT, Del Pino FA, Campos VF, et al. Genistein induces apoptosis and autophagy in human breast MCF-7 cells by modulating the expression of proapoptotic factors and oxidative stress enzymes. Mol Cell Biochem. 2014;390(1-2):235-42.

34.Pool H, Campos-Vega R, Herrera-Hernández MG, García-Solis P, García-Gasca T, Sánchez IC, et al. Development of genistein-PEGylated silica hybrid nanomaterials with enhanced antioxidant and antiproliferative properties on HT29 human colon cancer cells. Am J Transl Res. 2018;10(8):2306-23.

35.Suzuki K, Koike H, Matsui H, Ono Y, Hasumi M, Nakazato H, et al. Genistein, a soy isoflavone, induces glutathione peroxidase in the human prostate cancer cell lines LNCaP and PC-3. Int J Cancer. 2002;99(6):846-52.

[DOI: 10.22088/jbums.26.1.53]