

تاثیر اسید آسکوربیک بر مسیرهای سیگنالینگ

ژن های Bax و Bcl2 در رده سلولی AGS

یاسر آصفی*، سعید قربیان^۱

(۱) گروه ژنتیک، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اهر، اهر، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۸/۲۱

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۴/۱۱

چکیده

مقدمه: آنتی اکسیدان ها تاثیر زیادی در مهار استرس اکسیداتیو و رادیکال های آزاد داشته و باعث بیان ژن های آپوپتوز می شوند. بنا بر این آنتی اکسیدان ها نقش مهمی در پیشگیری از سرطان دارند. هدف از این پژوهش تاثیر اسید آسکوربیک بر مسیرهای سیگنالینگ ژن های Bcl2 و Bax در رده سلولی AGS می باشد.

مواد و روش ها: در این پژوهش رده سلولی AGS با غلظت های مختلف اسید آسکوربیک در بازه های زمانی مختلف تیمار شدند. اثر اسید آسکوربیک بر میزان مرگ و میر سلول ها با روش MTT اندازه گیری شد. استخراج RNA و سنتز cDNA صورت گرفت. در نهایت، بیان ژن Bcl2 و Bax با استفاده از روش Real Time PCR مورد بررسی قرار گرفت.

یافته های پژوهش: نتایج سمیت سلولی بیانگر آن است که در غلظت های مختلف اسید آسکوربیک، مرگ سلولی در گروه هدف در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی داری افزایش یافت ($P < 0.05$). نتایج تست Real Time PCR حاکی از آن بود که میزان بیان ژن Bcl2 و Bax در مقایسه با ژن GAPDH در اثر تیمار با اسید آسکوربیک افزایش معنی داری داشته است ($P < 0.05$).

بحث و نتیجه گیری: نتایج مطالعات نشان داد که اسید آسکوربیک نقش مهمی را در مهار رشد سلول های سرطانی دارد.

واژه های کلیدی: سرطان معده، اسید آسکوربیک، تست MTT، Bcl2 و Bax

* نویسنده مسئول: گروه ژنتیک، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اهر، اهر، ایران

Email: yaser.asefi@yahoo.com

Copyright © 2019 Journal of Ilam University of Medical Science. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution international 4.0 International License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits copy and redistribute the material, in any medium or format, provided the original work is properly cited.

مقدمه

در سال های اخیر الگوی مرگ و میر تغییر یافته و سرطان ها نقش عمده تری را به خود اختصاص داده اند. گزارش های مختلف نشان داده است که سرطان معده در جهان وفور بالایی دارد و سومین علت مرگ را در جوامع در حال توسعه به خود اختصاص داده است (۱،۲). یکی از مهم ترین راهکارهای پیشنهادی پیشگیری کننده از سرطان معده استفاده از برنامه تغذیه ای مناسب غنی از آنتی اکسیدان ها می باشد. نقش آنتی اکسیدان در پیشگیری و درمان سرطان ها توسط مطالعات بسیاری گزارش شده اند (۲،۳). در انسان، مهم ترین رادیکال های آزاد ROS (گونه های فعال اکسیژن) و RNS (گونه های فعال نیتروژن) است. مولکول اکسیژن در معرض پرتوهای مختلف، استرس و دودهای ناشی از استعمال سیگار، با گرفتن تک الکترون از دیگر مولکول ها، منجر به تخریب سلول ها و DNA می شود. حاصل فعالیت رادیکال های آزاد در بدن شامل ضعف سیستم ایمنی بدن و انواع تباهی از جمله سرطان است. در این میان، آنتی اکسیدان ها به عنوان اصلی ترین راه مبارزه با رادیکال های آزاد و بازسازی سلول های تخریب شده مطرح می شوند چرا که موجب تخریب آن و افزایش کارایی سیستم ایمنی بدن در مقابل انواع بیماری ها می گردند (۴،۵). در صورت ادامه یافتن استرس اکسیداتیو، آسیب های اکسیداتیو به بیومولکول های حیاتی (مانند ژنوم) وارد آمده و تجمع این آسیب ها منجر به برخی اثرات بیولوژیکی مانند تغییر در انتقال پیام، تغییر در بیان ژن، میتوز، تبدیل، جهش و مرگ سلولی می گردد که آنتی اکسیدان ها نقش مهمی را در مهار استرس اکسیداتیو دارند (۶).

آسکوربیک اسید یک ویتامین محلول در آب با فرمول مولکولی $C_6H_6O_6$ ، وزن مولکولی ۱۷۶/۱۳ گرم بر مول و نقطه ذوب بین ۱۹۰/۸ و ۱۹۲/۸ درجه سانتی گراد می باشد. این ویتامین در بدن نقش یک آنتی اکسیدان را ایفا می کند و از سلول های بدن در مقابل تخریب حفاظت می کند، یعنی این ویتامین توانایی زیادی در خنثی کردن رادیکال های آزاد دارد. بدن انسان قادر به سنتز این ویتامین نیست، در حالی

که می تواند در بدن ذخیره شود و مقدار مناسب باید به طور منظم از طریق رژیم غذایی دریافت شود (۷). به مجموعه ویژگی های یک فرد در سطح ژنوم ژنتیک گفته می شود. که یکی از عوامل ایجاد سرطان ها در انسان می باشد مولفه های اصلی زمینه ژنتیکی جهش ها و پلی مورفیسم ها هستند که اثر خود را با تغییر میزان بیان یا تغییر عملکرد پروتئین ها ایجاد می نمایند. سرطان بر اثر تغییرات ژن های انکوژن ها ایجاد می گردد (۸). انکوژن ها یا ژن های تومورزا، ژن های تغییر یافته ای هستند که در حالت عادی پروتئین هایی را که در کنترل رشد و تکثیر سلول ها نقش دارند، بیان می کنند. این ژن ها در حالت عادی پروتئین نامیده می شوند. ولی در صورت بروز جهش در پروتئین انکوژن ها، آن ها به انکوژن ها تبدیل می شوند. انکوژن ها اغلب باعث بیان بیش از حد فاکتورهای کنترلی می گردد اما مهارکننده های کلاسیک تومور در خلاف جهت انکوژن ها عمل می کنند تا تکثیر سلول را از طریق القاء توقف چرخه سلولی مهار کنند (۸،۹). Bcl2 در روی کروموزوم ۱۸ موقعیت q21.33 قرار دارد. جهش در آن سبب ایجاد انواعی از سرطان ها می شود. Bax (-BCL2 associated X protein) در روی کروموزوم ۱۹ در موقعیت q13.33 قرار دارد که در تنظیم ژن های هدف، چرخه سلولی و آپوپتوز نقش دارد (۹-۱۲). مصرف رژیم غذایی با ویتامین C بالامنجر به سرکوب رادیکال های آزاد و بیان ژن های آپوپتوز می شود که از ابتلا به سرطان معده جلوگیری می کند (۲). شایع ترین سرطان در کشور، سرطان معده بوده و آنتی اکسیدان ها تاثیر زیادی بر پیشگیری از آن را داشته و باعث بیان ژن های آپوپتوز می شوند. لذا هدف از این پژوهش تاثیر اسید آسکوربیک بر مسیرهای سیگنالینگ ژن های Bcl2 و Bax در رده سلولی سرطان معده می باشد.

مواد و روش ها

تست MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) در این پژوهش، ابتدا رده سلولی AGS (IBRC C10071) (Code: از انستیتو پاستور ایران تهیه گردید و به منظور

انجام آزمایش، سلول ها در فلاسک حاوی محیط کشت RPMI1640 (Gibco, USA) حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (FBS; Fetal Bovine Serum) و ۲ درصد آنتی بیوتیک های پنیسیلین-استرپتومایسین در فشار ۵ درصد CO₂ و دمای ۳۷ درجه سانتی گراد کشت داده شدند. وقتی تعداد سلول ها به حد مطلوب رسید، سلول ها با استفاده از ترکیب Trypsin-EDTA که از قبل گرم شده بود، جداسازی شدند. به منظور مطالعه اثر سایتوتوکسیک آسکوربیک اسید بر سلول های رده AGS، این سلول ها با تریپان بلو شمارش و به تعداد ۱۰۰۰۰ سلول در پلیت های ۹۶ خانه ای کشت داده شدند؛ سپس به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد با ۵ درصد CO₂ و ۹۵ درصد هوای مرطوب انکوباسیون شدند تا به رشد کافی برسند (۱۲). پس از آماده سازی، سلول ها با غلظت های مختلف ۵۰۰، ۱۲۵، ۳۱، ۸، ۲، ۰/۵، ۰/۱۲، ۰/۰۳ و ۰/۰۰۷ (تمامی غلظت ها به میکروگرم به میلی لیتر می باشد) با اسید آسکوربیک تیمار شدند و بعد از طی بازه های زمانی مشخص (۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت) جهت تعیین اثر سایتوتوکسیک اسید آسکوربیک بر بقای این سلول ها از روش رنگ آمیزی (Sigma-MTT, Aldrich, Germany) استفاده شد. به منظور بررسی بقای سلول ها با تست MTT در پایان بازه های زمانی، ابتدا محتویات هر خانه با محلول MTT با غلظت نهایی ۰/۵ میلی گرم بر میلی لیتر در ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت RPMI فاقد فنول رد جایگزین گردید. پس از ۴ ساعت انکوباسیون در تاریکی، محلول MTT با Dimethyl sulfoxide (DMSO) تعویض گردید و سپس جذب نوری در طول موج ۵۷۰ نانومتر توسط دستگاه الایزا ریدر قرائت شد. از محیط کشت دارای سلول بدون حضور دارو به عنوان گروه کنترل استفاده شد. و در نهایت دوز

IC₅₀ (Inhibitory concentration) یا پنجاه درصد کشدگی محاسبه گردید (۱۲).
استخراج RNA و سنتز cDNA به منظور استخراج RNA از کیت (Transgen Biotech ER101-01) استفاده گردید و تمام مراحل طبق پروتکل کیت انجام شد. در نهایت با استفاده از دستگاه نانو دراپ (thermo scientific، آمریکا) غلظت RNA مشخص گردید و برای اطمینان از عدم آلودگی، پروتئین OD260/OD280 بررسی گردید و برابر با ۱/۹ تایید شد. هم چنین غلظت RNA با خوانش در طول موج ۲۶۰ نانومتر به دست آمد. به منظور سنتز cDNA، ۱ میکروگرم از RNA به میکرونیوب RNase free وارد نموده و ۱ میکرولیتر آنزیم DNaseI و ۱ میکرولیتر بافر این آنزیم به آن اضافه گردید. حجم نهایی محلول به ۱۰ میکرولیتر رسانده شد و ۳۰ دقیقه انکوبه در دمای ۳۷ درجه صورت گرفت. در نهایت جهت غیر فعال کردن آنزیم DNaseI، ۱ میکرولیتر از محلول EDTA ۵۰ mM به آن افزوده شد و ۱۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه قرار گرفت. جهت سنتز cDNA نیز از کیت سیناژن استفاده شد و تمام مراحل طبق پروتکل کیت انجام گرفت (۱۱،۱۳).

PCR Real Time: جهت انجام PCR Real Time از دستگاه PCR Real Time ABI۳۰۰ استفاده شد. سپس یک میکروگرم از cDNA (TAKRA) در این واکنش استفاده گردید. پرایمرهای مورد نیاز جهت انجام واکنش توسط نرم افزار 3 Primer طراحی گردید. از GAPDH به عنوان ژن House keeping استفاده شد (جدول شماره ۱). نتایج آزمایش به روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ مورد آنالیز قرار گرفت (۱۲). جهت آنالیز آماری از نرم افزار SPSS نسخه ۲۳ استفاده شد و P<0.05 به عنوان معنی داری در نظر گرفته شد.

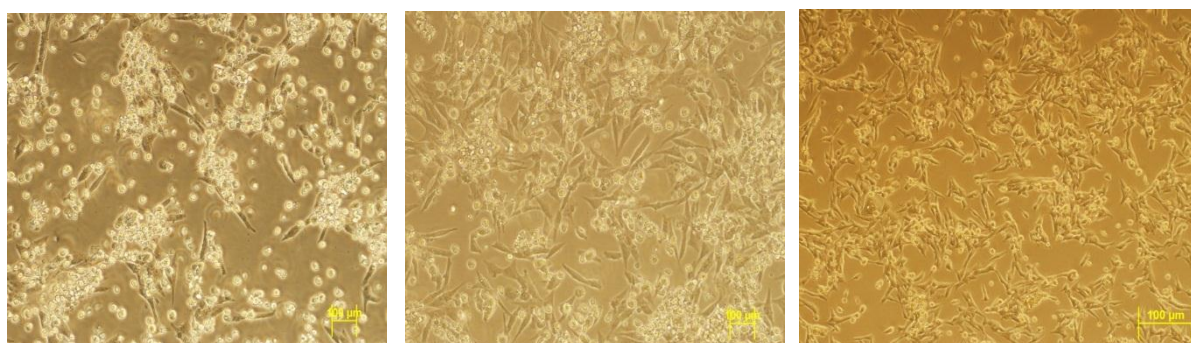
جدول شماره ۱. مشخصات پرایمرهای مورد استفاده

نام ژن	Sense 5'-3'	Antisense 5'-3'	طول محصول (bp)
GAPDH	CAAGGTCATCCATGACAACCTTTG	GTCCACCACCTGTTGCTGTAG	496
Bax	TGGGCTGGACATTGGACTTC	GATGGTCACGGTCTGCCAC	165
Bcl2	GAGGCAGGCAGTAGTATGGTG	AGGATAACGGAGGCTGGACA	100

یافته های پژوهش

AGS اتفاق می افتد. این در حالی است که در سلول های کنترل چنین تغییراتی مشهود نبوده و ساختار سلولی سالم و نرمال مشاهده شد. این تغییرات در واقع مقدمه ای برای تشکیل اجسام آپوپتوتیک و شروع فرآیند آپوپتوز بودند. علاوه بر تغییرات مورفولوژیک تعداد سلول های آپوپتوتیک نیز به صورت قابل ملاحظه ای بعد از تیمار با غلظت های ذکر شده در مقایسه با گروه کنترل افزایش یافته بود.

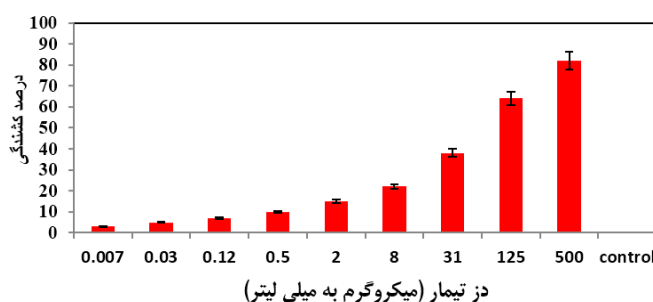
خصوصیات مورفولوژیکی سلول های سرطانی رده AGS تیمار شده با غلظت های مختلف آسکوربیک اسید به وسیله میکروسکوپ اینورت بررسی گردید (عکس های الف، ب و ج). نتایج نشان دادند که در غلظت های ذکر شده یک سری تغییرات مورفولوژیک از قبیل متراکم شدن کروماتین و تکه تکه شدن هسته و تشکیل اجسام آپوپتوتیک در سلول های سرطانی



شکل شماره ۱. عکس اینورت از رده سلولی AGS (الف) بدون تیمار با اسید آسکوربیک، (ب) تیمار شده با اسید آسکوربیک پایین ترین غلظت و (ج) تیمار شده با اسید آسکوربیک با بالاترین غلظت

است تیمار ۴۸ ساعته بیشترین تاثیر را روی سلول سرطانی داشته و در تمامی غلظت ها افزایش مرگ و میر نسبت به گروه کنترل مشاهده شده است ($P < 0.05$). هم چنین نشان داده شده است با افزایش غلظت آسکوربیک اسید، میزان مرگ و میر افزایش یافته و زنده مانده سلول ها کاهش یافته است. مقدار IC_{50} آسکوربیک اسید $29 \mu g/ml$ برآورد گردید. IC_{50} غلظتی است که ۵۰ درصد سلول ها کشته شده و ۵۰ درصد آن زنده هستند.

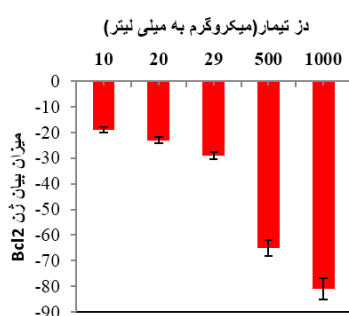
اثر سمیت سلولی آسکوربیک اسید بر روی سلول های AGS همان طور که در مواد و روش ها ذکر شد با استفاده از روش MTT مورد ارزیابی قرار گرفت. طی این مطالعه سلول AGS به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت با استفاده از آسکوربیک اسید تیمار گردید. نتایج با استفاده از نرم افزار Exell vol.2010 و سایت IC₅₀ Calculator آنالیز شده و نمودار به صورت درصد حیات مرگ و میر در مقابل غلظت رسم شد (شکل شماره ۲). همان طور که در شکل شماره ۲ مشخص



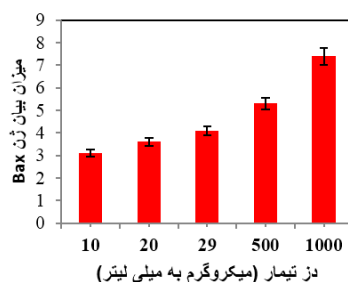
شکل شماره ۲. اثر غلظت های مختلف آسکوربیک اسید بر مرگ و میر سلول های رده سلولی AGS با استفاده از تست MTT ($P < 0.05$)

نسبت به تیمار با غلظت پایین، تاثیر معنی دار در بیان ژن ها داشت. میزان افزایش بیان ژن Bax در مقایسه با گروه کنترل، در دز بالای تیمار ۷/۴ برابر و در دز پایین ۳/۱ برابر بود. و میزان کاهش بیان ژن Bcl2 در مقایسه با گروه کنترل در دز بالا ۸۱ درصد و در دز پایین ۱۹ درصد بود ($P < 0.05$).

تغییرات بیان ژن Bax و Bcl2 در اثر اسید اسکوربیک در شکل های شماره ۳ و ۴ نشان داده شده است. همان طور که مشخص است سطوح بیان Bax و Bcl2 در اثر اسید اسکوربیک در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی داری ($P < 0.05$) به ترتیب افزایش و کاهش داشت. علاوه بر این، میزان بیان ژن ها وابسته به دز بود که تیمار با غلظت بالای اسید اسکوربیک



شکل شماره ۳. میزان بیان ژن Bax در اثر تیمار با اسکوربیک اسید ($P < 0.05$)



شکل شماره ۴. میزان بیان ژن Bcl2 در اثر تیمار با اسکوربیک اسید ($P < 0.05$)

بیماری کشندگی بالایی دارد (۳،۱۴). زندگی پر از استرس و تغذیه غیر اصولی نقش مهمی را در ایجاد سرطان دارند. نقش آنتی اکسیدان در پیشگیری و درمان سرطان ها توسط مطالعات بسیاری گزارش شده اند (۱۵). استرس اکسیداتیو، عدم تعادل بین رادیکال های آزاد و آنتی اکسیدان های بدن است. رادیکال های آزاد، مولکول ها یا اتم هایی هستند که کمبود الکترون دارند و می توانند این کمبود الکترون را از طریق واکنش با مولکول های بدن از جمله DNA تامین کنند و موجب تغییر ژن شوند، زیرا DNA به علت داشتن گروه های فسفات در اسکلت خود دارای بار

بحث و نتیجه گیری

در سال های اخیر با بهبود وضعیت بهداشتی و کاهش مرگ و میر به علت بیماری های عفونی، سرطان ها نقش مهم تری را در مرگ و میر یافته اند. طبق آمار منتشر شده در سال های اخیر، دوازده میلیون و هفتصد هزار مورد جدید سرطان در جهان شناسایی شده است. گزارش های مختلفی نشان داده است که سرطان معده در جهان وفور بالایی دارد و مهم ترین عامل رایج مرگ در میان مردان و زنان است، و چون متأسفانه بیماران مبتلا به سرطان معده در مراحل بسیار پیشرفته جهت تشخیص و درمان مراجعه می کنند، این

دارد. ROS و RNS علاوه بر عملکردهای سودمند، در آپوپتوز و سرطان که دو پدیده‌ی متضاد هستند نقش گسترده‌ای ایفا می‌کنند (۲۲-۲۰). ایجاد جهش در DNA آغازکننده وقایع سرطان زایی است. جهش‌های موثر بر بیان یا عملکرد ژن به ویژه ژن‌های سرکوب‌کننده تومور و پرتوانکوژن‌ها می‌تواند منجر به رشد نامنظم سلول‌ها گردد. شرایط استرس اکسیداتیو منجر به اکسیداسیون باز آلی گوانین و تشکیل 8-oxo-deoxy guanosine (8-oxo-dG) می‌شود. این اختلالات، جایگزینی (transversion) C:G به A:T را موجب می‌شود. چنین اختلالاتی در انکوژن‌ها و ژن‌های سرکوبگر تومور (مانند p53) نقش مهمی در سرطان زایی دارند. این اختلالات هم‌چنین در شرایط التهابی مزمن با هیپاتیت و سیروز و در بافت معده با عفونت هلیکوباکتریایی همراه است (۲۷-۲۵). بنا بر این دلایل گفته شده نشان می‌دهد که آسکوربیک اسید نقش مهمی را بیان ژن‌های آپوپتوز و پیشگیری از سرطان دارد که با پژوهش‌های جوان و همکاران (۲۰۱۴) و یانگ و همکاران (۲۰۱۳) مطابقت داشت (۲۰۱۴، ۱۰). یاکوان و همکاران در سال ۲۰۰۶ در مقاله‌ای تحت عنوان مکانیسم اسید آسکوربیک در پیشگیری از سرطان معده، گزارش کردند که آسکوربیک اسید مانع رشد و حیات سلول‌های سرطانی می‌شود که مطابق با پژوهش حاضر بود (۲۸).

همان‌طور که در شکل‌های شماره ۳ و ۴ نشان داده شده است اسید آسکوربیک سبب بیان ژن‌های Bax و Bcl2 شده است. میزان افزایش بیان ژن Bax در مقایسه با گروه کنترل، در دز بالای تیمار ۷/۴ برابر و در دز پایین ۳/۱ برابر بود. و میزان کاهش بیان ژن Bcl2 در مقایسه با گروه کنترل در دز بالا ۸۱ درصد و در دز پایین ۱۹ درصد بود. این نتایج نشان می‌دهد علاوه بر این که اسید آسکوربیک سبب بیان ژن‌های Bax و Bcl2 می‌شود، دز بالای آن نسبت به دز پایین تأثیر معنی‌داری بر بیان ژن دارد و بیان ژن‌ها وابسته به دز اسید آسکوربیک می‌باشد. مهم‌ترین عامل در تأثیر اسید آسکوربیک بر بیان ژن‌های Bax و Bcl2، خاصیت آنتی‌اکسیدانی آن بوده که سبب بیان ژن‌های آپوپتوز، کاهش رادیکال‌های آزاد، تنظیم سیگنالینگ

منفی است (۱۶). واکنش رادیکال آزاد با سایر مولکول‌ها، اکسیداسیون نامیده می‌شود، اما در بدن برای مقابله با فرآیندهای اکسیداسیونی رادیکال‌های آزاد با ماکرومولکول‌های مهم بدن از جمله DNA خطوط دفاعی‌ای تحت عنوان دفاع آنتی‌اکسیدانی وجود دارد. سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی با رادیکال‌های آزاد مقابله کرده و جلوی فرآیندهای مضر آن‌ها را می‌گیرند. اما هنگامی که تعادل از بین رفته باشد شرایط استرس اکسیداتیو ایجاد می‌گردد. در صورت ادامه یافتن استرس اکسیداتیو، آسیب‌های اکسیداتیو به بیومولکول‌های حیاتی مانند ژنوم وارد آمده و تجمع این آسیب‌ها منجر به برخی اثرات بیولوژیکی مانند تغییر در انتقال پیام، تغییر در بیان ژن، میتوز، تبدیل، جهش و مرگ سلولی می‌گردد (۱۷). ویتامین C یک آنتی‌اکسیدان قوی است، که در جریان خون قرار گرفته و اثر شیمیایی موادی که به بافت‌های بدن آسیب می‌رسانند را خنثی می‌کند. این ویتامین موجب محافظت بدن در مقابل آثار مخرب اشعه ماورای بنفش نورخورشید و رادیکال‌های آزاد می‌شود. هم‌چنین این ویتامین به افزایش قدرت ایمنی بدن کمک می‌کند (۱۸). گونه‌های فعال اکسیژن یک فرآیند ضروری در مسیرهای انتقال سیگنالینگ می‌باشد اما تولید بیش از حد آن یکی از علت اصلی سرطان است (۱۷). بنا بر این هدف از این مطالعه بررسی تأثیر آسکوربیک اسید بر مسیرهای سیگنالینگ ژن‌های Bcl2 و Bax در رده سلولی AGS می‌باشد.

همان‌طور که نشان داده شد (شکل شماره ۲) تیمار سلول‌های سرطانی با استفاده از آسکوربیک اسید سبب کاهش حیات سلول‌های سرطانی و افزایش مرگ و میر آن‌ها شده است، که دلیل آن خاصیت آنتی‌اکسیدانی و بیان ژن‌های آپوپتوز، انتقال پیام و تنظیم تکثیر سلولی می‌باشد (۲۴-۱۹). ROS هم‌چنین می‌تواند با تأثیر بر وقایع مربوط به چرخه سلولی در پیشبرد سرطان زایی نقش داشته باشد. نشان داده شده است که ROS، تلومرازهای سلولی در سلول‌های اندوتلیال را فعال کرده و فرآیند پیری را به تاخیر می‌اندازد. برای جلوگیری از عدم تعادل ردوکس و آسیب‌های اکسیداتیو، دفاع‌های آنتی‌اکسیدانی وجود

سلولی، تنظیم چرخه سلولی، تنظیم واکنش اکسیداسیون و احیا و مانع جهش می شود (۲۴-۱۹). آپوپتوز یک شکل از مرگ سلولی برنامه ریزی شده است. واژه مرگ سلولی برنامه ریزی شده برای توضیح حوادث پشت سرهم و هماهنگی به کار می رود که منجر به مرگ سلول طی مراحل تکوینی می شود (۲۹). اعضا خانواده B-cell lymphoma gene 2 به دو گروه تسهیل کننده (مثل Bcl2, Bax, Bak) و مهارکننده (مثل Bcl2) آپوپتوز تقسیم می شوند و نسبت بیان این دو گروه است که تعیین کننده بقا یا مرگ سلول می باشد. در شروع آپوپتوز عوامل تسهیل کننده مثل Bax فعال می شوند که منجر به نفوذپذیر شدن غشاء میتوکندری و آزاد گردیدن مواد پیش برنده آپوپتوز می شوند. دیپولاریزاسیون میتوکندری مهم ترین عامل موثر در مسیر داخلی است. دیپولاریزاسیون باعث آزاد شدن مواد پیش برنده آپوپتوزی از جمله سیتوکروم C از داخل میتوکندری به سیتوپلاسم می شود که با اتصال به یک مولکول Apaf-1 (Apoptotic protease-activating factor 1) باعث تشکیل آپوپتوزوم می گردد که شامل چند مولکول از Apaf-1،

ATP/Datp و سیتوکروم C و شکل غیرفعال کاسپاز شروع کننده ۹ می باشد که باعث فعال شدن کاسپاز ۹ و سپس فعال شدن کاسپازهای عمل کننده و در نهایت آپوپتوز سلول می گردد (۹،۳۰). پژوهشگران گزارش کرده اند یکی از دلایل افزایش بیان ژن p53 و Bax افزایش استرس اکسیداتیو است. بنا بر این می توان انتظار داشت سطوح بیان این ژن ها نیز به دلیل مهار استرس اکسیداتیو، کاهش پیدا کند. تاثیرات سلولی اسید آسکوربیک اساساً مبتنی بر فعالیت آنتی اکسیدانی است، اما نشان داده شده است که اسید آسکوربیک علاوه بر تنظیم چندین مسیر سیگنال دهی، بیان ژن های اصلی مرتبط با تکثیر سلولی و فرآیندهای التهابی را نیز تنظیم می کند (۳۰-۲۸،۸). نتایج حاصل از این پژوهش با پژوهش های هراک و همکاران (۲۰۰۷) و چن و همکاران (۲۰۱۲) مطابقت داشت (۲۹،۱۱). گالیمبرتی و همکاران (۲۰۱۲) و حسین و همکاران (۲۰۰۶) گزارش کردند که آنتی اکسیدان ها باعث بیان ژن های آپوپتوز می شود که در راستای پژوهش حاضر بود (۳۰،۱۳).

کد/خلاق: (۰۰۰۰۰۰۰۰۲۱۵۰۲۱۰۵۳)

References

- Bail J, Meneses K, Demark W. Nutritional status and diet in cancer prevention. *Sem Oncol Nurs* 2016; 32: 14-20. doi: 10.1016/j.soncn.2016.05.004
- Borji A, Bayat M, Shamsabadi F, Amini F, Dayyani M, Mehradmajd H. [Epidemiology of gastrointestinal cancers in Neyshabur city during 2006-12]. *J Neyshabur Uni Med Sci* 2015; 4: 37-44. (Persian)
- Yinyin C. Antioxidant and antiproliferative activities of several marine organisms from the West coast of peninsular Malaysia. *Fac Med* 2016; 4: 362-9.
- Beyer RE. An analysis of the role of coenzyme Q in free radical generation and as an antioxidant. *Biochem Cell Biol* 1992; 70: 390-403. doi:org/10.1139/h95-001
- Schieber M, Chandel NS. ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Curr Biol* 2014; 24:5: 453-62. doi: 10.1016/j.cub.2014.03.034.
- Shivani P. Vitamin C. *Dep Biol* 2015; 3:2025-36.
- Amaral JD, Xavier JM, Steer JC. The role of p53 in apoptosis. *Dis Med* 2014; 9: 145-52.
- Hemann MT, Lowe SW. The p53-Bcl-2 connection. *Cell Death Dif* 2015; 13: 1256-9. doi: 10.1038/sj.cdd.4401962.
- Juan L, Zhang C, Feng Z. Tumor suppressor p53 and its gain of function mutants in cancer. *Acta Biochim Biophys Sin* 2014; 46: 170-9. doi: 10.1093/abbs/gmt144.
- Khodapasand E, Jafarzadeh N, Farrokhi F, Kamalidehghan B, Houshmand M. Is Bax/Bcl-2 ratio considered as a prognostic marker with age and tumor location in colorectal cancer? *Iranian Bio J* 2015; 19:69-75. doi: 10.6091/ibj.1366.2015
- Alarifi S, Ali H, Alkahtani S, Alessia MS. Regulation of apoptosis through bcl-2/bax proteins expression and DNA damage by nano sized gadolinium oxide. *Int J Nanomed* 2019; 12:4541-51.

13. Bassiony H, Sabet S, Eldin TAS, Mohamed MM, Elghor AA. Magnetite nanoparticles inhibit tumor growth and upregulate the expression of P53/P16 in Ehrlich solid carcinoma bearing Mice. *Plos One* 2014; 9: 1-9.
14. Bail J, Meneses K, Demark W. Nutritional status and diet in cancer prevention. *Semin Oncol Nurs* 2016; 32: 14-20.
15. Chen J, Bhandar B, Kavdia M. Interaction of ROS and RNS with GSH and GSH/GPX systems. *FASEB J* 2015; 636-7.
16. Christine BA, Jo LF, Patricia AT, Elise B, John EV, James RM, et al. Manganese superoxide dismutase genetic polymorphisms, dietary antioxidants and risk of breast cancer. *Cancer Res* 2017; 59: 602-7.
17. Schieber M, Chandel NS. ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Els Inc* 2014; 3:2012-20.
18. Ana MO, Ricardo MD, Marcus VO, Ana AD, Benedito BD. Ascorbic acid in the prevention and treatment of cancer. *Rev Asso Med Bras* 2016; 62: 680-6. doi:10.1590/1806-9282.62.07.680
19. Tanaka K, Pracyk JB, Takeda K, Yu ZX, Ferrans VJ, Deshpande SS expression of Id1 results in apoptosis of cardiac myocytes through a redox dependent mechanism. *J Biol Chem* 2010; 273: 2592-8.
20. Rahal A, Kumar A, Singh V, Yadav B, Tiwari R, Chakraborty S, et al. Oxidative stress prooxidants and antioxidants the interplay. *Biomed Res Int* 2014; 2014:761264. doi:10.1155/2014/761264
21. Suzuki Y, Ono Y, Hirabayashi Y. Rapid and specific reactive oxygen species generation via NADPH oxidase activation during fasmediated apoptosis. *FEBS Let* 2008; 425: 209-12. doi:10.1016/S0014-5793(98)00228-2
22. Policastro L, Molinari B, Larcher F, Blanco P, Podhajcer OL, Costa CS. Imbalance of antioxidant enzymes in tumor cells and inhibition of proliferation and malignant features by scavenging hydrogen peroxide. *Mol Carcin* 2004; 39: 103-13.
23. Martindale JL, Holbrook NJ. Cellular response to oxidative stress signaling for suicide and survival. *J Cell Physiol* 2002; 192: 1-15.
24. Du J, Cullen JJ, Buettner GR. Ascorbic acid chemistry biology and the treatment of cancer. *Biochim Biophys Acta* 2012; 1826:443-57. doi: 10.1016/j.bbcan.2012.06.003.
25. Collins AR, Cadet J, Moller L, Poulsen HE, Vina J. Are we sure we know how to measure 8oxo and 8dihydroguanine in DNA from human cells? *Arch Biochem Biophys* 2004; 423: 57-65.
26. Yang Y, Karakhanova S, Werner J, Bazhin AV. Reactive oxygen species in cancer biology and anticancer therapy. *Curr Med Chem* 2013; 20: 3677-92.
27. Amral JD, Xavier JM, Steer CJ, Rodrigues CM. The role of p53 in apoptosis. *Dis Med* 2014; 144-52.
28. Yaxuan S, Qiusheng Z, Gang L, Dean G, Ziren W. Mechanism of ascorbic acid induced reversion against malignant phenotype in human gastric cancer cells. *Biomed Environ Sci* 2006; 19: 385-91.
29. Chen MC, Huang CY, Hsu SL, Lin E, Ku CT, Lin H. Retinoic acid induces apoptosis of prostate cancer DU145 cells through Cdk5 overactivation. *ECAM* 2012; 1-11. doi: 10.1155/2012/580736.
30. Hussein MR, Bedaiwy MA, Falcone T. Analysis of apoptotic cell death Bcl2 and p53 protein expression in freshly fixed and cryopreserved ovarian tissue after exposure to warm ischemia. *Fertil Steril* 2006; 85: 1082-92. doi:10.1016/j.fertnstert.2005.10.020

Effect of Ascorbic Acid on Signaling Pathways of Bcl2 and Bax Genes in AGS Cell Line

Asefi Y^{1*}, Ghorbian S¹

(Received: July 2, 2019)

Accepted: November 12, 2019)

Abstract

Introduction: Antioxidants have a great influence on the control of oxidative stress and free radicals; moreover, they cause the expression of apoptosis genes. Accordingly, they have an important role in preventing cancer. This study aimed to evaluate the effect of ascorbic acid on signaling pathways of Bcl2 and Bax genes in AGS cell lines.

Materials & Methods: In this study, the AGS cell line was treated with different concentrations of ascorbic acid at different time intervals. The effect of ascorbic acid on cell death was measured using the MTT method. Furthermore, RNA extraction and cDNA synthesis were performed in this study. Finally, the expression of Bcl2 and Bax genes was evaluated using a real-time

polymerase chain reaction (PCR) method. *Ethics code:*0000000215021053.

Findings: Considering the different concentrations of ascorbic acid, the results obtained from the cell toxicity indicated a significant increase in cell death in the test group, compared to the control group ($P<0.05$). The results of the real-time PCR test showed that the expression of Bcl2 and Bax gene was significantly increased due to treatment with ascorbic acid, compared to GAPDH ($P<0.05$).

Discussion & Conclusions: The results show that ascorbic acid plays an important role in inhibiting the growth of cancer cells.

Keywords: Ascorbic acid, Gastric cancer, MTT test, Bcl2, Bax

1. Dept of Genetics, Faculty of Science, Islamic Azad University, Ahar Branch, Ahar, Iran

*Corresponding author Email:yaser.asefi@yahoo.com

Scientific Journal of Ilam University of Medical Sciences