

# بررسی اثر سینامالدهید بر تغییرات بیان ژن‌های *C-jun*، *C-fos* و P53 در سلول‌های سرطانی شده بافت معده ی موش توسط دی متیل هیدرازین

مهدی آزادمنش<sup>۱</sup>، طاهره ناجی<sup>۲\*</sup> و عبدالرضا محمدنیا<sup>۳</sup>

۱- دانشجوی داروسازی، گروه علوم پایه، دانشکده داروسازی و علوم دارویی، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران  
 ۲- دانشیار گروه علوم پایه، دانشکده داروسازی و علوم دارویی، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران  
 ۳- استادیار، مرکز تحقیقات بیماری‌های مزمن تنفسی، پژوهشکده سل و بیماری‌های ریوی، مرکز آموزشی، پژوهشی و درمانی سل و بیماری‌های ریوی بیمارستان مسیح دانشوری، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

\*نویسنده مسئول: طاهره ناجی، دکتری تخصصی، [tnaji2002@gmail.com](mailto:tnaji2002@gmail.com)، [naji\\_t@iaups.ac.ir](mailto:naji_t@iaups.ac.ir)

تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۰/۵/۹ تاریخ بازنگری: ۱۴۰۰/۷/۹ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۴۰۰/۹/۲۹

## چکیده

**پیشینه مطالعه و هدف:** ژن‌ها نقش بسیار مهمی در بروز سرطان‌ها دارند. هدف از این بررسی، ارزیابی سه ژن *C-jun*، *C-fos* و P53 در سلول‌های سرطانی شده بافت معده موش توسط دی متیل هیدرازین است. **روش مطالعه:** در این مطالعه ۴۰ سر موش نژاد ویستار نر ۵۷ هفته‌ای بالغ در چهار گروه ۱۰ تایی تقسیم شدند. گروه اول شاهد، گروه دوم دریافت کننده کارسینوژن بدون سینامالدهید، گروه سوم فقط سینامالدهید و گروه چهارم کارسینوژن همراه با سینامالدهید را همزمان دریافت نمودند. پس از گذشت دوره مورد نظر بافت معده موش‌ها جداسازی شد و از لحاظ بیان ژن‌های مذکور مورد ارزیابی قرار گرفت. داده‌ها با نرم افزار SPSS و آزمون آماری One-way ANOVA مورد تجزیه تحلیل قرار گرفت. **نتایج:** بیان ژن‌های *C-fos*، *C-jun* و P53 در دریافت کننده کارسینوژن همراه با سینامالدهید نسبت به گروه شاهد افزایش پیدا کرد. این افزایش برای دو ژن C-fos ( $P=0.0146$ ) و P53 ( $P=0.0212$ ) معنی‌دار و برای ژن *C-jun* ( $P=0.01604$ ) معنی‌دار نبود. **نتیجه‌گیری:** سینامالدهید می‌تواند تغییراتی در بیان ژن‌های *C-fos*، *C-jun* و P53 که در مسیر ایجاد سرطان معده موثر هستند ایجاد نماید. پس می‌توان امید داشت در تحقیقات تکمیلی سینامالدهید به عنوان یک کاندید در درمان طب مکمل مد نظر قرار گیرد.

**واژه‌های کلیدی:** سرطان معده، سینامالدهید، دی متیل هیدرازین، تغییرات بیان ژن

## مقدمه

مرگ برنامه ریزی توموری شده هستند. چنانچه یک موتاسیون ژنتیکی در سلول تولید شود، سلول‌های طبیعی از مسیر خود خارج شده و تحت تاثیر فرمانده‌های جدید قرار می‌گیرند که به سوی سلول‌های سرطانی شدن پیشرفت می‌کنند. علاوه بر مواد شیمیایی، اشعه‌های آفتاب، امواج کوتاه (SW)، ویروس‌ها و باکتری‌ها هم در ایجاد سرطان‌ها نقش مهمی را دارند (Hanahan, 2012).

سرطان در کشورهای توسعه یافته و در حال توسعه به ترتیب اولین و دومین عامل مرگ می‌باشد. سرطان معده در جهان بعنوان چهارمین سرطان شایع و دومین عامل مرگ بر اثر سرطان شناخته می‌شود

سرطان در نتیجه تقسیم غیرقابل کنترل سلول‌ها ایجاد می‌گردد که عوامل متعددی در ایجاد آن دخیل هستند اما دو عامل اصلی یعنی عوامل محیطی و اختلالات ژنتیکی را از عوامل اصلی این بیماری محسوب می‌کنند. چهار دسته از ژن‌های کلیدی در فرآیندهای سلولی و مولکولی در بدن موجودات زنده نقش دارند، که در هدایت سلول به سمت سرطانی شدن نیز نقش مهمی ایفا می‌نمایند، که شامل: آنکوژن‌ها، ژن‌ها مهار کننده، ژن‌های ترمیم کننده DNA و ژن‌های

(Lieu *et al.*, 2011). بروز سرطان معده (خصوصاً در کشورهای توسعه یافته) روندی کاهشی دارد به طوری که در آمریکا، میزان بروز این سرطان در دهه‌های اخیر رو به کاهش می‌باشد. این وضعیت در کشور کانادا نیز مشاهده شده است و از سال ۱۹۸۴ تا سال ۲۰۱۳ میزان بروز این سرطان از ۱۸/۴ به ۵/۹ در هر ۱۰۰ هزار نفر کاهش یافته است (Baranovsky and Myers, 1986). در سایر کشورهای اروپایی نیز میزان سرطان شایع نبوده حال آن که در کشورهای آسیایی و در حال توسعه بروز این سرطان رو به افزایش می‌باشد. در کشور ایران برخلاف کشور های پیشرفته، میزان بروز سرطان معده در حال افزایش می‌باشد، این افزایش خصوصاً در غرب ایران (شامل استان‌های کردستان، همدان، کرمانشاه) قابل توجه و به عنوان یک مشکل و معضل مطرح می‌باشد. این افزایش در سایر مناطق کشور نیز مشاهده گردیده است (Hartgrink *et al.*, 2009; Malekzadeh *et al.*, 2009).

درمان‌های متداول سرطان، دارای عوارض جانبی بسیار مهم و جدی بوده و در بهترین حالت، تنها چند سال به طول عمر بیمار خواهد افزود. درمان‌های طب مکمل، می‌توانند در کنترل سرطان سودمند باشند؛ لذا تقاضای زیادی در جهت کاربردی نمودن مفاهیم و رویکردهای طب مکمل در پیشگیری از سرطان در سراسر جهان وجود دارد.

داروهای گیاهی فراوانی در این سال‌ها بر روی رده‌های مختلف سلول‌های سرطانی در شرایط آزمایشگاهی بررسی شده است که برخی از آن‌ها بسیار موثر بودند و حتی بررسی‌های درون تنی آن‌ها در بدن موش و همستر نیز نتایج جالب توجهی را نشان دادند (Ukiya *et al.*, 2006; Nassr-Allah *et al.*, 2009).

دارچین درخت همیشه سبز کوچک با ارتفاع ۱۰ الی ۱۵ متر است. این درخت بومی سریلانکا و هند است. دارچین با نام علمی *verum Cinnamomum* است که عصاره ساقه گیاه و سرشاخه‌های جوان و همچنین روغن برگ‌های این گیاه کاربرد درمانی دارند. دارچین قطعات خشک شده و یا پودر شده حاصل از پوست این درختان می‌باشد که هم در صنایع غذایی به عنوان ادویه و هم در صنایع داروسازی از آن استفاده می‌شود. دارچین دارای موسیلاژ، تانن، قند، رزین، اسانس، منیزیم، آهن، فیبر، کلسیم و کربوهیدرات است؛ اسانس مهمترین قسمت آن است و به ویژه در پوست تنه گیاه یافت می‌شود. قسمت اعظم این اسانس را سینامیک آلدئید تشکیل می‌دهد دارچین دارای خواص درمانی مختلفی از جمله خاصیت آنتی باکتریال و آنتی اکسیدان و ضدالتهاب و ضد دیابت و ضد سرطان و ضدتومور می‌باشد (Mancini-Filho *et al.*, 1998; Murcia *et al.*, 2004; Kristiniak *et al.*, 2012).

همچنین شواهدی مبنی بر اثر مثبت دارچین روی بیماری آلزایمر و آرتروز روماتوئید دیده شده است که نیاز به بررسی و تحقیقات بیشتری دارد (Sadeghi *et al.*, 2019). سینامالدهید یک ترکیب آلی با فرمول  $C_9H_8O$  و جرم مولی  $124.16 \text{ g/mol}$  می‌باشد. که به طور طبیعی به عنوان ایزومر ترانس دیده می‌شود و به عنوان یک افزودنی موجب طعم و بوی دارچین است. این ماده یک فنیل پروپانئید است (Ranasinghe *et al.*, 2013). این مایع چسبناک به رنگ زرد کم‌رنگ در پوست درختان دارچین و سایر گونه‌های جنس *Cinnamomum* وجود دارد. روغن اساسی پوست دارچین حدود ۹۰ درصد سینامالدهید است (Gutzeit and Ludwig-M, 2014).

دی متیل هیدرازین با فرمول شیمیایی  $(CH_3NH)_2$  یکی از پرکاربردترین مواد مورد استفاده برای ایجاد مدل‌های سرطان‌گوارشی است که در حیوانات آزمایشگاهی مورد استفاده قرار می‌گیرد. طی بررسی‌های انجام شده، دی متیل هیدرازین در کبد فعال شده و تبدیل به متابولیت فعال خود یعنی AOM (آزوکسی متان) و متیل ازوکسی متانول می‌شود. سپس توسط صفرا به خون و روده بزرگ منتقل می‌شود و در آنجا سبب تولید رادیکال‌های آزاد می‌شود که وظیفه‌ی آن‌ها ایجاد آسیب اکسیداتیو به DNA سلول‌های کولون و کبد است. در نهایت دی متیل هیدرازین با مکانیسم بیان شده، باعث ایجاد و رشد تومور می‌شود (Venkatachalam *et al.*, 2020).

ژن *C-fos* یک فاکتور رونویسی فعال کننده پروتئین یک فعال (AP-1) است که به آنزیم‌های خاصی که در سنتز فسفولیپیدها در شبکه آندوپلاسمی درگیر هستند، متصل می‌شود و یک عملکرد فعال کننده در کنار تنظیم ژنومی رشد دارد. ژن *C-fos* به عنوان یک تنظیم‌گر عمومی در پاسخ به محرک‌های گوناگون خارج سلولی به طور سریع و گذرا در هسته بیان می‌شود و سپس از طریق ساختن پروتئین نسخه بردار FOS بر ژن‌های هدف مرتبط با محرک تأثیر می‌گذارد. فعالیت پروتئین‌کوژن *C-fos* در پاسخ به محرک‌هایی چون میتوژن‌ها، فاکتورهای رشد و بیومدول‌تورها موجب شده از آن به طور وسیعی به عنوان مارکر آناتومیکی جهت مطالعه نواحی فعال شده توسط محرک استفاده گردد (Guzowski *et al.*, 2001).

بیان *C-fos* در بافت‌های سرطانی به طور قابل توجهی بیشتر از بافت‌های غیر کارسینوما نرمال و بافت‌های مجاور بافت سرطانی است. بیان *C-fos*، همبستگی معناداری با تومور دارد. علاوه بر این، بیان این ژن در رگ‌زایی تومور، به طور قابل توجهی بالاتر از عروق طبیعی است (Long *et al.*, 2016). *C-fos* یک پروتئین‌کوژن است و در انواع مختلف سرطان وجود دارد، *C-fos* یک دامنه پروتئین متصل به DNA هسته‌ای را رمزگذاری می‌کند که با محصول ژنی *C-jun* یک دایمر تشکیل می‌دهد و در نهایت فاکتور رونویسی فعال کننده پروتئین یک فعال را تشکیل می‌دهد. به عنوان عضوی از خانواده AP-1،

پروتئین *C-fos* در درجه اول در انتقال سیگنال تمایز و تکثیر سلولی مرتبط است (Milde-Langosch, 2005).  
 با این حال، مسیرهای سیگنالینگ پایین دستی ناشی از فعال سازی *C-fos* و نقش آن در تومورزایی و متاستاز هنوز کامل شناخته شده نیست. *C-fos* می‌تواند باعث از بین رفتن مسیر EMT و در نهایت منجر به رشد تهاجمی و متاستاتیک در سلول‌های اپیتلیال شود (Fialka et al., 1996).  
 پروتئین *C-jun* از اجزاء فاکتور رونویسی AP-1 است که فعالیت آن در بسیاری از انواع تومور افزایش می‌یابد. یک مکانیسم مهم در تحریک عملکرد AP-1 فسفوریلاسیون آمینوترمینال *C-jun* توسط *c-jun N* ترمینال کینازها است (Nateri et al., 2005).  
*C-jun* یک عضو خانواده پروتئین‌های زیپ لوسین از عوامل رونویسی است که با *C-fos* یا سایر پروتئین‌های bZip هم دایمر یا هترو دایمر می‌شود و پروتئین فعال کننده فاکتور رونویسی (AP-1) را تشکیل می‌دهد. بیان AP-1 در ایجاد تغییرات مختلف مهم سلول مانند: تکثیر، تمایز و آپوپتوز نقش دارد (Vleugel et al., 2002; Shaulian and Karin, 2006).  
 ژن *C-jun* برای اولین بار به عنوان یک آنکو پروتئین ویروسی شناخته شد و امروزه نقش آن در سرطان‌های انسانی با بیان بیش از حد به اثبات رسیده است (Vogt, 2002). سیگنال‌های خارج یا داخل سلولی، از جمله فاکتورهای رشد، تبدیل آنکو پروتئین‌ها و تابش اشعه ماورا بنفش، موجب تحریک فسفوریلاسیون *C-jun* در سرین ناحیه ۶۳/۷۳ تحریک می‌کنند و رونویسی وابسته به *C-jun* را فعال می‌کنند. بنابراین، *C-jun* فعال به طور بالقوه نقش مهمی در سرطان زایی و پیشرفت سرطان دارد (Vleugel et al., 2006).  
 علاوه بر تاثیر مستقیم *C-jun* ممکن است این ژن به طور غیرمستقیم بر سرطان زایی تاثیر بگذارد زیرا در انتهای آبشارهای سیگنالینگ واقع شده است که شامل آنکوژن‌های مهمی هستند که در تومورزایی انسانی فعال هستند، که شامل گیرنده های تیروزین کینازها، تیروزین کینازهای سیتوپلاسمی، Raf و Ras می‌باشند (Vogt, 2012). علاوه بر این، *C-jun* با مهار آپوپتوز باعث پیشرفت سلول تومور می‌شود. در تومورهای کبدی، *C-jun* با محافظت از سلول‌های کبدی تومور در برابر آپوپتوز، با *P53* وارد واکنش می‌شود. نتایج بررسی‌ها نشان داده است که حذف *C-jun* منجر به بیان بیش از حد *p53* و رتینوبلاستوما (*Rb*) و القای آپوپتوز می‌شود (Eferl et al., 2003). بررسی‌های ایمونوهیستوشیمی در سرطان پستان نشان داد که رابطه اعضای خانواده AP-1 و پروتئین‌های تنظیم کننده سلول با بیان *C-jun* و بیان پروتئین *Rb* رابطه معنی داری دارد (Milde-Langosch et al., 2000). همچنین فعال شدن *C-jun* ممکن است در ایجاد سرطان پروستات مستقل از آندروژن نقش داشته باشد

## روش مطالعه

این مطالعه پس از کسب مجوز از کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی آزاد اسلامی تهران واحد علوم دارویی با کد اخلاق IR.IAU.PS.REC.1400.234 انجام گرفت.

**گروه‌های مورد آزمایش:** برای انجام تحقیق تعداد ۴۰ سر موش نژاد ویستار نر، ۵۷ هفته ای بالغ با وزن حدودی  $230 \pm 10$  گرم مورد ارزیابی قرار گرفتند و این موش‌ها در چهار گروه ۱۰ تایی تقسیم شدند. سینامالدهید به نسبت ۱ به ۱۰ با استفاده از بیکربنات سدیم به حجم ۴۰ میلی لیتر رسانده شد و pH آن به حالت نرمال تنظیم گردید و به هر موش ۱ میلی لیتر از سینامالدهید به مدت ۲ هفته گاوژ گردید. گروه ۱ شاهد که فقط آب و غذا دریافت کردند ولی همزمان با همه موش‌ها گروه دیگر کنار هم نگهداری شدند که هر تغییری که در محیط ایجاد شود روی آن‌ها نیز صورت بگیرد.

گروه ۲ دریافت کننده کارسینوژن بدون سینامالدهید که در این گروه با ایجاد سرطان تغییر بیان ژن‌های مربوطه بررسی شد. گروه ۳ موش‌ها فقط سینامالدهید دریافت کردند برای اینکه اطمینان حاصل گردد سینامالدهید به تنهایی ایجاد بیماری خاص یا تغییر بیان ژن نکند.

گروه ۴ به موش‌های این گروه کارسینوژن همراه با سینامالدهید داده شد تا مشخص گردد که سینامالدهید چقدر تغییر در بیان ژن‌های مربوطه در سلول سرطانی شده ایجاد می‌کند.

زمان بندی ایجاد کارسینوژن‌نسی: ۲۱ میلی گرم دی متیل هیدرازین بر موش‌های آلبینو ویستار نر تزریق شد و پس از مصرف آن در ۲۰ هفته متوالی به صورت روزانه مورد بررسی قرار گرفتند.

**جداسازی بافت:** بافت معده موش‌ها با رعایت اصول و موازین اخلاقی جداسازی و بررسی گردید. به منظور جداسازی معده، موش‌ها با تزریق مستقیم کتامین به قلبشان بیهوش شدند و معده خارج و درون یک پلیت استریل قرار داده شد و سپس با استفاده از تیغ و پنس استریل به ۴ بخش برش داده شدند. و نمونه‌ها وارد میکروتیوب استریل وارد گردید. پس از هموژنیزاسیون نمونه‌ها در دمای  $-70^{\circ}\text{C}$  درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

#### استخراج RNA: در بخش مولکولی به منظور استخراج RNA

ابتدا ۵۰ تا ۱۰۰ میلی‌گرم از بافت معده موش را برش داده سپس یک میلی‌لیتر تریزول را به آن اضافه نموده و به مدت ۲۴ ساعت کرایوتیوب حاوی نمونه را در دمای  $-70^{\circ}\text{C}$  درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. در ادامه نمونه توسط دستگاه هموژنایزر مکانیکی، بافت بصورت هموژن درآمد، سپس کلروفرم به مقدار ۲۰۰ میکرولیتر به نمونه اضافه شد و سپس به مدت ۱ دقیقه ورتکس گردید. در ادامه نمونه به مدت ۲ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد و سپس با دور ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. پس از اتمام فرآیند سانتریفیوژ، فاز بالایی که همان RNA است را به میکروتیوب جدید انتقال داده و ۵۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول سرد به آن اضافه شد. در

ادامه به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری گردید، سپس به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با دور ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ کرده و بعد از آن فاز بالایی دور ریخته شد. سپس یک میلی‌لیتر الکل ۷۵ درصد سرد برای شستشوی RNA به رسوب اضافه شده و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با دور ۷۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ کرده و بار دیگر فاز بالایی را دور ریخته و به رسوب باقی مانده DEPC-water افزوده شد. به منظور بررسی کمیت و کیفیت RNA استخراج شده از دستگاه نانودراپ (شرکت Thermo) استفاده شد. بدین منظور ابتدا ۲ میکرولیتر آب مقطر به عنوان بلانک به دستگاه داده شد و سپس ۲ میکرو لیتر از RNA استخراج شده بر روی حسگر دستگاه قرار داده شد و میزان غلظت RNA خوانش گردید (Dejakam et al., 2020; Zaker Bostanabad et al., 2020).

**سنتز cDNA:** برای سنتز C-DNA از کیت سنتز شرکت پارس طوس (cat no : A101161) مطابق پروتکل کیت استفاده گردید.

**طراحی پرایمرها:** طراحی primer توسط نرم افزار oligo-7 صورت پذیرفت و سنتز آن توسط شرکت سیناکلون انجام شد. جدول شماره ۱ لیست توالی پرایمرهای مورد استفاده در پژوهش حاضر را نشان می‌دهد. در این بررسی از ژن GAPDH به عنوان کنترل داخلی واکنش PCR استفاده گردید تا از صحت انجام واکنش اطمینان حاصل گردد.

**بررسی بیان ژن توسط تکنیک Real-time-PCR:** Real-time PCR توسط master-mix cyber-green از شرکت Add-byo با دستگاه Rotor-gene Q انجام شد. پرایمرهای ساخته شده از شرکت سیناکلون به صورت لیوفیلیزه تحویل گرفته شد. بر اساس اطلاعات مربوط به هر پرایمر حجم مشخصی آب مقطر دیونیزه اضافه شد که در نهایت غلظت تمام پرایمرها در حد ۱۰۰ میکرومولار (غلظت پرایمر ذخیره) باشد. پرایمرهای آماده شده در مقادیر ۱۰ پیکومول بر میکرولیتر تقسیم و در  $-20^{\circ}\text{C}$  درجه سلسیوس نگهداری شدند.

**تجزیه و تحلیل آماری:** اطلاعات کمی حاصل از Real time به صورت داده‌های Ct و بیان ژن با استفاده از روش Fold Change و توسط نرم افزار REST بدست آمد. پس از جمع‌آوری داده‌ها با استفاده از نرم افزار آماری Prism GraphPad، SPSS و روش One Way ANOVA نسخه نهایی به بررسی و تجزیه و تحلیل اطلاعات پرداخته و نتایج حاصل استخراج گردید. آنالیز با آزمون‌های T test، post hoc، و Tukey انجام شد. داده‌ها بصورت  $\text{Mean} \pm \text{SD}$  ارائه می‌شوند و سطح معنی دار شدن  $P \leq 0.05$  در نظر گرفته می‌شود. سطح معناداری  $P \leq 0.05$  در بررسی‌های ژنتیکی به این مسئله اشاره دارد که آیا تفاوت

مشاهده شده بین گروه‌های مورد مطالعه کاملاً واقعی است یا اینکه صرفاً حاصل شانس و اتفاق است.

#### جدول ۱. توالی پرایمرهای مورد استفاده

نام پرایمر	توالی پرایمر	OD	TM(°C)
<i>GAPDH</i>	F: 5'-ATCACTGCCACTCAGAAGAC	4.5	59.35
	R: 5'-ACATTGGGGGTA GGAACAC	4.3	59.35
<i>P53</i>	F: 5'-TCCCCTCCTTTCTTGCCATT	4.2	57
	R: 5'-CAGAGACCCAGC AACTACCA	4.5	56.8
<i>C-fos</i>	F: 5'-TGCAAGATCCCCAATGACCT	4.5	59.4
	R: 5'-TGAGAAGAGGCA GGGTGAAG	4.3	59.7
<i>C-jun</i>	F: 5'-TTGAAAGCGCAA AACTCCGA	4.7	50
	R: 5'-TTTTCTTCCACTG CCCCTCA	4.6	50.6

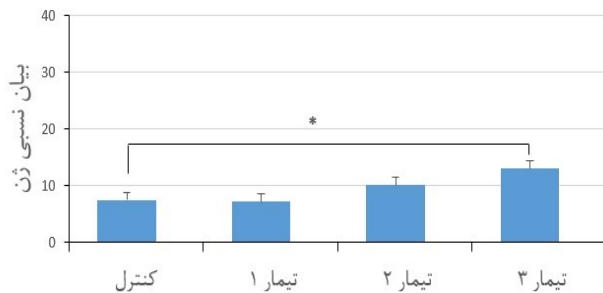
#### نتایج

آنالیز نتایج بیان ژن‌ها: به منظور محاسبه نتایج Real-time PCR از فرمول زیر استفاده گردید:

$$\text{Fold Change} = \frac{(E_{\text{target}})^{\Delta C_t \text{ target (control-treated)}}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta C_t \text{ ref (control-treated)}}$$

**نتایج ارزیابی بیان ژن *C-fos*:** نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل آماری نشان داد که در گروه تیمار ۱ (کارسینوژن فاقد سینامالدهید) نسبت به گروه کنترل (شاهد) به میزان ۱/۸۷۳ برابر کاهش بیان مشاهده شده است. در گروه تیمار ۲ (کارسینوژن همراه با سینامالدهید) نسبت به گروه کنترل، به میزان ۱/۳۴۱ برابر افزایش بیان مشاهده شده است. در گروه تیمار ۳ (سالم همراه با سینامالدهید) نسبت به گروه کنترل، به میزان ۲/۳۸۱ برابر افزایش بیان مشاهده شده است. نتایج نهایی نشان داد بیان ژن *C-fos* نسبت به گروه کنترل افزایش معناداری پیدا کرده است ( $P=0.0146$ ).

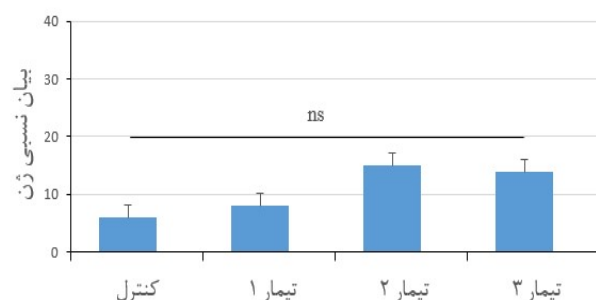
#### *C-fos* Gene



**نمودار ۱.** نمودار آنالیز آماری ژن *C-fos* بین گروه کنترل و تیمار ۳ که ارتباط معناداری را نشان داد ( $P=0.0146$ ). اما بین گروه کنترل با تیمار ۱ (کارسینوژن فاقد سینامالدهید) و تیمار ۲ (کارسینوژن همراه با سینامالدهید) هیچ ارتباط معناداری وجود ندارد. علامت ستاره دلالت بر معناداری دارد

**نتایج ارزیابی بیان ژن *C-jun*:** در گروه تیمار ۱ (کارسینوژن فاقد سینامالدهید) نسبت به گروه کنترل (شاهد)، به میزان ۹/۵۶ برابر افزایش بیان مشاهده شده است. در گروه تیمار ۲ (کارسینوژن همراه با سینامالدهید) نسبت به گروه کنترل، به میزان ۱۱/۰۹ برابر افزایش بیان مشاهده شده است. در گروه تیمار ۳ (سالم همراه با سینامالدهید) نسبت به گروه کنترل، به میزان ۸/۷۹۱ برابر افزایش بیان مشاهده شده است. نتایج نهایی نشان داد بیان ژن *C-jun* نسبت به گروه کنترل افزایش معناداری پیدا نکرده است ( $P=0.01604$ ).

#### *C-jun* Gene



**نمودار ۲-** نمودار آنالیز آماری ژن *C-jun* بین گروه کنترل و تیمارها (هر سه گروه) که ارتباط معناداری را نشان نداد ( $P=0.1604$ ). خط پیوسته بالای نمودار نشان می‌دهد میان گروه کنترل و تیمارها ارتباط غیرمعنا دار می‌باشد.

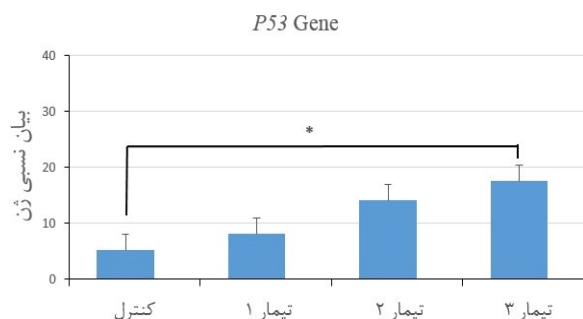
**نتایج ارزیابی بیان ژن *P53*:** در گروه تیمار ۱ (کارسینوژن فاقد سینامالدهید) نسبت به گروه کنترل (شاهد)، به میزان ۳/۴۲ برابر افزایش بیان مشاهده شده است. در گروه تیمار ۲ (کارسینوژن همراه با سینامالدهید) نسبت به گروه کنترل، به میزان ۸/۲۵ برابر افزایش بیان مشاهده شده است. در گروه تیمار ۳ (سالم همراه با سینامالدهید) نسبت به گروه کنترل، به میزان ۵۵/۵۹ برابر افزایش بیان مشاهده شده است.

عصاره دارچین بر روی رده‌های سلولی سرطانی از جمله سرطان لنفوما، سرطان مالنوما، سلول‌های سرطانی دهانه رحم، سرطان روده بزرگ موثر است و می‌تواند از تکثیر این تومورها جلوگیری نماید و یا سرعت تکثیر آن‌ها را کند نماید (Kwon et al., 2010). نتایج این ارزیابی نشان داد که اثر ضد توموری دارچین به طور مستقیم با افزایش فعالیت پروآپوپتوزی و مهار فعالیت‌های ژن‌های هدف آن‌ها مرتبط است. در واقع می‌توان عنوان نمود دارچین می‌تواند با استفاده از مواد موثره خود مانند سینامالدهید بر روی فرآیند تقسیم و تهاجم سلول‌های توموری نقش مهارکنندگی داشته باشد. در بررسی حاضر نیز این موضوع کاملاً تایید شد چون پس از تیمار موش‌های مبتلا به سرطان معده با سینامالدهید مشخص شد تغییر بیان ژن‌های کلیدی سرطان کاملاً مشاهده می‌شود. در این بررسی بیان ژن‌های *C-jun*، *C-fos* و *P53* در دریافت‌کننده کارسینوژن همراه با سینامالدهید نسبت به گروه شاهد تغییراتی پیدا کرده است پس می‌توان به اثر مهم سینامالدهید بر روی بیان ژن‌هایی مانند *P53* توجه نمود چون مطابق بررسی‌های انجام شده در سال‌های اخیر مشخص شده است که این ژن در تمامی سرطان‌ها تغییر بیان پیدا می‌نماید. با توجه به این موضوع که ثابت شده است بیان بیش از حد *C-jun* در سلول‌ها منجر به کاهش سطح *P53* و تسریع تکثیر سلولی می‌شود، پس می‌توان عنوان نمود اگر از تغییر این دو ژن جلوگیری نماید می‌تواند سلول‌ها را در سطح هموستازی نرمال حفظ نماید و از توموری شدن آن‌ها جلوگیری نماید.

Jiao و همکارانش در سال ۲۰۱۰ به بررسی نقش ژن *C-jun* در تهاجم سلول‌های اپیتلیال پستانی و گسترش سلول‌های سرطان پستان پرداختند و مشخص شد که ژن *C-jun* در سرطان پستان بیش از حد بیان می‌شود (Jiao et al., 2010). در بررسی حاضر افزایش بیان ژن *C-jun* تایید گردید اگرچه این افزایش بیان به لحاظ آماری معنادار نبود ( $P=0.01604$ ). اما افزایش بیان مشاهده گردید (نمودار ۲) که این موضوع تایید کننده تحقیقات گذشته Jiao و همکارانش می‌باشد.

Liang-Tzunng و همکاران در سال ۲۰۱۳ خواص ضد سرطانی و مکانیسم‌های القاء‌کننده آپوپتوز سینامالدهید را در سلول‌های هپاتوم انسانی مورد ارزیابی قرار دادند. نتایج این بررسی مشخص نمود که سینامالدهید می‌تواند موجب مرگ سلول‌های سرطانی با تغییرات در سطوح بیان ژن‌های موثر در فرآیند آپوپتوز گردد، یکی از ژن‌هایی که در فرآیند مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی بسیار کلیدی است ژن *P53* می‌باشد که در بررسی Lin تغییر بیان پیدا کرده بود با توجه به اینکه این ژن نگهبان ژنوم است لذا تغییرات ناشی از آن بسیار بر روی ساختارهای سلولی و خروج سلول‌ها از حالت عادی و ورود آن به سیکل توموری موثر می‌باشد (Lin et al., 2013). این موضوع در بررسی حاضر نیز تایید گردید و مشخص شد بیان ژن *P53* تحت تاثیر سینامالدهید تغییر معناداری ( $P=0.0212$ )، نموده است با توجه به این

نتایج نهایی نشان داد بیان ژن *P53* نسبت به گروه کنترل افزایش معناداری پیدا کرده است ( $P=0.0212$ ).



**نمودار ۳-** نمودار آنالیز آماری ژن *P53* بین گروه کنترل و تیمار ۳ ارتباط معناداری را نشان داد ( $P=0.0212$ ). اما بین گروه کنترل با تیمار ۱ (کارسینوژن فاقد سینامالدهید) و تیمار ۲ (کارسینوژن همراه با سینامالدهید) هیچ ارتباط معناداری وجود ندارد. علامت ستاره دلالت بر معناداری دارد.

## بحث

این مطالعه با هدف ارزیابی اثر سینامالدهید بر تغییرات بیان ژن‌های *c-jun*، *C-fos* و *P53* در سلول‌های سرطانی شده بافت معده ی موش نژاد نر ویستار توسط دی متیل هیدرازین انجام شد. بررسی آماری نتایج حاصله نشان داد بیان ژن‌های *C-jun*، *C-fos* و *P53* در دریافت‌کننده کارسینوژن همراه با سینامالدهید نسبت به گروه شاهد افزایش پیدا کرده است. که این افزایش برای دو ژن *C-fos* ( $P=0.0146$ ) و *P53* ( $P=0.0212$ ) که به لحاظ آماری معنی دار است و برای ژن *C-jun* ( $P=0.01604$ ) این افزایش معنی دار نبود (نمودارهای ۱-۳).

Cabello و همکارانش در سال ۲۰۰۹ در یک بررسی مشخص کردند سینامالدهید بر روی تکثیر سلول‌های ملانوما، تهاجم و رشد تومور اثر گذار است و می‌تواند سرعت موارد فوق را کاهش دهد. پس می‌توان از سینامالدهید جهت جلوگیری از تکثیر و تهاجم این سرطان استفاده نمود. نتایج این ارزیابی به خوبی نشان داد که تجویز خوراکی سینامالدهید، باعث فعالیت ضدملانوما می‌گردد. در حقیقت می‌توان عنوان نمود سینامالدهید به عنوان یک آنتی تومور نقش موثری دارد و می‌تواند تکثیر سلول‌های ملانوما را در محیط آزمایشگاه کاهش دهد. پس در مقام مقایسه نتایج بدست آمده با نتایج گزارش شده توسط Cabello و همکاران همسو می‌باشد. این موضوع نشان دهنده ی این است که سینامالدهید می‌تواند بر روی مسیر سیگنالینگ سلولی بخصوص سلول‌های سرطانی شده توسط دی متیل هیدرازین موثر باشد (Cabello et al., 2009)

Kwon و همکاران در سال ۲۰۱۰ در بررسی خود به ارزیابی اثرات ضد سرطان و ضد تومور عصاره ی دارچین پرداختند و نشان دادند که

## نتیجه‌گیری

با در نظر گرفتن تمامی نتایج بدست آمده در پژوهش حاضر و مقایسه این نتایج با بررسی‌های گذشته می‌توان عنوان نمود، در فرآیند سرطان یکسری ژن‌های بسیار کلیدی وجود دارند که در تنظیم سیکل سلولی و همچنین القاء فرآیند مرگ برنامه ریزی شده سلول یا همان آپوپتوز نقش اساسی را بر عهده دارند از جمله *C-fos*، *C-Jun* و *P53* که در تمامی بررسی‌ها نتایج مشابهی با تحقیق حاضر گزارش شده است یعنی این ژن‌ها در طی فرآیند سرطانی شدن بافت تغییرات سطح بیان خواهند داشت. پس چنانچه بتوان بیان این ژن‌ها را مدیریت کرد مثلاً با استفاده از *amiRNA*، *siRNA*ها و یا داروهای گیاهی موثر می‌توان امیدوار بود بتوان سرطان را تا حدودی کنترل نمود و به درمان هدفمند این بیماری مهملک کمک کرد.

## تقدیر و تشکر

بدین وسیله نویسندگان مقاله از تمامی همکاران و پرسنل زحمتکش مرکز حیوانات و آزمایشگاه بیمارستان بقیه الله تهران که در طول این تحقیق همراه و همیار ما بوده‌اند، بی نهایت سپاس‌گزاری و قدردانی می‌گردد.

## مراجع

- Baranovsky, A. and Myers, M.H. 1986. Cancer incidence and survival in patients 65 years of age and older. CA: a cancer journal for clinicians, 36(1): 26-41.
- Cabello, C.M., Bair III, W.B., Lamore, S.D., Ley, S., Bause, A.S., Azimian, S. and Wondrak, G.T. 2009. The cinnamon-derived michael acceptor cinnamic aldehyde impairs melanoma cell proliferation, invasiveness, and tumor growth. Free Radical Biology and Medicine, 46(2): 220-231.
- Dejakam, A., Dejakam, A. and Hekmat, A. 2020. Evaluating of bdnf expression in blood cells of opium recovering patients with a new treatment method: A molecular marker. Research in Karyotic Cell & Tissue, 1(1): 16-25.
- Edwards, J., Krishna, N.S., Mukherjee, R. and Bartlett, J.M. 2004. The role of c-jun and c-fos expression in androgen-independent prostate cancer. The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland, 204(2): 153-158.
- Eferl, R., Ricci, R., Kenner, L., Zenz, R., David, J.-P., Rath, M. and Wagner, E.F. 2003. Liver tumor development: C-jun antagonizes the proapoptotic activity of p53. Cell, 112(2): 181-192.
- Fialka, I., Schwarz, H., Reichmann, E., Oft, M., Busslinger, M. and Beug, H. 1996. The estrogen-dependent c-jun protein causes a reversible loss of mammary epithelial cell polarity involving a destabilization of adherens junctions. The Journal of cell biology, 132(6): 1115-1132.
- Gutzeit, H.O. and Ludwig-M, J. 2014. Plant natural products: Synthesis, biological functions and practical applications. John Wiley & Sons.
- Guzowski, J.F., Setlow, B., Wagner, E.K. and McGaugh, J.L. 2001. Experience-dependent gene expression in the rat hippocampus after spatial learning: A comparison of the immediate-early genes c-fos, and zif268. Journal of Neuroscience, 21(14): 5089-5098.
- Hanahan, D. 2012. Hallmarks of cancer: A 2012 perspective. Annals of oncology, 23: ix23.
- Hartgrink, H.H., Jansen, E.P., van Grieken, N.C. and van de Velde, C.J. 2009. Gastric cancer. The Lancet, 374(9688): 477-490.
- Kristiniak, S., Harpel, J., Breckenridge, D.M. and Buckle, J. 2012. Black pepper essential oil to

موضوع که در تیمار ۳ (موش‌های سالم همراه با سینامالدهید) نسبت به گروه شاهد، به میزان ۵۵/۵۹ برابر بیان ژن *P53* افزایش یافته است، می‌توان نتیجه گرفت سینامالدهید می‌تواند موجب افزایش بیان این ژن بسیار مهم در سیکل سلولی گردد و این موضوع بسیار مهم است چون این ژن با افزایش بیان خود نقش بنیادینی در سرکوب تومورها دارد(نمودار ۳).

Yue و همکاران در سال ۲۰۱۷ مشخص نمودند که بیان ژن *P53* در سلول‌های سرطانی تغییر می‌نماید (Yue et al., 2017). نتایج این حاصل شده از تحقیق حاضر نیز کاملاً تایید کننده این موضوع است زیرا در بررسی حاضر مشخص شد بیان ژن *P53* در سلول‌های تومور معده موش افزایش معناداری پیدا کرده است ( $P=0.0212$ ).

Muhammad و همکارانش در سال ۲۰۱۷ به بررسی نقش ژن *C-fos* در سرطان سر و گردن پرداختند، در این بررسی مشخص شد که بیان بیش از حد ژن *C-fos* در رده ی سلولی توموری دیده می‌شود (Muhammad et al., 2017) در بررسی حاضر نیز بیان ژن *C-fos* در موش‌هایی که در آن‌ها سرطان معده توسط دی متیل هیدرازین القاء شده است تغییر معناداری ( $P=0.0146$ ) پیدا کرده است (نمودار ۱) که با بررسی Muhammad و همکارانش کاملاً همسو می‌باشد و هر دو گروه به تغییر بیان بیش از حد ژن *C-fos* در طی فرآیند سرطانی شدن تاکید دارند.

- enhance intravenous catheter insertion in patients with poor vein visibility: A controlled study. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 18(11): 1003-1007.
- Kwon, H.-K., Hwang, J.-S., So, J.-S., Lee, C.-G., Sahoo, A., Ryu, J.-H., Jeon, W.K., Ko, B.S., Im, C.-R. and Lee, S.H. 2010. Cinnamon extract induces tumor cell death through inhibition of nfkb and ap1. *BMC cancer*, 10(1): 1-10.
- Lieu, C.H., William, W.N. and Lippman, S.M. 2011. Cancer chemoprevention. In: *Principles of anticancer drug development*. Springer: pp: 463-481.
- Lin, L.-T., Wu, S.-J. and Lin, C.-C. 2013. The anticancer properties and apoptosis-inducing mechanisms of cinnamaldehyde and the herbal prescription huang-lian-jie-du-tang (黃連解毒湯 huáng lián jiě dú tang) in human hepatoma cells. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 3(4): 227-233.
- Long, Y., Wu, Z., Yang, X., Chen, L., Han, Z., Zhang, Y., Liu, J., Liu, W. and Liu, X. 2016. MicroRNA-101 inhibits the proliferation and invasion of bladder cancer cells via targeting c-fos. *Molecular medicine reports*, 14(3): 2651-2656.
- Malekzadeh, R., Derakhshan, M.H. and Malekzadeh, Z. ۲۰۰۹. Gastric cancer in iran: Epidemiology and risk factors.
- Mancini-Filho, J., Van-Koij, A., Mancini, D., Cozzolino, F. and Torres, R. 1998. Antioxidant activity of cinnamon (*cinnamomum zeylanicum*, breyne) extracts. *Bollettino chimico farmaceutico*, 137. ۴۴۷-۴۴۳ : (۱۱)
- Milde-Langosch, K. 2005. The fos family of transcription factors and their role in tumourigenesis. *European journal of cancer*, 41(16): 2449-2461.
- Milde-Langosch, K., Bamberger, A.M., Methner, C., Rieck, G. and Löning, T. 2000. Expression of cell cycle-regulatory proteins rb, p16/mts1, p27/kip1, p21/waf1, cyclin d1 and cyclin e in breast cancer: Correlations with expression of activating protein-1 family members. *International journal of cancer*, 87(4): 468-472.
- Muhammad, N., Bhattacharya, S., Steele, R., Phillips, N. and Ray, R.B. 2017. Involvement of c-fos in the promotion of cancer stem-like cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. *Clinical Cancer Research*, 23(12): 3120-3128.
- Murcia, M.A., Egea, I., Romojaro, F., Parras, P., Jiménez, A.M. and Martínez-Tomé, M. 2004. Antioxidant evaluation in dessert spices compared with common food additives. Influence of irradiation procedure. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(7): 1872-1881.
- Nassr-Allah, A.A., Aboul-Enein, A.M., Aboul-Enein, K.M., Lightfoot, D.A., Cocchetto, A. and El-Shemy, H.A. 2009. Anti-cancer and antioxidant activity of some egyptian medicinal plants. *Journal of Medicinal Plants Research*, 3(10): 799-808.
- Nateri, A.S., Spencer-Dene, B. and Behrens, A. 20۰۰. Interaction of phosphorylated c-jun with tcf4 regulates intestinal cancer development. *Nature*, 437(7056): 281-285.
- Ranasinghe, P., Pigera, S., Premakumara, G., Galappaththy, P., Constantine, G.R. and Katulanda, P. 2013. Medicinal properties of 'true'cinnamon (*cinnamomum zeylanicum*): A systematic review. *BMC complementary and alternative medicine*, 13(1): 1-10.
- Sadeghi, S., Davoodvandi, A., Pourhanifeh, M.H., Sharifi, N., ArefNezhad, R., Sahebnaasagh, R., Moghadam, S.A., Sahebkar, A. and Mirzaei, H. 2019. Anti-cancer effects of cinnamon: Insights into its apoptosis effects. *European journal of medicinal chemistry*, 178: 131-140.
- Soussi, T. 2000. P53 antibodies in the sera of patients with various types of cancer: A review. *Cancer research*, 60(7): 1777-178. ^
- Ukiya, M., Akihisa, T., Yasukawa, K., Tokuda, H., Suzuki, T. and Kimura, Y. 2006. Anti-inflammatory, anti-tumor-promoting, and cytotoxic activities of constituents of marigold (*calendula officinalis*) flowers. *Journal of natural products*, 69(12): 1692-1. ۶۹۶
- Venkatachalam, K., Vinayagam, R., Arokia Vijaya Anand, M., Isa, N.M. and Ponnaiyan, R. 2020. Biochemical and molecular aspects of 1, 2-dimethylhydrazine (dmh)-induced colon carcinogenesis: A review. *Toxicology research*, 9(1): 2-18.
- Vleugel, M.M., Greijer, A.E., Bos, R., van der Wall, E. and van Diest, P.J. 2006. C-jun activation is associated with proliferation and angiogenesis in invasive breast cancer. *Human pathology*, 37(6): 668-674.
- Vogt, P.K. 2012. Retroviral oncogenes: A historical primer. *Nature Reviews Cancer*, 12(9): 639-648.
- Yue, X., Zhao, Y., Xu, Y., Zheng, M., Feng, Z. and Hu, W. 2017. Mutant p53 in cancer: Accumulation, gain-of-function, and therapy. *Journal of molecular biology*, 429(11): 1595-1606.
- Zaker Bostanabad, S., Darmanlo, S. and Darmanloo, S. 2020. Evaluation of vegfa and mthfd1 polymorphism in the blood cells of iranian women with recurrent miscarriage. *Research in Karyotic Cell & Tissue*, 1(1): 9-15.



Research Article

## The effect of Cinnamaldehyde on changes in the expression of *C-jun*, *C-fos*, *P53* genes in cancer cells of Wistar rat's gastric tissue by dimethylhydrazine

Mahdi Azadmanesh<sup>1</sup>, Tahereh Najji <sup>2,\*</sup>, Abdolreza Mohammadnia<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Pharmacy Student, Department of Basic Sciences School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Tehran University of Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran

<sup>2</sup> Associate Professor, Department of Basic Sciences, Faculty of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Tehran University of Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran

<sup>3</sup> Assistant Professor, Chronic Respiratory Diseases Research Center, Tuberculosis and Pulmonary Diseases Research Institute, Tuberculosis and Pulmonary Diseases Research Center, Masih Daneshvari Hospital Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

\*Correspondence to Tahereh Najji, Ph.D., najji\_t@iaups.ac.ir / [tnaji2002@gmail.com](mailto:tnaji2002@gmail.com)

Received 5<sup>th</sup> August 2021    Revised 12<sup>th</sup> October 2021    Accepted 12<sup>th</sup> December 2021

### Abstracts

**Introduction and aim:** Genes play a very important role in the development of cancer. This study aimed to evaluate three very important genes (*C-fos*, *C-jun*, and *P53*) in Wistar mice's stomach tissue cancer cells designed by dimethylhydrazine.

**Methods:** In this study, forty male Wistar mice, 57 weeks old, were evaluated and divided into four groups of 10. In the control group, the second group received Cinnamaldehyde-free carcinogens, the third group was healthy with the Cinnamaldehyde, and the fourth group received carcinogens with the Cinnamaldehyde at the same time. Then, the gastric tissue of mice was isolated and evaluated for the expression of *C-fos*, *C-Jun*, and *P53* genes. The data were analyzed with One-way ANOVA using SPSS.

**Results:** Statistical analysis of the results showed that the expression of *C-fos*, *C-Jun*, and *P53* genes in the carcinogen receptor with the Cinnamaldehyde was increased compared to the control group. This increase was statistically significant for two genes *C-fos* ( $P = 0.0146$ ) and *P53* ( $P = 0.0212$ ) and for the *C-Jun* gene ( $P = 0.01604$ ) this increase was not significant.

**Conclusion:** The results of this study showed that Cinnamaldehyde can alter the expression of important genes *C-fos*, *C-Jun*, and *P53* that are effective in causing gastric cancer.

**Keywords:** Gastric cancer, Cinnamaldehyde, Dimethyl hydrazine, gene expression changes