

تأثیر اسید سیتریک بر بیان ژن‌های $p53$ و $p21$ در سلول‌های

آدنوکارسینومای روده بزرگ انسان

علی رضا موجودی^۱، لیلا روحی^{۲*}، خلیل خاشعی ورنامخواستی^۳

۱. کارشناس ارشد، گروه بیوشیمی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

۲. استادیار، گروه فیزیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

۳. مربی، گروه ژنتیک، دانشکده پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی کازرون، کازرون، ایران

چکیده

زمینه و هدف: علیرغم پیشرفت‌های صورت گرفته در زمینه‌ی درمان آدنوکارسینومای روده بزرگ، مبتلایان همچنان دارای میزان بقاء پایینی هستند. اسید سیتریک به عنوان یک مهارکننده‌ی فیزیولوژیکی آنزیم‌های دخیل در مسیر گلیکولیز، در راستای حذف سلول‌های سرطانی مورد توجه می‌باشد. ژن‌های $p53$ و $p21$ بخاطر داشتن خاصیت پروآپتوزی در حذف سلول دخیل هستند. در این مطالعه اثر اسید سیتریک بر میزان بیان ژن‌های $p53$ و $p21$ در رده سلولی آدنوکارسینومای روده بزرگ انسان (HT-29) مورد بررسی قرار گرفت.

روش‌ها: در این مطالعه سلول‌های رده‌ی HT-29 با غلظت‌های مختلف اسید سیتریک شامل ۴۰۰، ۸۰۰ و ۱۶۰۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر برای بررسی بیان ژن‌های $p53$ و $p21$ ظرف مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت انکوبه شدند. سپس میزان بیان از طریق آنالیز Real Time-PCR مورد بررسی قرار گرفت. تحلیل آماری با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۸ و آزمون ANOVA انجام شد.

نتایج: طبق نتایج، تیمار با اسید سیتریک سبب افزایش معنی‌داری در بیان ژن‌های $p21$ ($P=0.044$) و $p53$ ($P=0.036$) در برخی از گروه‌های آزمایشی (۸۰۰ و ۱۶۰۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر برای ژن $p53$ و ۱۶۰۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر برای ژن $p21$) نسبت به گروه کنترل گردید.

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد اسید سیتریک می‌تواند با القاء بیان ژن‌های دخیل در مسیر آپوپتوز، به عنوان یک ماده‌ی ضد سرطان در راستای درمان سرطان روده بزرگ بکار رود.

کلید واژه‌ها:

اسید سیتریک، آدنوکارسینوما روده بزرگ، بیان ژن، ژن $p53$ ، ژن $p21$

تمامی حقوق نشر برای دانشگاه علوم پزشکی تربت حیدریه محفوظ است.

مقدمه

شیوه‌ی زندگی و عادات فردی عامل بخش قابل توجهی از افزایش بروز سرطان روده بزرگ می‌باشند. تغییر رژیم غذایی به عنوان یک عادت فردی می‌تواند نقش بالقوه‌ای در کاهش اساسی مرگ ناشی از سرطان روده بزرگ داشته باشد (۴). درمان اصلی سرطان روده بزرگ در مراحل اولیه جراحی و در مراحل پیشرفته اقدامات جراحی به همراه شیمی درمانی و رادیو درمانی می‌باشد که متأسفانه این روش درمانی در بسیاری از موارد عود را نشان می‌دهد و درمان قطعی به حساب

امروزه سرطان یکی از معضلات مهم و اساسی بهداشت و درمان در سراسر جهان است. در بین انواع سرطان‌ها، آدنوکارسینومای روده بزرگ یکی از شایع‌ترین بدخیمی‌ها و جزء اصلی مرگ و میر ناشی از سرطان در جهان به حساب می‌آید (۱،۲). آدنوکارسینومای روده بزرگ سومین سرطان شایع در مردان و دومین سرطان شایع در زنان می‌باشد. در کشور ایران نیز آدنوکارسینومای روده بزرگ سومین سرطان شایع در بین زنان و پنجمین در بین مردان است (۳).

*آدرس نویسنده مسئول: شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد، گروه فیزیولوژی

آدرس پست الکترونیک: lrouhi59@gmail.com

فیزیولوژیکی آنزیم‌های دخیل در مسیر گلیکولیز، در راستای حذف سلول‌های سرطانی از طریق القای مرگ برنامه ریزی شده نیز مورد توجه می‌باشد (۱۲).

ارتباط بین گلیکولیز و آپوپتوز به سطح آنزیم هگزوکیناز II بستگی دارد. آنزیم هگزوکیناز II گلوکز را به گلوکز ۶ فسفات تبدیل می‌نماید و باعث پیشبرد فرآیند گلیکولیز به وسیله‌ی آبشار آنزیمی می‌شود و زمانی که منافذ غشاء خارجی میتوکندری باز هستند، باعث پایداری یک جزء ساختاری این منافذ تحت عنوان VDAC شده که نقش آن تنظیم نفوذپذیری منافذ می‌باشد. لذا پایداری ایجاد شده در این جزء توسط هگزوکیناز II نفوذپذیری را در غشاء خارجی غیرفعال می‌کند. با حذف هگزوکیناز II از مجموعه، نفوذپذیری در غشاء خارجی میتوکندری القاء می‌گردد که به دنبال آن سیتوکروم C به درن سیتوپلاسم ترشح شده و آبشار کاسپازی به راه می‌افتد و آپوپتوز القاء می‌گردد. اسید سیتریک از طریق تأثیرگذاری بر سطح آنزیم هگزوکیناز II و دیگر آنزیم‌های دخیل در مسیر گلیکولیز عملکرد ضد سرطانی خود را اعمال می‌نماید (۱۵-۱۳). با توجه به نیاز به تحقیقات هر چه بیشتر جهت تایید اثرات ضد سرطانی اسید سیتریک، در مطالعه حاضر اثر اسید سیتریک بر میزان بیان ژن‌های *p53* و *p21* در رده سلولی آدنوکارسینومای روده بزرگ انسان (HT-29) مورد بررسی قرار گرفت.

روش‌ها

این مطالعه به صورت تجربی از اردیبهشت ۱۳۹۷ تا شهریور ۱۳۹۷ در مرکز تحقیقات سلولی-تکوینی و مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد انجام شد. رده‌ی سلولی HT-29 از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران خریداری شد. در محیط کشت DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's medium) (Gibco, USA) حاوی ۱۰ درصد FBS (Foetal Bovine Serum) (Gibco, USA) و یک درصد Penstrep (Penicillin-Streptomycin) (Gibco, USA) در انکوباتور (Memmert, Germany) با فشار ۵٪ گاز CO₂

نمی‌آید (۵). بنابراین یک نیاز فوری برای ایجاد راهکارهای درمانی موثرتر، به منظور بهبود طول بقا مبتلایان وجود دارد. از آنجائیکه مقاومت به مرگ سلولی و عدم وجود تعادل بین تقسیم سلولی و مرگ سلولی، منجر به عدم کنترل تکثیر سلول‌های توموری می‌شود، هم‌اکنون توجه‌ها به سوی شناسایی ترکیبات درمانی که قادر به القاء آپوپتوز در سلول‌های توموری باشند، جلب شده است. برخی از این ترکیبات با هدف قرار دادن پروتئین‌های ضد آپوپتوزی منجر به افزایش پروتئین‌های پروآپوپتوزی از جمله BAX، *p53* و *p21* می‌شوند. پروتئین *p53* توسط ژن سرکوبگر تومور *p53* واقع بر روی کروموزوم شماره‌ی ۱۷ رمزگذاری می‌شود. سطح این پروتئین به محض وقوع آسیب به DNA، به منظور ترمیم DNA یا القاء آپوپتوز افزایش می‌یابد. در این زمان پروتئین *p53* از طریق اتصال به DNA باعث تحریک ژن *WAF1* می‌شود که این ژن سازنده‌ی پروتئین P21 است. پروتئین P21 به پروتئین CDK2 می‌چسبد و اجازه‌ی ورود سلول به مرحله‌ی بعد را نمی‌دهد و چرخه سلولی را به منظور انجام ترمیم متوقف می‌کند. در صورت عدم ترمیم، پروتئین *p53* از طریق افزایش بیان پروتئین پروآپوپتوزی BAX آپوپتوز را القاء می‌کند و بدین طریق باعث مرگ سلول‌های توموری می‌شود (۶،۷).

از جمله‌ی این ترکیبات می‌توان به ترکیبات با منشأ طبیعی اشاره کرد. استفاده از ترکیبات طبیعی به عنوان دارو بخاطر اثرات جانبی کمتر در مقایسه با ترکیبات شیمیایی، مورد توجه می‌باشد (۸، ۹). از گذشته ترکیبات طبیعی منبع منحصر به فردی برای تأمین داروهای مصرفی جامعه‌ی بشری بوده‌اند و به خاطر عدم بروز مشکلات بیشتر در اثر استفاده از آن‌ها نقش مهمی در درمان بیماری‌های انسانی ایفا نموده‌اند (۱۰). اسید سیتریک یک اسید آلی طبیعی است که عموماً در عصاره‌ی برخی از میوه‌جات و سبزیجات، به ویژه مرکبات یافت می‌شود. این اسید امروزه به طور گسترده به عنوان یکی از افزودنی‌ها و نگهدارنده‌های مواد غذایی در صنعت مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۱). بعلاوه اسید سیتریک به عنوان یک مهارکننده‌ی

(Takara)، به cDNA تبدیل و به فریزر ۲۰- درجه سانتی گراد منتقل شدند. سنجش میزان بیان ژن‌های *p53* و *P21* با استفاده از دستگاه Real Time PCR مدل (Rotor gene 3000 corbett, Australia) با سه بار تکرار مورد ارزیابی قرار گرفت. برای انجام واکنش، مخلوط واکنشی متشکل از cDNA، به مقدار ۱ میکرولیتر، پرایمر رفت و برگشت هر کدام به مقدار ۰/۵ میکرولیتر، RNase-free water، به مقدار ۵/۵ میکرولیتر و ۱۲/۵ میکرولیتر مخلوط حاوی آنزیم (Master Mix RT-PCR) (Ampliqon) تهیه گردید. توالی پرایمرهای رفت (Forward) و برگشت (Reverse) ژن‌های *GAPDH*، *p53* و *P21* با استفاده از نرم افزار Oligo6 طراحی و سپس با Blast نمودن آن‌ها در NCBI از صحیح بودن آن‌ها اطمینان حاصل شد و نهایتاً توسط شرکت Macrogen سنتز شدند (جدول ۱).

از ژن *GAPDH*، به عنوان کنترل داخلی استفاده شد. سپس مخلوط واکنش پس از آماده سازی با حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر تحت تأثیر برنامه‌ی دمایی ذکر شده در جدول ۲ قرار گرفت. نهایتاً بررسی آماری با استفاده از آزمون آنالیز واریانس دوطرفه از طریق نرم افزار SPSS ورژن ۱۸ انجام شد (جدول ۳). حدود اطمینان برای همه‌ی آزمایشات ۹۵٪ در نظر گرفته شد و $P < 0/05$ معنی‌دار محسوب گردید.

رطوبت ۹۰٪ و دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی گراد، در فلاسک ۷۵ کشت داده شد. محیط کشت هفته‌ای سه بار تعویض و برای برداشت کردن سلول‌ها از محلول تریپسین/EDTA استفاده شد. اسید سیتریک به صورت آماده و به حالت جامد از شرکت SIGMA-ALDRICH با نام تجاری Citric acid- anhydrous، cell culture tested و شماره محصول C۲۴۰۴ تهیه گردید. به منظور بررسی میزان بیان ژن‌های *p53* و *P21*، تعداد 3×10^6 سلول در پلیت‌های ۶ خانه کشت داده شد و سپس، با غلظت‌های ۴۰۰، ۸۰۰ و ۱۶۰۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر اسید سیتریک (۱۶) در بازه‌های زمانی ۲۴ و ۴۸ ساعت تیمار شدند. پس از گذشت ۲۴ و ۴۸ ساعت، سلول‌ها در سه گروه تست (شامل سه غلظت مختلف) و گروه کنترل، برداشت و پس از شستشو با بافر PBS، Total RNA سلولی با استفاده از معرف بایوزول (Biozol Total RNA Extraction reagent)، با شماره محصول (BSC51M1)، (BioFlux, China)، جدا گردید. سپس با استفاده از کیت فرمنتاس (DNase I, RNase free) روی نمونه‌های RNA استخراج شده، تیمار DNase صورت گرفت تا DNA حذف شود و فقط RNA خالص در نمونه موجود باشد. در ادامه تمام توالی‌های RNA با استفاده از کیت سنتز cDNA (PrimeScript™ RT Reagent kit (Perfect Real Time))

جدول ۱. مشخصات پرایمرهای مورد مطالعه

ردیف	نام ژن	شناسه ژن	توالی پرایمر	طول پرایمر
۱	<i>p53</i>	NM_00546.5	رفت CATAGTGTGGTGGTGCCT	۲۰ جفت باز
			برگشت ACCTCAAAGCTGTTCCGTCC	۲۰ جفت باز
۲	<i>P21</i>	NM-001291549.1	رفت CATGTGGACCTGTCCTGTCTT	۲۲ جفت باز
			برگشت CTGGTCTGCCGCCGTTTTC	۱۹ جفت باز
۳	<i>GAPDH</i>	NM-001256799.2	رفت CACATGGCCTCCAAGGAGTAAG	۲۲ جفت باز
			برگشت AGGGGAGATTCAAGTGTGGTG	۲۰ جفت باز

نتایج

میکروگرم/ میلی‌لیتر) بعد از گذشت زمان‌های دو گانه‌ی انکوباسیون (۲۴ و ۴۸ ساعت) با استفاده از تست Real Time-PCR مورد بررسی قرار گرفت.

میزان بیان ژن‌های *p53* و *p21* در رده سلولی HT-29 تیمار شده با غلظت‌های مختلف اسید سیتریک (۴۰۰، ۸۰۰ و ۱۶۰۰

جدول ۲. شرایط دمایی واکنش Rael Time PCR

مرحله واکنش PCR	زمان	دما	چرخه
دنا تورا سیون اولیه	۱۰ دقیقه	۹۵ درجه‌ی سانتی گراد	۱ سیکل
دنا تورا سیون	۱۵ ثانیه	۹۵ درجه‌ی سانتی گراد	
آنیلینگ ژن <i>p21</i>	۶۰ ثانیه	۶۲ درجه‌ی سانتی گراد	
آنیلینگ ژن <i>p53</i>	۶۰ ثانیه	۶۲ درجه‌ی سانتی گراد	
آنیلینگ ژن <i>GAPDH</i>	۶۰ ثانیه	۶۱ درجه‌ی سانتی گراد	۴۰ سیکل

در زمان‌های انکوباسیون ۲۴ و ۴۸ ساعت ($P=0/036$) و افزایش ۲ برابری بیان ژن *p21* در زمان انکوباسیون ۲۴ و ۲/۳ برابری در زمان ۴۸ ساعت ($P=0/044$) در غلظت ۱۶۰۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر نسبت به گروه کنترل معنی‌دار بود (شکل ۱ و ۲).

تجزیه و تحلیل مقادیر Ct حاصل از دستگاه Real Time PCR با استفاده از فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ، بیانگر افزایش در میزان بیان هر دو ژن *p21* و *p53* در مقایسه با ژن مرجع در برخی از غلظت‌های مشخص می‌باشد. به طوری که افزایش حدود ۲ برابری بیان ژن *p53* در غلظت‌های ۱۶۰۰ و ۸۰۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر به ترتیب

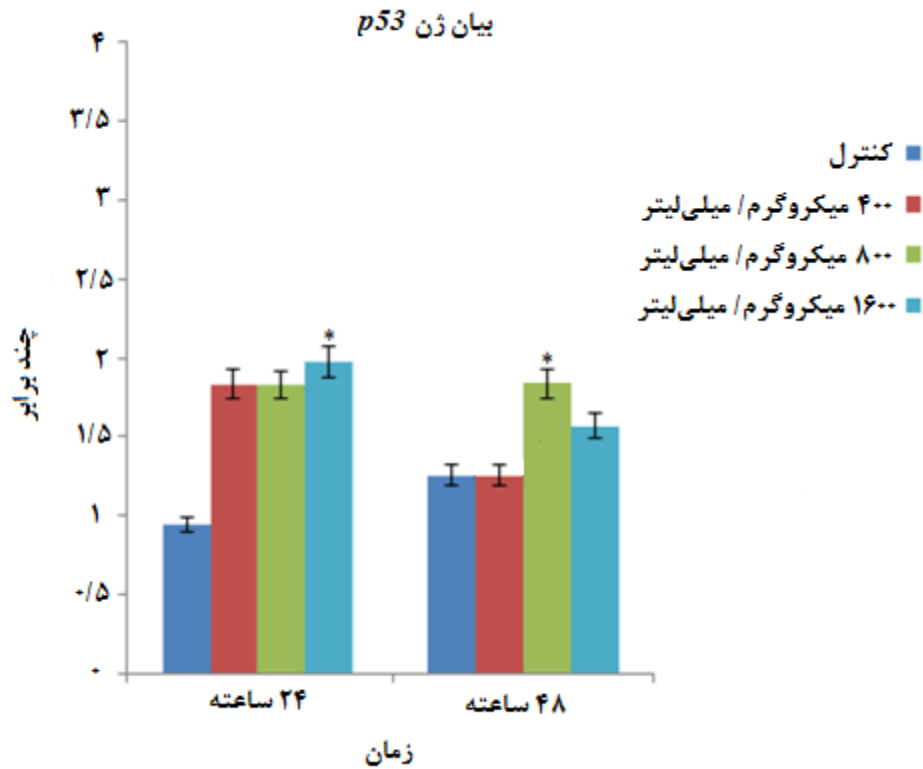
جدول ۳. نتایج آنالیز واریانس دوطرفه برای بیان ژن‌های *p21* و *p53*

نام ژن	گروه	انحراف معیار \pm میانگین	سطح معنی داری
	کنترل	۱±۰	
<i>p53</i>	۴۰۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر (۴۸، ۲۴)	۱۳/۲۱±۰/۲۶، ۳۳/۷۳±۲/۲۶	۰/۰۳۶
	۸۰۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر (۴۸، ۲۴)	۳۱/۹۳±۳/۳۵، ۳۲/۶۹±۲/۱۴	
	۱۶۰۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر (۴۸، ۲۴)	۲۵/۹۷±۵/۴۶، ۳۸/۸۹±۵/۹۶	
	کنترل	۱±۰	
<i>P21</i>	۴۰۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر (۴۸، ۲۴)	۲۹/۲۴±۱/۳۹، ۳۳/۳۹±۲/۲۹	۰/۰۴۴
	۸۰۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر (۴۸، ۲۴)	۲۷/۹۷±۱/۵۷، ۳۴/۰۹±۲/۳۸	
	۱۶۰۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر (۴۸، ۲۴)	۴۲/۲۴±۷/۳۹، ۳۷/۲۶±۴/۹۹	

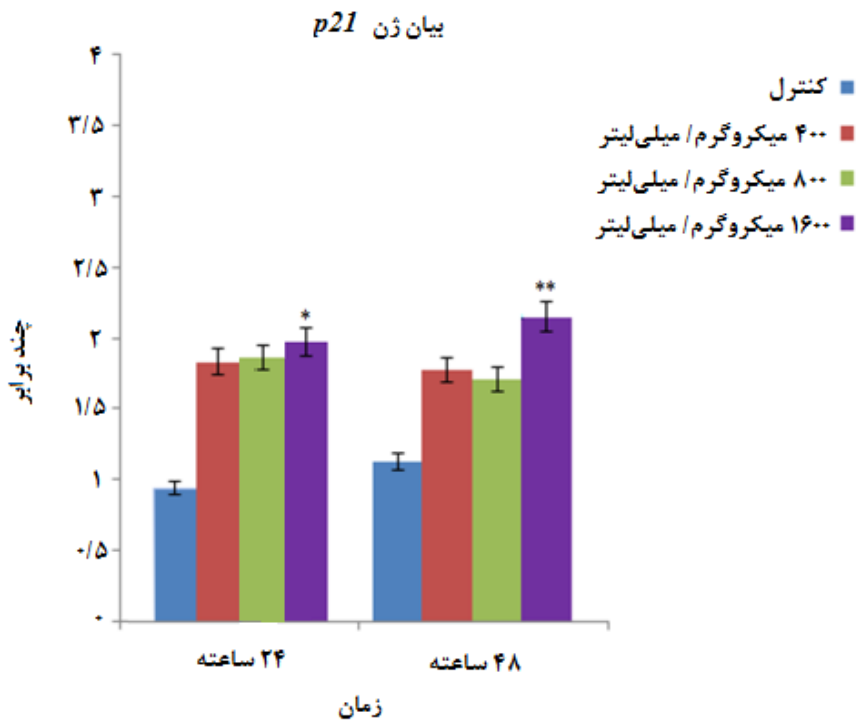
افزایش بیان ژن *p53* به صورت غیر وابسته به غلظت و زمان در زمان انکوباسیون ۲۴ و ۴۸ ساعته به ترتیب در غلظت ۱۶۰۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر و ۸۰۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر در مقایسه با گروه کنترل معنی‌دار بود. افزایش بیان ژن *p21* به صورت وابسته به زمان در هر دو زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت در غلظت ۱۶۰۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر نسبت به سایر گروه‌های آزمایشی دیگر در مقایسه با گروه کنترل معنی‌دار بود که در حقیقت نشان دهنده‌ی اثر گذاری هر چه بیشتر این غلظت از اسید سیتریک بر مهار روند رشد سلول‌های سرطانی می‌باشد.

بحث

در تحقیق حاضر توانایی اسید سیتریک در تغییر بیان ژن‌های رمزکننده‌ی پروتئین‌های پروآپوپتوزی دخیل در مسیر مرگ سلولی در سلول‌های رده‌ی آدنوکارسینومای روده بزرگ انسان (HT-29)، مورد بررسی قرار گرفت. در این تحقیق تیمار سلول‌های HT-29، با غلظت‌های مختلف اسید سیتریک (۴۰۰، ۸۰۰ و ۱۶۰۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر) و انکوباسیون آن‌ها برای مدت زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت نتایج قابل توجهی را در افزایش میزان بیان ژن‌های مورد هدف تحقیق (*p21* و *p53*) نشان داد.



شکل ۱. نمودار تغییر بیان ژن *p53* در غلظت‌های ۴۰۰، ۸۰۰ و ۱۶۰۰ میکروگرم / میلی لیتر اسید سیتریک و زمان انکوباسیون ۲۴ و ۴۸ ساعته بر اساس Ct. $p < 0.05$ * اختلاف معنادار در مقابل گروه کنترل.



شکل ۲. نمودار تغییر بیان ژن *p21* در غلظت‌های ۴۰۰، ۸۰۰ و ۱۶۰۰ میکروگرم / میلی لیتر اسید سیتریک و زمان انکوباسیون ۲۴ و ۴۸ ساعته بر اساس Ct. $p < 0.05$ *؛ $p < 0.01$ ** اختلاف معنادار در مقابل گروه کنترل.

نشان داد که تیمار طولانی مدت سلول‌های اپیتلیالی معده با غلظت‌های بالای سدیم سیترات باعث القای آپوپتوز و تغییر سطح سیتوکاین‌های مشخصی در این سلول می‌شود (۲۰). در سال ۲۰۲۰ نیز طی پژوهشی مشخص شد که هیدروکسی سیتریک اسید می‌تواند اثر سایتوتوکسیک تاموکسیفن را در سلول‌های سرطانی پستان (MCF-7) تقویت نماید (۲۱). در این مطالعه به دلیل محدودیت در جمع‌آوری نمونه‌های بیوپسی بافتی بررسی تنها در سطح سلول صورت گرفته است، سایر محققان می‌توانند اثر اسید سیتریک را در سطح بافت روی نمونه‌های بیوپسی روده بزرگ نیز سنجش نمایند.

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل شده از تحقیق حاضر، بیانگر این مسئله می‌باشد که اسید سیتریک قادر است با تاثیرگذاری بر بیان ژن‌های *p53* و *p21* و افزایش میزان تولید محصول آن‌ها که در واقع پروتئین‌های پروآپوپتوتیک هستند، آپوپتوز را در سلول‌های آدنوکارسینومای روده بزرگ انسان القاء نماید و از این طریق در درمان سرطان روده بزرگ مؤثر واقع گردد.

در تحقیق حاضر توانایی اسید سیتریک در تغییر بیان ژن‌های رمزکننده پروتئین‌های پروآپوپتوزی دخیل در مسیر مرگ سلولی در سلول‌های رده‌ی آدنوکارسینومای روده بزرگ انسان (HT-29)، مورد بررسی قرار گرفت. در این تحقیق تیمار سلول‌های HT-29، با غلظت‌های مختلف اسید سیتریک (۸۰۰، ۱۶۰۰ و ۳۲۰۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر) و انکوباسیون آن‌ها برای مدت زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت نتایج قابل توجهی را در افزایش میزان بیان ژن‌های مورد هدف تحقیق (*p53* و *p21*) نشان داد. افزایش بیان ژن *p53* به صورت غیر وابسته به غلظت و زمان در زمان انکوباسیون ۲۴ و ۴۸ ساعته به ترتیب در غلظت ۱۶۰۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر و ۸۰۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر در مقایسه با گروه کنترل معنی‌دار بود. افزایش بیان ژن *p21* به صورت وابسته به زمان در هر دو زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت در غلظت ۱۶۰۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر نسبت به سایر گروه‌های آزمایشی دیگر در مقایسه با گروه کنترل معنی‌دار بود که در حقیقت نشان دهنده‌ی اثر گذاری هر چه بیشتر این غلظت از اسید سیتریک بر مهار روند رشد سلول‌های سرطانی می‌باشد.

بررسی صورت گرفته در سال ۲۰۱۱ نیز نشان می‌دهد که اسید سیتریک به عنوان یک آنتی‌گلیکولیتیک و مهارکننده‌ی آنزیم فسفو فروکتوکیناز قادر است از طریق کاهش بیان ژن *Mcl-1* و افزایش بیان ژن‌های پروآپوپتوزی *p53* و *p21* باعث تخریب سلول‌های معده و آپوپتوز در آن‌ها شود (۱۷). مطالعه‌ی دیگری در سال ۲۰۱۳ نشان می‌دهد که اسید سیتریک نه تنها مانع از تکثیر سلول‌های HaCaT به روش وابسته به غلظت می‌شود، بلکه باعث القاء ژن‌های پروآپوپتوزی و توقف چرخه سلولی در مرحله G2 / M می‌شود (۱۸).

در سال ۲۰۱۷ بررسی اثر درمانی اسید سیتریک در سلول‌های سرطانی ریه و لوکمی نشان داد که تمایز سلول‌های سرطانی با اثر سیتریک اسید از طریق مهار چرخه‌ی تری کربوکسیلیک اسید متوقف می‌شد، لذا اسید سیتریک می‌تواند برای درمان سرطان مفید باشد (۱۹). در سال ۲۰۱۸ بررسی اثرات سایتوتوکسیک سدیم سیترات بر سلول‌های اپیتلیال معده انسان

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامه کارشناسی ارشد تحت عنوان بررسی اثر اسید سیتریک بر میزان بیان ژن‌های $p21$ و $p53$ در رده سلولی آدنوکارسینومای روده بزرگ انسان (HT29) مصوب دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد در سال ۱۳۹۷ با کد اخلاق IR.IAU.SHK.REC.1397.028 می‌باشد.

تضاد منافع

در این پژوهش هیچ گونه تعارض منافی توسط نویسندگان گزارش نشده است.

مشارکت نویسندگان:

- (۱) مفهوم پردازی و طراحی مطالعه یا جمع آوری داده ها ، یا تجزیه و تحلیل و تفسیر داده ها: علی رضا موجودی، لیلا روحی، خلیل خاشعی و رنامخواستی
- (۲) تهیه پیش نویس مقاله: علی رضا موجودی، لیلا روحی
- (۳) تایید دست نوشته پیش از ارسال به مجله: علی رضا موجودی، لیلا روحی، خلیل خاشعی و رنامخواستی

References

- Guren M. G. The global challenge of colorectal cancer. *The Lancet Gastroenterology & Hepatology* 2019; 4(12): 894-895.
- Kim JH. Chemotherapy for colorectal cancer in the elderly. *WJG* 2015; 21(17):5158-9.
- Rezaianzadeh A, Safarpour A. R, Marzban M. A systematic review over the incidence of colorectal cancer in Iran. *Annals of colorectal research* 2015; 3(1): 0-0. [Persian]
- Gandomani H. S, Aghajani M. Colorectal cancer in the world: incidence, mortality and risk factors. *Biomedical Research and Therapy* 2017; 4(10): 1656-1675. [Persian]
- Saebnia N, Sadeghizadeh M, Dehghan Eamj. The main factors involved in the recurrence of colorectal cancer and therapeutic methods against them. *Journal of Police Medicine* 2016; 5(2): 87-95. [Persian]
- Dahabreh IJ, Schmid CH, Lau J. Genotype misclassification in genetic association studies of the rs1042522 TP53 (Arg72Pro) polymorphism: a systematic review of studies of breast, lung, colorectal, ovarian, and endometrial cancer. *American J.epide* 2013; 177(12): 1317-1325.
- Xue X, Yu J-L, Sun D-Q. Curcumin induces apoptosis in SGC-7901 gastric adenocarcinoma cells via regulation of mitochondrial signaling pathways. *APJCP* 2013; 15(9): 3987-3992.
- Broecker-Preuss M, Viehof J, Jastrow H. Cell death induction by the BH3 mimetic GX15-070 in thyroid carcinoma cells. *J Experiment Clinic Cancer Res* 2015; 34(1): 15-186.
- Broecker-Preuss M, Becher-Boveleth N, Müller S. The BH3 mimetic drug ABT-737 induces apoptosis and acts synergistically with chemotherapeutic drugs in thyroid carcinoma cells. *Cancer cell international* 2016; 16(1): 303-308.
- Zhu L, Li L, Li Y. Chinese Herbal Medicine as an Adjunctive Therapy for Breast Cancer. *Evid.comp.alter.med* 2016; doi: 10.1155/2016/9469276.
- Angumeena AR, Venkappayya D. An overview of citric acid production. *LWT-Food Sci Technol* 2013; 50(2): 367-370.
- Huang L, Wang C, Xu H. Targeting citrate as a novel therapeutic strategy in cancer treatment. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer* 2020;1873(1): 188332.
- Ganapathy-Kanniappan S, Geschwind J. F. H. Tumor glycolysis as a target for cancer therapy: progress and prospects. *Molecular cancer* 2013; 12(1): 1-11.
- Camara A. K, Zhou Y, Wen P. C. Mitochondrial VDAC1: a key gatekeeper as potential therapeutic target. *Frontiers in physiology* 2017; 8: 460.
- Matoba Satoaki. p53 regulates mitochondrial respiration. *Science* 2006; 312(5780): 1650-1653.
- Chen X, Lv Q, Liu Y, Deng W. Effect of food additive citric acid on the growth of human esophageal carcinoma cell line EC109. *Cell Journal (Yakhteh)* 2017;18(4):493.
- Vo P. H, Nguyen S. T. Sodium citrate inhibits proliferation and induces apoptosis of hepatocellular carcinoma cells. *Biomed Res Therapy* 2020; 7(3): 3659-3666.
- Ying TH, Chen CW, Hsiao YP. Citric acid induces cell-cycle arrest and apoptosis of human immortalized keratinocyte cell line (HaCaT) via caspase-and mitochondrial-dependent signaling pathways. *Anticancer research* 2013; 33(10): 4411-4420.
- Ren JG, Seth P, Ye H. Citrate Suppresses Tumor Growth in Multiple Models through Inhibition of Glycolysis, the Tricarboxylic Acid Cycle and the IGF-1R Pathway. *Scientific reports* 2017; 7(1): 4537.
- Xia Y, Zhang X, Bo A, Sun J. Sodium citrate inhibits the proliferation of human gastric adenocarcinoma epithelia cells. *Oncology letters*, 2018, 15(5): 6622-6628.
- Ismail A, Doghish A. S. Hydroxycitric Acid Potentiates the Cytotoxic Effect of Tamoxifen in MCF-7 Breast Cancer Cells through Inhibition of ATP Citrate Lyase. *Steroids*, 2020; 160: 108656.

Effect of citric acid on *p53* and *p21* genes expression of the human colorectal Adenocarcinoma cell line

Alireza Mojodi¹, Leila Rouhi^{2*}, Khalil Khashei Varnamkhashti^{1,3}

1. M.Sc., Department of Biochemistry, Shahrekord Branch, University of Islamic Azad, Shahrekord, Iran
2. Ph.D., Department of Physiology, Shahrekord Branch, University of Islamic Azad, Shahrekord, Iran
3. Lecturer, Department of Genetics, School of Medicine, Kazerun Branch, University of Islamic Azad, Kazerun, Iran

Corresponding author: lrouhi59@gmail.com

Abstract

Background & Aim: Despite the advances in treatment of colorectal adenocarcinoma patients continue to have low survival. Citric acid is considered as a physiological inhibitor of enzymes involved in glycolysis pathway to remove cancer cells. The *p53* and *p21* gene products are involved in cell removal due to their pro-apoptotic properties. In this study, the effect of citric acid on *p53* and *p21* genes expression of the human colorectal adenocarcinoma cell line (HT29) examined.

Methods: In this study, HT-29 cells were treated by different concentrations of citric acid (400, 800 and 1600 µg/ml) and the expression of *P53* and *p21* genes were examined after 24 and 48 hours. And results were analyzed by Real Time PCR. Statistical analysis was accomplished by ANOVA tests using SPSS 18 software.

Results: According to results, treatment with citric acid increased the expression of *p21* ($P=.044$) and *p53* ($P=.036$) genes in some experimental groups (800 and 1600 µg/ml for *p53* gene and 1600 µg/ml for *p21* gene) compared to the control group.

Conclusion: Citric acid seems to be useful as an anticancer agent for the treatment of colorectal adenocarcinoma by inducing expression of genes that involved in the apoptosis pathway.

Keywords:

Citric Acid,
Colorectal adenocarcinoma,
Gene Expression,
p53 gene,
p21 gene

How to Cite this Article: Mojodi A, Rouhi L, Khashei Varnamkhashti K. Effect of citric acid on *p53* and *p21* genes expression of the human colorectal Adenocarcinoma cell line. Journal of Torbat Heydariyeh University of Medical Sciences. 2021;8(4):1-9.