

## Evaluation of Vitexin Effect on the Expression of AHRI, p53, Kras and Metabolic Genes of SKOV3 Ovarian Cancer Cells by <sup>1</sup>HNMR Spectroscopic Method

Zahra Adeli<sup>1</sup>, Majid Rajbian<sup>2</sup>, Hamid Sobhanian<sup>2</sup>, Zahra Zamani<sup>3\*</sup>

1. Ph.D., Department of Biology, Faculty of Science, Payame Noor University, Po Box 19395-3697, Tehran, Iran
2. Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Payame Noor University, Po Box 19395-3697, Tehran, Iran
3. Professor, Department of Biochemistry, Pasteur Institute of Iran, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

(Received: Jun. 08, 2021 - Accepted: Sep. 04, 2021)

### Abstract

Ovarian cancer happens as the result of change in gene and molecular metabolites. Because of chemotherapy side effects in cancer treatment such as drug resistance, using of complementary therapy with herbal and their derivatives is increased. This study evaluates anti-tumor effects of vitexin on AHRI, p53 and Kras genes expression by Real time PCR. Also metabolite changes due to these variations are measured by 1D NOESY, <sup>1</sup>HNMR. SKOV3 cells treated with different concentrations of vitexin and determined IC50 by MTT assay. The IC50 was measured as 520 μg/ml. Then RNA extracting and building of cDNA done to determine level of genes expression changes. Metabolites extracted by water, chloroformed and methanol and lyophilized samples evaluated by <sup>1</sup>HNMR. The expression of AHRI and p53 tumor suppressor genes in the treated cells increased by 1.93 and 1.76 times, respectively, and the expression of Kras oncogene gene decreased by 0.23 times. Maximum changes in metabolites pathways observed in Aminoacyl-tRNA biosynthesis, Biotin, cysteine, methionine, branch amino acids, lysine metabolism, and steroids biosynthesis. Vitexin shows its anti-tumor effects by targeting of several biochemical pathways and reload of metabolites by change in genes which have roll in ovarian cancer. So to confirm this study more evaluations in pathway signaling is needed.

**Keywords:** AHRI, <sup>1</sup>HNMR, Kras, Ovarian cancer, p53, Vitexin.

## ارزیابی اثر ویتکسین بر بیان ژن‌های سرطانی AHRI، p53، Kras و متابولومیکس سلول‌های سرطان تخمدان رده SKOV3 با استفاده از <sup>1</sup>HNMR اسپکتروسکوپی

زهرا عادلی<sup>۱</sup>، مجید رجبیان<sup>۲</sup>، حمید سبحانین<sup>۲</sup>، زهرا زمانی<sup>۳\*</sup>

۱. دکتری، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، صندوق پستی ۱۹۳۹۵-۳۶۹۷ تهران، ایران
۲. استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، صندوق پستی ۱۹۳۹۵-۳۶۹۷ تهران، ایران
۳. استاد، بخش بیوشیمی انستیتو پاستور ایران، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۳/۱۸ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۶/۱۳)

### چکیده

سرطان تخمدان که نتیجه فعل و انفعالات متعدد ملکولی و ژنتیکی و تغییرات متابولیکی است. به علت عوارض متعدد شیمی درمانی مثل مقاومت دارویی، نیاز به استفاده از روش‌های درمانی مکمل با گیاهان و مشتقات آنها در سرطان افزایش یافته است. در این مطالعه به بررسی خواص ضد توموری ویتکسین بر بیان ژن‌های AHRI، p53 و Kras با استفاده از روش Real time PCR و تغییرات متابولیکی همگام با این تغییرات ژنتیکی به روش <sup>1</sup>HNMR با پروتوکل 1D-NOESY انجام شد. سلول‌های تخمدان SKOV3 با غلظت‌های مختلف ویتکسین تیمار و رقت مهارکنندگی ۵۰ درصد آن با استفاده از روش MTT تعیین شد. پس از استخراج RNA و ساخت cDNA میزان بیان ژن تعیین گشت. استخراج متابولیت‌ها به وسیله <sup>1</sup>HNMR مورد بررسی قرار گرفت. مقدار IC50 برای ویتکسین ۵۲۰ μg/ml تعیین شد و میزان بیان ژن‌های سرکوبگر تومور AHRI و p53 در سلول‌های تیمار شده نسبت به گروه کنترل به ترتیب ۱/۹۳ و ۱/۷۶ برابر افزایش و بیان ژن انکوژن Kras به میزان ۰/۲۳ برابر کاهش پیدا کرد. بیشترین تغییرات مشاهده شده در مسیرهای متابولیکی شامل تغییرات متابولیتی مسیرهای متابولیسم آمینوآسیل tRNA سنتاز، متابولیسم بیوتین، سیستین و متیونین، لیزین و بیوستز استروئیدها است. ویتکسین خاصیت ضد توموری خود را با هدف قراردادن چندین مسیر بیوشیمیایی و برنامه ریزی مجدد متابولیکی بواسطه تغییرات در ژن‌های دخیل در ایجاد سرطان تخمدان را نشان داد. به این ترتیب برای تأیید بیشتر این مطالعه، نیاز به مطالعات در مسیرهای سیگنالینگ مرتبط است.

**واژه‌های کلیدی:** سرطان تخمدان، ویتکسین، <sup>1</sup>HNMR، p53، Kras، AHRI

## مقدمه

سرطان تخمدان به دلیل تشخیص دیر هنگام و مقاومت در برابر شیمی درمانی، علت اصلی مرگ‌ومیر ناشی از سرطان زنان و زایمان و دومین مورد بدخیمی شایع زنان در سراسر جهان است (Nunes *et al.*, 2018). حدود ۷۰ درصد کل موارد سرطان تخمدان، کارسینومای درجه بالایی است که به طور تهاجمی رشد کرده، به سرعت متاستاز می‌کند و دارای بی‌ثباتی کروموزومی بالایی است. سرطان تخمدان معمولاً به علت عدم وجود علائم در مراحل اولیه و همچنین غربالگری ضعیف، به یک تومور تشخیصی دیررس تبدیل می‌شود. داروهای شیمی درمانی گزینه‌های درمانی مناسب برای تومورهای غیرقابل برداشت هستند. با این حال، آنها عوارض جانبی بسیاری دارند که می‌تواند کیفیت زندگی بیمار را کاهش دهد همچنین به دلیل هزینه بالای داروها برای بسیاری از بیماران در دسترس نیستند (Mukhtar *et al.*, 2014). امروزه می‌توان به صورت هم‌زمان متابولیت‌ها را به کمک دستگاه‌های جدید طیف‌سنجی جرمی و رزنانس مغناطیس هسته‌ای مانند دستگاه‌های آنالیز LC/Ms و همچنین <sup>1</sup>HNMR با قدرت تفکیک بالا و استفاده از روش کمومتریکس برای تفکیک نمونه‌های نرمال و تست‌شده استفاده کرد. همچنین با این روش تشخیص بیومارکرها در بعضی سرطان‌ها، اثر دارو روی سلول‌ها و بافت‌های سرطانی را می‌توان شناسایی نمود. در دهه گذشته، روش متابولومیکس به طور گسترده‌ای برای شناسایی اثرات متابولیکی مختلف برای بهبود تشخیص سرطان تخمدان استفاده شده است (Lehnhardt *et al.*, 2005).

چای کامبوچا یک چای تخمیری است که توسط قارچ و باکتری خاص تهیه می‌شود. اثرات ضدسرطانی این چای باعث شده که ترکیبات مهم آن چای نیز بررسی شوند که از جمله این ترکیبات ویتکسین که یک گلیکوزید فلاون است را می‌توان اشاره کرد. این

ماده دارای اثرات ضدسرطانی و ضدمتاستازی می‌باشد. تأثیر ویتکسین پیش از این بر سرطان‌های مختلفی همچون سرطان خون، گلیوبلاستوما<sup>۱</sup>، کوریوکارسینوما<sup>۲</sup>، کبد، روده بزرگ، تخمدان، پروستات و سرطان نازوفارنکس<sup>۳</sup> بررسی و اثر ضدسرطانی آن تأیید شده است (Babaei *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2019; Ganesan & Xu, 2017).

مطالعات نشان داده است که ویتکسین مانند آنتی‌اکسیدان عمل می‌کند و باعث مهار آپوپتوز در سلول‌های غیرسرطانی می‌شود. از طرف دیگر، تأثیر متفاوتی بر آپوپتوز در سلول‌های توموری دارد. ویتکسین در چندین مطالعه با القای آپوپتوز اثرات ضدسرطانی را در رده سلول‌های سرطانی مختلف نشان داده است (He *et al.*, 2016; Ninfali, & Angelino, 2013).

سلول‌های سرطان تخمدان با سلول‌های نرمال تخمدان از نظر متابولیسم سلولی با هم متفاوت می‌باشند چرا که سلول‌های سرطانی برای ادامه رشد خود نیازمند تغییرات متابولیکی هستند که این تغییرات با تغییر در الگوی بیان ژن همراه است. در نتیجه بررسی پروفایل‌های متابولیکی سلول سرطانی راه‌کار مناسبی برای تشخیص و شناخت عملکرد سرطان تخمدان است (Gottschalk *et al.*, 2008).

p53 یک ژن سرکوب‌کننده سرطان است که در اکثر سرطان‌ها دچار جهش می‌شود. مطالعات مختلف نقش حیاتی p53 در سرکوب تومور را کاملاً ثابت کرده است (Wang *et al.*, 2019).

ARHI (DIRAS3) نیز یک ژن سرکوب‌کننده تومور است و در بیش از ۶۰ درصد از سرطان تخمدان مشاهده شده است. بیان مجدد ARHI مانع حرکت سلول‌های سرطانی با دخالت در سیگنالینگ Jak/stat

1. Glioblastoma

2. Choriocarcinoma

3. Nasopharyngeal Carcinoma

دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۹۵ و ۵ درصد CO<sub>2</sub> در فلاسک کشت و انکوبه شدند. بعد از رشد حداکثری، سلول فلاسک تریپسینه و شمارش سلول‌های رنگ‌آمیزی‌شده با روش تریپان بلو ۰/۲۵ درصد به‌وسیله لام نئوبار انجام شد. زمانی که تعداد سلول‌های زنده حدوداً به ۸۵ تا ۹۰ درصد رسید برای انجام تست MTT سوسپانسیونی از سلول‌ها تهیه شد. همچنین ماده مؤثره ویتکسین از شرکت Sigma-Aldrich تهیه شد (Paramee et al., 2018).

### درصد زنده‌مانی

تعداد ۴۰۰۰۰ سلول در هر چاهک پلیت ۹۶‌تایی، کشت داده شد و با رقت‌های مختلف ویتکسین (صفر، ۲۰۰، ۴۰۰، ۶۰۰، ۸۰۰ و ۱۰۰۰ µg/ml) تیمار و به‌ترتیب در بازه‌های زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت انکوبه شدند. سپس تست MTT با استفاده از نمک تترازولیم، از شرکت Sigma-Aldrich انجام شد.  $\pm SD$  برای میانگین جذب نوری ثبت شده استفاده گشت و در بررسی‌های آماری نیز  $p\text{-value} < 0.05$  در نظر گرفته شد.

### بررسی بیان ژن‌های پس از تیمار با ویتکسین

پرایمرها با استفاده از نرم‌افزار سایت NCBI طراحی و به منظور بررسی بیشتر اتصال صحیح توالی توسط برنامه Blast در NCBI نیز مورد مطالعه قرار گرفت. پرایمرها توسط شرکت سینا کلون تهیه شد. توالی پرایمرهای در جدول ۱ آمده است.

و مهار مسیر سیگنالینگ FAK/RhoA و کاهش شکل‌گیری مجتمع‌های چسبندگی کانونی است. شواهد نشان داده است که ARHI به‌طور مداوم در سلول‌های اپیتلیال تخمدان و پستان بیان می‌شود، اما در اکثر سلول‌های سرطانی تخمدان، پستان و حتی پانکراس و سلول‌های سرطانی بیان آن به‌طور چشمگیری کاهش یافته است (Yue et al., 2017).

Kras یک انکوژن است که هر گونه تغییری در این ژن باعث فعال شدن مسیر سیگنالینگ EGF شده و سبب پیشرفت سرطان از مراحل اولیه به مرحله آدنوماتوز شده و در نهایت سبب جهش در ژن سرکوبگر تومور p53 و ورود به مرحله بدخیمی می‌شود (Badgwell et al., 2012).

هدف از این مطالعه بررسی اثرات ضدسرطانی ویتکسین بر تغییرات متابولیسمی همگرا با تغییرات بیان ژن‌های مؤثر در روند سرطان زایی سلول‌های سرطان تخمدان رده SKOV3 توسط تکنیک <sup>1</sup>HNMR می‌باشد.

### مواد و روش‌ها

#### کشت سلولی

سلول‌های سرطان تخمدان رده SKOV3 با کد C209 از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه شد. سلول‌های SKOV3 در محیط کشت RPMI 1640 از شرکت (Gibco)، حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی و ۱ درصد آنتی‌بیوتیک‌های پنیسیلین و استرپتومایسین در

جدول ۱. توالی پرایمرهای طراحی‌شده برای ژن‌های Kras, AHRI, p53 (Primer design NCBI)

Gene name	Primer sequences (5' - 3')	Size (bp)	Annealing (°C)
GAPDH	F:AGGGCTGCTTTAACTCTGG	215bp	55-60
	R:CCCCACTTGATTTTGGAGGG		
p53	F: GCCCAACAACACCAGCTCCT	164bp	55
	R: CCTGGGCATCCTTGAGTTCC		
Kras	F: CTATTCGCAGCTCACACAGTTTAC	313bp	56
	R: TTCTTAATTTGGTCTGCGGC		
AHRI	F: GTGCGTAGTTTTTAATGTATTCGTC	165bp	60
	R: GACTAAAAAACCCGATTATATCGTT		

دقیقه با دور  $g$  ۸۰۰ سلول‌ها شستشو و محیط رویی خارج گشت. آنگاه برای استخراج متابولیت‌ها به روش دو فازی لیپوفیل و هیدروفیل، به نسبت ۲ به ۱ متانول و کلروفورم اضافه و سپس به نسبت ۱ به ۱، کلروفورم و آب دو بار تقطیر شده به نمونه‌ها افزوده و سپس به مدت ۱۰ دقیقه سونیکیت شدند. بعد از سانتریفیوژ با کمک سرنگ هامیلتون، فازهای ایجاد شده از هم جدا شدند. سپس نمونه‌های هیدروفیل لیوفیلیزه شده و در دستگاه طیف‌سنجی  $^1\text{H-NMR}$  بروکر ۵۰۰ MHz دانشگاه صنعتی شریف و با پروتکل 1D NOESY به مدت ۱۵ دقیقه، مورد طیف‌سنجی قرار گرفتند (Gottschalk *et al.*, 2008; Lodi & Ronen, 2011).

#### کومتریکس

در ابتدا داده‌های اولیه به دست آمده از دستگاه  $^1\text{H-NMR}$  توسط نرم‌افزار Mestrec بررسی و داده‌های را در محیط MATLAB و نرم‌افزار Prometab گروه‌بندی و متغیرهای به دست آمده تبدیل به ماتریکس اکسل می‌شود. با استفاده از وبگاه MetaboAnalyst و آپشن آنالیز آماری و استفاده از روش PLS-DA کمترین اجزای مربع و در محیط نرم‌افزاری Matlab به داده‌های آماده آنالیز چند متغیره در سایت MetaboAnalyst تبدیل شدند. با کمک این سایت داده‌های به دست آمده به اجزای اصلی و حداقل مربعات جزئی PLS-DA بین دو گروه متغیرهای متمایز کننده به دست می‌آید.

متغیرهای متمایز کننده را به جابه‌جایی‌های شیمیایی تبدیل کرده و متابولیت‌ها با استفاده از وبگاه  $^2\text{HMDB}$  مورد شناسایی قرار گرفتند. لیست ژن‌ها و متابولیت‌ها را به آپشن Integrated pathway analysis در MetaboAnalyst داده و ارتباط ژن‌ها را با چرخه

استخراج RNA کل از سلول‌های کنترل و تیمار شده با IC50 از ویتکسین در ساعت ۴۸ طبق پروتکل مربوطه با استفاده از کیت Gene All انجام شد، خلوص و غلظت نمونه‌های RNA با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر نانودراپ Nano-Drop ND-1000<sup>TM</sup> (Thermo Scientific) و اینتگریتی با ژل الکتروفورز ۱ درصد بررسی گردید. مقدار ۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر از نمونه‌های RNA که نتایج نسبت جذب نوری ۲۸۰/۲۶۰ نانومتر آنها بین ۲-۱/۸ بود جهت سنتز DNA با استفاده از کیت PCR-RT 2step (Sigma-Aldrich) صورت پذیرفت، بررسی بیان ژن‌های p53، KRAS و AHRI توسط روش انجام Real-time PCR انجام و در نهایت داده‌های خام حاصل از Real-time PCR با استفاده از نرم‌افزار اکسل تجزیه و تحلیل شد. پس از تکثیر، CT (threshold) نمونه‌ها شناسایی و همچنین (efficiency mean) تعیین شد. بر اساس روش Relative Quantification (RQ) و فرمولاسیون  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  به صورت مضربی از میزان بیان ژن‌های p53، Kras و AHRI درج شده و در مقایسه با ژن داخلی GAPDH و در مجاور نرمال سازی متوازن تفسیر گردید (Watanabe *et al.*, 2010).

#### تحلیل آماری

داده‌های حاصل از سه آزمایش مجزا به صورت میانگین  $\pm$  انحراف استاندارد (Mean  $\pm$  SD) محاسبه شد. از آزمون t-Student برای مقایسه گروه‌ها در آزمایشات استفاده شد و تفاوت میانگین در سطح  $P < 0.05$  معنا دار در نظر گرفته شد.

#### استخراج و آماده سازی نمونه‌ها جهت طیف سازی NMR و آنالیز داده‌ها

پس از کشت سلول، تعداد  $8 \times 10^6$  سلول با غلظت IC50 ویتکسین به مدت ۴۸ ساعت تیمار به عنوان کنترل در نظر گرفته شد. پس از سانتریفیوژ به مدت ۵

1. Partial least squares-discriminant analysis  
2. Human Metabolome Database

ویتکسین در غلظت  $520 \mu\text{g/ml}$  یا  $\text{IC}_{50}$  یا دوزی که بقای سلولی را تا ۵۰ درصد کاهش می‌دهد.

متابولیت‌ها به‌دست آمد. برای به‌دست‌آوردن معنی‌داری آماری از  $P < 0.05$  در تست‌های زنده‌مانی استفاده شد (Li & Deng, 2017).

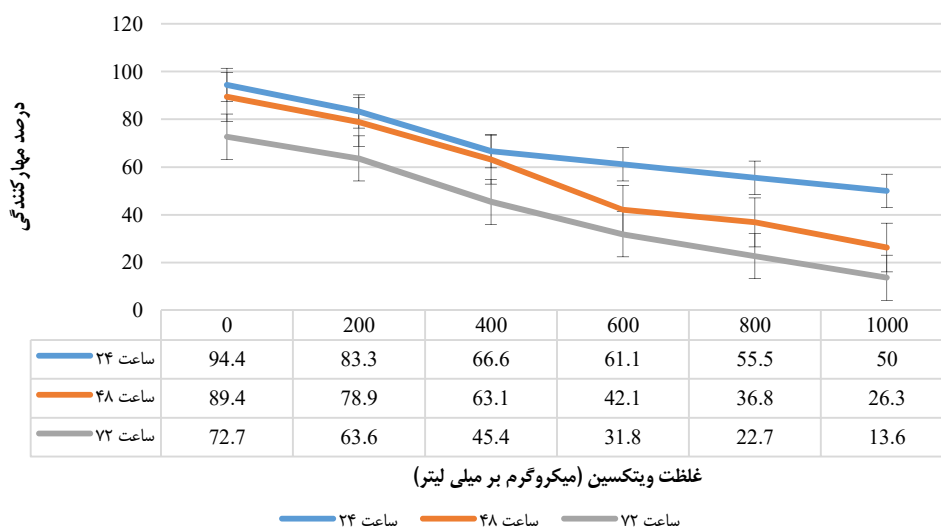
### بررسی بیان ژن‌های AHRI، Kras و p53 پس از تیمار با ویتکسین

غلظت  $520 \mu\text{g/ml}$  به‌دست‌آمده بالا برای بررسی بیان ژن استفاده شد. تیمار با این غلظت از ویتکسین سبب افزایش بیان ژن‌های سرکوبگر تومور p53 و AHRI به‌ترتیب به میزان  $1/77$  و  $1/99$  برابر و همچنین کاهش بیان ژن انکوژن Kras به میزان  $0/23$  برابر در مقایسه با سلول‌های کنترل به‌دست آمد.

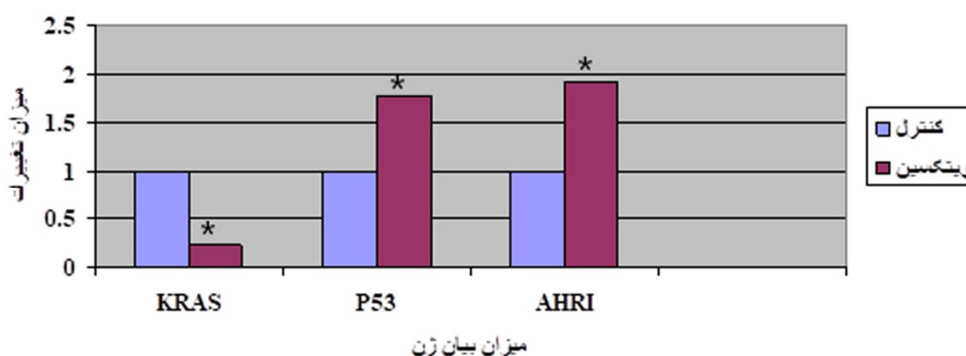
### نتایج

#### کاهش توانایی زیست سلول‌ها با ویتکسین

پس از تیمار با غلظت‌های مختلف ویتکسین در بازهی زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، کاهش قابل توجهی در تعداد سلول‌های زنده در رده سلول سرطانی SKOV3 نسبت به گروه شاهد مشاهده شد. همان‌طور که در نمودار ۱ و در سه بازهی زمانی نشان داده شده است،



**نمودار ۱.** منحنی مهار رشد سلول‌های رده SKOV3 به‌مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از تیمار با ویتکسین. میزان ۵۰ درصد زنده ماندنی ( $\text{IC}_{50}$ ) در سلول‌های سرطانی SKOV3 به‌روش MTT انجام شد ( $P < 0.05$ ).



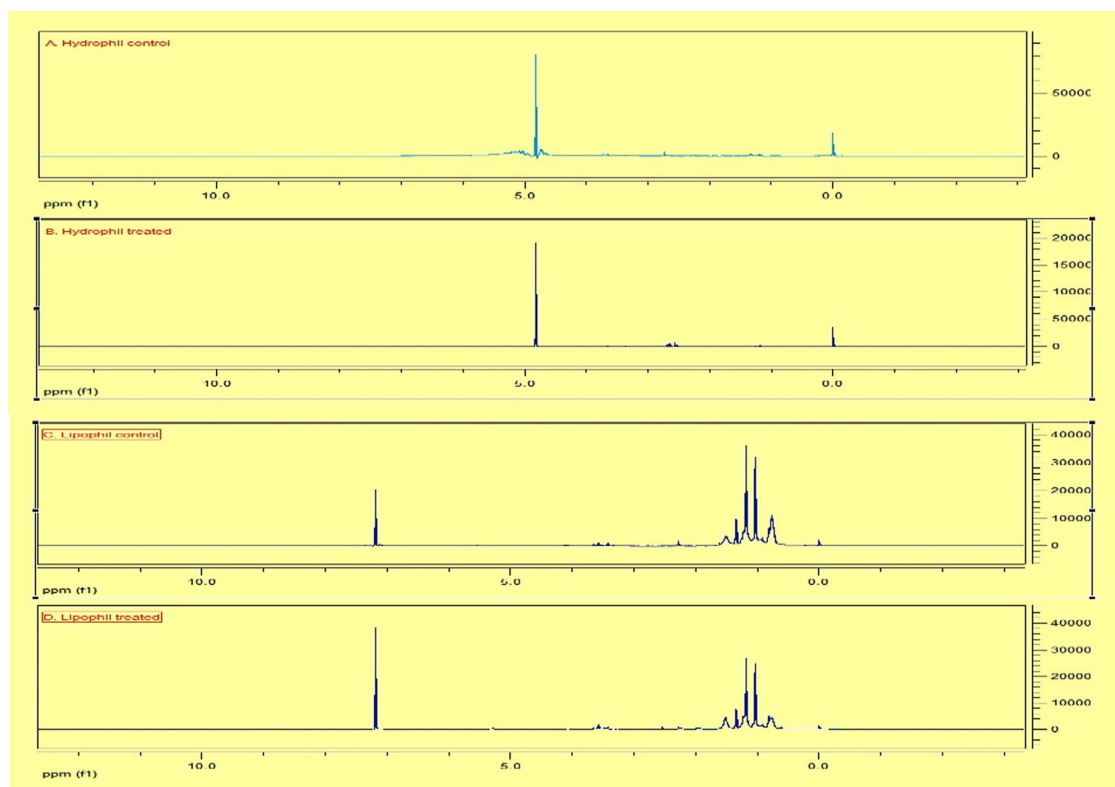
**نمودار ۲.** میزان بیان همزمان سه ژن AHRI، Kras و p53 در رده سلول‌های سرطانی تخمدان SKOV3 تحت تیمار با ویتکسین به‌مدت ۴۸ ساعت در غلظت  $(520 \mu\text{g/ml})$  با استفاده از Real-time PCR را نشان می‌دهد. ویتکسین باعث افزایش معنی‌دار بیان ژن‌های سرکوبگر AHRI و p53 و کاهش معنی‌دار بیان انکوژن Kras شده است ( $P < 0.05$ ).

### اثر ویتکسین بر تغییرات متابولیتی سلول‌های سرطانی SKOV3

پس از تیمار با ویتکسین تغییرات متابولیتی عمده‌ای در بررسی طیف‌های 1DNOESY 1D HNMR مشاهده شد. شکل ۱، نمودار Scores Plot و جداسازی متابولیت‌ها پس از تیمار با ویتکسین در فاز هیدروفیل و فاز لیپوفیل را نشان می‌دهد. شکل ۲، تجزیه و تحلیل PLS-DA مربوط به فاز هیدروفیل و لیپوفیل نمونه‌های تیمار شده در مقایسه با کنترل است. نقاط داخل نمودار نشان‌دهنده سطوح تغییرات شیمیایی متابولیت‌ها و عدد VIP (variable importance projection) اندازه‌گیری اهمیت تغییرات شیمیایی در مدل PLS-DA می‌باشد. جعبه‌های رنگی سمت راست غلظت‌های نسبی متابولیت مربوطه در گروه‌های سلولی آزمایش و کنترل را نشان می‌دهند. پس از معرفی و شناسایی متابولیت‌ها از پایگاه HMDB،

مسیرهای متابولیکی مربوط به این متابولیت‌ها و ژن‌های Kras، AHRI و p53 و متابولیت‌های تغییر یافته در هر کدام از این مسیرها توسط سایت MetaboAnalyst و از طریق مسیر Joint Pathway Analysis بررسی شدند. جدول ۲ مهمترین مسیرهای متابولیکی و شناسایی متابولیت‌های تغییر یافته و ارتباط این تغییرات با تغییرات ژنتیکی بالقوه مربوط به ژن‌های مورد مطالعه را نشان می‌دهد.

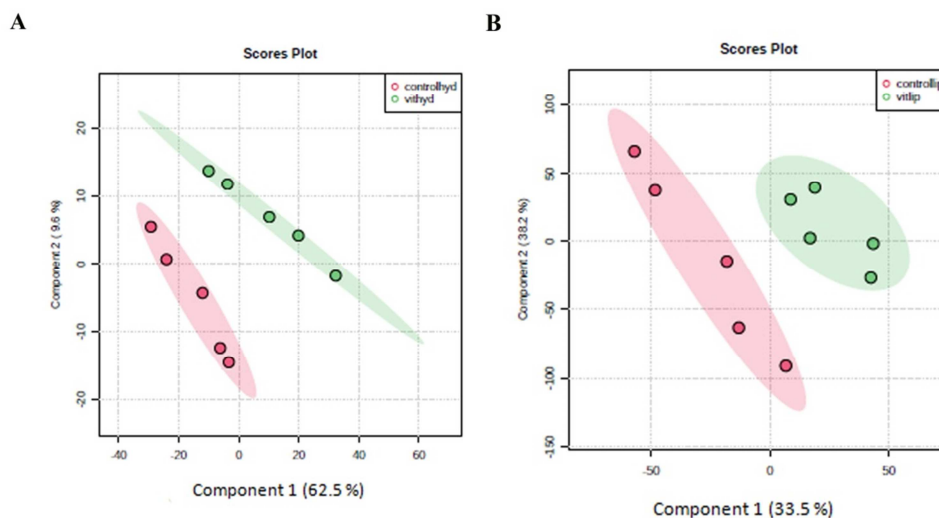
نتایج به دست آمده از طیف‌سنجی  $^1\text{HNMR}$  در شکل ۱ نشان داده شده است. بررسی طیف 1D HNMR به دست آمده از دو گروه کنترل و تیمار شده، تغییرات عمده متابولیکی پس از درمان با ویتکسین را نشان می‌دهد. شکل A طیف خام گروه کنترل و شکل B گروه تیمار شده با ویتکسین را در فاز هیدروفیل نشان می‌دهد و شکل C و D طیف خام این دو گروه را در فاز هیدروفیل نشان می‌دهند (شکل ۱).



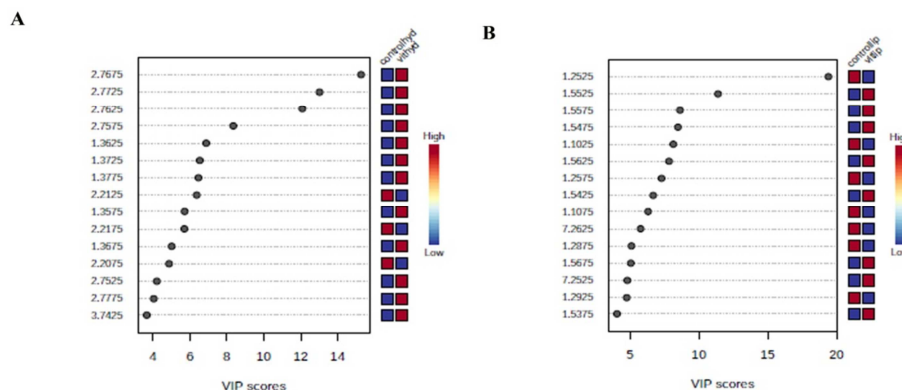
شکل ۱. A) طیف خام  $^1\text{HNMR}$  فاز هیدروفیل سلول‌های SKOV3 کنترل، B) فاز هیدروفیل سلول‌های SKOV3 تیمار شده با ویتکسین، C) طیف خام  $^1\text{HNMR}$  فاز لیپوفیل سلول‌های SKOV3 کنترل و D) طیف خام  $^1\text{HNMR}$  فاز لیپوفیل سلول‌های SKOV3 تیمار شده با ویتکسین را نشان می‌دهد.

شکل ۲-A، نمودار PLS-DA گروه کنترل و تیمار با ویتکسین را در فاز آبدوست (هیدروفیل) نشان می‌دهد و شکل ۲-B طیف‌های همپوشانی این دو گروه را در فاز لیپوفیل نشان می‌دهد. در این مطالعه، نمودارهای PLS-DA برای متابولیت‌های استخراج‌شده از سلول، در فاز هیدروفیل نشان داد که متابولیت‌ها در دو شاخه مجزا از هم جدا شده‌اند به طوری که واریانس ۶۲/۵ درصد و ۹/۶ درصد بود (شکل ۲-A). در مرحله لیپوفیل، این جداسازی با ۳۳/۵ و ۳۸/۲ درصد از واریانس کل داده‌ها را نشان داد (شکل ۲-B). در شکل (۳-A, B) پیش‌بینی مهم متغیر

شکل ۲-A، نمودار PLS-DA گروه کنترل و تیمار با ویتکسین را در فاز آبدوست (هیدروفیل) نشان می‌دهد و شکل ۲-B طیف‌های همپوشانی این دو گروه را در فاز لیپوفیل نشان می‌دهد. در این مطالعه، نمودارهای PLS-DA برای متابولیت‌های استخراج‌شده از سلول، در فاز هیدروفیل نشان داد که متابولیت‌ها در دو شاخه مجزا از هم جدا شده‌اند به طوری که واریانس ۶۲/۵ درصد و ۹/۶ درصد بود (شکل ۲-A). در مرحله لیپوفیل، این جداسازی با ۳۳/۵ و ۳۸/۲ درصد از واریانس کل داده‌ها را نشان داد (شکل ۲-B). در شکل (۳-A, B) پیش‌بینی مهم متغیر



شکل ۲. نمودار PLS-DA متابولیت‌های سلول SKOV3 سرطان تخمدان. گروه کنترل و تحت تیمار با ویتکسین را در دو فاز (A) هیدروفیل (B) لیپوفیل نشان می‌دهد. نمودارها تمایز کاملاً مشخصی را بین دو گروه در هر دو مرحله نشان می‌دهند.



شکل ۳. VIP scores برای متابولیت‌های متمایزکننده فاز هیدروفیل (A) و فاز لیپوفیل (B) سلول‌های SKOV3 تیمار شده با ویتکسین را نشان می‌دهد. جعبه‌های سمت راست نمودار VIP نسبت فراوانی و غلظت متابولیت‌ها را نشان می‌دهد.

جدول شماره ۲. مسیرهای متابولیکی تغییر یافته در سلول‌های سرطان تخمدان رده SKOV3 پس از تیمار با ویتکسین

Raw P	Hits	Total	متابولیت‌ها	مسیرهای متابولیکی
سطح معنادار آماری	تعداد متابولیت‌های تغییر یافته	کل متابولیت‌ها		
۰/۰۰۱۳	۲	۴۸	ال-متیونین ال-لیزین	بیوستز آمینوآسیل tRNA
۰/۰۰۷۲	۱	۵۸	پروژسترون	بیوستز هورمون استروئیدی
۰/۰۴۰۶۱	۱	۳۳	ال-سیستاتیونین	متابولیسم گلیسین، سرین و ترئونین
۰/۰۵۰۵	۲	۱۰	بیوتین ال-لیزین	متابولیسم بیوتین
۰/۱۰۳۵	۲	۳۳	ال-سیستاتیونین ال-متیونین	متابولیسم سیستئین و متیونین
۰/۱۲۲۱	۱	۲۵	ال-لیزین	مسیر تجزیه لیزین
۰/۱۸۹۰	۲	۶۵	dGMP dGTP	متابولیسم پورین
۰/۱۹۳۳	۱	۲۷	آلفا-دی-گالاکتوز	متابولیسم گالاکتوز
۰/۱۹۷۵	۱	۴۲	لا-تسترون	بیوستز استروئید

### بحث و نتیجه‌گیری

مطابق با نتایج این پژوهش، مطالعات نشان داده اند که بیشترین علت سرطان و بدخیمی‌های انسان، جهش در ژن‌های سرکوبگر تومور، انکوژن‌ها و همچنین تنظیم نامناسب ژن‌های خاص می‌باشد که نتیجه آن از بین رفتن پروتئین‌های ضد آپوپتوز است (Sutton et al., 2019).

با توجه به نمودار ۲ بیان ژن AHRI (DIRAS3) به میزان ۱/۹۳ برابر افزایش یافته است. ژن AHRI یک ژن سرکوبگر تومور از خانواده RAS با نام متداول (DIRAS3) است که باعث مهار تکثیر سلول سرطانی، کاهش متاستاز و افزایش اتوفاژی تومور می‌شود. DIRAS3 باعث تشکیل کمپلکس آغازگر BECN1-PIK3C3-ATG14 و ایجاد مجتمع آغازین اتوفاژی و در نهایت باعث اتوفاگوزوم می‌شود. نتایج نشان داده است، این ژن به‌طور گسترده در سلول‌های نرمال اپیتلیال اندام‌های مختلف انسان بیان می‌شود که با ایجاد سرطان تخمدان بیان این ژن حدود ۶۰ درصد کاهش یافته است. همچنین یافته‌ها نشان داده است که در سرطان‌های دیگری همچون پستان، ریه، پروستات، تیروئید و لوزالمعده بیان این

ژن کاهش یافته است (Dobrzycka et al., 2009).

نتایج به‌دست‌آمده در این مطالعه کاهش بیان ژن Kras به میزان ۰/۲۳ برابر را طبق نمودار ۲ نشان می‌دهد. ژن KRAS یک انکوژن است که به‌واسطه مسیر انتقال سیگنال MAP-kinase، باعث تعدیل تمایز سلولی و افزایش بیان پروتئین GTPase و افزایش تحریک رشد سلول می‌شود. در ۲۰ تا ۳۰ درصد از کل تومورهای انسانی یکی از اعضا خانواده RAS دچار جهش می‌شود. در سرطان تخمدان، اغلب ناهنجاری‌ها متعلق به جهش‌های KRAS بوده است که میزان جهش‌های نقطه‌ای Kras بین ۱۵ تا ۳۹ درصد و در سرطان روده بزرگ نیز جهش ۵۱ درصدی این ژن گزارش شده است. که به نظر می‌رسد جهش Kras بیشتر با کارسینومای مخاطی مرتبط است (Silwal-Pandit et al., 2018).

همچون دیگر سرگوبگران تومور، بیان ژن p53 (TP53) در سرطان تخمدان مورد مطالعه ما به میزان ۱/۷۶ برابر افزایش بیان نشان داد (نمودار ۲). ژن p53 (TP53) یک ژن سرکوبگر تومور محسوب می‌شود که به‌عنوان یک فاکتور رونویسی متصل به DNA، قابلیت اتصال به چند صد عنصر پروموتور مختلف در



متابولیسم‌های تغییر یافته بیشتری باید در اختیار داشته باشند (Bonifácio *et al.*, 2020).

به نظر می‌رسد میزان انرژی سلول در سرطان بسیار حائز اهمیت می‌باشد. یکی از راه‌کارهای مهار سرطان می‌تواند کنترل انرژی سلول باشد. بنابراین با کاهش سطح انرژی سلول از طریق تغییر در متابولیت مسیر های انرژی زا می‌توان رشد سلول سرطان تخمدان را مهار کرد. که در این بررسی متابولیت‌هایی همچون ال سیستاتین و ال متیونین، در مسیر چرخه سیستئین-متیونین که باعث تأمین انرژی سلول سرطان تخمدان رده SKOV3 بوده‌اند، تغییر یافتند. سیستئین و متیونین هر دو اسیدهای آمینه حاوی گوگرد هستند. اسید آمینه سیستئین از کاتابولیسم گلوکوتایون خارج سلولی، کاتابولیسم پروتئین یا سنتز جدید متیونین و مصرف سیستئین در رژیم غذایی، که فرم اکسید شده سیستئین است، گرفته می‌شود. سیستئین در سرطان به‌عنوان منبع اتم های کربن و گوگرد شناسایی شده است. نقش محوری سیستئین در مسیرهای مختلف متابولیکی و اهمیت سولفید هیدروژن (H<sub>2</sub>S) به‌عنوان یک بستر انرژی‌زا و یک مولکول سیگنالینگ گزارش شده است ( Yamamoto *et al.*, 2020). متیونین پیش ماده سوکسینیل CoA، هموسیستئین، سیستئین، کراتین و کارنیتین است. تحقیقات نشان داده است که متیونین در متابولیسم لیپیدها، فعال‌سازی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان درون‌زا مانند متیونین سولفوکسید ردوکتاز A و بیوستنتر گلوکوتایون برای مقابله با استرس اکسیداتیو مداخله می‌کند. علاوه بر این، محدودیت متیونین از تغییر متابولیسم متیونین-ترنس متیلاسیون جلوگیری می‌کند، در نتیجه آسیب DNA و فرایندهای سرطان‌زایی را کاهش می‌دهد (Lien *et al.*, 2017). سلول‌های سرطانی برای بقا و تکثیر به متیونین و سیستئین (Met-Cys) وابستگی زیادی دارند. در مطالعه‌ای که به‌منظور بررسی اثرات محرومیت Met-Cys در تکثیر سلول‌های گلیوما انجام شد نتایج نشان

ژنوم را دارد. از این رو بیان صدها ژن را تنظیم می‌کند. بیش از سه دهه تحقیق در مورد TP53 نقش اساسی آن را در تنظیم فرآیندهای اصلی سلولی، نظیر کنترل تکثیر و حفظ ساختار ژنوم اثبات کرده است (Gottschalk *et al.*, 2008).

پس از بررسی اثر سمیت و کاهش زیست پذیری ویتکسین بر سلول‌های سرطانی SKOV3، مشاهده شد ویتکسین به صورت وابسته به دوز و زمان سبب کاهش توانایی زیستی سلول‌ها سرطانی SKOV3 می‌شود. IC<sub>50</sub> یا دوزی که بقاء سلولی را تا ۵۰ درصد کاهش می‌دهد، در سه بازه‌ی زمانی در نمودار ۱ ارائه شده است. که میزان IC<sub>50</sub> در ۴۸ ساعت ۵۲۰ μg/ml به‌دست آمد (نمودار ۱). استفاده از گیاهان و مشتقات آنها در پیشگیری از بسیاری از سرطان‌ها، در کنار سایر روش‌های درمانی دیگر همواره مورد توجه بوده است. یکی از ترکیبات اصلی چای کامبوچا ماده ای به نام ویتکسین است این ترکیب به مانند یک آنتی‌اکسیدان عمل می‌کند و باعث مهار آپوپتوز در سلول‌های سرطانی می‌شود. اثرات ضدسرطانی ویتکسین در سرطان‌های مختلفی همچون سرطان نازوفارنکس (NPC)، لوسمی میلوئید مزمن (K-562)، گلیوبلاستوما، پروستات، کبد، مری و تخمدان پیش از این بررسی و تأیید شده است ( Lodi & Ronen, 2011; Li & Deng, 2017; Ping, 2020).

در این پژوهش اثر ویتکسین بر تغییرات متابولیتی سلول‌های سرطانی تخمدان رده SKOV3 به‌روش <sup>1</sup>HNMR بررسی شد. نتایج بررسی ما نشان می‌دهد، مهمترین تغییرات پروفایل متابولیتی در روند سرطان تخمدان با تغییرات متابولیتی مسیرهای متابولیسم آمینوآسیل tRNA سنتتاز، متابولیسم بیوتین، سیستئین و متیونین، لیزین و بیوستنتر استروئید ها همراه است. سلول‌های تکثیر یافته غیرطبیعی، به‌دلیل داشتن ویژگی‌های بدخیم سلول‌های سرطانی، از جمله تکثیر سریع و حمله تهاجمی به بافت‌های طبیعی، برای پاسخ به این افزایش بیوستنتر و نیازهای تغذیه ای

تشکیل متابولیت‌های فرعی از طریق آنزیم‌های سیتوکروم P450 ممکن است منجر به تولید ترکیبات جهش‌زای DNA شود. سپس رادیکال‌های آزاد تولید شده با کمک استروژن، فعال شده و باعث جهش می‌شوند. در نتیجه تجمع جهش‌ها در ژن‌های مختلف در سلول‌های لوله‌های رحمی و تخمدان منجر به سرطان می‌شود (Mungenast & Thalhammer, 2014). نتایج مطالعه‌ای که بر روی تأثیر جهش در ژن‌های Kras و TP53 بر هورمون‌های استروئیدی در سرطان تخمدان انجام شد نشان داد، جهش در ژن TP53 تنظیم‌کننده اصلی پیشرفت، تمایز و پاسخ‌دهی به هورمون‌های استروئیدی است (Ren et al., 2016). داده‌های اپیدمیولوژیک نشان می‌دهد که القای سرطان تخمدان با قرارگرفتن در معرض استروژن در طول زندگی ارتباط دارد. همچنین داده‌های تجربی نشان می‌دهد که سلول‌های سرطانی تخمدان تعدادی از مسیرهای تنظیم شده با استروژن را با سایر سرطان‌های وابسته به هورمون، به‌عنوان مثال، سرطان پستان و آندومتر تقسیم می‌کنند (Mungenast & Thalhammer, 2014).

یکی دیگر از مسیرهای مهم متابولیکی که در اثر تیمار سلول سرطان تخمدان با ویتکسین تغییر یافته است، مسیر سنتز آمینواسیل tRNA است. در این مسیر متابولیت‌های ال ایزولوسین، ال لیزین، ال تریپتوفان و ال‌متیونین دستخوش تغییر شدند. آمینواسیل tRNA سنتزها با کاتالیز اتصال اسیدهای آمینه به RNA، نقش مهمی در سنتز پروتئین دارند. تغییر عملکرد این آنزیم باعث ایجاد انواع سرطان از جمله سرطان ریه، لوزالمعده، کلورکتال، پستان، کبد و همچنین تخمدان شده است. آمینواسیل tRNA سنتزها به‌صورت آزاد یا به‌صورت مولتی کمپلکس tRNA سنتز در سلول‌های یوکاریوتی وجود دارند. بررسی که روی سرطان خون میلوئید حاد انجام شد، آنزیم آمینواسیل tRNA سنتزها و ژن‌های تنظیم‌کننده P21 p53 PCNA را مرتبط گزارش کرد (Li et al., 2019).

داد که رژیم غذایی محدودکننده Met-Cys رشد گلیوم را مهار می‌کند (Sanderson et al., 2019). نتایج به‌دست‌آمده ما در این پژوهش، تغییر متابولیت‌ال-لیزین در مسیر متابولیکی لیزین را نشان داد (جدول ۲). مطالعات صورت گرفته بر روی سلول‌های سرطانی نشان داد که در بروز انواع سرطان علاوه بر تغییرات ژنتیکی، تغییرات اپی ژنتیک قابل بازگشت نیز دخالت دارند. از جمله این تغییرات متیلاسیون لیزین ۹ در هیستون می‌باشد که باعث خاموش شدن ژن و ایجاد سرطان می‌شود. داستیلاسیون لیزین ۱۲ توسط مهارکننده هیستون داستیلاز باعث القای تمایز و آپوپتوز می‌شود. همچنین فعالیت سرکوبگری توموری p53 را نیز تنظیم می‌کند (Gil et al., 2017). در بررسی که روی سرطان تخمدان و مقاومت سیس پلاتین انجام شد لیزین متیلاز (KDM3A) به‌عنوان تنظیم‌کننده شناسایی شد علاوه بر این، KDM3A با سرکوب بیان مهارکننده کیناز وابسته به سیکلین، در حالی که پیر شدن سلولی را ممانعت می‌کند باعث رشد سلول سرطان تخمدان می‌شود (Sanderson, 2006).

بر اساس جدول ۲ مسیر بیوسنتز استروئید و هورمون استروئیدی به‌ترتیب در متابولیت‌های لاستترول و پروژسترون تغییر یافتند. افزایش میزان استروئید و هورمون‌های استروئیدی ریسک ابتلا به سرطان تخمدان را افزایش می‌دهد، کنترل میزان استروئیدها می‌تواند در کاهش سرطان تخمدان مؤثر باشد. آنزیم‌های استروئیدوژنیک مسئول بیوسنتز کلسترول انواع هورمون‌های استروئیدی از جمله گلوکوکورتیکوئیدها، مینرالوکورتیکوئیدها، پروژستین‌ها، آندروژن‌ها و استروژن‌ها هستند. آنها از چندین آنزیم اختصاصی سیتوکروم P450، هیدروکسی استروئید دهیدروژناز و استروئید ردوکتاز تشکیل شده‌اند. تداخل در بیوسنتز استروئید ممکن است منجر به اختلال در تولید مثل، تغییر در تمایز (جنسی)، رشد و نمو و ایجاد سرطان‌های خاص شود. همچنین نتایج نشان داده که

سلول‌های سرطان تخمدان رده SKOV3 توانست مانع رشد سلول‌های سرطانی شود. بر اساس نتایج این تحقیق مشخص شد که ویتکسین از طریق مهار ژن‌های سرکوبگر تومور AHRI و p53 و ژن انکوژن Kras سبب تغییرات عمده در مسیرهای متابولیکی و در نتیجه مهار سرطان می‌شود. با توجه به بررسی انجام شده بر روی سلول‌های سرطان تخمدان رده SKOV3 به روش‌های Real time PCR، MTT و  $^1\text{H NMR}$  می‌توان ویتکسین را برای جلوگیری از رشد سلول سرطان تخمدان در نظر گرفت. بنابراین ویتکسین احتمالاً می‌تواند در فرآیند درمان سرطان نیز مؤثر باشد. با این حال، برای تأیید بیشتر، نیاز به تحقیقات گسترده تری در جهت افزایش اعتبارسنجی این یافته‌ها و بررسی مسیرهای سیگنالینگ مرتبط با این تغییرات است.

علاوه بر این، مطالعات اخیر که بر روی سلول‌های سرطانی A549 انجام شد، نشان داده است که آمینواسیل tRNA سنتتازها به واسطه برخی از مسیرهای سیگنالینگ و همرا با ژن p53 در تنظیم تومورها نقش دارند (Zhou *et al.*, 2020).

بر اساس تحقیقات گذشته روی اثرات ویتکسین و همچنین بر اساس نتایج به دست آمده در این مطالعه با استفاده از روش MTT نشان داد که ویتکسین می‌تواند به واسطه آپوپتوز باعث مهار رشد سلول‌های سرطان تخمدان رده SKOV3 شود. ویتکسین همچنین با تغییر در بیان ژن‌های مؤثر در فرآیند تومورزایی سرطان تخمدان، باعث افزایش بیان ژن‌های سرکوبگر تومور و کاهش بیان انکوژن‌ها شده است. و به دنبال آن ویتکسین با تغییر در متابولوم

## REFERENCES

- Babaei, F.; Moafizad, A.; Darvishvand, Z.; Mirzababaei, M.; Hosseinzadeh, H.; & Nassiri-Asl, M. (2020). Review of the effects of vitexin in oxidative stress-related diseases. *Food Science & Nutrition*.
- Badgwell, D. B.; Lu, Z.; Le, K.; Gao, F.; Yang, M.; Suh, G. K. & Bast, R. C. (2012). The tumor-suppressor gene ARHI (DIRAS3) suppresses ovarian cancer cell migration through inhibition of the Stat3 and FAK/Rho signaling pathways. *Oncogene*, 31(1), 68-79.
- Bonifácio, V. D.; Pereira, S. A.; Serpa, J.; & Vicente, J. B. (2020). Cysteine metabolic circuitries: druggable targets in cancer. *British Journal of Cancer*, 1-18.
- Dobrzycka, B.; Terlikowski, S. J.; Kowalczyk, O.; Niklińska, W.; Chyczewski, L.; & Kulikowski, M. (2009). Mutations in the Kras gene in ovarian tumors. *Folia histochemica et cytobiologica*, 47(2), 221-224.
- G Li, H.; Tian, Y.; Li, X.; Wang, B.; Zhai, D.; Bai, Y.; et al. (2019). Knockdown of IARS2 inhibited proliferation of acute myeloid leukemia cells by regulating p53/p21/PCNA/eIF4E pathway. *Oncol. Res.* 27, 673–680. doi: 10.3727/0965-04018x15426261956343.
- Ganesan, K.; & Xu, B. (2017). Molecular targets of vitexin and isovitexin in cancer therapy: a critical review. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1401(1), 102-113.
- Gil, J.; Ramírez-Torres, A.; & Encarnación-Guevara, S. (2017). Lysine acetylation and cancer: A proteomics perspective. *Journal of proteomics*, 150, 297-309.
- Gottschalk, M.; Ivanova, G.; Collins, D. M.; Eustace, A.; O'Connor, R.; & Brougham, D. F. (2008). Metabolomic studies of human lung carcinoma cell lines using in vitro  $^1\text{H NMR}$  of whole cells and cellular extracts. *NMR in Biomedicine: An International Journal Devoted to the Development and Application of Magnetic Resonance In vivo*, 21(8), 809-819.
- He, M.; Min, J. W.; Kong, W. L.; He, X. H.; Li, J. X.; & Peng, B. W. (2016). A review on the pharmacological effects of vitexin and isovitexin. *Fitoterapia*, 115, 74-85.

- Lehnhardt, F. G.; Bock, C.; Röhn, G.; Ernestus, R. I.; & Hoehn, M. (2005). Metabolic differences between primary and recurrent human brain tumors: a <sup>1</sup>H NMR spectroscopic investigation. *NMR in Biomedicine: An International Journal Devoted to the Development and Application of Magnetic Resonance In vivo*, 18(6), 371-382.
- Li, T.; & Deng, P. (2017). Nuclear Magnetic Resonance technique in tumor metabolism. *Genes & diseases*, 4(1), 28-36.
- Lien, E. C.; Ghisolfi, L.; Geck, R. C.; Asara, J. M.; & Toker, A. (2017). Oncogenic PI3K promotes methionine dependency in breast cancer cells through the cystine-glutamate antiporter xCT. *Science signaling*, 10(510).
- Lodi, A.; & Ronen, S.M. (2011). Magnetic resonance spectroscopy detectable metabolomic fingerprint of response to antineoplastic treatment. *PloS one*, 6(10), e26155.
- Mukhtar, E.; Adhami, V. M.; & Mukhtar, H. (2014). Targeting microtubules by natural agents for cancer therapy. *Molecular cancer therapeutics*, 13(2), 275-284.
- Mungenast, F.; & Thalhammer, T. (2014). Estrogen biosynthesis and action in ovarian cancer. *Frontiers in endocrinology*, 5, 192.
- Ninfali, P.; & Angelino, D. (2013). Nutritional and functional potential of Beta vulgaris cicla and rubra. *Fitoterapia*, 89, 188-199.
- Nunes, S. C.; Ramos, C.; Lopes-Coelho, F.; Sequeira, C. O.; Silva, F.; Gouveia-Fernandes, S & Serpa, J. (2018). Cysteine allows ovarian cancer cells to adapt to hypoxia and to escape from carboplatin cytotoxicity. *Scientific reports*, 8(1), 1-17.
- Paramee, S.; Sookkhee, S.; Sakonwasun, C.; Takuathung, M.N.; Mungkornasawakul, P.; Nimlamool, W.; & Potikanond, S. (2018). Anti-cancer effects of Kaempferia parviflora on ovarian cancer SKOV3 cells. *BMC complementary and alternative medicine*, 18(1), 1-13.
- Ping, Y.; Xu, C.; Xu, L.; Liao, G.; Zhou, Y.; Deng, C.; & Xiao, Y. (2020). Prioritizing gene cascading paths to model colorectal cancer through engineered organoids. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 8.
- Ren, Y. A.; Mullany, L. K.; Liu, Z.; Herron, A. J.; Wong, K. K.; & Richards, J. S. (2016). Mutant p53 promotes epithelial ovarian cancer by regulating tumor differentiation, metastasis, and responsiveness to steroid hormones. *Cancer research*, 76(8), 2206-2218.
- Sanderson, J.T. (2006). The steroid hormone biosynthesis pathway as a target for endocrine-disrupting chemicals. *Toxicological sciences*, 94(1), 3-21.
- Sanderson, S. M.; Gao, X.; Dai, Z.; & Locasale, J. W. (2019). Methionine metabolism in health and cancer: a nexus of diet and precision medicine. *Nature Reviews Cancer*, 19(11), 625-637.
- Silwal-Pandit, L.; Langerød, A.; & Børresen-Dale, A. L. (2017). TP53 mutations in breast and ovarian cancer. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 7(1), a026252.
- Sutton, M. N.; Huang, G. Y.; Liang, X.; Sharma, R.; Reger, A. S.; Mao, W.; ... & Bast, R. C. (2019). DIRAS3-Derived peptide inhibits autophagy in ovarian cancer cells by binding to beclin1. *Cancers*, 11(4), 557.
- Wang, W.; Cheng, H.; Gu, X.; & Yin, X. (2019). The natural flavonoid glycoside vitexin displays preclinical antitumor activity by suppressing NF-κB signaling in nasopharyngeal carcinoma. *OncoTargets and therapy*, 12, 4461.
- Watanabe, T.; Miura, T.; Degawa, Y.; Fujita, Y.; Inoue, M.; Kawaguchi, M.; & Furihata, C. (2010). Comparison of lung cancer cell lines representing four histopathological subtypes with gene expression profiling using quantitative real-time PCR. *Cancer cell international*, 10(1), 1-12.

- Yamamoto, J.; Han, Q.; Inubushi, S.; Sugisawa, N.; Hamada, K.; Nishino, H & Hoffman, R. M. (2020). Histone methylation status of H3K4me3 and H3K9me3 under methionine restriction is unstable in methionine-addicted cancer cells, but stable in normal cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 533(4), 1034-1038.
- Yue, X.; Zhao, Y.; Xu, Y.; Zheng, M.; Feng, Z.; & Hu, W. (2017). Mutant p53 in cancer: accumulation, gain-of-function, and therapy. *Journal of molecular biology*, 429(11), 1595-1606.
- Zhou, Z.; Sun, B.; Nie, A.; Yu, D.; & Bian, M. (2020). Roles of Aminoacyl-tRNA Synthetases in Cancer. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8, 1446.