Archive of SID

مقاله پژوهشی

مجله سلول و بافت (علمی - پژوهشی)
جلد۹، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۷

بررسی اثر ضد سرطانی عصاره هیدروالکلی بذر خارسنبل(*Blepharis persica*) بر رده سلول‌های سرطانی سینه و پروستات و اثر هم‌افزایی آن با داروی دوکسوروبیسین

کیان آقاعباسی .Ph.D. Student[۱]، حسن حسنی کومله .Ph.D[۲*]، ناهید عسکری .Ph.D[۳]، مسعود ترک زاده ماهانی .Ph.D[۳]، عبدالله رمضانی قرا .Ph.D [۴]

۱- دانشجوی دکتری بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه گیلان، پردیس دانشگاهی، بخش بیوتکنولوژی کشاورزی، رشت، ایران
۲- دانشگاه گیلان، دانشکده علوم کشاورزی ، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، رشت، ایران
۳- دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، گروه بیوتکنولوژی، کرمان، ایران
۴- دانشگاه جیرفت، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی گیاهی، کرمان ، ایران

* پست الکترونیک نویسنده مسئول: kumleh@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۵/۲ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۰/۱۸

چکیده

هدف: در این تحقیق اثرات ضدسرطانی و آپوپتوزیسی عصاره هیدروالکلی بذر خارسنبل *Blepharis persica* بر روی سلول‌های سرطانی سینه و پروستات و اثر هم‌افزایی آن با دارو دوکسوروبیسین مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: عصاره هیدروالکلی بذر با روش خیساندن و با اتانول ۷۰درصد تهیه شد. ۸ غلظت عصاره و ۴ غلظت ترکیبی از دوکسوروبیسین (۱۲۵و ۶۲/۵ نانوگرم بر میلی‌لیتر) با عصاره غلظت‌های (۰/۳۱۵و ۰/۶۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) تهیه شد. سلول‌های سرطانی سینه (MCF-7)، پروستات (LNCaP) و سلول‌های فیبروبلاست (SKM)کشت داده شدند. درصد زنده‌مانی رده‌های سلولی با تستMTT اندازه‌گیری و میزان آپوپتوزیس در رده‌های سلولی از روش Annexin/PI سنجیده شد و بررسی بیان ژن *BCL2* در مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت با روش Real-Time quantitative RT-PCR (RT-qPCR) صورت گرفت.

نتایج: عصاره به‌ترتیب بر رده‌های سلولی پروستات، پستان و فیبروبلاست بیشترین اثر بازدارندگی رشد را نشان داد. اثر ترکیبی دوکسوروبیسین با عصاره در هر سه رده سلولی با کنترل هیچ‌گونه تفاوت معناداری نداشت. نتایج Annexin/PI نشان‌داد میزان آپوپتوزیس اولیه، تاخیری و نکروز در رده‌های سلولی تیمار شده نسبت به کنترل افزایش داشته است. بیان ژن BCL_2 در رده‌های سلولی با تیمار غلظت ۱/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره گیاه در مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت نسبت به ژن کنترل بتااکتین به‌طور معنی‌داری کاهش یافته بود ($p<۰/۰۱$).

نتیجه‌گیری: عصاره هیدروالکلی بذر خارسنبل توانایی کاهش تکثیر سلول‌های سرطانی سینه و پروستات و القا آپوپتوزیس در سلول‌های سرطانی را دارد و هرچند که در غلظت کم موجب افزایش اثرات ضد سرطانی دوکسوروبیسین نمی‌شود، ولی می‌تواند جایگزنی برای آن با عوارض جانبی کمتر باشد.

واژگان کلیدی: آپوپتوزیس، خارسنبل ، BCL2 ، LNCaP، MCF-7

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

سرطان به‌عنوان یکی از کشنده‌ترین عوامل مرگ و میر در دنیا، سالیانه بیش از ۷/۵ میلیون نفر را در به کام مرگ می‌کشاند (۱). بر اساس پیش‌بینی سازمان بهداشت جهانی بروز سرطان در ایران تقریبا ۸۶۰۰۰ نفر در سال ۱۳۹۹ شمسی خواهد بود که میزان مرگ و میر ناشی از آن حدود ۶۳۰۰۰ مورد خواهد رسید (۲ و ۳). درکشورهای در حال توسعه سرطان پستان از جمله شایع‌ترین سرطان‌ها در بین زنان است (۴). این سرطان از عوامل اصلی به خطر انداختن سلامتی در میان زنان است و اولین عامل مرگ و میر بر اثر سرطان در بین زنان محسوب می‌شود (۵). بر اساس آمار وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی در سال ۱۳۹۲ بیش از ۴۰۰۰۰ نفر در ایران دچار این بیماری شده‌اند و بر این تعداد هر ساله افزوده می‌شود (۶). از سوی دیگر پروستات یکی از غدد مهم دستگاه تولید مثل در مردان است و بیماری‌های ناشی از آن دارای اهمیت فراوانی هستند (۷). سرطان پروستات شایع‌ترین سرطان بدخیم در میان مردان است، بیشترین مورد بروز سرطان در مردان (حدود ۲۸ درصد) و دومین عامل مرگ‌ومیر (حدود۱۱ درصد) را به‌خود اختصاص داده است. فاکتورهای ژنی و عوامل محیطی از مهم‌ترین فاکتورهای هستند که در بروز سرطان سینه و پروستات نقش دارند، از طرف دیگر عواملی محیطی مانند رژیم غذایی، نحوه زندگی، شرایط جغرافیایی، عوامل استرس‌زا، سن و چاقی در بروز این بیماری دخیل هستند (۱۱-۸). متخصصین بالینی از روش‌های متعددی در تشخیص و درمان انواع سرطان‌ها استفاده می‌کنند که شیمی درمانی، پرتو درمانی، جراحی و هورمون درمانی عمده‌ترین آن‌ها هستند ولی مهم‌ترین روش مبارزه با سرطان، شیمی‌درمانی است که عوارض جانبی زیادی از جمله خستگی، حالت تهوع و ریزش مو و غیره را برای بیمار ایجاد می‌کند، این عوارض می‌تواند بر روی کیفیت زندگی بیمار تاثیر زیادی داشته باشد (۱۲و۱۳). داروی دوکسوروبیسین با نام تجاری آدریامایسیین یکی از قوی‌ترین و اصلی‌ترین داروهای شیمی درمانی گروه آنتراسیکلین است. این دارو در درمان بسیاری از سرطان‌ها نظیر معده، پستان، ریه، تخمدان، استخوان، بیماری هوچکین و سرطان خون مورد استفاده قرار می‌گیرد، این دارو همانند دیگر داروهای شیمی درمانی دارای عوارض جانبی بسیار زیادی است که می‌توان به تب، مسمومیت قلبی و غیره اشاره کرد (۱۶-۱۴). چندین مکانیسم برای اعمال خاصیت سمیت این دارو در نظر گرفته می‌شود که مهم‌ترین آن‌ها آسیب به DNA می‌باشد. دوکسوروبیسین با پایداری اتصال کمپلکس آنزیم توپوایزومراز II به DNA از اتصال مجدد رشته‌های شکسته شده جلوگیری می‌کند. آسیب به DNA به‌عنوان یک محرک سلولی باعث فعال شدن پروتئین‌های مسیر آپوپتوزیس می‌شود (۱۷). پروتئین‌های خانواده BCL_2، یک گروه از تنظیم کننده‌های داخل سلولی آپوپتوزیس یا مرگ برنامه ریزی شده سلول هستند. تعدادی از پروتئین‌ها خانواده BCL_2، پروآپوپتوتیک هستند یعنی آپوپتوزیس به‌وسیله افزایش بیان این پروتئین‌ها راه اندازی می‌شود و BAX جز این گروه است. تعداد دیگری از پروتئین-های خانواده BCL_2 آنتی‌آپوپتوتیک هستند یعنی آپوپتوزیس به‌وسیله مهار آزادسازی این پروتئین‌ها باز داری می‌شود مانند BCL_2 که به‌طور گسترده در سطح غشا خارجی میتوکندری و ER غشا هسته واقع

www.SID.ir

Archive of SID

شده‌اند و تمامیت غشا را حفظ می‌کنند (۲۰-۱۸). تحقیقات زیادی در مدت بیش از بیست سال بر روی مرگ برنامه‌ریزی شده سلول یا آپوپتوزیس صورت گرفته است و در نتیجه این تحقیقات ثابت شده است که مرگ برنامه ریزی شده سلول به‌عنوان یک مانع طبیعی رشد سرطان می‌باشد، ترکیبات طبیعی موجود در گیاهان با تاثیر بر روی مسیر آپوپتوزیس سلول‌های سرطانی می‌توانند به‌عنوان یک ترکیب ضد توموری شناخته شوند (۲۱).

جنس *Blepharis* دارای ۱۰۰ گونه گیاهی است که در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری رشد می‌کند. گیاه خارسنبل از جنس *Blepharis* با نام علمی *Blepharis persica* شناخته می‌شود (۲۲). گونه مشابه این گیاه، *B.edulis* است که در بیابان‌های خاورمیانه و آفریقا رشد می‌کند (۲۳). خارسنبل گیاهی است چندساله و کم ارتفاع، دارای برگ بیضی و میوه کپسولی است. ریشه آن مدر است و برگ‌های آن دارای خاصیت بند آوردن خون هستند. در حال حاضر تحقیقات زیادی بر روی این گیاه انجام نشده است و اطلاعات کمی از خواص و فواید دارویی این گیاه وجود دارد (۲۴). با توجه به آن‌که گیاهان دارای اثرات ضد توموری از جمله القای آپوپتوزیس و مرگ سلول‌های سرطانی هستند و عوارض جانبی از استفاده آن‌ها کمتر است و همچنین این گیاه در مناطق بومی جنبه دارویی دارد، در این تحقیق بر آن شدیم که در ابتدا اثرات ضدسرطانی عصاره بذر گیاه خارسنبل با کمک تست MTT (Dimethylthiazol-2-yl-2,5-diphenyltetrazolium bromide) بر روی رده‌های سلول‌های سرطانی سینه (MCF-7) و پروستات (LNCaP) سنجیده شود و با رده سلولی نرمال فیبروبلاست (SKM) به‌عنوان گروه کنترل مقایسه شود و همچنین میزان القا آپوپتوزیس در رده‌های سلولی با کمک روش فلوسایتومتری سنجش شود. ترکیب دارو دوکسوروبیسین و عصاره نیز مورد سنجش قرار گرفت و در پایان بیان ژن Bcl_2 با کمک روش Real-Time quantitative RT-PCR برای هر یک از گروه‌های مورد مطالعه مورد سنجش قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

تهیه نمونه گیاهی: این تحقیق یک تحقیق بنیادی، کاربردی است. گیاه خارسنبل از مناطق جنوبی و گرمسیر استان کرمان در فصل بهار در سال ۱۳۹۶ از منطقه کهنوج با طول جغرافیایی ۵۷ و عرض جغرافیایی ۲۷ درجه و ارتفاع از سطح دریا ۵۰۸ متر جمع آوری شد و بعد از تائید استاد گیاه شناسی ، گیاه در سایه و دمای محیط خشک شد و سپس بذرهای گیاه جدا شدند و تا زمان عصاره‌گیری در دمایی اتاق نگه‌داری شدند.

تهیه عصاره گیاهی: برای تهیه عصاره هیدروالکی از روش خیساندن (Macerate) و اتانول ۷۰ درصد استفاده شد (۲۵). ابتدا ۴۰ گرم از بذر به‌کمک دستگاه آسیاب کاملا پودر شد. پودر حاصل در ۳۰۰ میلی‌لیتر الکل ۷۰ درصد حل شد و به‌مدت ۷۲ ساعت روی دستگاه شیکر با دور متوسط در دمایی اتاق قرار داده شد. در مرحله بعدی کار با کمک کاغذ صافی واتمن ۱ در مدت ۳۰ دقیقه عصاره‌های صاف شد و جداسازی الکل با کمک دستگاه روتاری در خلا در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد و مدت ۴۵ دقیقه صورت گرفت. در نهایت برای جداسازی کامل حلال از عصاره در داخل

www.SID.ir

Archive of SID

آون به‌مدت ۴۸ساعت در دمایی ۴۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. عصاره حاصل تا فرایند آزمایشگاهی در فریزر ۲۰- سانتی‌گراد نگه‌داری شد .

تهیه غلظت‌های مختلف عصاره و دارو: در این تحقیق از ۸ غلظت عصاره هیدروالکلی بذر خارسنبل و ۴ غلظت دارویی دوکسوروبیسین استفاده شد. به‌منظور تهیه ۱۰ میلی‌لیتر استوک۱۰ میلی‌گرم برمیلی‌لیتر عصاره هیدرو الکلی، ابتدا میزان ۱۰۰ میلی‌گرم از عصاره نیاز است که این مقدار در ۴۰۰ میکرو لیتر Dimethyl sulfoxide (DMSO) (۴ درصد) حل شد، در ابتدا ۱ میلی‌لیتر محیط کشت فاقد سرم اضافه شد و بعد از آن مابقی محیط کشت اضافه تا کاملا در عصاره حل شود. غلظت‌های دیگر به‌ترتیب ۷/۵، ۵ ، ۲/۵، ۱/۲۵، ۰/۶۲۵ ، ۰/۳۱۵و ۰/۱۵۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از استوک اصلی با کمک فرمول $m_1c_1=m_2c_2$ به‌دست آمد. در این تحقیق از دارو دوکسوروبیسین ۵۰ میلی‌گرم بر ۲۵میلی لیتر به‌صورت محلول با نام تجاری Ebedoxo استفاده شد. ابتدا برای تهیه ۷ میلی‌لیتر از استوک نانوگرم بر میلی لیتر ۵۰۰ از این دارو ۱/۲۵ میکرولیتر از آن را در ۴۰۰ میکرولیتر DMSO و محیط کشت بدون سرم به‌صورت کم کم اضافه شد تا حجم محلول ۷ میلی‌لیتر شود و از استوک به دست آمده غلظت‌های ۲۵۰ ، ۱۲۵ و ۶۲/۵ نانوگرم بر میلی‌لیتر دارو تهیه شد. عصاره موجود و دارو را قبل از رقت سازی با فیلتر سررنگی ۰/۲۲میکرومتر فیلتر شدند. در این تحقیق همچنین اثر ترکیبی دارو دوکسوروبیسین در غلظت‌های کم (۱۲۵و ۶۲/۵ نانوگرم برمیلی لیتر با غلظت‌های کم عصاره (۰/۶۲۵ و ۰/۳۱۵ میلی گرم بر میلی لیتر) مورد سنجش قرار گرفت .

کشت سلولی : در این پژوهش، سه رده سلول‌های سرطانی سینه (MCF7)، پروستات (LNCaP) و فیبروبلاست (SKM) در داخل فلاسک ۲۵ سانتی‌متر مربع به‌صورت کشت شده از انستیتو پاستور ایران خریداری شدند. سلول‌های سرطانی در محیط کشت RPMI ۱۶۴۰ و سرم جنینی گاو FBS ۱۰ درصد به‌همراه ۱ درصد آنتی بیوتیک‌های استرپتومایسین و پنی‌سیلین کشت داده شدند و هر سه رده سلولی را در انکوباتور ۵ درصد CO_2 و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شدند. سلول‌های نرمال فیبروبلاست در محیط کشت DMEM حاوی ۱۰ درصد سرم FBS کشت داده شدند. سلول‌های سرطانی سینه و پروستات بعد از ده مرحله پاساژ منظم و سلول‌های فیبروبلاست بعد از ۵ مرحله پاساژ آماده تیمار با غلظت‌های مختلف عصاره، دارو و ترکیب غلظت کم‌دارو و عصاره شدند.

تست تترازولیوم MTT: رده‌های سلولی در فلاسک ۲۵ سانتی‌متر مربع به صورت مجزا کشت داده شدند و بعد از چند پاساژ به فلاسک ۷۵ سانتی‌متر مربع انتقال داده شدند و در انکوباتور ۵ درصد CO_2 و دمای ۳۷ درجه سانتی گراد کشت داده شدند. بعد از شمارش سلولی به میزان ۱۰۰ میکرولیتر شامل تقریبا ۷۰۰۰ سلول از سوسپانسیون سلولی در پلیت‌های ۹۶ خانه ریخته شدند و به‌مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور حاوی CO_2 و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌منظور چسبیدن و رشد سلول‌ها به کف پلیت قرار داده شدند. سپس محیط کشت رویی سلول‌ها خارج شد و محیط حاوی غلظت‌های عصاره، دارو و ترکیب دارو با عصاره و

www.SID.ir

Archive of SID

همچنین محیط کشت فاقد سرم به‌عنوان کنترل به سلول‌ها اضافه شدند. بعد از ۲۴ ساعت به‌هر یک از چاهک‌ها به میزان ۱۰میکرولیتر MTT (-MELFORD ساخت انگلستان) اضافه شد و بعد از آن‌که ۴ ساعت در انکوباتور نگه‌داری شدند به هریک از چاهک‌ها ۱۵۰ میکرولیتر DMSO اضافه شد و بعد از ۳۰ دقیقه جذب سلول‌ها توسط دستگاه الیزا ریدر در طیف جذب ۴۹۰ و ۶۳۰ خوانده شد و بر حسب فرمول مربوطه میزان زنده‌مانی محاسبه شد.

۱۰۰ ×میانگین جذب سلول های تحت اثر ماده

توکسیک- ۱= درصد مهارکنندگی رشد

میانگین جذب کنترل منفی

درصد مهارکنندگی رشد -۱۰۰ = درصد بقا یا زنده‌مانی

بررسی مرگ برنامه‌ریزی شده سلول توسط دستگاه فلوسایتومتری: جهت سنجش میزان آپوپتوزیس در رده سلول‌های سینه، پروستات و سلول‌های فیبروبلاست عصاره هیدروالکلی با غلظت ۱/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر انتخاب شد و سلول‌های تیمار شده و بدون تیمار (کنترل) از روش Annexin/PI با کیت تشخیصی Kit I (BD Pharmingen™, USA) و با کمک دستگاه فلوسایتومتری (CYFlow شرکت partec G mbH ساخت آلمان) انجام گرفت. آزمایش به این صورت انجام شد که سلول‌های سرطانی و فیبروبلاست با عصاره هیدروالکلی ۱/۲۵ میلی‌گرم برمیلی لیتر در مدت ۲۴ ساعت تیمار داده شدند و برای هر کدام از رده‌های سلولی یک کنترل در نظر گرفته شد. سلول‌ها با محلول نمکِ فسفات با خاصیت بافری (PBS) شستشو داده شدند. بعد از سانتریفیوژ سلول‌ها، به رسوب حاصل بافر بایندینگ اضافه شد. سپس ۵ میکرولیتر از رنگ annexin V اضافه می‌شود و به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد و سلول‌ها در مرحله بعدی با محلول بایندینگ شستشو داده شدند و در ۱۰ ماکرولیتر رنگ PI به سلول‌ها اضافه شد و در پایان کار آنالیز توسط دستگاه انجام شد.

بررسی بیان ژن BCL2: فرایند استخراج RNA کل از سلول‌های سرطانی پستان، پروستات و سلول‌های فیبروبلاست بدون تیمار و تحت تیمار عصاره هیدروالکلی ۱/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بذر خارسنبل به‌مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت و همچنین تحت تیمار ترکیب عصاره ۱/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر با دارو ۶۲/۵ نانوگرم بر میلی‌لیتر انجام پذیرفت. ابتدا سلول‌های تحت تیمار و کنترل از کف فلاسک‌های ۲۵ سانتی‌متر مربع با کمک آنزیم تریپسین جدا شدند و برای مراحل استخراج آماده شدند. استخراج RNA با RNA-X PLUS انجام شد. بعد از استخراج کمیت و کیفیت RNA موجود با دستگاه اسپکتوفتومتری و ژل الکتروفورز مورد سنجش قرار گرفت. cDNA با کمک کیت سنتز (Takara ساخت ژاپن) با دستگاه PCR (Biometra GmbH ساخت آلمان) ساخته شد و توالی پرایمر رفت و برگشت ژن BCL_2 و ژن کنترل داخلی بتااکتین با استفاده از نرم‌افزار Primer3 طراحی شده و به‌منظور اطمینان بیشتر از درصد GC، دمای Tm و نداشتن دایمر با همدیگر، پرایمرها با برنامه (Gene Runner نسخه ۳.۵۰ Hasting Software, Inc) بررسی شدند (جدول۱).

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱: توالی و طول محصولات آغازگرهای مورد استفاده

Primer	Tm (C°)	Primer sequence	Product size (bp)
β- actin	64	F:GGACATCCGCAAAGACCTGTA	189
		R:ACATCTGCTGGAAGGTGGACA	
BCL_2	61	F:GTGGATGACTGAGTACCTGA	119
		R:AGCCAGGAGAAATCAAACAGA	

پس از طراحی، پرایمرها برای سنتز به شرکت FAZA Biotechسفارش داده شدند. محلول CYBR Green مخصوص فرایند Real time-qPCR از شرکت یکتا تجهیز آزما تهیه شد و بیان ژن‌های مورد نظر بعد از تیمار با کمک دستگاه rotor-Gene RG-3000 (ساخت استرالیا و شرکت CORBETT Research) مورد سنجش قرار گرفت.

آنالیز آماری

با توجه با آنکه برای هر تیمار و کنترل در تست MTT ، ۳ تکرار وجود داشت. ابتدا داده‌ها وارد اکسل شدند و سپس توسط نرم‌افزار20 SPSS در طرح کاملا تصادفی آنالیزها انجام گرفت و از آزمون ANOVA یک‌طرفه برای مقایسه گروه‌ها و آزمون دانکن برای آزمون تفاوت بین گروه‌ها استفاده شد. تست‌های مربوط به ژن BCL_2 و ژن داخلی بتا اکتین برای هر نمونه سه تکرار در دستگاه rotor-Gene RG-3000 گذاشته شد و نتایج حاصل از بیان ژن برای بررسی اختصاصیت محصول تکثیر شده، منحنی ذوب مورد بررسی قرار گرفت و داده های خام به‌صورت Ct از دستگاه استخراج شد و با کمک فرمول $\Delta\Delta$ ct نمونه‌های شاهد و تیمار به‌دست آورده و نسبت ژن هدف به ژن مرجع بتااکتین را از طریق $2^{-\Delta\Delta ct}$ ۲ محاسبه شد . نتایج حاصل از $2^{-\Delta\Delta ct}$ ۲ برای سه تکرار به اکسل منتقل شد و با نرم‌افزار SPSS در سطح ۵ و یک درصد میزان معنی‌دار شدن بیان ژن هدف مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج

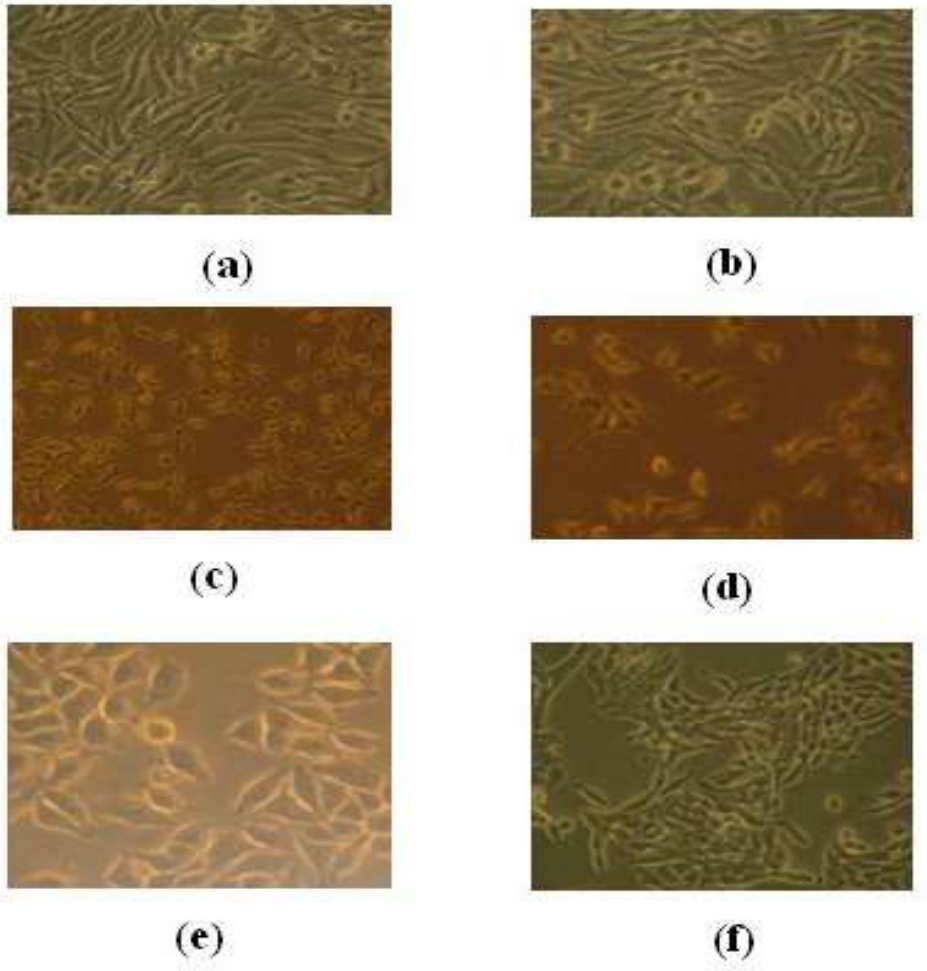
تست MTT

در این تحقیق تاثیر عصاره هیدروالکلی خارسنبل با ۸ غلظت مختلف، ۴ دوز دارو دوکسوروبیسین و ترکیب غلظت پایین عصاره با غلظت پایین دارو دوکسو روبیسین روی رده‌های سلول‌های سرطانی سینه، پروستات و سلول فیبروبلاست مورد بررسی قرار گرفت. نتایج با کمک روش MTT در سه تکرار به این شکل بود در هر سه رده سلولی تاثیر عصاره بر روی زنده‌مانی سلول‌ها در سطح ۱درصد و ۵ درصد معنی‌دار بود. به‌طوری که عصاره هیدروالکلی بذر گیاه خارسنبل در غلظت‌های ۱۰و ۷/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به ترتیب بر روی رده‌های سلولی پروستات و سینه و فبیروبلاست بیشترین تاثیر را داشت (شکل۱)، غلظت ۱۰ و ۷/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در پروستات ۸۵/۶۴ و ۸۲/۲۹ درصد سمیت سلولی، در سرطان سینه ۸۳/۰۳

www.SID.ir

Archive of SID

و ۷۷/۲۰ و در فیبروبلاست ۷۴/۶۸و ۷۲/۶۲ بازدارندگی رشد ایجاد کرده بود.

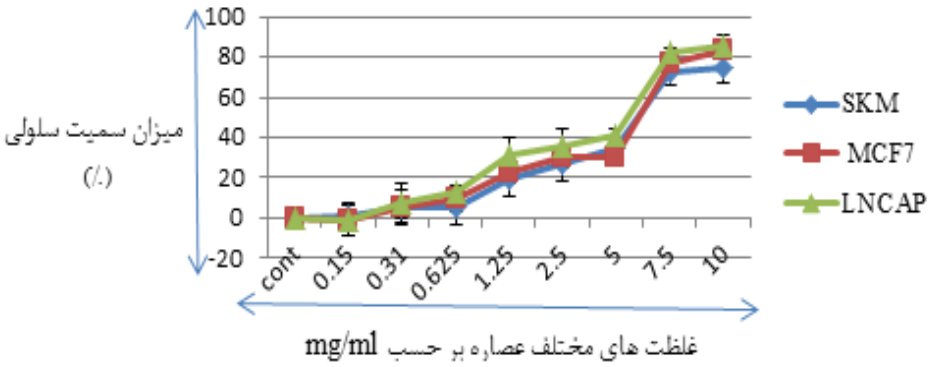


شکل ۱: (a) سلول کنترل یا بدون تیمار فیبروبلاست، (b) سلول تحت تیمار فیبروبلاست غلظت ۱/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، (c) سلول کنترل یا بدون تیمار پستان، (d) سلول پستان تحت تیمار با غلظت ۱/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، (e) سلول کنترل یا بدون تیمار پروستات، (f) سلول پروستات تحت تیمار با ۱/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در ۲۴ ساعت (بزرگ‌نمایی x ۱۰۰ رده‌های سلولی)

میزان سمیت سلولی در غلظت‌های بالا (۱۰، ۷/۵، ۵ ، ۲/۵ و ۱/۲۵) تفاوت معنی‌داری در سطح ۱ درصد بر روی رده‌های سلول‌های سرطانی و فیبروبلاست نسبت به کنترل آن‌ها وجود داشت. غلظت ۰/۱۵میلی‌گرم بر میلی‌لیتر هیچ‌گونه سمیت سلولی نداشت ولی غلظت ۰/۳۱۵ و ۰/۶۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بر روی پستان، فیبروبلاست و پروستات با آن‌که افزایش میزان سمیت سلولی مشاهده می‌شد ولی تفاوت معنی‌داری در سطح ۵ درصد میزان سمیت سلولی تیمارها با کنترل دیده نشد (شکل ۲).

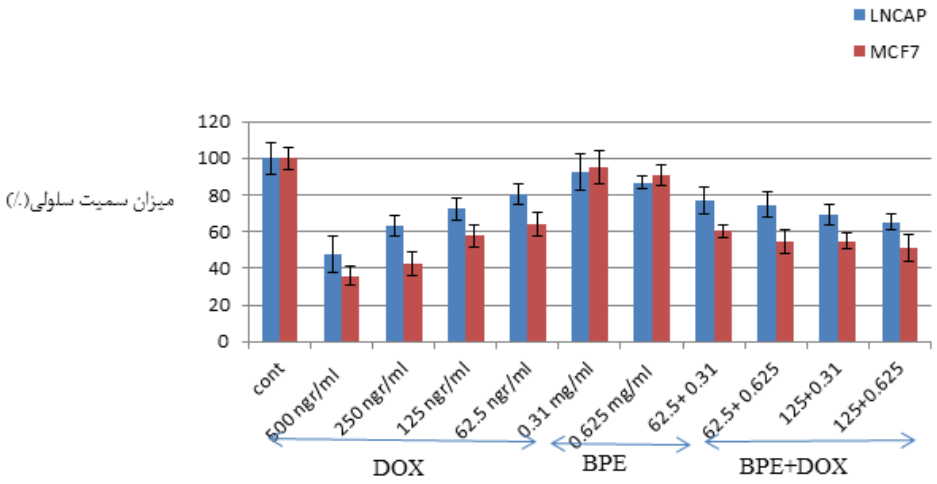
www.SID.ir

Archive of SID



شکل۲: میزان سمیت سلولی غلظت‌های مختلف (mg/ml) عصاره هیدروالکلی بذر خارسنبل بر روی رده‌های سلولی سرطان پروستات (رنگ سبز)، فیبروبلاست (رنگ آبی) و سینه (قرمز) و تفاوت معنی‌دار در سطح ۱درصد در اثر افزایش غلظت عصاره

نتایج نشان می‌دهد که با افزایش غلظت عصاره هیدروالکلی درصد زنده‌مانی هر سه رده سلولی کاهش یافته است. نتایج تست MTT در ۴ غلظت دارویی دوکسوروبیسین بر روی دو رده سلول‌های سرطانی سینه و پروستات دارای اثرات سمیت سلولی بوده و بقای سلولی را کاهش می‌دهد ، دوزهای۵۰۰ و ۲۵۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر دارو در سرطان سینه و دوز ۵۰۰ نانوگرم بر میلی لیتر در سرطان پروستات اثرات سمیت قابل توجهی داشتند، به‌طوری‌که بیش از ۵۰ درصد سلول‌ها را کشته بودند ولی اثر ترکیبی غلظت ۱۲۵و ۶۲/۵ نانوگرم بر میلی‌لیتر دارو دوکسوروبیسین با دو غلظت ۰/۳۱۵و ۰/۶۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره بذر گیاه در هر سه رده سلولی با کنترل آن‌ها هیچ‌گونه تفاوت معنی‌داری را نشان نداد (شکل ۳).



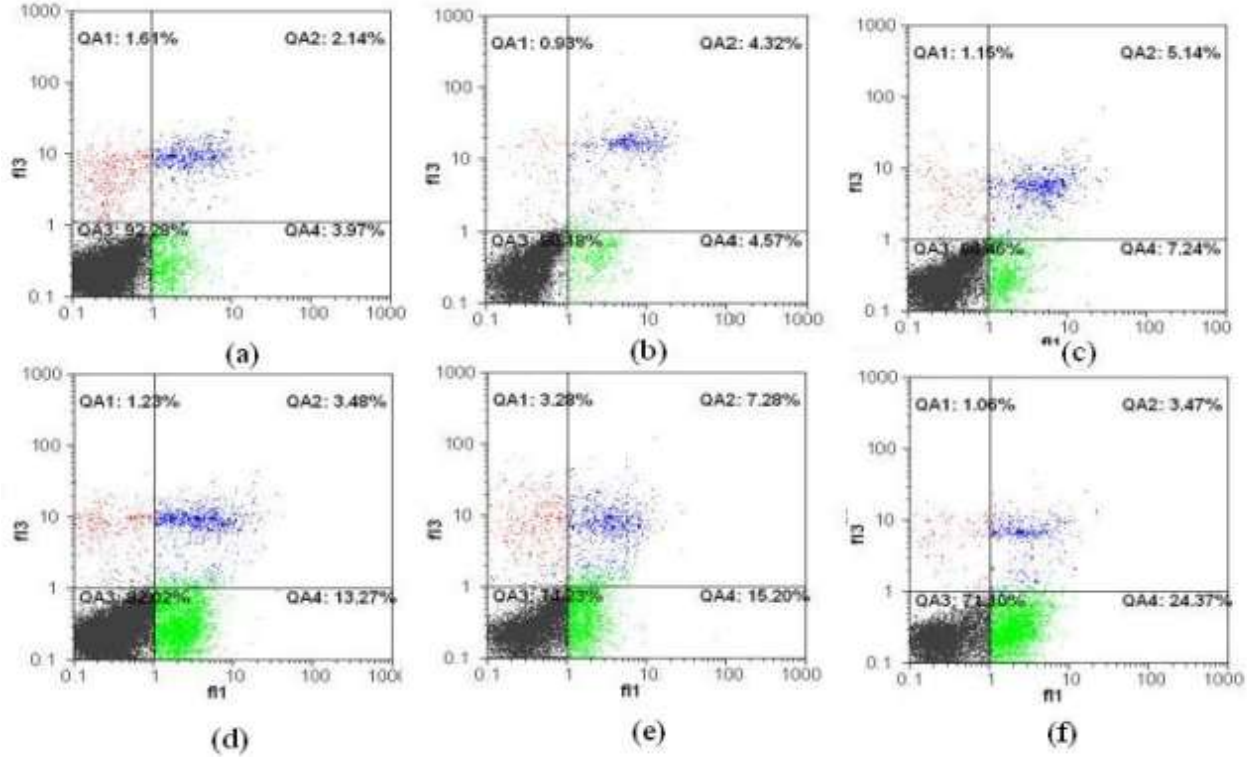
شکل۳: DOX : تاثیر دوزهای مختلف داروی دوکسوروبیسین ، BPE: تاثیرغلظت کم اثر عصاره خارسنبل بر روی سرطان پستان و پروستات. BPE+DOX: اثرترکیبی غلظت کم عصاره خارسنبل و دوز پایین دارو بر روی دو رده سلول‌های سرطانی

www.SID.ir

Archive of SID

تست فلوسایتومتری

نتایج حاصل از دستگاه فلوسایتومتری در رده سلول‌های پستان، پروستات و فیبروبلاست تیمار شده با عصاره هیدروالکلی با غلظت ۱/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و کنترل (بدون تیمار) بعد از ۲۴ روز مورد سنجش قرار گرفتند. سلول‌های کنترل پروستات، سینه و فیبروبلاست، به‌ترتیب میزان زنده‌مانی سلول‌ها ۸۴/۴۶، ۹۰/۱۸، ۹۲/۲۸ و مقدار آپوپتوزیس اولیه ۷/۲۴، ۴/۵۷، ۳/۹۷ و درصد آپوپتوزیس تاخیری ۵/۱۴، ۴/۳۲ ، ۲/۱۴ و درصد نکروزیس در سلول‌های کنترل ۱/۱۵ ، ۰/۹۳و ۱/۶۱ نشان داده شد (شکل۴).



شکل۴: نتایج حاصل از دستگاه فلوسایتومتری :Q_1= درصد میزان نکروز، Q_2= درصد آپوپتوزیس تاخیری، Q_3= درصد میزان سلول‌های زنده، Q_4= درصد سلول‌های که وارد آپوپتوزیس اولیه شدند. سلول‌های کنترل یا بدون تیمار (a) فیبرویلاست، (b) پستان و (c) پروستات، سلول‌های تحت تیمار با غلظت ۱/۲۵ میلی گرم بر میلی‌لیتر در (d) فیبروبلاست، (e) پستان و (f) پروستات

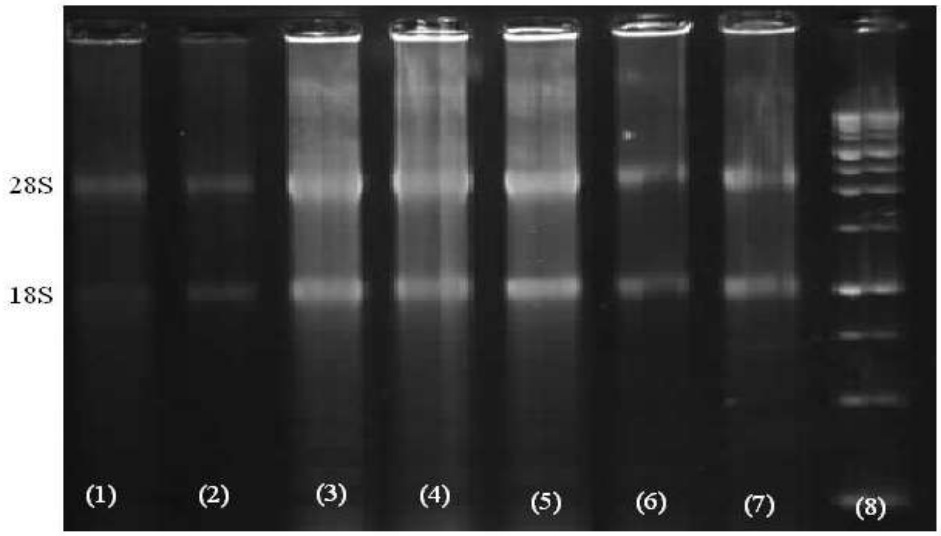
باتوجه به آنکه سلول‌ها تحت تیمار قرار نگرفته بودند میزان آپوپتوزیس و نکروزیس دیده شده در رده‌های سلولی قابل قبول بودند. درصد زنده‌مانی سلول‌های تحت تیمار با غلظت ۱/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره هیدروالکلی خارسنبل در رده‌های سلولی پروستات، پستان، فیبروبلاست به‌ترتیب ۷۱/۱۰ ،۷۴/۲۳، ۸۲/۰۲ و میزان آپوپتوزیس اولیه ۲۴/۳۷، ۱۵/۲۰ ، ۱۳/۲۷، درصد آپوپتوزیس ثانویه به‌ترتیب ۳/۴۷ ، ۷/۲۸ و ۳/۴۸ و همچنین درصد نکروز در سلول‌های تحت تیمار به‌ترتیب ۱/۰۶، ۳/۲۸ و ۱/۲۳ مشخص شد. نتایج نشان داد میزان درصد آپوپتوزیس اولیه، آپوپتوزیس تاخیری، مجموع کل

www.SID.ir

Archive of SID

آپوپتوزیس و نکروزیس دیده شده در ردههای سلولی تیمار شده نسبت به ردههای سلولی بدون تیمار افزایش داشته است.

نتایج بیان ژن BCL_2 : استخراج RNA کل از سه رده سلول‌های SKM، LNCaP و MCF-7 تحت تیمار در مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت و ترکیبی عصاره هیدروالکلی ۱/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر با دارو در مدت ۲۴ ساعت و همچنین استخراج از سلول‌های بدون تیمار یا کنترل انجام گرفت. کیفیت RNAهای نمونه‌ها روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد بررسی شد. دو باند مربوط به S ۱۸و S ۲۸به‌وضوح قابل تشخیص بودند که نشان دهنده کیفیت بالای RNA استخراجی بود (شکل ۵).

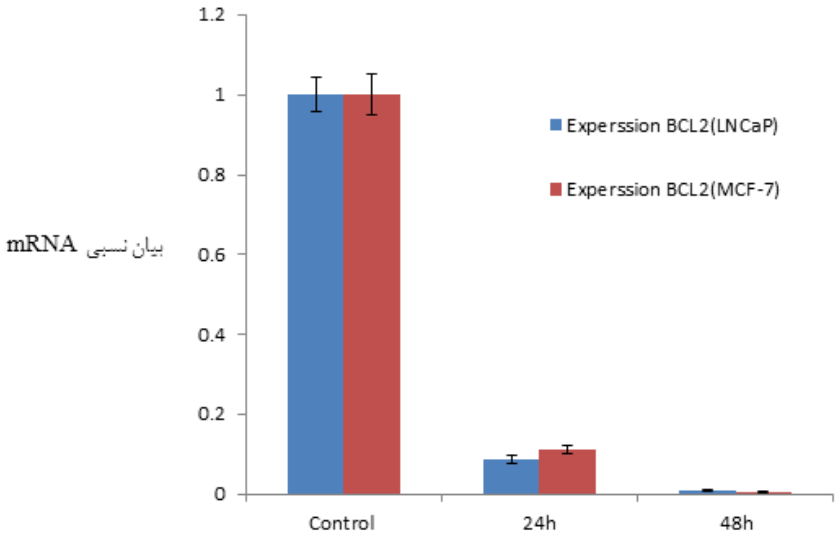


شکل ۵: RNA کل استخراج شده ردههای سلولی در مدت ۲۴ ساعت، شماره ۱: تحت تیمار پروستات ،۲: تحت تیمار پستان ۳: مربوط به‌ترکیبی دارو و عصاره، ۴: کنترل پروستات ، ۵: کنترل فیبروبلاست، ۶: کنترل پستان ۷: تحت تیمار فیبروبلاست و ۸: نردبان ملکولی یا Ladder 1kbp روی ژل اگاروز ۱/۵ درصد

بررسی تغییر بیان ژن آپوپتوزیسی BCL_2 نسبت به ژن کنترل بتا اکتین در ردههای سلولی MCF7 و LNCaP در غلظت ۱/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره و ترکیب این غلظت با غلظت کم‌دارو با روش Realtime -qPCR در مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت بدین‌شکل بود که در مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت بیان ژن BCL_2 در تمامی ردههای سلولی کاهش یافته بود و این کاهش بیان در مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت نسبت به ژن کنترل در سطح ۱ درصد معنی‌دار بود. بیشترین کاهش بیان به‌ترتیب در سلول‌های سرطانی پروستات، سینه نشان داده شد (شکل ۶).

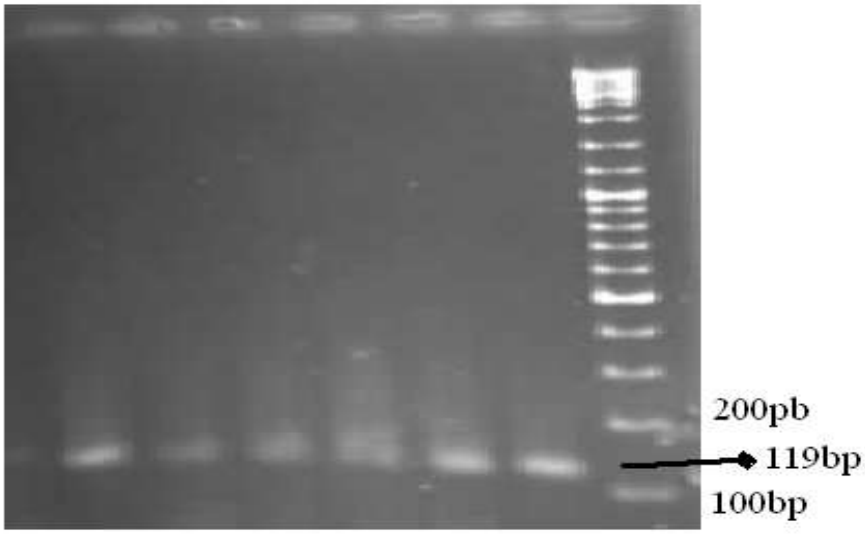
www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۶: مقایسه بیان ژن *BCL2* نسبت به ژن کنترل داخلی بتااکتین در مدت زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت در رده سلول‌های سرطانی LNCap و MCF-7

تفاوت معنی‌داری در سطح ۱ درصد بین دو تیمار غلظت ۱/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره و اثر ترکیبی آن با دارو مشاهده نشد و کاهش چشم‌گیری در بیان ژن BCL_2 بین این دو تیمار مشاهده نشد. به‌منظور اطمینان از تک باند بودن پرایمرهای موجود، محصولات حاصل از Realtime-qPCR را روی ژل آگاروز ۲ درصد بارگذاری شدند (شکل ۷).



شکل ۷: محصول Realtime-PCR– سمت راست چاهک اول نردبان ملکولی 1kbp (Ladder) و بقیه مربوط به ژن Bcl2 با طول ۱۱۹ bp در رده سلولی روی ژل آگاروز ۲درصد

www.SID.ir

Archive of SID

بحث

سرطان به‌عنوان یک بیماری کشنده در جهان شناخته می‌شود و هر ساله تعداد زیادی از افراد جدید درگیر این بیماری می‌شوند، در کشورهای در حال توسعه مانند ایران این بیماری عامل اصلی مرگ و میر انسان هاست. سرطان سینه در زنان ایرانی و سرطان پروستات در مردان ایرانی به‌عنوان شایع‌ترین سرطان‌ها مطرح است و در دهه‌های اخیر شیوع آن افزایش یافته است (۲۷و ۲۶). بیشتر گیاهان و سبزیجاتی مورد استفاده قرار می‌گیرند و در طبیعت وجود دارند دارای خاصیت دارویی هستند. این گیاهان به‌دلیل داشتن ترکیبات دارویی و خاصیت آنتی اکسیدانتی می‌توانند به‌عنوان یک عامل ضد سرطانی عمل کنند (۲۸). خاصیت دارویی گیاهان به‌دلیل وجود متابولیت‌های ثانویه است. این ترکیبات برای رشد و نمو گیاهان ضروری نیستند ولی برای حیات و بقا گیاهان ضروری هستند و همچنین دارای پیچیدگی‌های بیشتری نسبت به متابولیت‌های اولیه هستند (۲۹). در این تحقیق از گیاه خارسنبل *Belepharis persica*، گیاه بومی مناطق جنوبی ایران استفاده شد تا اثرات ضد سرطانی آن مورد سنجش قرار گیرد. گیاه خارسنبل دارای خواص دارویی است و در مناطق بومی از قسمت‌های مختلف آن استفاده می‌کنند. از ترکیبات شیمیایی موجود در گیاه خارسنبل می‌توان آلانتوان، کاتچول، تانن، ساپونین و گلوکز را نام برد (۲۵). ساپونین یک متابولیت ثانویه است که در بسیاری از گیاهان دارویی و حتی جانوران دیده شده است. این ترکیب دارای طیف وسیعی از خواص دارویی از جمله: ضد آسم، ضد التهاب، ضد باکتریایی، مفید برای قلب، تقویت کننده سیستم ایمنی، ضد قارچ و ضدسرطان است (۳۱و۳۰). با توجه به آنکه این گیاه دارای متابولیت ثانویه متعددی از جمله ساپونین است می‌توان گفت این گیاه دارای خواص ضد سرطانی می‌باشد. در این تحقیق با روش خیساندن، عصاره هیدروالکلی این گیاه طی مدت ۷۲ ساعت تهیه شد. نتایج حاصل از تست MTT این عصاره بذر خارسنبل نشان داد که تفاوت معنی‌داری در اثر سمیت سلولی این عصاره در غلظت‌های مختلف با کنترل آن وجود دارد. غلظت‌های ۱۰و ۷/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر این عصاره با آن‌که در هر سه رده سلولی بالای ۵۰ درصد مهار رشد سلول‌ها را داشت ولی کمترین بازدارندگی رشد را بر روی سلول‌های فیبروبلاست داشته است. در تحقیق Baskar و همکاران (۳۲) اثر عصاره‌های مختلف قسمت هوایی گیاه *Blepharis maderaspatensis* هم‌خانواده-*Blepharis persica* بر روی رده‌های سلول‌های سرطانی MCF7 و AGS مورد مطالعه قرار گرفت و نتایج نشان داد که غلظت‌های مختلف عصاره الکلی این گیاه در ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بر روی رده‌های سلولی معده و سینه دارای اثر مهار کنندگی رشد دارد و با افزایش غلظت و زمان، میزان تاثیر گزاری عصاره بیشتر شده است. همتا و پروینی (۳۳) به بررسی اثرات سمیت عصاره گیاه رزماری روی رده‌های سلول‌های سرطانی MCF7 القا شده توسط DMBA در رت‌های نژاد SD پرداختند، نتایج نشان داد که عصاره الکلی رزماری بر روی سلول‌های MCF7 دارای اثرات سمی قابل توجهی بوده است ولی عصاره آبی خواص ضد سرطانی بسیار ضعیفی داشت. اثر عصاره هیدروالکلی میوه خارخسک بر تکثیر سلول‌های سرطان پروستات و روده بزرگ انسان در شرایط آزمایشگاهی توسط Yaghoobi و همکاران (۳۴) انجام شد. نتایج نشان‌داد افزایش غلظت عصاره هیدروالکلی میوه خارخسک باعث افزایش اثر بازدارندگی رشد بر روی رده‌های سلول

www.SID.ir

Archive of SID

های LNCaP شده است و عصاره موجود بر روی سلول‌های فیبروبلاست اثر کمتری داشته است. در تحقیق Ashour (۳۵) در مصر صورت گرفت با کمک تست DPPH radical اثبات شد که قسمت‌های هوایی گیاه *blepharis edulis* خاصیت آنتی اکسیدانتی و ضد سرطانی دارند و همچنین نتایج حاصل از تحقیق Mahboubi و همکاران (۳۶) در ایران نشان داد گیاه *blepharis edulis* یا خارسنبل بومی ایران در قسمت های هوایی این گیاه ترکیبات فنولی زیادی وجود دارد که این ترکیبات دارای خواص آنتی اکسیدانتی و ضد میکروبی هستند، نتایج این تحقیقات یه‌همراه نتایج حاصل از این تحقیق دال بر این مطلب است که عصاره گیاه خارسنبل دارای خواص آنتی اکسیدانتی و ضد سرطانی است. در این مطالعه بیان ژن BCL_2 با کمک Realtime-PCR نیز مورد سنجش قرار گرفت و نتایج نشان داد بیان این پروتین به‌صورت معنی‌داری تحت تیمار عصاره ۱/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت کاهش یافته است. این نشان دهنده این است که عصاره هیدروالکلی تاثیر بر روی مسیر آپوپتوزیسی گذاشته است. احمدی و همکاران (۳۷) تاثیر عصاره هیدروالکلی برگ گیاه سدر (*Ziziphus spina-christi*) بر زنده‌مانی MCF7 و بیان ژن‌های *BAX* و BCL_2 مورد بررسی قرار دادند. نتایج به این شکل بود که با افزایش غلظت عصاره زنده‌مانی سلولی نسبت به کنترل کاهش معنی‌داری پیدا کرد و همچنین در غلظت ۰/۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره گیاه، بیان ژن *BCL2* دچار کاهش معنی‌داری ($p<۰/۰۱$) شده است. از عوامل دیگری که می‌تواند در کاهش بیان BCL_2 موثر باشد ساپونین است، ساپونین به‌عنوان یک متابولیت ثانویه می‌تواند یک عامل موثر در آپوپتوزیس سلول‌های سرطانی و کاهش دهنده بیان ژن BCL_2 باشد (۳۸).

نتایج این تحقیق نیز نشان داد که عصاره هیدروالکلی این گیاه کاهش دهنده بیان BCL_2 است که می‌توان به‌دلیل وجود ساپونین در این گیاه نسبت داد. نتایج حاصل از دستگاه فلوسایتومتری نشان‌دهنده همین مطلب بود که سلول‌های سرطانی رو به آپوپتوزیس آورده‌اند و عصاره حاصل بر روی مسیر آپوپتوزیس سلول‌های سرطانی سینه و پروستات تاثیر داشته است.

نتیجه گیری

نتایج این تحقیق حاکی از اثر بالقوه عصاره عصاره هیدروالکلی بذر گیاه خارسنبل بر بیان ژن BCL_2 در سلول‌های سرطانی پستان و پروستات انسان و ارتباط آن با مهار رشد سلول‌های سرطانی است. با توجه به آن در مرحله بعدی کار با جداسازی ماده موثره این گیاه و تحقیقات تکمیلی می‌توان به‌عنوان یک ترکیب موثر در درمان سرطان معرفی شود. نتایج همچنین نشان داد عصاره این گیاه بر روی مسیر آپوپتوزیس تاثیر دارد با تحقیقات تکمیلی از جمله بررسی بیان ژن‌های دیگری که در مسیر آپوپتوزیس درگیر هستند و می‌تواند به‌طور دقیق‌تری پاسخگو این مطلب باشد که عصاره حاصل به‌عنوان ترکیبی موثر برای درمان سرطان سینه و پروستات مورد استفاده قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

این مقاله از پایان نامه دوره دکترای رشته بیوتکنولوژی کشاورزی مصوب در دانشکده کشاورزی دانشگاه گیلان استخراج شده است. از مسئولین آزمایشگاه ژنتیک و بیوتکنولوزی دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته کرمان جهت قرار دادن امکانات و وسایل آزمایشگاهی و آقایان دکتر علی درخشانی، دکتر فیروز جنت علی پور که ما را در انجام و ارتقاء کیفی این پژوهش یاری دادند، صمیمانه تشکر و قدردانی می شود.

www.SID.ir

Archive of SID

منابع

1. Deka SJ, Mamdi N, Manna D, Trivedi V. Alkyl Cinnamates Induce Protein Kinase C Translocation and Anticancer Activity against Breast cancer cells through Induction of the Mitochondrial Pathway of Apoptosis. J Breast Cancer. 2016; 19(4): 358-371.

2. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN. Int J Cancer .2015; 136(5): 359-386.

3. Mousavi SM, Gouya MM, Ramazani R, Davanlou M , et al. Cancer incidence and mortality in Iran. Ann Oncol. 2009; 20(3): 556-563.

4. Salehi F, Mohsenzadeh F, Aefi M. Prevalence of anxiety of death in patients with breast cancer in Kermanshah , 2015. Ir Jof Breast Dis. 2015; 8(4): 36-40.

5. Kruk J, Aboul-Enein Hy. Psychological stress and the Risk of breast cancer: A case-control study. Cancer Detect Prev. 2004; 28(6): 399-408.

6. Jamshidinaeeni Y, Davoodi H, Esmaeili S. Effects of Vitamin D on risk of breast cancer. Iran J Nutr Sci Food Technol. 2013; 7(4)(27): 53-62.

7. Jemal A, Murray T, Ward E, Samuls A, et al. Cancer statistics . CA cancer J. Clin. 2005; 55(1): 10-30.

8. Moheghi N, Afshari JT, Brook A. The Cytotoxic Effect of *Zingiber Afficinale* in Breast Cancer (MCF7) Cell line. J Ofogh Danesh. 2011; 17(3): 28-34.

9. Chikezie O. Madu and Yi Lu.Novel diagnostic biomarkers for prostate cancer. J cancer. 2010; 1(1):150-177.

10. DeMarzo AM, Nelson WG, Isaacs WB, Epstein JI. Pathological and molecular aspects of prostate cancer .Lancet .2003; 361; 955-964.

11. Shingo A, Hidewaki N, Toyomasa K. Molecular Features of the Transition from prostatic Intraepithelial Neoplasia (PIN) tp prostate cancer: Genome-wide Gene-expression Profiles of Prostate cancers and PINs. Cancer Res. 2004; 64(17): 5963-72.

12. Glause A, Muller S. Hemoglobin and fatigue in cancer patients in separable twice. Sohweiz Med Wochenschr .2000; 130(13): 471-477.

13. Hyun lee. Fatigue and hope: Relationships to Psychosocial adjustment in Korean woman with breast cancer. Appl Nurs Res. 2001; 14(2): 87-93.

14. Kajstura J, Cheng W, Sarangarajan R, Lim P, et al. Necrotic and apoptotic myocyte cell death in the aging heart of Fischer 344 rats. Am. J. Physiol. 1996; 271 (3 Pt 2): 1215-1228.

15. Frias MA, Somers S, Gerber-Wicht C, Opie LH, et al. The PGE2-Stat3 interaction in doxorubicin-induced myocardial apoptosis. Cardiovasc. Res. 2008; 80 (1): 69-77.

16. Thorn CF, Oshiro C, Marsh S, et al. Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects. Pharmacogenetics Genomics. 2011; 21(7): 440-6.

17. Cruet Hennequart S, Prendergast ÁM, Shaw G, Barry FP, et al. Doxorubicin induces the DNA damage response in cultured human mesenchymal stem cells. International journal of hematology. 2012; 96(5): 649-656.

18. Cory S, Adams, JM, The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch, Nature Reviews Cancer. 2002; 2(9): 647-656.

www.SID.ir

Archive of SID

19. Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer S J. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis, Genes & development. 1999; 13(15): 1899-1911

20. Green DR, Kroemer G.The pathophysiology of mitochondrial cell death.Science Signalling. 2004; 305: (5684): 626.

21. Kaufmann B, Christen P, Veuthey JL. Parameters affecting microwave-assisted extraction of withanolides. Phytochemical Analysis. 2002; 12(5): 327–331.

22. Mozffarian V. A Dictionary of Iranian Plant names.Farhang Moaser. Tehran, Iran.1996; p. 172.

23. Gutterman Y. Delayed seed dispersal and rapid germination as survival mechanisms of the desert plant *Blepharis persica* (Burm.) Kuntze. Oecologia.1972; 10(2): 145-149.

24. Mir Heydar H. Plant Education.Office of the Publishing Islamic Culture . Tehran, Vol. 8. 2006. 8 (3): 21-4.

25. Khacha-ananda S, Tragoolpua Kh, Chantawannakul p, Tragoolpua Y. Antioxidant and Anti-cancer Cell Proliferation Activity of Propolis Extracts from Two Extraction Methods. A PJC. 2013; 14: 6991-6995.

26. Hairrchi I, Kolahdoozan S, Karbakhsh M, Chegini N, et al. Twenty years o breast cancer in Iran : downstaging without a formal screening program. Ann Oncol. 2011 ; 22(1): 93-97.

27. Jemal A, Siegel R,Ward E, Murray T, et al. Cancer statistics. CA Cancer J Clin. 2006; 56(2): 106-30.

28. Shukla Y, Singh M. Cancer preventive properties of ginger: a brief review. Food Chem Toxico. 2007; 45(5): 683-690.

29. Montoro P, Baraca A, Pizza C, De Tommasi N. Structure antioxidant activity realionships of flavonoids isolated from different plants species. Food chemistry. 2005; 92: 249-355.

30. Lacaille-Dubois M.A, Wagner H. Bioactive saponins from plants: an update. In:Studies in natural Products Chemistry. Rahman A.U.(ed). Elsevier, Amsterdam; 2000; 21: 633-687.

31. Hostettmann K, Marston A Chemistry and pharmacology of natural product : saponins. Cambridge University Press, UK. 1995 :286.

32. Baskar AA, KhalidS. Al, Mohammed A, et al. In vitro antioxidant and antiproliferative potential of medicinal plants used in traditional Indianmedicine to treat cancer. Redox Report. 2012; 17(4): 145- 156 .

33. Hamta A, Parvini P. Study of Cytotoxic Effects of Taxol and Rosemary Extracts on Cancerous Cells Derived From DMBA-induced Breast Cancer in SD Rats. Journal of Cell & Tissue. 2011; 2(2) : 117-126.

34. Pourali M, Yaghoobi MM, Salehii MH. Cytotoxic, Anti-Proliferative and Apoptotic Effects of *Tribulus terrestris L.* Fruit Extract on Human Prostate Cancer Lncap and Colon Cancer HT-29 Cell Lines. Jundishapur J Nat Pharm Prod. 2017; 12(2): e33561.

35. Ashour MAG. Isolation, HPLC/UV characterization and antioxidant activity of phenylethanoids from *Blepharis edulis* (Forssk.)Pers. growing in Egypt. Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University. 2012; 50(1): 67-72.

www.SID.ir

Archive of SID

36. Mahboubi M, Haghi GH ,Kazempour N, Hatemi AR. Total phenolic content, ntioxidant and antimicrobial activities of *Blepharis edulis* extracts. Songklanakarin J. Sci. Technol. 2013; 35(1): 11-16.

37. Ahmadi R, Rahimi S, Ehteshamzad N. The effect of hydroalcoholic *Ziziphus spina-christi* leaf extract on viability of breast cancer cell line (MCF7) and evaluation of Bax and Bcl_2 genes expression level. Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences. 2017; 21(5): 407-413.

38. Dikavsakaya D, Schiffmam D , Lan P. Loss of APC incidence polypoidy as a results of a combination of defects in mitosis and apoptosis. Journal of Cell Biol. 2007; 176(2): 183-195.

www.SID.ir

Archive of SID

Journal of Cell & Tissue (JCT)
Autumn 2018; 9(3)

Original Article

Anticancer activity of Blepharis persica seed hydroalcoholic extract on (MCF-7) human breast cancer and (LNCaP) prostate cancer cell lines and its synergistic effect with doxorubicin

Aghaabbasi K, Ph.D. Student[1], Hassani Kumleh H, Ph.D.[2*] Askari N, Ph.D.[3] Torkzadeh-Mahani M, Ph.D.[3], ramzani-ghara A, Ph.D.[4]

1. PhD student. Department of Biotechnology, University Campus 2 - University of Guilan ,Khalij Fars highway (5th kilo meter of Ghazvin road), Rasht, Iran
2. Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Khalij Fars highway (5th kilo meter of Ghazvin road), Rasht, Iran
3. Department of Biotechnology,Institute of Sciences and High Technology and Environmental Sciences, Graduate University of Advanced Technology, End of Haft Bagh-e-Alavi Highway, Kerman, Iran.
4. Faculty of basic sciences, Department of plant biology, University of jiroft. km 8 Bandar Abbas Road, kerman , Iran.

* Email corresponding author: kumleh@yahoo.com

Received: 24 Jul. 2018 Accepted: 8 Jan.. 2019

Abstract

Aims: This study was aimed to investigate the anti-proliferative effects of hydroalcoholic extract of *Blepharis persica* seed and its synergy effect with doxorubicin on human breast cancer and prostate cancer cell lines.

Materials and Methods: hydroalcoholic extract of seed was prepared using maceration, and ethanol%70. Eight concentrations of extract and four concentrations of combined with doxorubicin (125, 62.5ngr/ml) and extract (0.625, 0.315mg/ml) were prepared. MCF7, LNCaP and SKM cell lines were cultured. Cell viability was evaluated by MTT assay after 24h. To **s**how apoptosis induction of breast and prostate cancer cell death by extracts**,** Annexin/PI test were performed. *BCL_2* gene expression was analyzed using Real-Time RT-qPCR for 24,48h.

Results: The highest effects of growth inhibition were observed in the prostate, breast and fibroblast cell lines with extract, respectively. The combined effect of doxorubicin with extract in three cell lines in comparison with control did not show any significant difference. The results of Annexin / PI indicated that the percentage of initial apoptosis, delayed apoptosis and necrosis in treated cells increased compared to control. *BCL_2* expression in cell lines decreased significantly over 24 and 48 h compares to control($p<0.01$).

Conclusion: hydroalcoholic extract of *B.persica* seed has ability to inhibit the proliferation of cancer cell lines as well as the induction of apoptosis in cancer cells, compared with using it with doxorubicin, although the extract did not have any synergy effect with doxorubicin at lower concentrations, it can be a substituted for this kind of drug with fewer side effects.

Keywords*:* Apoptosis, *Blepharis persica*, *BCL_2*, LNCaP, MCF7

www.SID.ir