Archive of SID

(مقاله پژوهشی)

بررسی اثر عصاره گیاه یوفوربیا میکروسیدا بر تکثیر سلولی و بیان سایتوکاین ها در سلولهای سرطان پستان رده MDA-MB-231

محمدرضا محمودیان ثانی[۱]، مجید اسدی سامانی[۲]، آرش القاسی[۳*]

۱-استادیار گروه مرکز تحقیقات بیماری های تالاسمی و هموگلوبینوپاتی.
۲-استادیار گروه مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی.
۳-استادیار گروه کودکان خون و سرطان کودکان.

۱-گروه مرکز تحقیقات بیماریهای تالاسمی و هموگلوبینوپاتی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران.
۲- گروه مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، پژوهشکده علوم پایه سلامت، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران.
۳-گروه کودکان خون و سرطان کودکان، دانشکده پزشکی بیمارستان شهید بقایی دو، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران.

* نویسنده مسئول:
آرش القاسی؛ استادیار گروه کودکان خون و سرطان کودکان، دانشکده پزشکی بیمارستان شهید بقایی دو دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران.
تلفن: ۰۰۹۸۹۱۶۱۸۱۱۴۲۹
Email: arashalqasi@yahoo.com

چکیده

زمینه و هدف: سرطان پستان، عامل حدود یک سوم سرطان ها در زنان و عامل مرگ و میر های گسترده ناشی از سرطان در زنان می باشد. در طب سنتی برخی از کشورها از گونه های جنس *Euphorbia* برای معالجه اورام و تومورها استفاده شده است. مطالعه حاضر با هدف تعیین اثر عصاره E. microsciadia بر کشندگی سلول های توموری و بیان برخی سایتوکاین های دخیل در التهاب و سرطان در رده سلولی MDA-MB-231 طراحی و اجرا شده است.

روش بررسی: سلول های رده سلولی MDA-MB-231 در محیط DMEM به همراه ۱۰ درصد سرم جنین گاوی، پنی سیلین ۱۰۰ واحد بر میلی لیتر و استرپتومایسین ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر، در شرایط دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، CO_2 ۵درصد و رطوبت ۹۵ درصد کشت داده شدند. اثر عصاره بر زیست پذیری سلولهای MDA-MB-231 با روش MTT بررسی شد. برای ارزیابی میزان بیان mRNA سیتوکاین های *IL-1 β, IL-6, IL-8, IL-10, IL-17A, TGF- β1, INF- γ* بعد از تیمار رده سلولی MDA-MB-231 با عصاره RNA به کمک ترایزول استخراج شد. بعد از استخراج RNA و تبدیل آن به cDNA، میزان بیان mRNA در نمونه ها توسط تکنیک TaqMan real-time PCR اندازه گیری شد و بیان سایتوکاین ها در دو گروه تیمار با عصاره و کنترل با استفاده از تست Mann–Whitney مورد آنالیز قرار گرفت.

یافته‌ها: پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت مقادیر IC50 برای یوفوربیا میکروسیدا ۲۷۸/۳۰ و ۲۳۸/۲۰ میکروگرم در میلی لیتر بدست آمد. اثرات ضد تکثیری بر رده سلولی MDA-MB-231 وابسته به دوز و زمان بود. عصاره اثرات ضد تکثیری در رده سلولی MDA-MB-231 به روش وابسته به دوز و زمان به نمایش گذاشت. *IL-1 β, IL-8, INF- γ* افزایش بیان معناداری ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد از تیمار با عصاره نشان دادند. *TGF- β1, IL-6, IL-10, IL-17A*بعد از ۲۴ ساعت افزایش بیان و پس از ۴۸ ساعت از تیمار کاهش بیان نشان دادند.

نتیجه‌گیری: عصاره ی E. microsciadia ممکن است بتواند به عنوان ابزاری برای دست کاری بیان ژن های پیش گفته و در نهایت، کنترل رشد و تکثیر سلول ها که امری اساسی در مطالعات ملکولی و سلولی حیطه ی سرطان است.

واژگان کلیدی: یوفوربیا میکروسیدا، سرطان پستان، MDA-MB-231 ، سایتوکاین.

دریافت مقاله: ۱۳۹۸/۱۰/۸ **دریافت مقالهٔ اصلاح‌شده:** ۱۳۹۸/۱۰/۹ **اعلام قبولی:** ۱۳۹۸/۱۱/۳۰

مجلهٔ علمی پزشکی جندی‌شاپور، دورهٔ ۱۸، شمارهٔ ۶، ۱۳۹۸

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

امروزه سرطان به عنوان یکی از معضلات دامن گیر و اصلی جامعه بشری است که هزینه های هنگفتی از نظر اجتماعی، اقتصادی و نیز روحی به جامعه انسانی وارد می کند و همچنان علیرغم پیشرفت های اخیر در غربالگری و درمان سرطان، دارای نرخ بالایی از بروز و شیوع می باشد. سرطان پستان، عامل حدود یک سوم سرطان ها در زنان و پس از سرطان ریه، دومین علت مرگ ناشی از سرطان در آنان است (۱). ۷۶ ٪ سرطانهای شایع زنان در ایران مربوط به پستان است و مجموع مبتلایان به سرطان پستان در ایران ۴۰ هزار نفر است و سالیانه بیش از ۷ هزار بیمار به این تعداد اضافه می گردد (۲). مجموع مطالعات نشان داده که بیش از ۴۰٪ از مبتلایان در سنین ۵۰ – ۴۰ سال بوده اند و میانگین سنی آنان در ایران کمتر از سایر کشورها هست. میزان بروز سرطان پستان در ایران به میزان ۲۰ مورد جدید در هر ۱۰۰۰۰۰ زن در سال است که برابر ۷۰۰۰ مورد جدید در هر سال است (۳). با توجه به این که اغلب راه کارهای درمانی موجود، درمان قطعی و دایمی سرطان پستان نیستند، تلاش برای دستیابی به داروهای جدید با مکانیزم های اثر بخشی متفاوت با داروهای معمول، ادامه دارد. در این رابطه، یکی از روش های مورد توجه پژوهشگران، دست کاری در مسیر های مرتبط با سایتوکاین ها می باشد. مطالعه حاضر با هدف تعیین اثر گیاه دارویی (E. microsciadia) Euphorbia microsciadia Boiss. بر کشندگی سلول های توموری MDA-MB-231 و بیان سایتوکاین ها به منظور تهیه احتمالی داروی ضد سرطانی گیاهی موثرتر طراحی و اجرا شده است. امروزه با گسترش استفاده از گیاهان دارویی برای پیشگیری و درمان بیماری ها و با توجه به افزایش بروز سرطان های مختلف چه در کشورهای توسعه یافته و چه در حال توسعه، استفاده از گیاهان دارویی برای کشف داروهای ضد سرطانی، به ویژه سرطان پستان به عنوان شایع ترین سرطان در بین خانم ها ی جهان، که با وجود اثرات جانبی کمتر بتوانند جایگزین شیمی درمانی، درمان های طاقت فرسا و موارد مقاوم به درمان شوند، ضروری به نظر می‌رسد (۴–۶). به منظور گام نهاندن در مسیر کشف داروهای گیاهی ضدسرطانی جدید، این مطالعه سعی دارد مکانیسم های اثرات ضد سرطانی .E. microsciadia را بر روی سلول های سرطانی پستان مورد بررسی قرار دهد.

روش بررسی

گیاه E. microsciadia از شهرستان سامان در استان چهارمحال و بختیاری جمع آوری شد. گیاه توسط جناب آقای دکتر شیرمردی در مرکز تحقیقات جهاد کشاورزی استان چهارمحال و بختیاری شناسایی شد و یک نمونه هرباریومی از گیاه در هرباریوم مرکز تحقیقات گیاهان دارویی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد نگهداری و با کد هرباریومی Skums-659 ثبت شد. بخش های هوایی گیاه پس از خشک شدن در سایه پودر شدند و برای عصاره گیری مورد استفاده قرار گرفتند. برای تهیه عصاره هیدروالکلی .E microsciadia، با روش ماسراسیون با ۳–۱ بار تکرار عمل عصاره گیری پودر گیاه انجام شد. در این روش از حلال های آب و اتانول تلخ بدون بو تیریک اسید با نسبت های مشخص استفاده و سپس عصاره استخراج شده با کاغذ صافی فیلتر شد. عصاره های فیلتر شده به منظور حذف حلال و تغلیظ شدن، به مدت ۳ تا ۵ روز در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه قرار گرفتند. در نهایت عصاره های خمیری و یا پودر شده به کمک DMSO کاملا حل و پس از سانتریفیوژ کردن و حذف قسمت ته نشین شده، برای انجام آزمایش در نظر گرفته شدند. سلول های سرطانی پستان انسانی رده -MDA-MB 231 از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی ایران تهیه شدند. سلول ها در محیط DMEM به همراه ۱۰ درصد سرم جنین گاوی،

www.SID.ir

Archive of SID

پنی سیلین ۱۰۰ واحد بر میلی لیتر و استرپتومایسین ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر، در شرایط دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، CO2 ۵درصد و رطوبت ۹۵ درصد کشت داده شدند. بررسی توان زیستی سلولها به روش (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (MTT): سلول های کشت شده تک لایه ای پس از رسیدن به confluency ۹۰-۸۰ درصد در پلیت های ۹۶ چاهکی به تعداد مناسب (با تعداد ۱۰۰۰-۱۰۰۰۰ سلول در هر چاهک با توجه به نوع و اندازه سلول ها) کشت و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور CO2 در شرایط ۵ درصد CO2 و ۹۵ درصد رطوبت انکوبه و بعد از ۲۴ ساعت با غلظت های ۱۰ تا ۱۰۰۰ از عصاره (که توسط DMSO حل و با استفاده از محیط کشت RPMI رقت سازی شده بودند) تیمار شدند. لازم به ذکر است که حداکثر غلظت DMSO در محیط کشت برای جلوگیری از آسیب سلولی ۰/۱ درصد در نظر گرفته شد. بررسی مورفولوژی سلولها با میکروسکوپ اینورت نوری: به منظور بررسی مورفولوژیکی اولیه سلول ها، پس از تیمار سلول ها با عصاره (با غلظت های IC50) در زمان ها ی ۲۴ و ۴۸ ساعت تصویر برداری آن ها توسط میکروسکوپ اینورت انجام شد. استخراج mRNA به وسیله ترایزول (Roche, Germany) انجام گرفت. در ادامه با استفاده از دستگاه نانو دراپ میزان Total RNA اندازه گیری و سپس ۳ میکرولیتر از Total RNA با استفاده از کیت RevertAid (#K1632, First Strand cDNA Synthesis (Fermentase طبق روش شرکت سازنده به cDNAتبدیل شد. پرایمرهای مخصوص و پروب های TaqMan با استفاده از برنامه ی Primer Express (TAG Copenhagen) طراحی شدند (جدول ۱) تمام واکنش های Real-Time PCR در دستگاه Rotor Gene TM 3000 (Corbett) انجام شدند. واکنش ها در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر در میکروتیوب های ۰/۱ میلی لیتری صورت گرفت. ترکیبات هر واکنش شامل ۱۲ میکرولیتر از TaqMan Universal PCR Master Mix (2X)، ۰/۴ میکرولیتر از هر یک از پرایمرهای رفت و برگشت با غلظت ۱۰ پیکومولار و ۰/۲ میکرولیتر از پروب ها با غلظت ۱۰ پیکومولار، ۷ میکرولیتر آب RNase, DNase-free و ۲ میکرولیتر cDNA الگو بود. در نهایت نمونه های مورد نظر در دستگاه قرار داده شدند و ۴۵ سیکل تکثیر انجام پذیرفت. تجزیه و تحلیل داد ه ها: برای بررسی آماری داده ها، ΔCt ژن در هر نمونه از افتراق Ct ژن مربوطه و Ct ژن β-actin به عنوان ژن رفرانس محاسبه شد. نتایج در برنامه REST (Relative Expression Software Tool) به صورت سنجش نسبی با روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ یا 2(-Delta Delta C(T)) آنالیز شدند. و اطلاعات جمع آوری شده با استفاده از آزمون آماری Mann-Whitney U برای بررسی بیان ژن در دو گروه مختلف، در نرم افزار SPSS تجزیه و تحلیل شدند. همچنین برای تهیه شکل های مربوطه از نرم افزار GraphPad Prism 5 Demo استفاده گردید.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱: توالی پرایمر ها و پروب های مورد استفاده در ارزیابی بیان سایتوکاین ها

ژن ها	توالی پرایمرها و پروب
β-actin	Forward 5-AGCCTCGCCTTTGCCGA-3
	Reverse 5-CTGGTGCCTGGGGCG-3
	Probe FAM-CCGCCGCCCGTCCACACCCGCC-TAMRA
IL-1β	Forward 5-ACAGATGAAGTGCTCCTTCCA-3
	Reverse 5-GTCGGAGATTCGTAGCTGGAT-3
	Probe FAM- CTCTGCCCTCTGGATGGCGG-TAMRA
IL-6	Forward 5- GGTACATCCTCGACGGCATCT-3
	Reverse 5- GTGCCTCTTTGCTGCTTTCAC-3
	Probe FAM-TGTTACTCTTGTTACATGTCTCCTTTCTCAGGGCT-TAMRA
IL-8	Forward 5-TTGGCAGCCTTCCTGATTTC-3
	Reverse 5-TATGCACTGACATCTAAGTTCTTTAGCA-3
	Probe FAM-CCTTGGCAAAACTGCACCTTCACACA-TAMRA
IL-10	Forward 5-TCAAGGCGCATGTGAACTC-3
	Reverse 5-CGGCCTTGCTCTTGTTTTC-3
	Probe FAM-CGGCGCTGTCATCGATTTCTTCC-TAMRA
IL-17A	Forward 5-AATCTCCACCGCAATGAGGA-3
	Reverse 5-ACGTTCCCATCAGCGTTGA-3
	Probe FAM-CGGCACTTTGCCTCCCAGATCACA-TAMRA
TGF-β1	Forward 5-CAGCAACAATTCCTGGCGATA-3
	Reverse 5-AAGGCGAAAGCCCTCAATTT-3
	Probe FAM-CTGCTGGCACCCAGCGACTCG-TAMRA
INF-γ	Forward 5-AGCTCTGCATCGTTTTGGGTT-3
	Reverse 5-GTTCCATTATCCGCTACATCTGAA-3
	Probe FAM-TCTTGGCTGTTACTGCCAGGACCCA-TAMRA

یافته ها

میزان غلظت مهاری ۵۰ درصد(IC50) عصاره .E.microsciadia پس از ۲۴ ساعت و ۴۸ ساعت

میزان غلظت مهاری ۵۰ درصد (IC50) عصاره. E. microsciadia پس از ۲۴ ساعت و ۴۸ ساعت به ترتیب ۲۷۸/۳۰ و ۲۳۸/۲۰ میکروگرم بر میلی لیتر بدست آمد (شکل ۱).

بررسی میکروسکوپی اولیه سلول ها نشان داد عصاره E. microsciadiaپس از ۲۴ و ۴۸ ساعت قادر است اثرات توکسیک چشمگیری بر روی سلول ها داشته باشد (شکل۲). در بررسی سلول های تحت تیمار تغییرات مورفولوژیکی بارز از جمله تغییرات عمده در حالت طبیعی غشای سلولی، گرانوله شدن سلول ها و کاهش حجم سلول ها مشاهده شد.

نتایج بررسی اثرات عصاره E.microsciadia بر بیان سایتوکاین های تحت مطالعه در سلول های MDA-MB-231

اثر عصاره E.microsciadia بر بیان سایتوکاین های التهابی *INF- γ ,TGF-β,IL-8*

نتایج بررسی بیان ژن *INF- γ* به دنبال تیمار سلول ها با استفاده از عصاره هیدرو الکلی E.microsciadia نشان داد که عصاره باعث افزایش معنادار بیان ژن INF- γ در هر دو زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از تیمار می گردد و پس از ۲۴

www.SID.ir

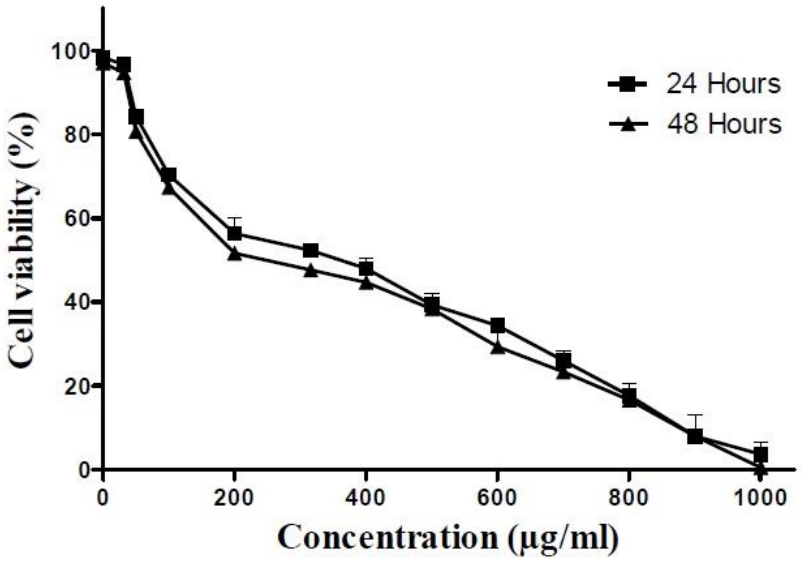
Archive of SID

ساعت شروع به کاهش می نماید. نتایج بررسی بیان ژن *TGF-β* به دنبال تیمار سلول ها با استفاده از عصاره هیدرو الکلی E.microsciadia نشان داد که عصاره باعث افزایش بیان معنادار *TGF-β* ۲۴ ساعت پس از تیمار می گردد. نتایج بررسی بیان ژن *IL-8* به دنبال تیمار سلول ها با استفاده از عصاره هیدرو الکلی E.microsciadia نشان داد که عصاره در هر دو زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت ساعت پس از تیمار باعث افزایش بیان *IL-8* می گردد. این نتایج در شکل ۳ نشان داده شده است.

ستاره ها میزان معناداری را نشان می دهند: *P<0.05 **P<0.001

اثر عصاره E.microsciadia بر بیان سایتوکاین های التهابی *IL-1 β, IL-6, IL-10,IL-17*

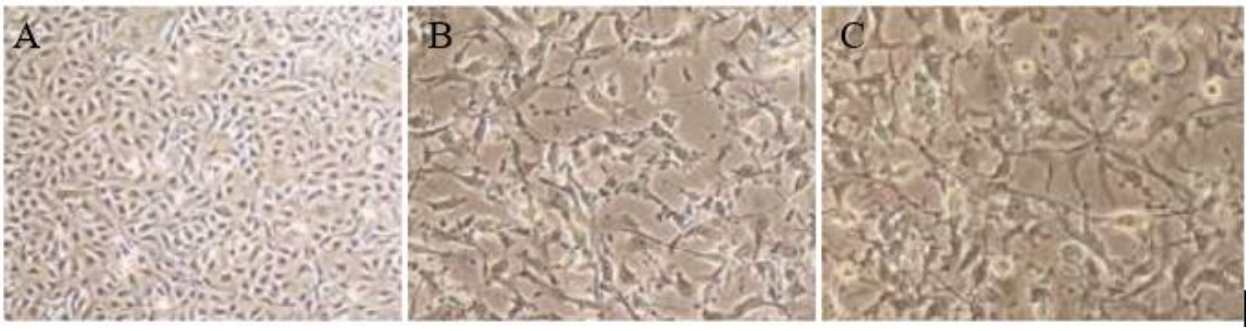
نتایج بررسی بیان ژن *IL-1 β* به دنبال تیمار سلول ها با استفاده از عصاره هیدرو الکلی E.microsciadia نشان داد که عصاره باعث افزایش بیان معنادار ژن *IL-1 β* در هر دو زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از تیمار می گردد و پس از ۲۴ ساعت شروع به کاهش می نماید. نتایج بررسی بیان ژن *IL-6* به دنبال تیمار سلول ها با استفاده از عصاره هیدروالکلی E.microsciadia نشان داد که عصاره باعث افزایش بیان *IL-6* ۲۴ ساعت پس از تیمار و کاهش بیان ۴۸ ساعت پس از تیمار شده است. نتایج بررسی بیان ژن *IL-10* به دنبال تیمار سلول‌ها با استفاده از عصاره هیدرو الکلی E.microsciadia نشان داد که عصاره باعث افزایش بیان معنادار ژن *IL-10* ۲۴ ساعت پس از تیمار می گردد و سپس شروع به کاهش می نماید. نتایج بررسی بیان ژن *IL-17A* به دنبال تیمار سلول‌ها با استفاده از عصاره هیدرو الکلی E.microsciadia نشان داد که عصاره باعث افزایش معنادار بیان ژن *IL-17A* ۲۴ ساعت پس از تیمار می گردد و سپس شروع به کاهش می نماید. نتایج در شکل ۴ نشان داده شده است.



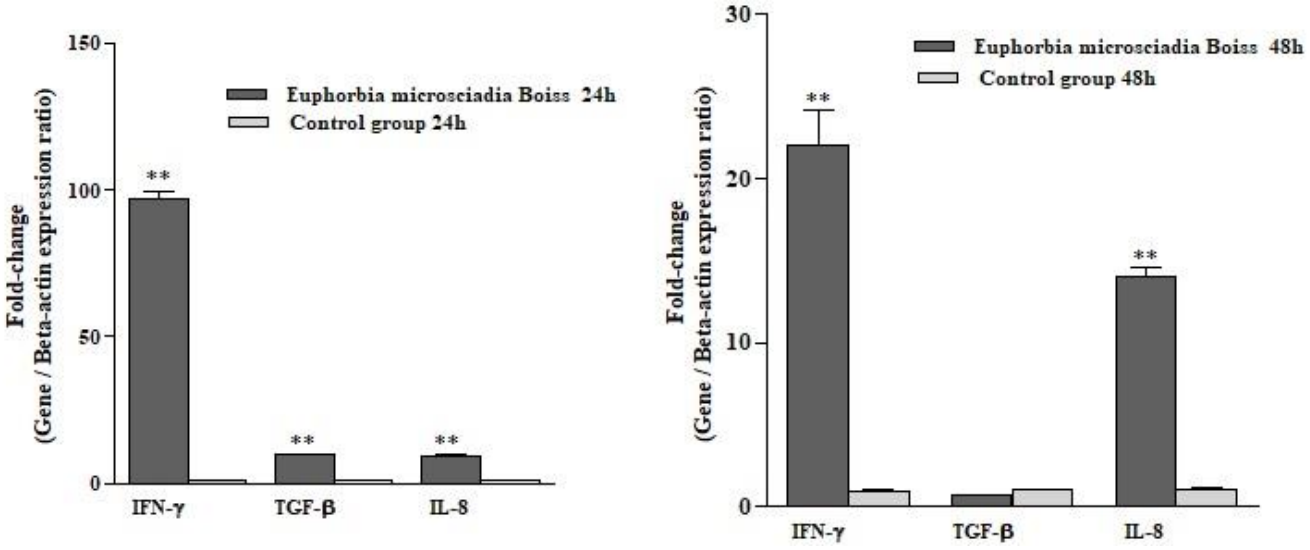
شکل ۱ : اثرات مهار رشدی عصاره هیدروالکلی E. microsciadia بر روی رده توموری سرطان پستان MDA-MB231.

www.SID.ir

Archive of SID



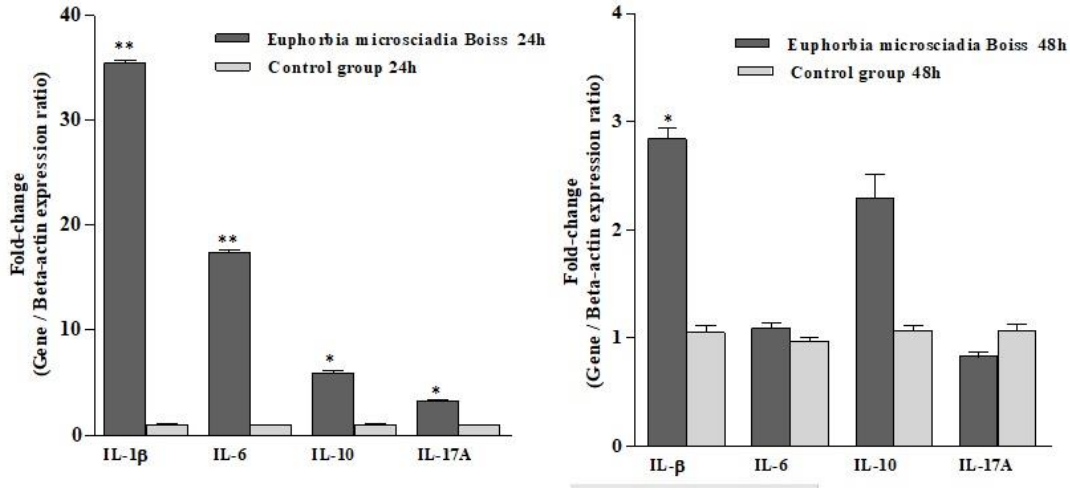
شکل۲: مورفولوژی سلول های سرطانی پستان انسان رده MDA-MB-231 (بزرگ نمایی ۴۰x) A : نمونه کنترل B : نمونه در معرض غلظت ۳۰ / ۲۷۸ میکروگرم بر میلی لیتر از E.microsciadia بعد از ۲۴ ساعت C : نمونه در معرض غلظت ۲۰ / ۲۳۸ میکروگرم بر میلی لیتر از E.microsciadia بعد از ۴۸ ساعت



شکل۳: تغییرات بیان ژن های *INF- γ,TGF-β,IL-8* نسبت به ژن رفرانس *β-actin* تحت تاثیر غلظت IC50 از عصاره E.microsciadia مقادیر بر اساس میانگین (mean±SEM) بیان شده است ارزیابی معنی دار بودن نتایج با استفاده از ازمون پارامتری Mann–Whitney U test بدست امده.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل۴: تغییرات بیان ژن های *IL-1 β, IL-6, IL-10, IL-17A* نسبت به ژن رفرانس *Beta-actin* تحت تاثیر غلظت IC50 از عصاره E.microsciadia مقادیر بر اساس میانگین (mean±SEM) بیان شده است ارزیابی معنی دار بودن نتایج با استفاده از ازمون پارامتری Mann–Whitney U test بدست آمده.

بحث

در مطالعه حاضر در سلول های تیمار شده با E. microsciadia در ۲۴ ساعت اولیه تیمار بیشتر سایتوکاین های التهابی افزایش یافتند ولی پس از ۴۸ ساعت افزایش INF-γ همراه با کاهش سایتوکاین های التهابی همراه شد و موجب مهار رشد سلول های توموری گردید. در واقع به نظر می رسد E. microsciadia با بیان بالای *INF-γ* پس از ۴۸ ساعت می توانند بیان سایتوکاین های التهابی همچون اینترلوکین ۶ و ۱۰ و *TGF-β* را از سلول های Th2کاهش دهد. در مطالعه حاضر بیان *INF-γ* در سلول های تیمار شده با E. microsciadia پس از ۲۴ ساعت به شدت افزایش نشان داد و میزان بیان *TGF-β* پس از ۴۸ ساعت کاهش یافت. *TGF-β* رفتارهای گوناگون سلول شامل تکثیر، تمایز، مهاجرت و آپوپتوز را تنظیم می کند. مسیر سیگنالینگ *TGF-β* رشد سلول های تومور را مهار می کند و شناخته شده است که در طی مراحل اولیه کارسینوژنز مانند سرکوبگر تومور عمل می‌کند. *TGF-β* یک القاکننده بالقوه و بسیار مهم epithelial–mesenchymal transition (EMT) در پیشرفت سرطان است (۷, ۸). *INF-γ* دارای عملکرد ضد توموری بوده و مطالعات نشان داده اند که *INF-γ* قادر است رشد سلول های توموری متعددی از جمله سلول های سرطانی سینه را مهار کند. *INF-γ* قادر است با اثر بر سایتوکاین های متعدد رشدی و گیرنده مرگ مسیرهای آپوپتوزی را فعال نماید (۹). در مطالعه حاضر اینترلوکین ۱۰ در ۲۴ ساعت اول افزایش نشان داد ولی پس از ۴۸ ساعت از میزان بیان آن کاسته شد. *IL-10* یک سایتوکاین ضد التهابی است که می تواند باعث مهار پاسخ های بیش از حد سیستم ایمنی شود. این سایتوکاین نیز مانند برخی دیگر از سایتوکاین ها می تواند نقش دوگانه ای در سلول های توموری ایفا نماید به گونه ای که هم نقش افزایش تکثیر و هم نقش مهار رشدی بر روی سلول های سرطانی همچون سرطان سینه ایفا نماید (۱۰, ۱۱). بیان اینترلوکین ۱ بتا (*IL-1β*) در ۲۴ ساعت اولیه تیمار افزایش یافته ولی پس از ۴۸ ساعت کاهش چشمگیر

www.SID.ir

Archive of SID

داشته اما هنوز در گروه تیمار بیان بیشتری نسبت به کنترل دارد. *IL-1β* در بسیاری از سلول های سرطانی شامل سرطان های سینه، پروستات، کولون، ریه، سر و گردن و ملانوما بررسی شده است و افزایش بیان این سایتوکاین تایید شده است به طوری که بیمارانی با مقادیر بالای بیان اینترلوکین ۱ بتا عموما پیش آگاهی ضعیفی پس از درمان در آنها وجود دارد (۱۲). نتایج بررسی بیان ژن *IL-6* به دنبال تیمار سلول‌ها با استفاده از عصاره هیدروالکلی E.microsciadia نشان داد که عصاره ۴۸ ساعت پس از تیمار باعث کاهش بیان *IL-6* می شود. تحقیقات تجربی و اپیدمیولوژیکی پیشنهاد می کنند، یک رابطه قوی، بین التهاب و انواع مختلف سرطان وجود دارد. *IL-6* در سرطان های اپیتلیالی نظیر کارسینومای پستان افزایش می یابد (۱۳). *IL-6* سایتوکاینی است که در ریز محیط تومور عملکرد پیش التهابی داشته و در رگ زایی و متاستاز نقش دارد (۱۴). *IL-8* به دنبال تیمار سلول ها با عصاره در هر دو زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از تیمار افزایش بیان نشان داد. *IL-8* دارای اثرات پیش برنده التهاب است. این سایتوکاین توسط انواع سلول های تومور مثل پروستات، ریه و پستان ترشح می شود. بیان بیش از حد *IL-8* با افزایش رشد تومور و پیشرفت بیماری و همچنین عود کردن سرطان پستان همراه بوده و ارتباطی مستقیم بین سطوح *IL-8* و آنژیوژنز، رشد و متاستاز تومور وجود دارد. بیان *IL-8* در سلول های MDA-MB-231 توسط *NF - RB* تنظیم می شود؛ این فاکتور رونویسی ضروری با بیان تعدادی از سایتوکاین ها، گیرنده های سایتوکاینی و نیز فاکتورهای رشد نقش به سزایی در تنظیم بیان *IL-8* ایفا می کند. افزایش بیان *IL-6* و *IL-8* در سلول های تیمار شده با داروی شیمی درمانی doxorubicin گزارش شده است (۱۵, ۱۶). اینترلوکین ۱۷ (*IL-17A*) سایتوکاینی پیش التهابی جدید است که عموما به وسیله سلولهای T کمکی فعال شده CD4+ که سلول های Th17 نامیده می شوند، تولید می گردد؛ ولی این سایتوکاین از طریق ماکروفاژها، نوترو فیل ها، مونوسیت ها و سلول های CD8 + T نیز بیان می شود (۱۷) مطالعات جدید نشان داده اند که سلول های تولید شده *IL-17* به وفور در سرطان پروستات، سرطان ریه، سرطان پستان و سرطان رحم یافت می شوند (۱۸, ۱۹). *IL-17* موجب افزایش تولید *VEGF* در سلول های سرطانی می شود و ممکن است مکانیزم احتمالی *IL-17* در رگ زایی و رشد تومور به همین دلیل باشد (۱۹). بررسی مطالعات نشان می دهد تاکنون مکانیسم اثرات ضد سرطانی E. microsciadia بر روی سلول های سرطان پستان مشخص نشده است. با این حال در زیر به برخی از مطالعاتی که به بررسی اثر ضد سرطانی گونه های دیگری از جنس Euphorbia و ترکیبات استخراج شده از این جنس پرداخته شده است اشاره می شود: Sharma و همکاران در سال ۲۰۱۴ اثرات آنتی اکسیدانی، ضد التهابی و ضد سرطانی عصاره اتانولی Euphorbia hirta را بررسی و نشان دادند عصاره گیاه مذکور دارای فعالیت آنتی اکسیدانی قوی است و در غلظت ۲۰۰ میکروگرم در میلی لیتر بالاترین اثر ضد التهابی را داراست و همچنین در غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر اثرات ضد سرطانی انتخابی را نشان می دهد (۲۰). همچنین Kwan و همکاران در مطالعه ای دیگر به بررسی اثرات کشندگی سلولی، و ضد سرطانیگیاه Euphorbia hirta بر روی لاین سلولی MCF-7 پرداخته و نشان دادند که گیاه مذکور در غلظت ۲۵/۲۶ میکرو گرم در میلی لیتر بعد از ۲۴ ساعت می تواند باعث مهار ۵۰ درصد از سلول ها گردد (۲۱). در مطالعه دیگری در سال ۲۰۱۶ Choene و Motadi ضمن بررسی ترکیبات فیتوشیمیایی گیاه Euphorbia tirucalli با استفاده از LC-MS، اثرات مهار رشدی عصاره گیاه را بر روی لاین های مختلف سرطان پستان از جمله MDA-MB 231 و MCF-7 مورد بررسی

www.SID.ir

Archive of SID

قرار دادند. عصاره گیاه در رفتاری وابسته به غلظت و نوع سلول اثرات مهار رشدی را بعد از ۴۸ ساعت نشان می دهد (۲۲). در ایران زارع و همکاران به بررسی ترکیبات شیمیایی یکی از انواع گونه های جنس Euphorbia به نام Euphorbia macrostegia پرداخته اند و نشان داده اند که گیاه مذکور دارای طیف وسیعی از ترکیبات فعال از جمله تری ترپن ها و اسیدهای چرب غیر اشباع می باشد که می توانند اثرات ضد سرطانی داشته باشند (۲۳). با توجه به نقش سایتوکاین های-*IL-1β, IL-6, IL-10, IL-17A, TGF-β1, INF-γ* و گیرنده های آنها بر سرنوشت سلول های سرطانی نظیر سلول های سرطان پستان، می توان پیش بینی کرد که کنترل میزان بیان این ژنها در سلول های سرطانی، به توفیق در کنترل و درمان سرطان کمک کند. عصاره ی E. microsciadia به دلیل اثرات مهار رشدی بر روی سلول های سرطانی پستان و اثرات بر بیان برخی سایتوکاین های دخیل در فرایندهای التهاب و سرطان می تواند به عنوان گزینه ای برای تولید داروهای ضد سرطانی بر علیه سرطان سینه درنظر گرفته شود. با اینحال نیاز به مطالعات بر روی نمونه های حیوانی و انجام کارآزمایی های بالینی احساس می شود.

قدردانی

نویسندگان از همه افرادی که در انجام این پژوهش کمک کردند، تشکر و قدرانی می نمایند.

منابع

1-Anastasiadi Z, Lianos GD, Ignatiadou E, Harissis HV, Mitsis M. Breast cancer in young women: an overview. Updates Surg. 2017;69(3):313-7.
2-Naghavi M, Marczak LB, Kutz M, Shackelford KA, Arora M, Miller-Petrie M, et al. Global Mortality From Firearms,1990-2016 .Jama. 2018;320(8):792-814.
3-Jarvandi S, Montazeri A, Harirchi I, Kazemnejad A. Beliefs and behaviours of Iranian teachers toward early detection of breast cancer and breast self-examination. Public Health. 2002;116(4):245-9.
4-Asadi-Samani M, Kooti W, Aslani E, Shirzad H. A Systematic Review of Iran's Medicinal Plants With Anticancer Effects. J Evid Based Complementary Altern Med. 2016;21(2):143-53.
5-Global battle against cancer won't be won with treatment alone--effective prevention measures urgently needed to prevent cancer crisis. Cent Eur J Public Health. 2014;22(1):23, 8.
6-Monsuez JJ, Charniot JC, Vignat N, Artigou JY. Cardiac side-effects of cancer chemotherapy. Int J Cardiol. 2010;144(1):3-15.
7-Imamura T, Hikita A, Inoue Y. The roles of TGF-beta signaling in carcinogenesis and breast cancer metastasis. Breast Cancer. 2012;19(2):118-24.
8-Bierie B, Moses HL. Transforming growth factor beta (TGF-β) and inflammation in cancer. Cytokine & growth factor reviews. 2010;21(1):49-59.
9-Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. Nature. 2012;490(7418):61-70.
10-Venetsanakos E, Beckman I, Bradley J, Skinner JM. High incidence of interleukin 10 mRNA but not interleukin 2 mRNA detected in human breast tumours. Br J Cancer. 1826-30:(12)75;1997.
11-Changkija B, Konwar R. Role of interleukin-10 in breast cancer. Breast cancer research and treatment. 2012;133(1):11-21.
12-Yeh TC, Huang TT, Yeh TS, Chen YR, Hsu KW, Yin PH, et al. miR-151-3p Targets TWIST1 to Repress Migration of Human Breast Cancer Cells. PLoS One. 2016;11(12):e0168171.
13-Iliopoulos D, Hirsch HA, Struhl K. An epigenetic switch involving NF-κB, Lin28, Let-7 MicroRNA, and IL6 links inflammation to cell transformation. Cell. 2009;139(4):693-706.
14-Hong DS, Angelo LS, Kurzrock R. Interleukin- 6 and its receptor in cancer: implications for translational therapeutics. Cancer. 2007;110(9):1911-28.
15-Janelsins MC, Mustian KM, Palesh OG, Mohile SG, Peppone LJ, Sprod LK, et al. Differential expression of cytokines in breast cancer patients receiving different chemotherapies: implications for cognitive impairment research. Support Care Cancer. 2012;20(4):831-9.
16-Freund A, Jolivel V, Durand S, Kersual N, Chalbos D, Chavey C, et al. Mechanisms underlying differential expression of interleukin-8 in breast cancer cells. Oncogene. 2004;23(36):6105-14.
17-Kawaguchi M, Adachi M, Oda N, Kokubu F, Huang S-K. IL-17 cytokine family. Journal of Allergy and Clinical Immunology. 2004;114(6):1265-73.

www.SID.ir

Archive of SID

18-Zarogoulidis P, Katsikogianni F, Tsiouda T, Sakkas A, Katsikogiannis N, Zarogoulidis K. Interleukin-8 and interleukin-17 for cancer. Cancer Invest. 2014;32(5):197-205.
19-Liu J, Duan Y, Cheng X, Chen X, Xie W, Long H, et al. IL-17 is associated with poor prognosis and promotes angiogenesis via stimulating VEGF production of cancer cells in colorectal carcinoma. Biochem Biophys Res Commun. 2011;407(2):348-54.
20-Sharma N, Samarakoon KW, Gyawali R, Park YH, Lee SJ, Oh SJ, et al. Evaluation of the antioxidant, anti-inflammatory, and anticancer activities of Euphorbia hirta ethanolic extract. Molecules. 2014;19(9):14567-81.
21-Kwan YP, Saito T, Ibrahim D, Al-Hassan FM, Ein Oon C, Chen Y, et al. Evaluation of the cytotoxicity, cell-cycle arrest, and apoptotic induction by Euphorbia hirta in MCF-7 breast cancer cells. Pharm Biol. 2016;54(7):1223-36.
22-Choene M, Motadi L. [Validation of the Antiproliferative Effects of Euphorbia tirucalli Extracts in Breast Cancer Cell Lines]. Mol Biol (Mosk). 2016;50(1):115-27.
23-Zare S, Ghaedi M, Miri R, Heiling S, Asadollahi M, I TB, et al. Phytochemical Investigation on Euphorbia macrostegia (Persian wood spurge). Iran J Pharm Res. 2015;14(1):243-9.

www.SID.ir

Archive of SID

Effect of *Euphorbia Microsciadia (Boiss)* Extract on Cell Proliferation and Cytokine Expression in Breast Cancer MDA-MB-231 Cell Line

Mohammad Reza Mahmoudian Sani[1], Majid Asadi Samani[2], Arash Alghasi[3]*

1-Assistant Professor of Thalassemia and Hemoglobinopathy Research Center.
2-Assistant Professor of Cellular and Molecular Research Center.
3-Assistant Professor of Pediatric Hematology and Oncology.

1-Department of Thalassemia and Hemoglobinopathy Research Center, Health research institute, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran.
2-Department of of Cellular and Molecular Research Center, Basic Health Sciences Institute, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran.
3-Department of Pediatrics Hematology and Oncology, School of Medicine Shahid Baghaei the 2nd Hospital Ahvaz Jundishapur University of Medical sciences, Ahvaz, Iran.

*Corresponding author:
Arash Alghasi; Department of Pediatrics Hematology and Oncology, School of Medicine Shahid Baghaei the 2nd Hospital Ahvaz Jundishapur University of Medical sciences, Ahvaz, Iran.
Tel:+989161811429
Email: arashalqasi@yahoo.com*

Abstract

Background and Objective: Breast cancer accounts for about one-third of all cancers in women. Behind lung cancer, it is the second leading cause of cancer deaths in this gender group. In traditional medicine, *Euphorbia (E.) microsciadia (Boiss)* is a plant used for cancer treatment. Therefore, the main purpose of this study was to determine the effect of *E. microsciadia* extract on elimination of tumor cells and expression of cytokines in breast cancer MDA-MB-231 cell line.

Materials and Methods: Cell culture was performed in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM); supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), penicillin (1IU/ml), and streptomycin (1µg/ml) at 37°C, with 5% CO_2 and 95% humidity. The effect of *E. microsciadia* extract on the viability of MDA-MB-231 cells was then evaluated by MTT assay. To estimate the expression level of the mRNA of IL-1β, IL-6, IL-8, IL-10, IL-17A, TGF-β1, and INF-γ following MDA-MB-231 cell line treatment with the plant extract, the RNA was extracted using TRIzol solution for cDNA synthesis. The mRNA expression level was subsequently measured in the samples by TaqMan real-time polymerase chain reaction (PCR) technique. The expression of cytokines in both groups of extract treatment and control was ultimately analyzed via Mann-Whitney U test.

Results: After 24 and 48 h, the IC_{50} values for the *E. microsciadia* extract were determined at 278.30 and 238.20µg/ml, respectively. Besides, the extract showed evidence of anti-proliferative effects on the MDA-MB-231 cell line in a dose- and time-dependent manner. Moreover, the expression levels of INF-γ, IL-8, and IL-1β had significantly increased 24 and 48 h after being treated with *E. microsciadia* extract. The expression level of TGF-β1, IL-6, IL-10, and IL-17A had correspondingly augmented and decreased after 24 and 48 h of treatment; respectively.

Conclusion: The *E. microsciadia* extract may be used as a tool to manipulate expression of cytokine genes and to ultimately control cell growth and proliferation, which is of utmost importance for molecular and cellular studies in cancer therapy.

Keywords: Euphorbia microsciadia Boiss, Breast cancer, MDA-MB-231, Cytokine.

►*Please cite this paper as:*
Mahmoudian Sani MR, Asadi Samani M, Alghasi A. Effect of Euphorbia Microsciadia (Boiss) Extract on Cell Proliferation and Cytokine Expression in Breast Cancer MDA-MB-231 Cell Line. Jundishapur Sci Med J 2019; 18(6):547-557

Received: Nov 11 2019 **Revised: Dec 14, 2019** **Accepted: Jan 1, 2020**

www.SID.ir