

## مقایسه اثرات آپوپتوزی S14161 و عصاره هیدروالکلی برگ‌های لیمو بر رده سلول‌های سرطانی سینه MCF-7

کیاوش هوشمندی<sup>۱</sup>، سعد گورانی‌نژاد<sup>۲\*</sup>، الهام حویزی<sup>۳</sup> و<sup>۴</sup> محمد رضا تابنده<sup>۵</sup>

- ۱- دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
- ۲- گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
- ۳- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
- ۴- مرکز تحقیقات سلول‌های بنیادی و فناوری ترانسژنیک دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
- ۵- بخش بیوشیمی و بیولوژی مولکولی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

\* Email: goorani\_s@scu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۷/۱۰/۱۶ تاریخ پذیرش: ۹۷/۱۲/۲۶

### چکیده

سرطان سینه یک بیماری چندعاملی است که ژنتیک، عوامل هورمونی و محیط در ایجاد آن نقش دارد. در تحقیق و بررسی حاضر سعی بر آن است که با استخراج عصاره برگ‌های لیموترش، و همچنین استفاده از کوچک مولکول S14161، تاثیر هر دو ترکیب را در آپوپتوز سلول‌های سرطانی سینه رده MCF-7 مورد مقایسه قرار گیرد. اثرات آپوپتوزی S14161 و عصاره هیدروالکلی برگ‌های لیموترش بر رده سلول‌های سرطانی سینه MCF-7 با استفاده از روش MTT، مورفولوژی سلول‌ها با رنگ آمیزی آکریدین اورنج با استفاده از میکروسکوپ فلوروسنت بررسی شد. نتایج نشان داد که S14161 و عصاره برگ‌های لیمو به صورت وابسته به دوز و زمان، میزان بقاء و تکثیر سلول‌های MCF-7 را کاهش می‌دهند. براساس نتایج تست MTT غلظت ۱۰ میکرومولار S14161 و غلظت ۶ میلی مولار عصاره برگ لیمو در مدت زمان ۲۴ ساعت به عنوان غلظت IC50 سلول‌های MCF-7 تعیین گردید. مقایسه عصاره لیموترش و S14161 نشان می‌دهد که میزان سمیت سلولی کوچک مولکول نسبت به عصاره لیموترش بیشتر بوده و اختلاف معنی‌داری میان درصد بقای سلول‌های سرطانی تیمار شده با S14161 و سلول‌های تیمار شده با عصاره لیموترش در روز اول، سوم و پنجم دیده می‌شود ( $P < 0.05$ ). همچنین تغییرات مورفولوژی بارزی نظیر کاهش سیتوپلاسم، پیگمانته شدن هسته و قطعه قطعه شدن کروماتین در سلول‌های تیمار شده دیده شد. اثر اختصاصی S14161 بر مهار رشد سلولی و نیز عدم مشاهده عوارض سمی تا غلظت‌های بسیار بالا این کوچک مولکول را بعنوان راهکاری اساسی در درمان سرطان سینه معرفی می‌کند.

**کلیدواژه‌ها:** کوچک مولکول، S14161، عصاره‌ی لیمو ترش، رده سلولی MCF-7.

## مقدمه

سرطان‌ها از بدو پیدایش بشر وجود داشته‌اند و همچنان درمان سرطان یکی از شایع‌ترین و طاقت‌فرساترین مسائل طب بالینی است [۲۷]. سرطان پستان شایع‌ترین بدخیمی زنان در سراسر دنیا است به طوری که ۳ درصد از کل سرطان‌ها و ۱۵ درصد از مرگ‌های ناشی از سرطان در میان زنان می‌باشد. مطالعات انجام شده در داخل کشور نشان می‌دهند سرطان سینه در ایران به عنوان شایع‌ترین سرطان در زنان ایرانی مطرح بوده و اطلاعات موجود از افزایش شیوع این بدخیمی طی دو دهه گذشته در ایران حکایت از آن دارد [۱۶، ۱۷]. از جمله راه کارهای درمانی سرطان سینه می‌توان به جراحی، شیمی درمانی و رادیوتراپی اشاره کرد [۱۴]. با این وجود، معایب مختلفی از جمله عود بیماری ناشی از متاستاز در چندماه پس از درمان، اثرات ناشی از مصرف داروها بر روی متابولیسم گلوکوکورتیکوئیدها و خطرات سرطان بعد از شیمی درمانی سرطان پستان، سبب محدودیت استفاده از این سیستم‌های درمانی شده است [۱۰، ۳۰]. بنابراین مطالعه و بررسی عواملی با اثرات مضر کمتر، یکی از مهم‌ترین اهداف تحقیق در حوزه درمان سرطان است [۳۱]. یکی از مهمترین عوامل هورمونی در بروز سرطان سینه بیان بیش از حد رسپتورهای استروژنی می‌باشد [۳]. بسیاری از اثرهای بیولوژیکی استروژن در سلول‌های اپیتلیال رحم و پستان بواسطه‌ی گیرنده‌ی استروژن ( Estrogen receptor, ER) صورت می‌پذیرد [۷]. استروژن یک فاکتور اساسی نه تنها در گسترش غده‌ی پستانی می‌باشد بلکه در گسترش و پیشرفت سرطان پستان و رحم در مراحل اولیه و پیشرفته نقش دارد بگونه‌ای

که، ۷۰ درصد از سرطان‌های پستان بدخیم سطح بالای از ER را بیان می‌کنند [۱۹، ۲۵]. کوچک مولکول‌ها از سال‌ها پیش به‌عنوان پروب‌های شیمیایی و یا به‌عنوان عوامل ایجاد موتاسیون در علم ژنتیک شیمیایی وارد زیست‌شناسی شده‌اند. از این گذشته در جریان گسترش علم شیمی سنتز مولکول‌های بسیار زیادی هر روزه در حال تولید و اضافه شدن به مجموعه مولکول‌های شناخته شده توسط انسان می‌باشد. برای کوچک مولکول‌ها تعریف دقیقی ارائه نشده است اما می‌توان آنها را به دو دسته طبیعی و مصنوعی تقسیم کرد [۸]. امروزه کوچک مولکول‌های مؤثر در درمان سرطان با اثرات جانبی اندک شناسایی شده است. خصوصیات مهم کوچک مولکول‌ها شامل تمایل زیاد برای اتصال به پلیمرهای زیستی، ایجاد تغییر در فعالیت پلیمرهای زیستی پس از اتصال به آن‌ها، قابلیت انتشار سریع از غشاهای زیستی بدلیل اندازه کوچک، هزینه پائین و ساده‌تر بودن تولید کوچک مولکول‌ها در مقایسه با هم‌تاهای پروتئینی آن‌ها می‌باشد. شود [۲۰]. یکی از این کوچک مولکول‌های شناخته شده S14161 (6-Boromo-8-ethoxy-3-nitro-2H-chromene) می‌باشد که در مطالعات متعدد مورد بررسی قرار گرفته شده است. S14161 باعث مهار مستقیم PI3K (مقدار PI3K در اغلب سرطان‌ها بطور معنی‌داری افزایش می‌یابد که باعث افزایش تکثیر سلول‌های سرطانی می‌گردد) در مسیر سیگنالینگ PI3K/AKT می‌گردد [۵، ۳۳]. تعداد زیادی از مواد مغذی گیاهی موجود در میوه‌ها، سبزی‌ها، ادویه‌جات، با جلوگیری از ایجاد مواد شیمیایی سمی مانند رادیکال‌های آزاد و بهبود فرایندهای سم‌زدایی در بدن به‌عنوان عوامل قوی

سپس در دمای اتاق خشک و پس از آن با قیچی خورد و توسط هاون پودر گردید. سپس ۵۰ گرم پودر از هر کدام در ۵۰۰ سی سی اتانول ۵۰٪ حل گردید و به مدت ۳ شبانه روز روی استیرر قرار گرفت و سپس با استفاده از کاغذ واتمن شماره ۱ فیلتر و با استفاده از روتاری خشک گردید و پودر حاصله برای استفاده‌های بعدی در دمای یخچال نگهداری شد.

### آماده سازی محلول عصاره لیموترش

ابتدا برای تهیه غلظت‌های ۲، ۴، ۶، ۸ و ۱۰ میلی‌مولار برگ لیموترش مقدار لازم از پودر تهیه شده برای هر غلظت، در محیط‌کشت حل و پس از فیلتر نمودن در دمای یخچال تا زمان استفاده نگهداری شد.

### کشت و پاساژ سلولی

سلول‌های رده MCF-7 از بانک سلولی انستیتو پاستور تهران خریداری گردید و پس از شمارش و تعیین درصد بقا در محیط‌کشت DMEM (Gibco, USA) حاوی (Gibco, USA) ۱۰٪ FBS کشت و در انکوباتور (شرکت سینا، ایران) با ۵٪ CO<sub>2</sub>، ۹۵٪ رطوبت و دمای °C ۳۷ نگهداری شدند. زمانی که تراکم سلول‌ها در فلاسک به ۸۰ درصد رسید، پاساژ سلولی صورت گرفت. سلول‌های MCF-7 در پلیت ۹۶ خانه‌ای و در هرخانه به تعداد  $10^4 \times 1$  سلول حاوی محیط کشت کامل کشت داده شدند. ۲۴ ساعت بعد سلول‌ها با غلظت‌های متفاوت از کوچک ملکول‌ها تیمار شده و در روزهای ۱، ۳ و ۵ بقای سلول‌ها ارزیابی شد.

### ارزیابی بقاء سلولی

به‌منظور تعیین IC<sub>50</sub> از ارزیابی فعالیت حیاتی

پیشگیرانه در برابر سرطان عمل می‌کنند [۳۲]. مرکبات یکی از میوه‌های تجاری هستند و شامل چندین میوه مهم از جمله پرتقال، لیمو، گریپ فروت و نارنگی می‌باشد از آنجا که پوست این میوه غنی از فلاونون‌ها و پلی‌متوکسیلات‌ها و فیتوکمیکال‌ها می‌باشد که در گیاهان دیگر بسیار نادر است (A, 2008). مانتی و همکاران او گزارش داده‌اند که فلاونوئیدهای موجود در مرکبات موجب مهار رشد سلول‌های سرطانی در لوسمی می‌شوند. اثر کامپفرول، که آن هم یک نوع فلاونوئید است برای مهار رشد خطوط سرطان تخمدان با غلظت ۲۰ و ۴۰ میکرومولار و همچنین رده سلول‌های سرطان پستان نشان داده شده است [۱۳].

در تحقیق و بررسی حاضر سعی بر آن است که با استخراج عصاره برگ‌های لیموترش، و همچنین استفاده از کوچک مولکول S14161، تاثیر هر دو ترکیب را در آپوپتوز سلول‌های سرطانی سینه رده MCF-7 مورد مقایسه قرار گیرد.

### مواد و روش کار

#### تهیه کوچک مولکول S14161

برای تهیه این کوچک مولکول، غلظت‌های ۱، ۲، ۵، ۱۰ و ۱۵ میکرومولار از S14161 (SML-0232-) (5MG Sigma) تهیه و پس از فیلتر نمودن توسط فیلتر سرسرنگی ۰/۲۲ میکرومتر در دمای ۴ درجه تا زمان استفاده نگهداری شد.

#### تهیه عصاره لیموترش

در این آزمایش برگ‌های گیاه لیموترش از باغ‌های اطراف شهرستان دزفول در بهار ۱۳۹۷ جمع‌آوری گردید. برای عصاره‌گیری، در ابتدا برگ‌های درخت جمع‌آوری و با آب مقطر به خوبی شستشو داده شدند.

مقایسه شدند.

### بررسی تغییرات سلول های سرطانی با رنگ آمیزی آکریدین اورنج

جهت بررسی کیفی زنده ماندن سلول ها از رنگ آمیزی آکریدین اورنج/ اتیدیوم بروماید (شرکت Sigma) استفاده شد. برای این منظور سلول ها با غلظت های ذکر شده و در زمان های ذکر شده با عصاره برگ های لیموترش و کوچک مولکول S14161 تیمار و بعد از ۲۴ ساعت رنگ آمیزی شدند. در ابتدا استوک ۱ میلی گرم بر میلی لیتر رنگ آکریدین اورنج و استوک ۱ میلی گرم بر میلی لیتر رنگ اتیدیوم بروماید تهیه و به نسبت مساوی ترکیب شدند. سپس سلول ها با این ترکیب رنگ و در زیر میکروسکوپ فلوروسنت عکس برداری شدند.

### بررسی آماری

داده های حاصل از آزمون MTT، با کمک نسخه ۱۸ نرم افزار SPSS (IBM SPSS, Armonk, NY, USA) و آزمون آماری (ANOVA) تجزیه و تحلیل شدند. نمودارهای لازم با کمک نرم افزار Microsoft Excel 2016 (Microsoft Corp., Redmond, WA, USA) رسم و تفاوت ها در سطح  $P < 0.05$  معنی دار در نظر گرفته شد.

### یافته ها

ارزیابی بقای سلولی در سلول های تیمار شده با S14161 براساس نتایج تست MTT غلظت ۱۰ میکرومولار S14161 در مدت زمان ۲۴ ساعت به عنوان IC50 سلول های MCF-7 تعیین گردید. درصد زنده ماندن

سلول از آزمون احیا MTT (4, 5) سلول های سرطانی تعداد حدود  $1 \times 10^4$  cells/Well در هر چاهک از پلیت ۹۶ چاهکی حاوی محیط کشت مرسوم کشت شدند. ۲۴ ساعت بعد سلول ها با غلظت های ۱، ۲، ۵، ۱۰ و ۱۵ میکرومولار از کوچک مولکول S14161 و غلظت های ۱، ۲، ۴، ۶، ۸ و ۱۰ میلی مولار برگ لیموترش به مدت ۱، ۳ و ۵ روز تیمار شدند. برای هر سلول یک گروه کنترل هم در نظر گرفته شد که تیمار نشدند. همچنین سپس آزمون MTT به صورت زیر انجام شد. به این صورت که در زمان های مورد نظر، محیط کشت از چاهک های حاوی سلول خارج و به هر خانه حدود ۱۰۰ میکرولیتر محیط تازه حاوی ۱۰ میکرومولار محلول MTT (با غلظت ۵ میلی گرم بر میلی لیتر) اضافه شد، سلول ها به مدت ۳ ساعت در دمای  $37^{\circ}\text{C}$  انکوبه شدند و سپس محلول MTT خارج و به هر چاهک ۱۰۰ میکرومولار DMSO (Merck, USA, 100%) اضافه شد و جذب نوری نمونه ها در طول موج ۵۷۰ نانومتر با استفاده از دستگاه میکروپلیت ریدر (Biotek, آلمان) اندازه گیری شد.

### بررسی مورفولوژیکی

برای بررسی و مقایسه مورفولوژیکی سلول ها، در هر کدام از سلول های گروه کنترل (تیمار نشده) و گروه های تیمار شده با غلظت های ۱، ۲، ۵، ۱۰ و ۱۵ میکرومولار از S14161 و غلظت های ۱، ۲، ۴، ۶، ۸ و ۱۰ میلی مولار برگ لیموترش پس از ۱ و ۳ و ۵ روز با دوربین دیجیتال متصل به میکروسکوپ اینورت و میکروسکوپ فلوروسنت عکس گرفته شد و تصاویر میکروسکوپی در گروه های کنترل و تیمار بررسی و

سلولی (کاهش بقای سلولی) در غلظت ۱۰ میلی مولار دیده شد. و همچنین کمترین میزان سمیت سلولی در غلظت ۲ میلی مولار دیده شد ( $P < 0/05$ ) ( نمودار ۲).

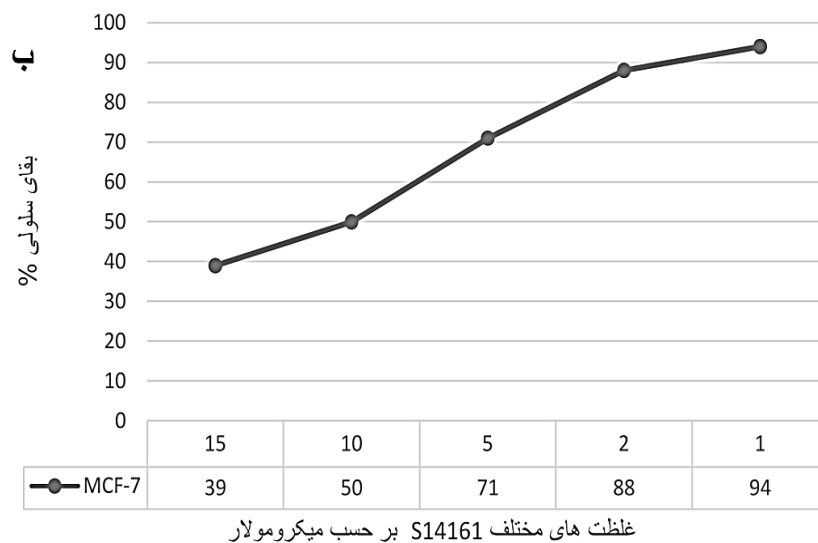
#### مقایسه میزان سمیت سلولی عصاره لیموترش و S14161

بر اساس نتایج تست MTT، درصد زنده مانده سلول‌های رده MCF-7 هنگام تیمار با غلظت‌های تعیین شده عصاره لیموترش و کوچک مولکول S14161 در روزهای ۱، ۲ و ۳ در شکل ۳ آمده است. مقایسه عصاره لیموترش و S14161 نشان می‌دهد که میزان سمیت سلولی کوچک مولکول نسبت به عصاره لیموترش بطور قابل توجهی بیشتر بوده است و اختلاف معنی‌داری میان درصد بقای سلول‌های سرطانی تیمار شده با S14161 و سلول‌های تیمار شده با عصاره لیموترش در روز اول، سوم و پنجم دیده می‌شود ( $P < 0/05$ ) (شکل ۳).

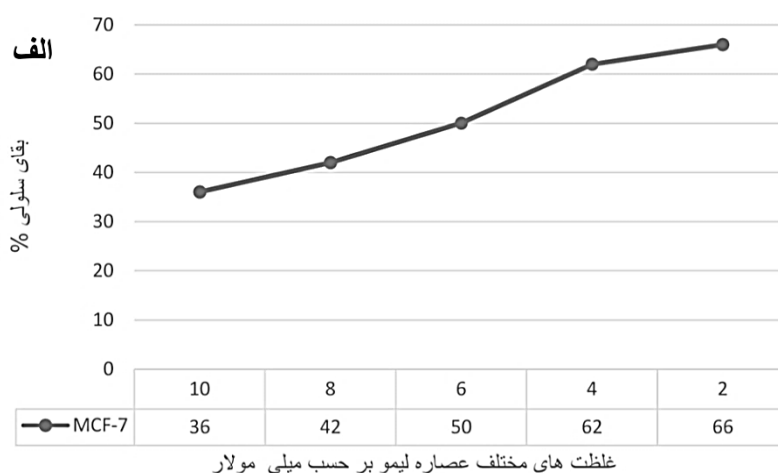
سلول‌ها بر اساس تست MTT در سلول‌های تحت تیمار با غلظت‌های ۱، ۲، ۵، ۱۰ و ۱۵ میکرومولار از S14161 به ترتیب ۹۴، ۸۸، ۷۱، ۵۰، ۳۹ درصد بود که در شکل ۱ آمده است که در این تحقیق حداکثر سمیت سلولی (کاهش بقای سلولی) در غلظت ۱۵ میکرومولار S14161 دیده شد. همچنین کمترین میزان سمیت سلولی در غلظت ۱ میکرومولار S14161 دیده شد ( $P < 0/05$ ) (شکل ۱).

#### ارزیابی بقای سلولی در سلول‌های تیمار شده با عصاره لیموترش

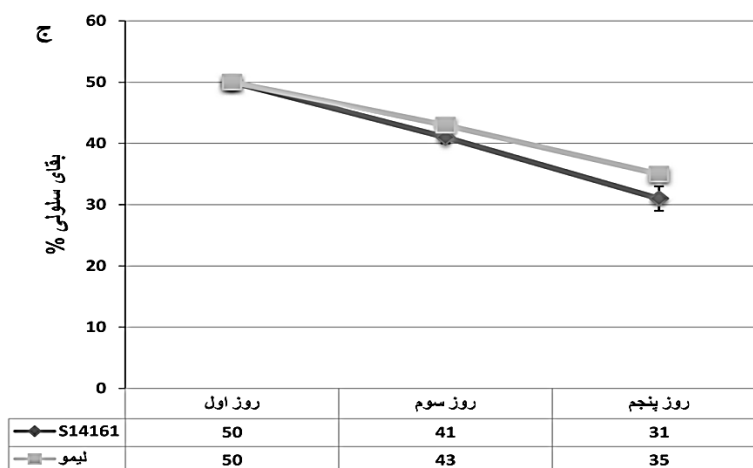
بر اساس نتایج تست MTT غلظت ۶ میلی مولار از عصاره لیموترش در مدت ۲۴ ساعت به عنوان IC50 سلول‌های MCF-7 تعیین گردید. درصد زنده ماندن سلول‌ها بر اساس تست MTT در سلول‌های تحت تیمار با غلظت‌های ۱، ۲، ۴، ۶، ۸ و ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر عصاره لیموترش به ترتیب ۶۶، ۶۲، ۵۰، ۴۲، ۳۶ می‌باشد که در شکل ۲ آمده است. حداکثر سمیت



شکل ۱. درصد بقای سلول‌های سرطانی MCF-7 در غلظت‌های تعیین شده کوچک مولکول S14161 با استفاده از روش MTT (آزمون ANOVA)



شکل ۲. درصد بقای سلول های سرطانی MCF-7 در غلظت های تعیین شده عصاره لیموترش با استفاده از روش MTT (آزمون ANOVA)

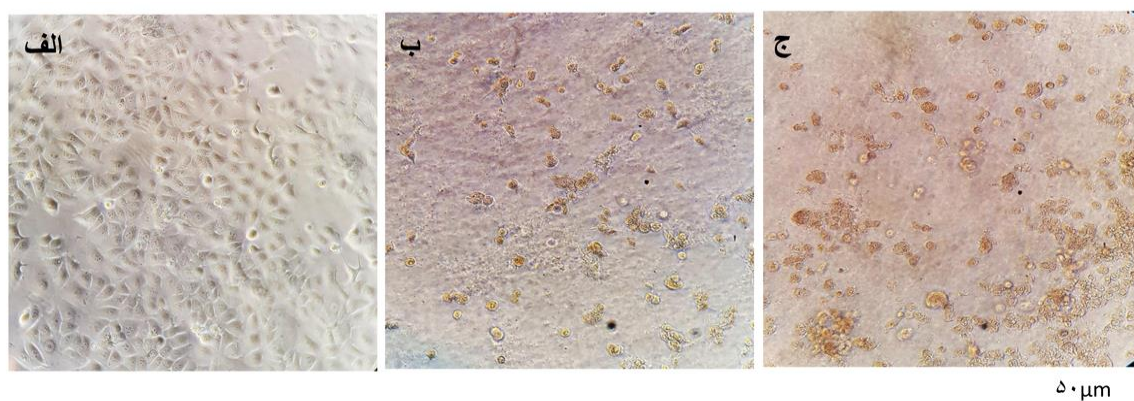


نمودار ۳. مقایسه میزان سمیت سلولی عصاره لیموترش و S14161 با استفاده از روش MTT

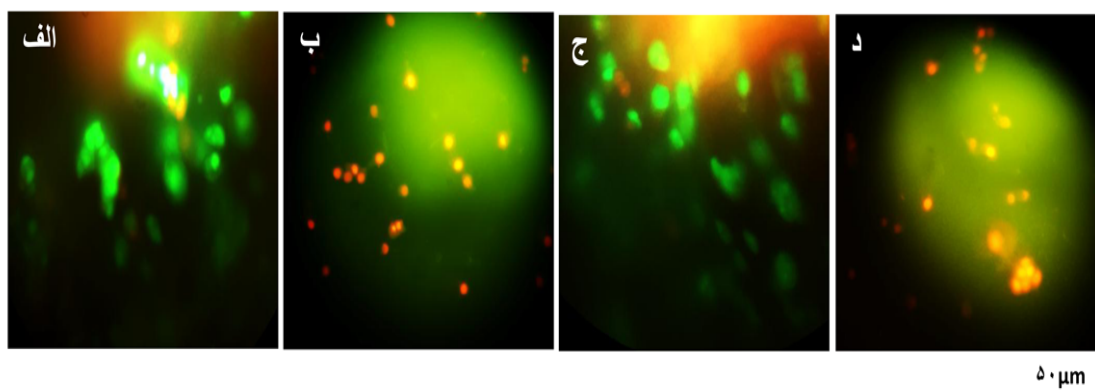
توجهی داشتند شکل سلول ها تحت اثر عصاره و کوچک مولکول تفاوت های بارزی و وابسته به دوزی با یکدیگر نشان دادند از جمله که هسته سلول ها منقبض شده و غشای آنها آسیب دیده در حالی که سلول های سالم با غشای دست نخورده و رنگ سبز مشاهده می شدند. مشاهدات ما همسو با نتایج MTT بود به طوری که سلول ها آپوتوز یافته در گروه تیمار شده با کوچک مولکول S14161 نسبت به عصاره لیمو بیشتر بود (شکل ۳ و ۴).

### نتایج مورفولوژی سلول ها

رنگ آمیزی آکریدین اورنج/ اتیدیوم بروماید برای بررسی مورفولوژی سلول های سالم و آپوتوز یافته انجام شد. در این رنگ آمیزی سلول های آپوتوز یافته به رنگ نارنجی دیده می شوند. نتایج مورفولوژی با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت و میکروسکوپ اینورت معمولی نشان می دهد سلول های MCF-7 تیمار شده با عصاره لیموترش و همچنین S14161 نسبت به نمونه کنترل، تغییرات مورفولوژیکی قابل



شکل ۳. بررسی مورفولوژی سلول‌ها با میکروسکوپ اینورت: الف نمونه کنترل سلول‌های MCF-7 ب- تأثیر کوچک مولکول S14161 با غلظت ۱۰ میکرومولار به عنوان IC50 بر روی رده سلول سرطانی MCF-7 ج- تأثیر عصاره لیمو با غلظت ۶ میلی‌مولار به عنوان IC50 بر روی سلول سرطانی MCF-7



شکل ۴. بررسی مورفولوژی سلول‌های رنگ‌آمیزی شده با رنگ اکریدین اورنج / اتیدیوم بروماید زیر میکروسکوپ فلورسنت: الف- نمونه کنترل کوچک مولکول S14161 و ب- رنگ‌آمیزی اکریدین اورنج کوچک مولکول S14161 ج- کنترل عصاره برگ لیمو د- رنگ‌آمیزی اکریدین اورنج عصاره برگ لیمو

این داروها و اثر جانبی فراوان این داروها علاوه بر خاصیت آنتی‌توموری آنها محدودیت‌هایی در استفاده از این داروها ایجاد کرده است. در این شرایط، کوشش در جهت یافتن یک عامل فارماکولوژیک مؤثر با حداقل اثر جانبی و ارزان‌تر بویژه در دو بافت سینه و رحم که نسبت به عوامل اندوکراین بسیار حساس می‌باشند امری اجتناب‌ناپذیر می‌باشد. یکی از مهمترین عوامل هورمونی در بروز سرطان سینه بیان بیش از حد رسپتورهای استروژنی می‌باشد [۳، ۱۱]. بسیاری از

## بحث

سرطان سینه شایع‌ترین بدخیمی نئوپلاستیک زنان در دنیا است و به عنوان مهمترین دلیل مرگ ناشی از سرطان در خانم‌ها مطرح می‌باشد [۴، ۹]. علی‌رغم پیشرفت‌های فراوانی که در حوضه‌ی درمان سرطان صورت پذیرفته است سالانه میلیون‌ها مرگ ناشی از سرطان در جهان رخ می‌دهد که اغلب مرگ و میرها در ارتباط با افزایش مقاومت بدن این افراد در برابر داروهای درمانی می‌باشد. همچنین گران قیمت بودن

هنگام تیمار با غلظت های تعیین شده عصاره لیموترش و کوچک مولکول S14161 در روزهای ۱، ۳ و ۵ نشان داد که میزان سمیت سلولی کوچک مولکول نسبت به عصاره لیموترش بطور قابل توجهی بیشتر بوده است و اختلاف معنی داری میان درصد بقای سلول های سرطانی تیمار شده با S14161 و سلول های تیمار شده با عصاره لیموترش دیده می شود. تغییرات مورفولوژی بارزی در سلول های تیمار شده از جمله هسته سلولی متقبض شده و غشای آسیب دیده شد.

چندین اثر بیولوژیکی متعاقب با افزایش سطوح ER در سلول های سرطانی که در معرض استروژن می باشند مشاهده می شود که برخی از آنها عبارتند از افزایش تکثیر سلول های سرطانی در انواع سرطان های پستان و رحم: یکی از مهمترین مسیرهای سیگنالینگ درگیر در این روند مسیر سیگنالینگ (Phosphatidylinositol 3 kinase/AKT) PI3K/AKT می باشد. یکی از فاکتورهای مهم در تنظیم سیکل و تکثیر سلولی، محافظت سلول ها از مرگ برنامه ریزی شده سلول یا آپوپتوز و تشکیل و رشد عروق خونی می باشد. این مسیر در سلول های سرطانی به طور واضحی افزایش می یابد [۱۲، ۲۱].

در مطالعات دیده شده که کوچک مولکول ها قادر به بلوکه کردن استروژن وابسته به رشد سلول های سرطانی هستند. همچنین اینکه اثر S14161 بعنوان مهارکننده PI3K و متعاقباً کاهش سیکلین D در درمان میلوما و لوکمی توسط Mao و همکارانش بررسی شده است اثر اختصاصی این مهارکننده بر PI3K و نیز عدم مشاهده عوارض سمی تا غلظت های بسیار بالا این مهار کننده را بعنوان راهکاری اساسی در درمان انواع سرطان ها معرفی کرده است. مطالعات متعدد ارتباط بین PI3K و میزان رونویسی سیکلین D

اثرهای بیولوژیکی استروژن در سلول های اپیتلیال رحم و پستان بواسطه گیرنده استروژن (ER) صورت می پذیرد [۷]. استروژن یک فاکتور اساسی نه تنها در گسترش غده پستانی می باشد بلکه در گسترش و پیشرفت سرطان پستان و رحم در مراحل اولیه و پیشرفته نقش دارد [۱۹، ۲۵]. درمان اندوکراین به عنوان اولین راهکار درمانی در بیماران سرطان پستان در ۳۰ سال گذشته بوده است. با این وجود، مقاومت زیر گروه های مختلفی از این سرطان نسبت به درمان اندوکراین [۲۳، ۲۴] لزوم همراهی یک عامل شیمیایی را با درمان اندوکراین مشخص نمود.

امروزه کوچک مولکول های مؤثر در درمان سرطان با اثرات جانبی اندک شناسایی شده است. تقریباً تمامی داروهایی که امروزه از آنها در درمان بیماری ها استفاده می شود «کوچک مولکول» هستند [۸، ۲۰]. یکی از این کوچک مولکول های شناخته شده S14161 می باشد که در مطالعه حاضر مورد بررسی قرار گرفته شده است. همچنین مطالعات نشان داده است که گیاهان دارای ترکیبات دارویی فعالی هستند که در شرایط آزمایشگاهی می توان این ترکیبات را استخراج و به عنوان دارو جهت مطالعات ضد سرطان مورد استفاده قرار داد. همچون مرکبات که فلاونوئیدهای موجود در آنها موجب مهار رشد سلول های سرطانی در لوسمی می شوند. اثر کامپفرول، که آن هم یک نوع فلاونوئید است برای مهار رشد خطوط سرطان تخمدان و همچنین رده سلول های سرطان پستان نشان داده شده است [۱۳]. لذا در تحقیق حاضر خواص ضد سرطانی عصاره برگ های لیموترش و کوچک مولکول S14161 در آپوپتوز سلول های سرطانی سینه رده MCF-7 مورد مقایسه قرار گرفت. براساس نتایج تست MTT، درصد زنده مانی سلول های رده MCF-7



دی ال تریبی نثول و ... می‌باشند. در بین ترکیبات نام برده شده فلاونوئیدها و لیمونن از جمله ترکیبات مهم در پوست مرکبات هستند که نقش مهم آنها در پیشگیری و درمان سرطان است [۲۶]. چندین مطالعه، فعالیت ضد التهابی قابل توجه کورستین، که نوعی دیگر از فلاونوئیدها است را به علت مهار مستقیم فرآیندهای اولیه در التهاب نشان می‌دهد. آنها گسترش انواع سرطان را با جلوگیری از تقسیم سلول‌های سرطانی، تنظیم نمایان ژن‌ها، جلوگیری از رسیدن خون به تومور و کاهش آسیب ناشی از رادیکال‌های آزاد و التهاب، کندتر کرده و اغلب متوقف می‌کند. تحقیقی که بر روی خاصیت ضد میکروبی مرکبات صورت گرفته، نتایج آن نشان داد که عصاره آبی پوست پرتقال رشد اشیریشیاکلی، استافیلوکوکوس اورئوس و کاندیدا آلبیکانس را در شرایط آزمایشگاهی و در شیر مهار می‌کند [۲۹]. در مطالعه حاضر نیز دیده شده که عصاره برگ‌های لیموترش توانسته است که درصد بقای سلول‌های سرطانی سینه را کاهش دهند. در سال‌های اخیر مطالعات بسیاری در خصوص اثرات ضد سرطانی عصاره‌های گیاهی صورت گرفته است که نشان می‌دهند که گیاهان نیز می‌توانند جز داروهای ضد سرطانی باشند [۶]. همچون ماده طبیعی ضد توموری ترانس سینامیک اسید که اخیراً در مطالعات بررسی شده است نشان می‌دهد که اثر مهاری سلولی سرطانی ترانس سینامیک اسید بر رشد تومورهای کارسینوما رحم، آدنوکارسینوما کلون و سارکومای استخوان [۳۵] لوکمی و سرویکس، گلیوبلاستوما، ملانوما، پروستات، کارسینوم ریه [۱۸] در شرایط مدل‌های حیوانی مورد تأیید قرار گرفته است. در مطالعه امینی و همکاران، اثر ضد سرطانی عصاره

را مشخص نموده‌اند بگونه‌ای که، مهار PI3K/AKT باعث کاهش سایکلین D می‌گردد [۵، ۳۳]. همچنین Kunkun طی مطالعه‌ای آنالوگ S14161 (-BENC) را بعنوان ترکیبی مؤثر در درمان میلوما و لوکمی معرفی کرد (Han et al., 2014). مهار مسیر سیگنالینگ PI3K در پلاکت‌ها و اثر مهاری S14161 بر تشکیل ترومبوز (بدون افزایش احتمال ایجاد خونریزی) نیز توسط Wenxiu گزارش شد [۳۴]. نتایج این مطالعات، نتایج پژوهش حاضر را تقویت می‌کند و می‌توان با تأیید بیشتری اثر آپوپتوزی S14161 را بر روی سلول‌های سرطانی بیان کرد. با این وجود بررسی این فاکتور در سرطان رحم توسط Shu و همکاران نشان داد این فاکتور اثر ناچیزی بر فسفوریلاسیون و غیرفعال سازی AKT ایفا می‌کند [۵].

Mao Chengjian و همکاران نیز در مطالعه خود بر روی کوچک مولکول‌های مهارکننده رسپتور استروژن در سلول‌های سرطانی، بیان کردند که این کوچک مولکول‌ها به طور اختصاصی و به طور موثری قادر به بلوکه کردن استروژن وابسته به رشد سلول‌های سرطانی هستند [۲۲]. همچنین پژوهش دیگر در ارتباط با مهار غیر رقابتی کوچک مولکول TPSF بر روی ژن تنظیم کننده بیان استروژن و رشد سلول‌های سرطان سینه بیان میکند که اثر سمیت این کوچک مولکول به طور اختصاصی و موثری باعث مهار فعالیت رسپتور و رشد سلول‌های سرطانی سینه می‌شود [۲۸].

لیموترش میوه‌ای از گروه مرکبات است. پوست این میوه‌ها غنی از فلاونون‌ها و پلی‌متوکسیلات‌ها و فیتوکمیکال‌ها می‌باشد که در گیاهان دیگر بسیار نادر است. پوست مرکبات محتوی مقدار زیادی اسانس است که دارای لیمونن، دی سایکلیدک آلدئید، لینالول،

- [5] Brennan, P., Mehl, A. M., Jones, M., & Rowe, M., 2002, Phosphatidylinositol 3-kinase is essential for the proliferation of lymphoblastoid cells. *Oncogene*, 21, 1263-1271.
- [6] Carvalho, A. A., Andrade, L. N., de Sousa, É. B. V., & de Sousa, D. P., 2015, Antitumor phenylpropanoids found in essential oils. *BioMed research international*, 2015 :392674.
- [7] Dickson, R. B., & Stancel, G. M., 2000, Chapter 8: Estrogen receptor-mediated processes in normal and cancer cells. *JNCI Monographs*, 2000, 135-145.
- [8] Ding, S., & Schultz, P. G., 2004, A role for chemistry in stem cell biology. *Nature biotechnology*, 22(7):833-40.
- [9] Fisch, T., Pury, P., Probst, N., Bordoni, A., Bouchardy, C., Frick, H., et al., 2005, Variation in survival after diagnosis of breast cancer in Switzerland. *Annals of oncology*, 16, 1882-1888.
- [10] Fisher, B., Costantino, J. P., Wickerham, D. L., Cecchini, R. S., Cronin, W. M., Robidoux, A., 2005, Tamoxifen for the prevention of breast cancer: current status of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project P-1 study. *Journal of the national cancer institute*, 97, 1652-1662.
- [11] Fossum, T. W., Hedlund, C.S., Hulse, D.A., Johnson, A.L., Schulz, K.S., Seim, H.B., et al., 2007, surgery of the female reproductive tract. In: *Small animal surgery*, St. Louis, Mosby.
- [12] Fruman, D. A., Chiu, H., Hopkins, B. D., Bagrodia, S., Cantley, L. C., & Abraham, R. T., 2017, The PI3K Pathway in Human Disease. *Cell*, 170, 605-635.
- [13] Ghasemzadeh, A., & Ghasemzadeh, N., 2011, Flavonoids and phenolic acids: Role and biochemical activity in plants and human. *Journal of medicinal plants research*, 5, 6697-6703.
- [14] Guo, J., Bourre, L., Soden, D. M., O'Sullivan, G. C., & O'Driscoll, C., 2011, Can non-viral technologies knockdown the barriers to siRNA delivery and achieve the next generation of cancer therapeutics? *Biotechnology Advances*, 29, 402-417.
- [15] Han, K., Xu, X., Chen, G., Zeng, Y., Zhu, J., Du, X., et al., 2014, Identification of a promising PI3K inhibitor for the treatment of multiple myeloma through the structural

آنالاس بر روی سلول های کارسینومای انسانی کولون و معده باعث مهار رشد و تکثیر سلول های سرطانی شد و مکانسیم اثر ضد سرطانی برومیلین موجود در عصاره از طریق فعال سازی مسیرهای آپوپتوز و مهار هم زمان بقای سلول شناخته شد [ ۱ ].

### نتیجه گیری

در مطالعه حاضر در بررسی مقایسه اثر این دو ترکیب دیده شده که کوچک مولکول S14161 نسبت به عصاره لیموترش بهتر عمل کرده است. از آنجایی که غلظت عصاره لیموترش (میلی مولار) نسبت به کوچک مولکول (میکرومولار) در این بررسی بیشتر بوده است، میتوان نتیجه گرفت که کوچک مولکول در کمترین مقدار بیشترین اثر سمیت سلولی را بر رده سلولی MCF-7 سرطان سینه داشته است و تأثیر آپوپتوزی قابل توجهی را نشان داد. تغییرات مورفولوژیکی در شکل سلول ها تحت اثر عصاره و کوچک مولکول تفاوت های بارز و وابسته به دوزی با یکدیگر نشان دادند.

### Reference

- [1] Amini, A., Ehteda, A., Moghaddam, S. M., Akhter, J., Pillai, K., & Morris, D. L. 2013, Cytotoxic effects of bromelain in human gastrointestinal carcinoma cell lines (MKN45, KATO-III, HT29-5F12, and HT29-5M21). *OncoTargets and therapy*, 6: 403-410.
- [2] Available on the: 7 [Thttp://www.salamatnew.com/viewNews.aspx](http://www.salamatnew.com/viewNews.aspx), 2008, Directed by Anonymous.
- [3] Bojrab, M. J., Waldron, D. R., & Toombs, J. P., 2014, *Current Techniques in Small Animal Surgery*, Fifth Edition, Teton NewMedia.
- [4] Bray, F., McCarron, P., & Parkin, D. M., 2004, The changing global patterns of female breast cancer incidence and mortality. *Breast cancer research*, 6: 229.

- optimization. *Journal of hematology & oncology*, 15, 7:9.
- [16] Harirchi, I., Kolahdoozan, S., Karbakhsh, M., Chegini, N., Mohseni, S., Montazeri, A., et al., 2010, Twenty years of breast cancer in Iran: downstaging without a formal screening program. *Annals of oncology*, 22, 93-97.
- [17] Hosainzadegan, H., Ezzetpor, B., Abdollahpor, F., Motamedy, M., & Rashidipor, M., 2010, Study of Cytotoxic Activity of Olive and Green Tea Extracts on Breast Tumor Cell Line. *Journal of Ardabil University of Medical Sciences*, 10, 287-294.
- [18] Liu, L., Hudgins, W. R., Shack, S., Yin, M. Q., & Samid, D., 1995, Cinnamic acid: a natural product with potential use in cancer intervention. *International journal of cancer*, 62, 345-350.
- [19] Loi, S., Haibe-Kains, B., Desmedt, C., Lallemand, F., Tutt, A. M., Gillet, C., et al., 2007, Definition of clinically distinct molecular subtypes in estrogen receptor-positive breast carcinomas through genomic grade. *Journal of clinical oncology*, 25, 1239.
- [20] Lyssiotis, C. A., Lairson, L. L., Boitano, A. E., Wurdak, H., Zhu, S., & Schultz, P. G., 2011, Chemical control of stem cell fate and developmental potential. *Angewandte Chemie International Edition*, 50, 200-242.
- [21] Manning, B. D., & Cantley, L. C., 2007, AKT/PKB Signaling: Navigating Downstream. *Cell*, 129, 1261-1274.
- [22] Mao, C., Patterson, N. M., Cherian, M. T., Aninye, I. O., Zhang, C., Montoya, J. B., et al., 2008a, A new small molecule inhibitor of estrogen receptor  $\alpha$  binding to estrogen response elements blocks estrogen-dependent growth of cancer cells. *Journal of Biological Chemistry*, 283, 12819-12830.
- [23] Mao, X., Cao, B., Wood, T. E., Hurren, R., Tong, J., Wang, X., et al., 2011, A small-molecule inhibitor of D-cyclin transactivation displays preclinical efficacy in myeloma and leukemia via phosphoinositide 3-kinase pathway. *Blood*, 117, 1986-1997.
- [24] Mao, X., Liang, S.-b., Hurren, R., Gronda, M., Chow, S., Xu, G. W., et al., 2008b, Cyproheptadine displays preclinical activity in myeloma and leukemia. *Blood*, 112, 760-769.
- [25] Miyoshi, Y., Murase, K., Saito, M., Imamura, M., & Oh, K., 2010, Mechanisms of estrogen receptor- $\alpha$  upregulation in breast cancers. *Medical molecular morphology*, 43, 193-196.
- [26] Moshaeidi Sh., 2012, Antioxidant and antimicrobial activities of essential oils from *Zataria multiflora* bois, *Origanum vulgare* and *Mentha pulegium* and some growth factor on *anterococos fekalis* [dissertation]. Tehran: Shahid Beheshti University.
- [27] Naser, P., 2012, Genetic disorders of cancers in humans. Special Issue of the Twelfth Iranian Congress of Genetics. Tehran-IRI.
- [28] Patterson, N. M., Cherian, M. T., Mao, C., Aninye, I. O., Reynolds, P. D., Schiff, R., et al., 2010, A noncompetitive small molecule inhibitor of estrogen-regulated gene expression and breast cancer cell growth that enhances proteasome-dependent degradation of estrogen receptor  $\alpha$ . *Journal of Biological Chemistry*, 31, 285 (53): 41863-73.
- [29] Razmjoo, M., Khaki, P., Nasiri, M., & Rezaei, K. 2016, Possibility study of multilayer encapsulation by external gelation procedure on the survival of probiotic bacteria undergoing orange juice pasteurization. *Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology*, 11, 59-66.
- [30] Rubino, C., de Vathaire, F., Diallo, I., Shamsaldin, A., Grimaud, E., Labbe, M., et al., 2002, Radiation Dose, Chemotherapy and Risk of Lung Cancer After Breast Cancer Treatment. *Breast Cancer Research and Treatment*, 75, 15-24.
- [31] Taraphdar, A. K., Roy, M., & Bhattacharya, R., 2001, Natural products as inducers of apoptosis: Implication for cancer therapy and prevention. *Current science*, 1387-1396.
- [32] Tayarani-Najaran, Z., & Emami, S. A., 2011, Cytotoxic Plants: Potential Uses in Prevention and Treatment of Cancer, INTECH Open Access Publisher, 651-692.
- [33] White, P. C., Shore, A. M., Clement, M., McLaren, J., Soeiro, I., Lam, E. W. F., & Brennan, P., 2006, Regulation of cyclin D2 and the cyclin D2 promoter by protein

- kinase A and CREB in lymphocytes. *Oncogene*, 25, 2170-80.
- [34] Yi, W., Li, Q., Shen, J., Ren, L., Liu, X., Wang, Q., et al., 2014, Modulation of platelet activation and thrombus formation using a pan-PI3K inhibitor S14161. *PLoS One*, 12; 9 (8): e102394.
- [35] Zhang, Y., Yang, XY., Kunag, ZS., Xiao, C., 2010, Inhibitory effect of cinnamon acid germanium on growth of uterocervical carcinoma (U\_ (14)) cells in mice [J]. *Chinese Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 4, 026.

## Comparison of Apoptotic Effects of S14161 and *Citrus limon* Leaves Hydroalcoholic Extracts on Breast Cancer Cells MCF-7

Hushmandi K.<sup>1</sup>, Gooraninejad S.<sup>2\*</sup>, Hoveizi E.<sup>3,4</sup>, Tabandeh M.R.<sup>4,5</sup>

<sup>1</sup> Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

<sup>2</sup> Department of Clinical Science, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

<sup>3</sup> Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

<sup>4</sup> Stem cells and transgenic technology research center (STTRC), Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

<sup>5</sup> Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

\* Email: goorani\_s@scu.ac.ir

Received: 6 January 2019

Accepted: 17 March 2019

### Abstract

Breast cancer is a multifactorial disease in which genetics, hormonal factors and the interaction between individuals and the environment contribute to it. In the present study, we try to compare the effect of lime leaves extract and S14161 small molecule on apoptosis of MCF-7 breast cancer cells. Apoptotic effects of S14161 and hydroalcoholic extract of Lime leaves on MCF-7 cells were investigated using MTT method, the morphology of cells with acridine orange staining using the fluorescent microscope. The results showed that the S14161 and Lime leave extract decreases the survival rate and proliferation of MCF-7 cells in a time and dose-dependent manner. Based on the results of the MTT test, 10  $\mu$ M concentration of S14161 and 6 mM concentration of Lime extract was determined within 24 hours as IC50 concentration of MCF-7 cells. Comparison of Lime extract and S14161 showed that the amount of small molecule cytotoxicity was higher than that of Lime leaves extract and there was a significant difference between survival percentage of cancer cells treated with S14161 and cells treated with lime leaves extracts on day 1, 3 and 5 ( $P < 0.05$ ). Also, there were significant morphological changes such as shrinkage and increasing size of vacuoles, cytoplasmic loss, nucleus pigmentation and fragmentation of chromatin in treated cancer cells. The specific effect of this inhibitor on cell growth, as well as the lack of observation of toxic effects to high concentrations, has been described as a major strategy for treating breast cancers.

**Keywords:** Small molecule, S14161, Sour Lime Extract, MCF-7 Cell Line.