

## بررسی اثر سیتوتوکسی سیتی و مهار رشد سلولی داروی اتورواستاتین بر رده‌ی سلولی سرطان پستان (MCF-۷)

دکتر خدیجه شاهرخ آبادی<sup>۱</sup>، دکتر جواد بهارآراء<sup>۲</sup>، دکتر سعیده ظفربالانژاد<sup>۳</sup>، زهرا حسامی<sup>۴</sup>

نویسنده‌ی مسول: مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد، دانشکده‌ی علوم پایه، گروه زیست شناسی Shahrokhahady@yahoo.com

دریافت: ۹۱/۱۰/۷ پذیرش: ۹۲/۴/۲۴

### چکیده

**زمینه و هدف:** با توجه به رشد روزافزون سرطان استفاده از ترکیباتی که خاصیت ضد توموری دارند، مورد استقبال می‌باشد. استاتین‌ها دارای اثرات وابسته به دوز دوگانه‌ای در جهت مهار و تحریک رشد سلولی می‌باشند، لذا در این پژوهش به بررسی اثر سیتوتوکسیسیتی و مهار رشد سلولی داروی اتورواستاتین بر روی رده‌ی سلولی MCF۷ پرداخته شد.

**روش بررسی:** سلول‌های توموری MCF۷ در محیط کشت RPMI ۱۶۴۰ حاوی سرم جنین گاو و آنتی‌بیوتیک کشت گردید. سپس سلول‌ها با غلظت‌های متفاوت اتورواستاتین در محیط کشت تیمار شدند و درصد زنده ماندن سلول‌ها با روش‌های رنگ سنجی تریپان بلو و MTT به منظور تعیین دوز و زمان مناسب جهت تحریک رشد یا سمیت اتورواستاتین تعیین گردید. همچنین تغییرات مورفولوژیکی سلول‌ها از قبیل میزان چسبندگی بر بستر و میزان گرانوله شدن سیتوپلاسم و هسته، توسط میکروسکوپ معکوس ارزیابی شد. داده‌ها به کمک آزمون‌های آماری *T-Tukey* و *Anova* در سطح  $P < 0/05$  تحلیل شد.

**یافته‌ها:** پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت هیچ تفاوت معنی‌دار آماری در درصد بقای سلولی MCF۷ کشت شده در تیمار با دوزهای ۰/۱ و ۱ میکرومول اتورواستاتین نسبت به گروه کنترل مشاهده نشد ( $P > 0/05$ ). اما درصد بقای سلولی MCF۷ کشت شده در تیمار با اتورواستاتین ۱۰ میکرومول در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌دار نشان داد ( $P < 0/05$ ).

**نتیجه‌گیری:** داروی اتورواستاتین با غلظت ۱۰ میکرومول منجر به کاهش درصد زنده ماندن سلول‌های سرطان پستان انسان (MCF۷) در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ و ۷۲ ساعت شد.

**واژگان کلیدی:** اتورواستاتین، سلول سرطانی پستان، رنگ سنجی، سلول توموری

### مقدمه

سیاست‌گذاری‌های بهداشتی هستند (۱). به لحاظ دقت و توجه خاصی که به این بیماری‌ها معطوف گردیده است،

انواع سرطان‌ها به علت شیوع زیاد، عوارض وسیع و مرگ و میر بسیار، کانون توجه اکثر برنامه‌ریزی‌ها و

- ۱- دکترای ژنتیک مولکولی، استادیار دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد
- ۲- دکترای علوم جانوری- تکوینی، دانشیار دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد
- ۳- دکترای علوم جانوری- تکوینی، مربی دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد
- ۴- کارشناس ارشد علوم جانوری- تکوینی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد

می‌رسد که در این خصوص روش‌های متعددی استاندارد شده است (۱۰). امروزه از روش‌های رنگ سنجی به خاطر سهولت در به کارگیری و دقت کافی در حصول نتایج، بیش‌تر استفاده می‌شوند، رنگ‌هایی مثل MTT، نوترال رد، XTT کاربرد بیشتری دارند (۱۱-۱۳). روش رنگ سنجی MTT بسیار سریع، حساس و قابل اندازه‌گیری برای پروليفراسیون همه‌ی رده‌های سلولی است، اساس ارزیابی این روش، قدرت آنزیم دهیدروژناز میتوکندریایی است. این روش برای اندازه‌گیری لنفوکاین‌های پروليفراتیو، میتوزن‌ها، لیز شدن با واسطه‌ی کمپلمان، تعیین فاکتورهای رشد T-Cell و بررسی اثرات سایتوتوکسیسیته‌ی مواد و داروهای مختلف بر روی سلول‌ها به کار گرفته می‌شود (۱۴). یکی از فاکتورهای موثر در MTT، تعداد سلول‌های زنده است که برای اطمینان از درصد سلول‌های زنده، Viability سلول‌ها را با تریپان بلو محاسبه می‌نمایند. باید توجه نمود که اساس بررسی سایتوتوکسیسیته دارو بر سلول‌ها مشاهده‌ی تغییرات موفولوژیکی آن‌ها می‌باشد. این تغییرات که شامل سطوح واکوئله شده و کاهش اندازه‌ی تراکم هسته‌هاست، می‌تواند بازتاب تغییرات متابولیکی باشد که تنها در سطح مولکولی در سلول‌های تیمار شده قابل بررسی است (۱۵ و ۱۶). در این مطالعه به بررسی اثر سیتوتوکسی سیته و القای رشد سلولی ناشی از داروی آترواستاتین با غلظت‌های ۰/۱، ۱ و ۱۰ میکرومول بر رده‌ی سلولی سرطان پستان انسان (MCF۷) پرداخته شد، آیا داروی آترواستاتین با غلظت‌های مورد نظر اثر سیتوتوکسی سیته بر سلول‌های سرطان پستان انسان دارد و یا منجر به القای تکثیر و رشد سلول‌ها می‌شود، سوالی بود که این پژوهش به آن پاسخ داد.

مزیت این کار این بود که مطالعه بر روی داروهای نظیر استاتین‌ها و ترکیبات آن با توجه به کاربری آن، راه را برای تحقیق و توسعه در سنتز داروهای موثرتر با اثرات جانبی کمتر همواره می‌سازد. چنانچه این دارو بتواند باعث مهار

امروزه آمار بقا و طول عمر بیماران نسبت به گذشته افزایش یافته است. معمولاً سرطان‌های زنان به خصوص سرطان پستان به‌عنوان یکی از مشکلات اصلی در زمینه‌ی سلامت زنان مطرح است (۲). بر اساس گزارش سازمان جهانی بهداشت، در فوریه‌ی ۲۰۰۹ سرطان پستان سالیانه سبب مرگ ۵۱۹ هزار نفر در سراسر جهان شده است (۳). هم‌چنین این بیماری دومین علت مرگ ناشی از سرطان در خانم‌هاست (۴). سرطان‌های انسانی در سطح ملکولی به دلیل نقص ارتباطات بیولوژیکی و بیوشیمیایی سلول‌ها رخ می‌دهد (۵). گروه داروهای مهار کننده‌ی آنزیم ۳- هیدروکسی ۳- متیل گلو تاریل کوآنزیم A ردوکتاز (HMG-COA) که به استاتین‌ها معروف هستند، در دوزهای پایین از طریق افزایش اکسید نیتریک (NO) منجر به تحریک رگ‌زایی می‌شوند در حالی که این ترکیبات در دوزهای بالا پرنیلاسیون پروتئین‌ها را کاهش داده و باعث مهار رشد سلولی می‌شوند (۶). مطالعات بالینی نشان می‌دهد که شاید بتوان استاتین‌ها را به جز اثر ساده‌ی کاهش کلسترول خون، در درمان و پیشگیری از بیماری‌های غیر قلبی مانند سرطان، عفونت‌ها، بیماری‌های مزمن انسدادی بکار برد. استاتین‌ها از تکثیر سلولی جلوگیری کرده، اثرات ضد التهابی و سرکوب کننده‌ی ایمنی دارند (۷). آترواستاتین از دیگر ترکیبات خانواده استاتین‌ها می‌باشد که نسبت به سایر اعضای این خانواده دارای عوارض جانبی کمتر و اثربخشی بیشتری می‌باشد (۸). آترواستاتین دارای اثرات دو گانه‌ای بر رشد بافت آندومتر می‌باشد. به طوری که این دارو در دوزهای پایین (۰/۱ میکرومول) منجر به افزایش رشد بافت در مقایسه با گروه کنترل می‌شود، اما دوزهای بالاتر آترواستاتین (۱ و ۱۰ میکرومول) رشد را نسبت به گروه کنترل کاهش می‌دهد که این کاهش رشد شامل کاهش تکثیر سلولی و کاهش میزان رگ‌زایی می‌باشد (۹). در این راستا سنجش میزان بقا و تکثیر سلولی در تعیین میزان اثر داروهای ضد سرطانی بر روی سلول‌ها، امری مهم به نظر

۵ سی سی محیط کشت پیش‌بینی شد. پس از ۲۴ ساعت که از چسبندگی سلول‌ها اطمینان حاصل شد نوبت به افزایش آتورواستاتین با غلظت‌های ۰/۱، ۱ و ۱۰ میکرومولار گردید. برای مقایسه‌ی مرفولوژی سلول‌ها، از فلاسک حاوی سلول‌های کنترل (سلول‌های توموری MCF۷ که تیمار نشده‌اند) و فلاسک‌های دارای سلول‌های تیمار شده پس از ۲۴، ۴۸، ۷۲، ۹۶ و ۱۲۰ ساعت (۵ شبانه روز) با دوربین دیجیتال (America Camera HP) با درشت‌نمایی  $20\times$  میکروسکوپ معکوس عکس گرفته شد. عکس‌ها برای مقایسه و نتیجه‌گیری نهایی ذخیره شدند.

**بررسی کمیت سلول‌ها به روش MTT assay:** تست MTT برای رده‌ی سلولی MCF۷ و در غلظت‌های ۰/۱، ۱ و ۱۰ میکرومولار آتورواستاتین به صورت نه‌تایی مطابق مراحل زیر انجام شد:

۱- تهیه‌ی سوسپانسیون سلولی از رده‌ی سلولی MCF۷ و افزودن مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی به هرول از پلیت ۹۶ خانه‌ای برای این‌که در هرول تعداد  $5 \times 10^3$  سلول قرار گیرد، تست تر پیان بلو و شمارش تعداد سلول‌ها انجام شد. ۲- انکوباسیون به مدت ۲۴ ساعت برای اطمینان از چسبیدن سلول‌ها بر بستر، (در انکوباتور  $5\text{CO}_2$  درصد و رطوبت ۱۰۰ درصد). ۳- افزودن داروی آتورواستاتین با غلظت‌های ۰/۱، ۱، ۱۰ میکرومولار، به سلول‌های مورد آزمایش. تمامی مراحل بالا به صورت موازی و در سه پلیت جداگانه برای سنجش سه روز متوالی آماده سازی شد. پلیت‌ها به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در انکوباتور  $\text{CO}_2$  دار قرار داده شدند. پس از ۲۴ ساعت برای پلیت اول، محیط کشت رویی با برگرداندن پلیت خالی شد. سپس ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت تازه و ۲۰ میکرولیتر رنگ MTT به هر ول افزوده شد، پلیت با فایل آلومینوم پوشیده شده و به مدت ۴ ساعت در انکوباتور انکوبه گردید. پس از طی زمان (۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت)، محیط کشت سلول‌ها با برگرداندن

رشد سلول‌های سرطانی یا تکثیر سلول‌ها شود، می‌توان تأثیر این دارو را در مهار رشد سلول‌های سرطانی یا ترمیم سلول‌های آسیب دیده در درمان‌های کلینیکی به‌عنوان دستمایه‌ی پژوهش‌های بعدی پیشنهاد نمود.

### روش بررسی

رده‌ی سلولی سلول‌های سرطان پستان انسان (MCF۷)، در محیط  $1640\text{RPMI}$  و  $10\%$  FBS و  $1/5\text{cc}$  استریتومايسين و  $0/5\text{cc}$  پنی‌سیلین، از پژوهش‌شده‌ی بوعلی تهیه و در انکوباتور  $37$  درجه‌ی سانتی‌گراد و  $\text{CO}_2$ ، ۵ درصد انکوبه و رشد داده شد. این رده‌ی سلولی از نظر مورفولوژی به صورت اپیتلیالی و از نظر کروموزومی  $2n=46$  می‌باشد. چون سلول‌های مورد نظر از نوع چسبنده می‌باشند، برای پاساژ سلولی، ابتدا محیط کشت رویی سلول‌ها را خالی کرده و در شرایط استریل با افزودن ۳ سی سی سرم فیزیولوژی سلول‌ها شسته شدند، سپس به هر یک از ۳ فلاسک T ۷۵ (شرکت nunc دانمارک)  $1/5$  سی سی تریپسین ۲۵ درصد اضافه کرده درب فلاسک‌ها را بسته و مدت دو دقیقه در انکوباتور قرار دادیم (۱۸). در مرحله‌ی بعد با میکروسکوپ معکوس کنترل نموده چنان چه سلول‌ها از بستر جدا شده بودند، سلول‌ها را با ۱ سی سی محیط کشت و ۳ سی سی سرم فیزیولوژی با دور ۱۵۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ کردیم، دوبار سلول‌ها شستشو داده شدند و در آخرین مرحله سلول‌ها در ۱ سی سی محیط کشت حل شده و به فلاسک‌های T۷۵ جدید منتقل شدند. برای بررسی اثر آتورواستاتین بر رده‌ی سلولی MCF۷ آزمایش در دو مرحله انجام شد.

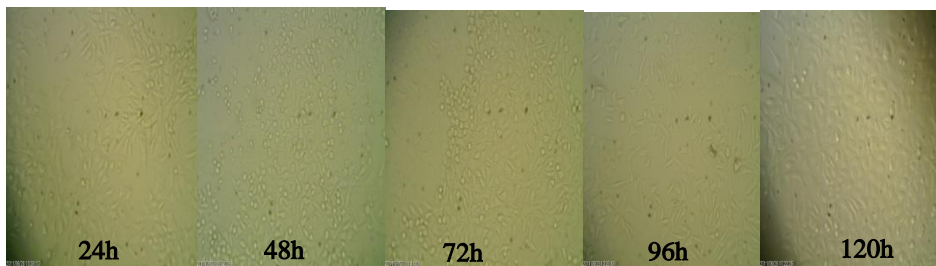
**بررسی کیفیت سلول‌ها:** در این مرحله سلول‌ها از نظر مورفولوژی، میزان چسبندگی بر بستر و میزان گرانوله شدن سیتوپلاسم و هسته مورد ارزیابی قرار گرفتند. برای انجام آزمایش ۴ فلاسک T۷۵ هر یک حاوی  $1 \times 10^6$  سلول در

غلظت های ۱۰ و ۱ و ۰/۱ میکرومولار آترواستاتین در مقایسه با میزان تکثیر سلولی به صورت رسم نمودار در ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به دست آمد. میانگین درصد سلول‌های زنده و فعالیت متابولیکی سلول‌های تیمار شده با غلظت‌های ۰/۱ و ۱ میکرومولار آترواستاتین نسبت به سلول‌های کنترل تفاوت معنی‌داری نشان نداد ( $P > 0/05$ ). میانگین درصد زنده مانی و فعالیت متابولیکی سلول‌های تیمار شده با غلظت ۱۰ میکرومولار آترواستاتین در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت نسبت به سلول‌های کنترل کاهش معنی‌داری نشان داد ( $P < 0/05$ ). همچنین با استفاده از آنالیز آماری و مقایسه نمودارها،  $IC_{50}$  (غلظتی از دارو که درصد کاهش رشد نسبت به کنترل را نشان می‌دهد) برای سلول‌های سرطانی MCF7 با غلظت ۱۰ میکرومولار آترواستاتین در زمان ۴۸ ساعت بدست آمد. در این بررسی اساس روش رنگ سنجی، بر مبنای تبدیل نمک تترازولیوم محلول به فورمازان نامحلول در میتوکندری‌های سلول‌های زنده است که تحت تاثیر حلال DMSO به رنگ بنفش در می‌آید. شدت رنگ ایجاد شده که بیانگر تعداد سلول‌های زنده است، توسط دستگاه الیزا ریدر در جذب نوری ۵۷۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. بنابراین تعداد سلول‌های زنده در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه‌ای با میزان OD یا جذب نوری اندازه‌گیری شده در ارتباط است. در نهایت میزان OD بیانگر درصد سلول‌های زنده است. نتایج نشان می‌دهد که میزان حیات سلول‌ها در غلظت‌های ۰/۱ و ۱ میکرومولار پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون تاثیر قابل بحثی بر مرگ و میر سلول‌ها نداشت. اما در غلظت ۱۰ میکرومولار میزان بقای سلول‌ها بعد از ۷۲ ساعت به ۶۰٪ رسید. نمودارهای ۱ و ۲ و ۳ تاثیر داروی آترواستاتین در غلظت‌های فوق‌الذکر را نشان می‌دهد.

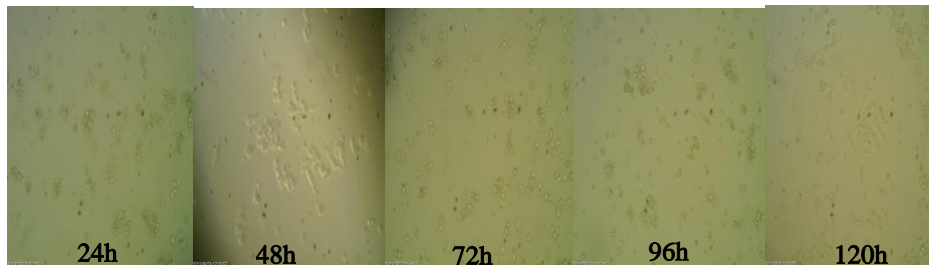
پلیت خالی شده و به هرول ۲۰۰ میکرولیتر حلال DMSO و ۲۵ میکرولیتر بافر گلاسنین اضافه شد و با سمپلر محیط و سلول‌ها خوب مخلوط شدند تا دانه‌های رسوبی ایجاد شده حل گردند. جذب نوری هرول توسط دستگاه Plate Eliza Reader در طول موج ۵۷۰ نانومتر قرائت گردید. کلیه‌ی این مراحل برای پلیت دوم و سوم پس از گذشت زمان ۴۸ و ۷۲ ساعت انجام گرفت. تمامی مراحل آزمایش سه بار تکرار گردید و داده‌های به دست آمده به صورت میانگین مورد ارزیابی قرار گرفت. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از روش آنالیز واریانس یکطرفه (ANOVA) و آزمون توکی (آزمون اختلاف حقیقی) استفاده گردید. سطح معنی‌داری آزمون‌ها  $P < 0/05$  در نظر گرفته شد.

#### یافته‌ها

**نتایج مورفولوژیکی:** سلول‌های تیمار شده با دوزهای ۱ و ۰/۱ میکرومولار در مقایسه با گروه کنترل در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ و ۷۲ ساعت تغییرات مورفولوژیکی واضحی را نشان نداد، اما در روزهای چهارم و پنجم به علت این‌که تعداد سلول‌ها بسیار زیاد شده بود، تراکم بسیار زیاد سلولی به واسطه‌ی کاهش سطح در تمامی فلاسک‌ها قابل رویت بود؛ به همین دلیل تعداد زیادی از سلول‌ها از بستر جدا شده و به صورت گرد شده در محیط کشت مشاهده شد. اما در سلول‌های تیمار شده با دوز ۱۰ میکرومولار آترواستاتین، نسبت به سلول‌های کنترل از روز دوم به بعد سلول‌ها به طور دسته جمعی یا منفرد تحلیل رفتگی و واکیله شده و کاهش سیتوپلاسم و پیگمانه شدن را نشان دادند. این نتایج بیانگر اثر سایتوتوکسیسته آترواستاتین با غلظت ۱۰ میکرومولار بود. شکل ۱ نتایج تغییرات مورفولوژیکی سلول‌های نرمال و سرطانی را تحت تأثیر دوزهای مختلف دارو نشان می‌دهد. **نتایج تست MTT:** نتایج جذب نوری (OD) برحسب

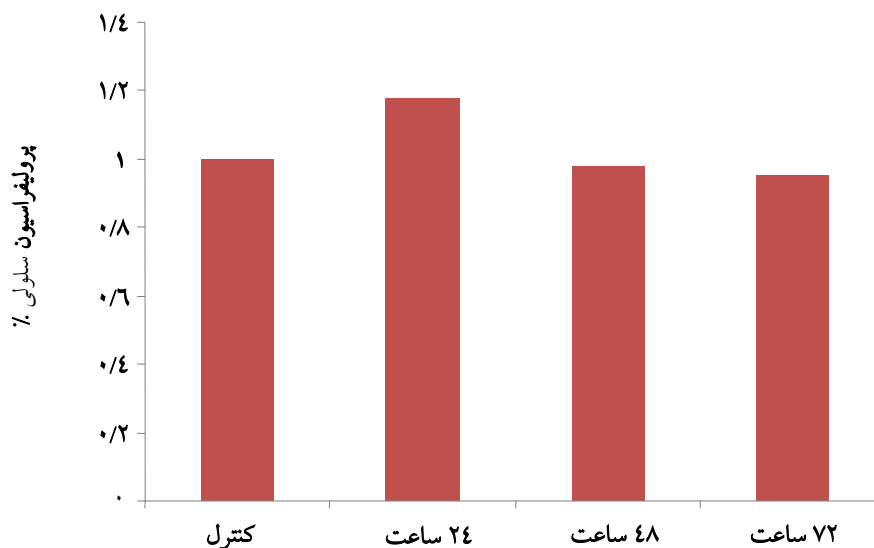


(الف)

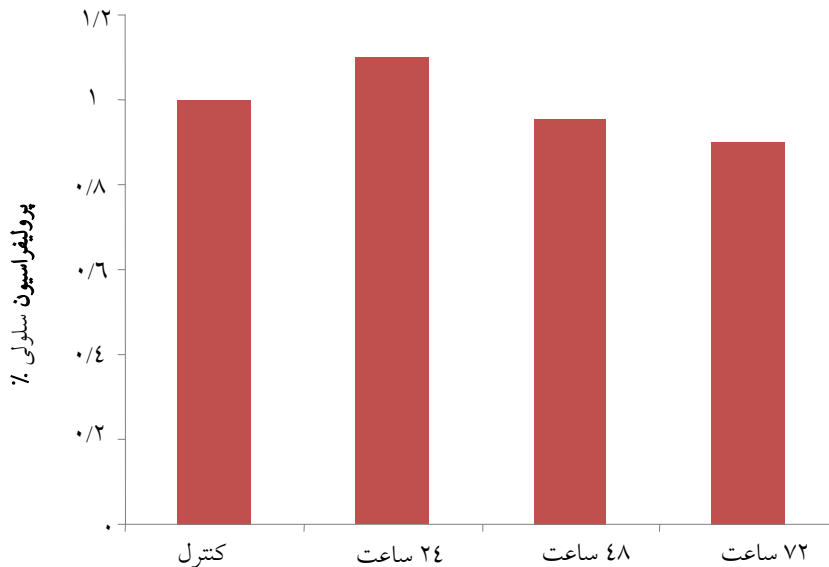


(ب)

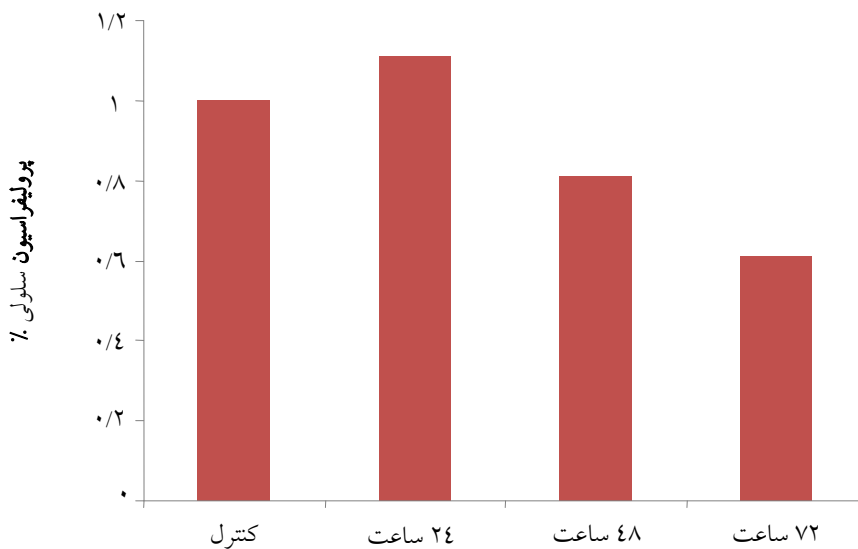
شکل ۱: مقایسه‌ی مورفولوژیکی نمونه‌های کنترل (الف)، و تیمار شده با دوز ۱۰ میکرومول آتورواستاتین (ب)، به ترتیب در زمان‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲، ۹۶ و ۱۲۰ ساعت پس از تیمار. سلول‌ها پس از تیمار با دارو به طور دسته جمعی یا منفرد تحلیل رفته، آکوتله شده و کوچک شدن سلول و بیگمانته شدن را نشان می‌دهند.



نمودار ۱: تأثیر داروی آتورواستاتین با غلظت ۰/۱ میکرومول بر سلول‌های سرطان پستان انسان (MCF-۷) پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت با روش *MTT assay*. تفاوت معنی‌داری در درصد بقای سلولی پس از گذشت زمان نسبت به گروه کنترل (سلول‌های تیمار نشده) مشاهده نمی‌شود.



نمودار ۲: تأثیر داروی آترواستاتین با غلظت ۱ میکرومول بر سلول‌های سرطان پستان انسان (MCF-7) پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت با روش *MTT assay*. تفاوت معنی‌داری در درصد بقای سلولی نسبت به گروه کنترل (سلول‌های تیمار نشده) مشاهده نمی‌شود.



نمودار ۳: تأثیر داروی آترواستاتین با غلظت ۱۰ میکرومول بر سلول‌های سرطان پستان انسان (MCF-7) پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت اثر مهارکنندگی دارو پس از ۴۸ و ۷۲ ساعت تفاوت معنی‌داری نسبت به کنترل نشان می‌دهد.

## بحث

سرطان پستان یکی از شایع‌ترین بدخیمی‌ها است که براساس گزارش در کشورهای آمریکا و اروپای غربی از هر نه زن یک نفر در طول زندگی خود به آن مبتلا می‌گردد (۱۷). با وجود انجام درمان‌های تهاجمی وسیع و تلاش‌های زیاد برای غربالگری مبتلایان به سرطان پستان، هنوز سرطان پستان دومین عامل مرگ ناشی از سرطان در کشورهای پیشرفته است. با توجه به گزارش کشوری ثبت موارد سرطانی، سرطان پستان رتبه‌ی اول را در بین زنان ایران داشته است (۴). امروزه این باور وجود دارد که می‌توان سرطان را توسط مجموعه‌ای از ترکیبات طبیعی یا مصنوعی مهار کرد (۱۸). مکانیسم‌ها و تغییر رفتارهای ژنی بسیاری برای تبدیل سلول‌های طبیعی به کارسینومایی مورد نیاز است که مطالعات مولکولی می‌تواند در شناسایی و ردیابی مسیر مولکولی آن در پیشرفت مهم باشد (۱۹). اکنون تلاش‌ها برای کشف و شناسایی عوامل ضد سرطانی جدید که موجب افزایش میزان حساسیت سلول‌های سرطانی گردند رو به افزایش است. مقاومت سلول‌های سرطانی نسبت به داروهای شیمیایی منجر به کاهش سطح پاسخ این سلول‌ها نسبت به دارو و در نتیجه شکست اقدامات درمانی می‌گردد. بنابراین، تحقیق و توسعه برای داروهای موثرتر و یا با اثرات جانبی کمتر بر آنژیوژنز تومور از اهمیت فزاینده‌ای برخوردار است (۲۰). از جمله مزایای بالقوه این نوع درمان، دسترسی آسان به اهداف داخل عروقی، عدم وجود مقاومت سلول توموری در مقایسه با شیمی درمانی مرسوم بر علیه سرطان و یا بیماری‌های وابسته به آنژیوژنز می‌باشد (۲۱). هدف از این تحقیق، مطالعه و ارزیابی اثرات ضد توموری و مهار رشد سلولی داروی آتوراستاتین بود. مطالعات بالینی متعددی که در سراسر جهان روی استاتین‌ها انجام شده محققان را بر آن داشته تا فواید متعددی را برای استفاده استاتین‌ها در بیماران سرطانی قایل شوند. به عبارت ساده‌تر، استاتین‌ها به دلیل

خاصیت ضدایمنی و جلوگیری از تکثیر سلولی خطر بروز سرطان را کاهش می‌دهند. البته این اثر هنوز مورد تایید جوامع علمی قرار نگرفته است (۷). استاتین‌ها ترکیباتی هستند که منجر به تکثیر، مهاجرت و تمایز سلول‌های آندوتلیال می‌شوند و همچنین باعث اشتقاق سلول‌های آنژیوبلاست از مغز استخوان با تحریک مسیر پروتئین کیناز سرین-ترئونین می‌شوند (۲۲). بر اساس گزارش وایز و همکاران، اثرات وابسته به دوز استاتین‌ها مستقل از تاثیر این ترکیبات بر میزان چربی خون است. آن‌ها بیان کردند تکثیر، مهاجرت و تمایز سلول‌های آندوتلیال در غلظت‌های پایین استاتین‌ها افزایش یافته اما به‌طور مشخصی، در غلظت‌های بالا کاهش می‌یابد. این محققین بیان کردند که اثرات ضد رگ‌زایی استاتین‌ها در غلظت بالا در ارتباط با کاهش ترشح VEGF از سلول‌های آندوتلیال و همچنین افزایش آپوپتوز در این سلول‌ها می‌باشد (۲۳). منتصری و همکاران در سال ۲۰۰۶ نیز گزارش کرده‌اند که داروی آتوراستاتین دارای تأثیرات وابسته به دوز دوگانه‌ای بر رشد بافت آندومتر انسانی در محیط کشت سه بعدی فیبرین می‌باشد، به‌طوری که این دارو در دوز پایین (۰/۱ میکرومولار) منجر به افزایش رشد بافت در مقایسه با گروه کنترل گردید، اما دوزهای بالاتر آتوراستاتین رشد را نسبت به گروه کنترل کاهش می‌دهد، که این کاهش رشد شامل کاهش تکثیر سلولی و کاهش میزان رگ‌زایی می‌باشد (۹). نتایج به‌دست آمده از بررسی اثر آتوراستاتین با غلظت‌های ۱۰ و ۱ و ۰/۱ میکرومول بر سلول‌های سرطانی پستان انسان، بیانگر اثر سایتوتوکسی‌سیته بیشتر آتوراستاتین با غلظت ۱۰ میکرومول بر این سلول‌ها در محیط *In Vitro* می‌باشد. نتایج به دست آمده از پژوهش حاضر در زمینه‌ی آتوراستاتین با غلظت بالا، ۱۰ میکرومول بر مهار رشد سلولی، با نتایج وایز و منتصری مشابه است. در این مطالعه، سلول‌های سرطان پستان انسان بررسی شدند، در مطالعه‌ی منتصری اثرات

همکاران بیان کردند که استاتین‌ها قادر به کاهش تکثیر سلول‌های آندوتلیال و مهاجرت آن‌ها می‌باشند (۲۹). بنابراین با توجه به یافته‌های این پژوهش می‌توان به‌کارگیری دوز بالای آترواستاتین را در مهار رشد سلول‌های سرطان پستان انسان (MCFV) به عنوان یک روش مکمل در جلوگیری از رشد و متاستاز سلول‌های توموری پیشنهاد نمود.

### نتیجه‌گیری

با توجه به اثر مهارکننده‌ی دوز بالای آترواستاتین (۱۰ میکرومول)، بر رشد سلول‌های سرطان پستان، پیشنهاد می‌شود تحقیق بر روی کاربرد کلینیکی آترواستاتین با دوز بالا در جهت جلوگیری از رشد و متاستاز سلول‌های توموری به صورت *In Vivo* دستمایه‌ی پژوهش‌های بعدی قرار گیرد.

### تقدیر و تشکر

با تشکر از مدیر محترم گروه زیست‌شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد و سپاس از جناب آقای دکتر جلیل توکل افشار رئیس بخش ایمنونژنتیک پژوهشکده‌ی بوعلی مشهد و همکاری سرکار خانم آرزو شجیعی و قدردانی از شرکت داروسازی تهران شیمی که در اجرای این پژوهش همکاری صمیمانه را داشته‌اند.

آترواستاتین بر بافت آندومتر انسان در محیط سه بعدی فیبرینی مورد بررسی قرار گرفته است. مکانیسم پیشنهادی مهار رشد سلولی آترواستاتین با غلظت بالای ۱۰ میکرومول را می‌توان با نتایج پژوهش لوفز و همکاران سازگار دانست، این پژوهشگران گزارش کردند که دوزهای بالای استاتین‌ها پرنیلاسیون پروتئین را کاهش داده و باعث مهار رشد سلولی می‌شوند (۶). در حقیقت استاتین‌ها با مهار مسیر مولونات ضمن مهار تولید برخی پروتئین‌های پرنیله‌کننده که در مکانیسم‌های پاتولوژیک دخیل هستند، از تولید بعضی از عوامل مفیدی و محافظتی مثل یوبی‌کینون کوآنزیم A که در غشای میتوکندری‌ها یافت می‌شود و نقش اصلی را در تولید انرژی دارد، جلوگیری می‌کند (۲۴). اسید موالونیک به‌عنوان محصول آنزیم ۳- هیدروکسی ۳- متیل گلووتاریل کوآنزیم A ردوکتاز (HMG-COA) منشا بسیاری از ایزو پرونوئیدهایی است که به غیر از سنتز کلسترول نقش مهمی در وقایع داخل سلولی از قبیل آپوپتوزیس، التهاب، مهاجرت و چسبندگی لوکوسیت‌ها و انعقاد دارند (۲۷-۲۵). اسفندیاری و همکاران در طی مطالعه‌ی مشابهی غلظت‌های ۱ و ۵ و ۱۰ میکرومول داروی لووستاتین را بر کشت بافت آندومتر انسانی نشان دادند. آن‌ها بیان کردند که داروی لووستاتین دارای اثرات مهارکننده بر رشد بافت آندومتر است و هیچ‌گونه اثر دوگانه دیگری ندارد (۲۸). وینسنت و

### References

- 1- Spencer JW, Jacobs JJ. Complementary and alternative medicines: an evidence based approach: Mosby, St Levis, Missouri; 1999.
2. Boon H, Olaunde F, Zick SM. Trends in complementary alternative medicine used by breast cancer survivors: comparing survey data

- from 1998 to 2005. BMC women's Health. 2007; 7: 4-11.
- 3- World Health Organization. Cancer, Fact Sheet; Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/index.html>.
  - 4- Damjanove I, Linder J. Anderson Pathology, 10th ed, New York; Mosby. 1996: 23-65.



- 5- Parsa N. Molecular basis of human cancer. Applied Biology International Congress, 1-2 Sep. 2011, Mashhad-Iran. [Abstract]; page: 4.
- 6- Laufs U. Beyond lipid-lowering: effects of statins on endothelial nitric oxide. *Eur J Clin Pharmacol.* 2003; 58: 719-31.
- 7- Harst PV, Voors A, Gilst W, Bohm M, Veldhuis D. Statins in the treatment of chronic heart failure: a systematic review. *Plos Med.* 2006; 3:333.
- 8- Wierzbicki AS. Atorvastatin. *Expert Opin Pharmacother.* 2001; 2: 819-30.
- 9- Montaseri A, Khazaie M, Ghorbani R, Rezaei M. Evaluating the effects of atorvastatin on cultured human endometrium in a three-dimensional Fibrin Matrix. *J Reprod Fertil.* 2007; 7: 366-358.
- 10- Shokrgozar M, Zali H, Rezaei-Tavirani M, Amanzadeh A. Comparison of two staining assays trypan blue and MTT in vitro evaluation of human calprotectin proliferation inhibition on human gastric cancer cells. *Kowsar Med J.* 2007; 12: 127-137.
- 11- Buttke TM, McCubrey JA, Owen TC. Use of anaqueous soluble tetrazolium/formazan assay to measure viability and proliferation of lymphokine dependent cell lines. *J Immunol Meth.* 1993; 157: 233-40.
- 12- Weichert H, Blechschmidt I, Schroder S, Ambrosius H. The MTT-assay as a rapid test for cell proliferation and cell killing: application to human peripheral blood lymphocytes (PBL). *Allerg Immunol (Leipz).* 1991; 37: 139-144.
- 13- Rapport L, Robinson C. Cell Titer 96 and titer 96 AG, non radioactive cell proliferation assay. *Promega Notes Magazine.* 1993; 44: 46-47.
- 14- Goodwin CJ, Holt SJ, Downes S, Marshall NJ. Micro culture tetrazolium assays: a comparison between two new tetrazolium salts, XTT and MTT. *J Immune Methods.* 1995; 179: 95-103.
- 15- Shahrokhadi Kh, Tavakkolafshari J, Rakhshandeh H, Brook A. Study of cytotoxicity effect of total Saffron's extract on HepG2 cell line. *Tehran Azad univ Med Sci J.* 2009; 19: 153-159.
- 16- Clynes M. Animal cell culture techniques. Berlin; New York: Springer, 1998.
- 17- Cotran RS, Kumar V, Collins T. Robbins pathologic basis of disease, 6th ed, W. B. Saunders Company, Philadelphia. 1999; 11: 301.
- 18- Abdullaev FI. Inhibitory effect of crocetin on intracellular nucleic acid and protein synthesis in malignant cell. *Toxicol Lett.* 1994; 70: 243-251.
- 19- Fakhraei M, Nejaty V, Dalirazh N. Vanadium compounds mediated apoptosis and cell cycle arrest in K562 cell line. *J Zanjan Univ Med Sci.* 2011; 20: 23-35.
- 20- Kummalue T. Molecular mechanism of herbs in human lung cancer cells. *J Med Assoc Thai.* 2005; 88: 1725-34.
- 21- Boehm T, Folkman J, Browder T, O'Reilly MS. Antiangiogenic therapy of spermental

cancer does not induce acquired drug resistance. *Nature*. 1997; 390: 404-7.

22- Llevadot J, Asahara T. Effect of statins on angiogenesis and vasculogenesis. *Rev Esp Cardiol*. 2002; 55: 838-44.

23- Weis M, Heeschen C, Glassford A, Cooke J. Stains have biphasic effects on angiogenesis. *Circulation*. 2002; 105: 739-45.

24- Baharara J, Ashraf AR, Balanejad S, Samareh-Mosavi S. The inhibitory effect of low frequency electromagnetic field (50HZ) on angiogenesis in chorioalntoic membrane of chick. Zahedan. *J Res Med sci*. 2010; 12: 12-8.

25- Smith G, Davidson R, Bloor S. Pharmacological properties of ZD4522 a new HMG-CoA reductase inhibitor. Presented at the International Symposium on Atherosclerosis, Stockholm. June 25-29, 2008.

26- Arnaud C, Braunersreuther V, Mach F. Toward immune modulator and anti

inflammatory properties of stains. *Trends Cardiovasc Med*. 2005; 15: 202-6.

27- Coward WR, Marei A, Yang A, Vesa-Nicotera MM, Chow SC. Statin-induced pro inflammatory response in mitogen activated peripheral blood mononuclear cells through the activation of caspase-1 and IL-18 secretion in monocytes. *J Immunol*. 2006; 176: 5284-92.

28- Esfandiari N, Khazaei M, Ai J, Bielecki R, Gotlieb L, Ryan E, Casper R. Effect of stain on an in vitro model of endometriosis. *Fertil Steril*. 2006; 87: 257-62.

29- Vincent L, Chen W, Hong L. Inhibition of endothelial cell migration by cerivastatin, and HMGCoA reductase inhibitor: contribution to its anti-antigenic effect. *FEBS Lett*. 2001; 495: 159-66.

## The Effect of Atorvastatin on Progress and Proliferation of MCF7 Breast Cancer Cell Line

Shahrokhhabadi KH<sup>1</sup>, Baharara J<sup>1</sup>, Zafar Balanejad S<sup>1</sup>, Hesami Z<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dept. of Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran.

**Corresponding Author:** Shahrokhhabadi KH, Dept. of Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran.

**E-mail:** Shahrokhhabady@yahoo.com

**Received:** 27 Dec 2012    **Accepted:** 15 Jul 2013

---

**Background and Objective:** Due to progressive increase in the number of cases of cancer, there is a need to develop anti-tumor compounds. Statins have a variety of different effects on proliferation, migration and survival of cells and have been suggested as proper candidates for the inhibition of this disease. The aim of this study was to determine cytotoxicity effects of Atorvastatin with variety of concentrations on the growth of MCF7 cell line.

**Materials and Methods:** MCF7 cell lines were incubated in RPMI 1640 medium supplemented with 10% FBS in a humidified incubator (37 °C & 5% CO<sub>2</sub>). Different concentrations of Atorvastatin on quantitative proliferation of the cell line were determined by Dimethyl Thiazol Tetrazolium bromide (MTT) colorimetric assay and Trypan blue. The data were analyzed by SPSS version 11.5. The statistical analysis was performed by one-way ANOVA and Tukey's tests.

**Results:** There was no statistical significance in cytotoxicity effect of 1 μmol and 0.1 μmol of Atorvastatin on survival of MCF7 cells after 24, 48 and 72 hrs comparing to control cells. But in 10 μmol concentration of Atorvastatin, a significant decrease was observed in survival of MCF7 cells at the mentioned time points.

**Conclusion:** Different concentrations of Atorvastatin have different effects on the growth of cultured cell lines. It seems that 10 μmol concentration decreases growth of cultured human breast cancer cells. Further animal studies on this subject are suggested.

**Keywords:** Atorvastatin, MCF7, MTT assay, Tumor cell