Archive of SID

ارزیابی اثر سمیت سلولی عصارهٔ گیاه ریواس بر سلول‌های سرطان سینهٔ ردهٔ MCF-7 و آنالیز بیان ژن ODC1

زینب نوری[1]، اکبرصفی پورافشار*[2]

۱. کارشناسی ارشد مهندسی بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه پیام نور تهران شرق، تهران، ایران
۲. استادیار، دکترای تخصصی زیست‌شناسی سلولی ـ تکوینی، گروه زیست‌شناسی، واحد نیشابور، دانشگاه آزاد اسلامی، نیشابور، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۲/۲۴
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۴/۳۱

چکیده

زمینه از ویژگی‌های سلول‌های سرطانی که آن‌ها را از سلول‌های طبیعی بدن متمایز می‌کند، افزایش میزان آنزیم اورنیتین دکربوکسیلاز (ODC1) است که اثر بسیار مهمی در متابولیسم پلی‌آمین‌ها در سلول‌های سرطانی دارد. در این پژوهش، اثرات سمیت سلولی عصاره‌های آبی، اتانولی و ان هگزانی گیاه ریواس بر سلول‌های سرطانی ردهٔ MCF-7 بررسی شد. همچنین میزان بیان ژن اورنیتین دکربوکسیلاز، به‌عنوان یکی از ژن‌های درگیر در سرطان پستان، تحت تأثیر عصارهٔ این گیاه مطالعه شد.

روش کار سلول‌های سرطان پستان ردهٔ MCF-7 در محیط DMEM کشت شدند. سپس تحت تیمار غلظت‌های افزایشی عصاره از صفر تا ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر قرار گرفتند. فعالیت سایتوتوکسیک عصاره با استفاده از سنجش MTT بررسی شد. آنالیز کمّی بیان ژن ODC1 با استفاده از تکنیک Real Time-PC صورت پذیرفت.

یافته‌ها با افزایش غلظت، تأثیر عصاره بر سلول‌ها به‌طور معناداری افزایش یافت و افزایش فراوانی در مرگ‌ومیر سلول‌ها دیده شد. در هر سه عصارهٔ ریواس، بیشترین سمیت سلولی در ۷۲ ساعت مشاهده گردید. تغییرات بیان ژن ODC1 در لاین سلولی MCF-7 تیمارشده با غلظت‌های مختلف عصارهٔ ریواس، نشانگر کاهش بیان ژن با افزایش غلظت عصاره‌هاست.

نتیجه‌گیری نتایج نشان می‌دهد عصارهٔ گیاه ریواس بر بیان ژن ODC1 در سلول‌های سرطانی پستان انسان اثر بالقوه‌ای دارد و باعث مهار رشد سلول‌های سرطانی می‌شود.

کلیدواژه‌ها:
ریواس، ضدسرطان، سایتوتوکسیک، اورنیتین دکربوکسیلاز.

۱. مقدمه

طبق آمار منتشرشده از سوی وزارت بهداشت و درمان، درحال حاضر سرطان پستان شایع‌ترین سرطان در میان زنان کشور به‌شمار می‌رود و دومین سرطان کُشنده بعد از سرطان ریه است [۱]. براساس نتایج تحقیقات به‌دست‌آمده، از هر هشت زن ایرانی، یک نفر احتمال ابتلا به سرطان پستان را داراست و حدود یک‌چهارم کل سرطان‌های زنان در کشور مربوط به این نوع سرطان می‌شود [۲]. از ویژگی‌های سلول‌های سرطانی که آن‌ها را از سلول‌های طبیعی بدن متمایز می‌کند، افزایش میزان آنزیم اورنیتین دکربوکسیلاز (ODC1) است که اثر بسیار مهمی در متابولیسم پلی‌آمین‌ها در سلول‌های سرطانی دارد [۳]. آنزیم ODC در اولین مرحلهٔ سنتز پلی‌آمین‌ها نقش دارد و در رشد سلول و سنتز DNA بسیار تأثیرگذار است. نبود این آنزیم باعث آپوپتوز سلولی می‌شود؛ ولی در سلول‌های سرطانی فعالیت این آنزیم به‌صورت غیرعادی

* نویسندهٔ مسئول: اکبرصفی پورافشار
نشانی: نیشابور، دانشگاه آزاد اسلامی نیشابور، دانشکدهٔ علوم پایه، گروه زیست‌شناسی

تلفن: ۴۲۶۱۳۹۰۵-۰۵۱
رایانه: asafshar@iau-neyshabur.ac.ir
شناسه ORCID: 0000-0002-1566-9140
شناسه ORCID نویسندهٔ اول: 0000-0002-3720-8484

مجلهٔ علمی ـ پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی سبزوار، دورهٔ ۲۶، شمارهٔ ۴، مهر و آبان ۱۳۹۸، ص ۵۲۶-۵۳۴
آدرس سایت: http://jsums.medsab.ac.ir رایانامه: journal@medsab.ac.ir
شاپای چاپی: ۷۴۸۷-۱۶۰۶

www.SID.ir

Archive of SID

افزایش می‌یابد. تاکنون نتایج مختلفی از عملکرد این آنزیم در سرطان پستان به‌دست آمده که تقریباً همگی نشانگر نقش آن در پیشرفت سرطان است [۴]. به‌هم خوردن تنظیمات مولکولی ژن این آنزیم باعث تغییر در الگوهای بیان و بیان بیش از حد آن در سلول‌های سرطانی می‌شود. مطالعات نشان داده است که کاهش در میزان و فعالیت این آنزیم سبب کاهش رشد سلول‌های سرطانی می‌شود [۵]. جهت کاهش فعالیت سلول‌های سرطانی، داروهای متعدد شیمیایی استفاده می‌شود که معمولاً کارا نبوده و دارای عوارض جانبی متعددی هستند. استفاده از عصارهٔ گیاهان دارویی جهت درمان سرطان‌ها، به‌ویژه سرطان پستان، علاوه‌بر کاهش اثرات جانبی داروهای سنتتیک، می‌تواند منبع دردسترس و ارزان برای بیماران مبتلا باشد.

ریواس[1] از گیاهان دارویی خانوادهٔ پلی‌گوناسه است که در ایران و کشورهای اطراف همچون ترکیه، پاکستان و هند رویش دارد. مطالعات متعددی درمورد فعالیت بیولوژیکی عصارهٔ این گیاه انجام شده است [۶ـ۸]. برای عصاره‌های این گیاه خواص آنتی‌باکتریایی [۹] و آنتی‌اکسیدانی [۱۰] گزارش شده است. به‌علاوه پژوهش‌های پراکنده‌ای دربارهٔ اثرات ضدتکثیری و ضدسرطانی این گیاه صورت گرفته است که می‌توان به مطالعهٔ تارتیک و همکاران [۱۱] اشاره کرد که اثر سمیت سلولی عصارهٔ اتانولی این گیاه را بر سلول‌های PC3 بررسی کردند. همچنین در مطالعه‌ای دیگر اسماعیل‌بیگ و همکاران [۱۲] اثر آپوپتیک عصارهٔ متانولی این گیاه به‌همراه ۹ گیاه دیگر را بر رده‌های سلولی HeLa، Fen و K562 ارزیابی کردند.

با توجه به اثرات دارویی ذکرشده برای گیاه ریواس، در این پژوهش سعی براین است تا اثرات سمیت سلولی عصارهٔ ریواس بر ردهٔ سرطانی MCF-7 بررسی شود. همچنین میزان بیان ژن اورنیتین دکربوکسیلاز، به‌عنوان یکی از ژن‌های درگیر در سرطان پستان، تحت تأثیر عصارهٔ این گیاه مطالعه می‌شود.

۲. مواد و روش‌ها

۲,۱. تهیهٔ عصارهٔ گیاهی

گیاه ریواس از ارتفاعات منطقهٔ بینالود در شهرستان نیشابور تهیه شد. عصارهٔ این گیاه به کمک دستگاه سوکسله در سه حلال مختلف شامل اتانول، ان هگزان و آب مقطر تهیه گردید. ابتدا ساقهٔ ریواس پودر و سپس آسیاب شد؛ در ادامه با استفاده از روش سوکسله به مدت ۴ ساعت عصاره‌گیری انجام شد. پس از آن، حلال‌ها توسط دستگاه روتاری حذف شدند و عصاره‌های غلیظ‌شده در دمای اتاق خشک شدند. از غلظت‌های صفر، ۱۰، ۲۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر عصاره‌ها در این پژوهش استفاده گردید. برای غلظت صفر، آب مقطر دیونیزه به‌کار گرفته شد.

۲,۲. کشت سلولی

در این پژوهش، از ردهٔ سلولی سرطان پستان MCF-7 استفاده شد. سلول‌های MCF-7 از پژوهشکدهٔ بوعلی دانشگاه علوم پزشکی مشهد تهیه گردید. برای کشت سلول‌ها از محیط DMEMبه‌همراه ۱۰٪ FBS (سرم جنین گاوی) استفاده شد. سلول‌ها در فلاسک ۲۵ سانتی‌متر مربع در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با ۵٪ دی‌اکسیدکربن و ۹۵٪ رطوبت کشت داده شدند.

۲,۳. سنجش سمیت سلولی

برای تعیین درصد فراوانی سلول‌های زنده و فعالیت سایتوتوکسیسیتی عصاره از روش سنجش MTT استفاده شد. بدین منظور پلیت‌های ۹۶خانه‌ای حاوی سلول‌های تیمارشده همراه با رنگ (دی متیل تیازول ـــ۲ و ۵ دی فنیل تترازولیوم برماید) به مدت ۴ ساعت انکوبه شدند. بعد از گذشت ۴ ساعت، مایع رویی دور ریخته شد. کریستال‌های نامحلول آبی‌رنگ فورمازان در ۲۰۰ میکرولیتر محلول DMSO حل شد و در دستگاه الایزا ریدر (Awareness, Palm City, FL, USA) در طول موج ۵۴۰ نانومتر مورد ارزیابی قرار گرفت. این تست برای هر غلظت ۳ بار تکرار شد. به‌منظور تعیین درصد سلول‌های زنده در هر غلظت عصاره، میانگین جذب‌های نوری سلول‌های تیمارشده با غلظت مورد نظر از عصاره بر میانگین جذب‌های نوری محلول معادل DMSO تقسیم و درنهایت عدد حاصل در ۱۰۰ ضرب شد. غلظت مؤثر عصارهٔ دارای سمیت سلولی، با کمیتی به‌نام IC_{50} گزارش شد که نشان‌دهندهٔ غلظتی است که در آن نیمی از سلول‌ها زنده هستند. برای محاسبهٔ IC_{50} از نرم‌افزار Prism5.0 استفاده شد.

۲,۴. اندازه‌گیری بیان نسبی ژن ODC1

بدین منظور پس از کشت سلول‌ها، غلظت‌های غیرکُشندهٔ عصاره‌های اتانولی و آبی در ۳ تکرار افزوده شد و سلول‌ها به مدت ۴۸ ساعت درون انکوباتور قرار داده شدند و سپس جهت استخراج RNA مورد استفاده قرار گرفتند و پس از آن سنتز cDNA صورت پذیرفت.

1. rheum Ribes

www.SID.ir

Archive of SID

بررسی کمّی بیان ژن ODC1 به‌روش Real Time SYBER Green PCR با استفاده از دستگاه ABI Step-One (Applied Biosystems) انجام شد. جهت طراحی آغازگرهای ویژهٔ ژن اورنیتین دکربوکسیلاز (ODC1) از توالی مربوط به mRNA این ژن استفاده شد که در پایگاه اطلاعاتی NCBI با شمارهٔ دسترسی NM-002539.2 موجود است. سنتز آغازگرهای طراحی‌شده به‌وسیلهٔ نرم‌افزار Oligo 7.5 توسط شرکت ندای فن راه انجام شد (جدول ۱).

جدول ۱. خصوصیات پرایمرهای طراحی‌شده برای ژن‌های ODC1 و ACTB

نام آغازگر	توالی ´3 - ´5	طول نوکلئوتیدی	دمای ذوب (Tm)	GC%	طول قطعهٔ تکثیر شده	Self complementarity	Self 3' complementarity
ODC1-FW	GTGGGTGATTGGATGCTCTTTG	۲۲	۵۹/۸۳	۵۰	۱۰۸	۲	۰
ODC1-RV	ACCAGGCTAACTACTCGCTCAA	۲۲	۵۹/۰۳	۵۰		۵	۱
ACT-FW	TCCATCATGAAGTGTGACGT	۲۰	۵۶/۸۷	۴۵	۱۵۴	۶	۴
ACT-RV	GAGCAATGATCTTGATCTTCAT	۲۲	۵۴/۳۲	۳۶/۳۶		۸	۴

برای انجام واکنش‌های qRT-PCR، از cDNA ساخته‌شده به‌عنوان الگو با پرایمرهای اختصاصی طراحی‌شده برای ژن‌ها استفاده شد. برای کنترل داخلی ژن بتا اکتین به‌کار رفت. مخلوط واکنش شامل ۱۰ میکرولیتر SYBER Green PCR Master Mix (ABI)، ۰/۴ میکرولیتر Forward primer، ۰/۴ میکرولیتر Reverse primer، ۶/۲ میکرولیترH2O و ۳ میکرولیتر cDNA است. شرایط چرخهٔ دمایی و زمانی شامل دمای واسرشتگی اولیه ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه، سپس برای ۴۰ چرخه، دمای واسرشتگی ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه و در انتها اتصال پرایمر و طویل شدن در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه انجام شد. با استفاده از روش $\Delta\Delta C_T$ داده‌های حاصل از دستگاه Real-time PCR آنالیز شد.

۲,۵. آنالیز آماری

برای تجزیهٔ واریانس داده‌های مربوط به اثرات سمیت سلولی از نرم‌افزار SAS نسخهٔ ۹/۱ استفاده شد. Ctهای مربوط به واکنش qRT-PCR از نرم‌افزار دستگاه Real-time PCR استخراج شد و پس از محاسبهٔ پارامترهای مربوط، آنالیزهای آماری صورت گرفت. برای رسم نمودارها از نرم‌افزار Excel استفاده شد.

۳. نتایج

۳,۱. بررسی سمیت سلولی عصاره‌های ریواس

نتایج حاکی از آن است که عصارهٔ ریواس با غلظت‌های به‌کاررفته دارای اثرات سمیت سلولی است. نتایج سمیت سلولی نشان داد عصارهٔ ان هگزان و اتانولی با افزایش غلظت و افزایش زمان، سمیت سلولی بیشتری از عصارهٔ آبی را نمایان ساخت (شکل ۱).

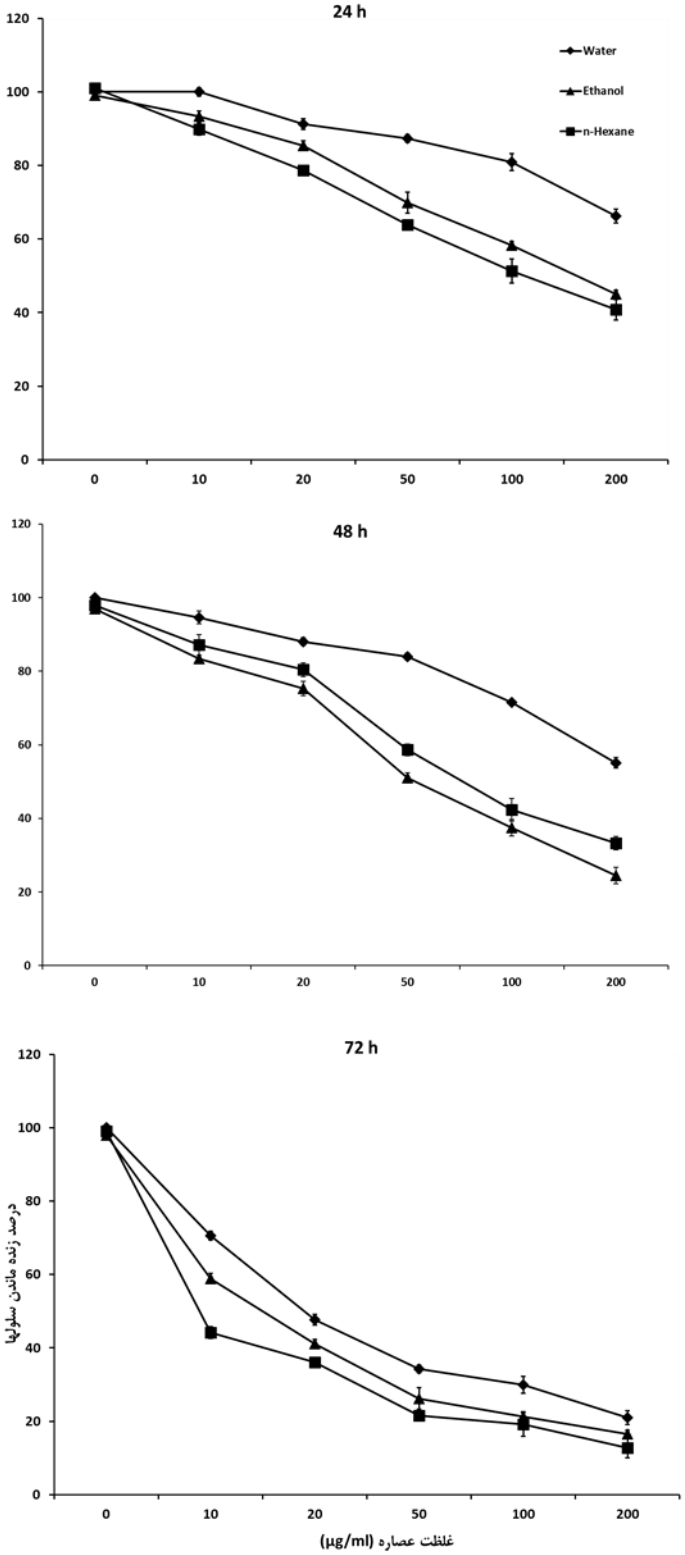
عصاره‌های این گیاه دارای اثر سمیت سلولی مؤثر بر سلول‌های سرطانی بوده و غلظتی از عصاره‌ها که باعث کاهش بیش از ۵۰٪ میزان بقای سلول‌ها می‌شوند، به‌عنوان IC_{50} درنظر گرفته شد (جدول ۲).

جدول ۲. مقادیر IC_{50} برحسب میکروگرم در میلی‌لیتر برای عصاره‌های مختلف ریواس در ردهٔ سلولی MCF-7

نوع عصاره	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت
اتانولی	۲۰۰<	۹۰	۱۵/۶
هگزان	۱۸۷	۷۶/۳۸	۹/۳۹
آبی	۲۰۰<	۱۰۸/۸	۲۷/۳

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۱. اثر غلظت‌های مختلف عصارهٔ ریواس بر درصد زنده‌مانی سلول‌های ردهٔ سلولی MCF-7

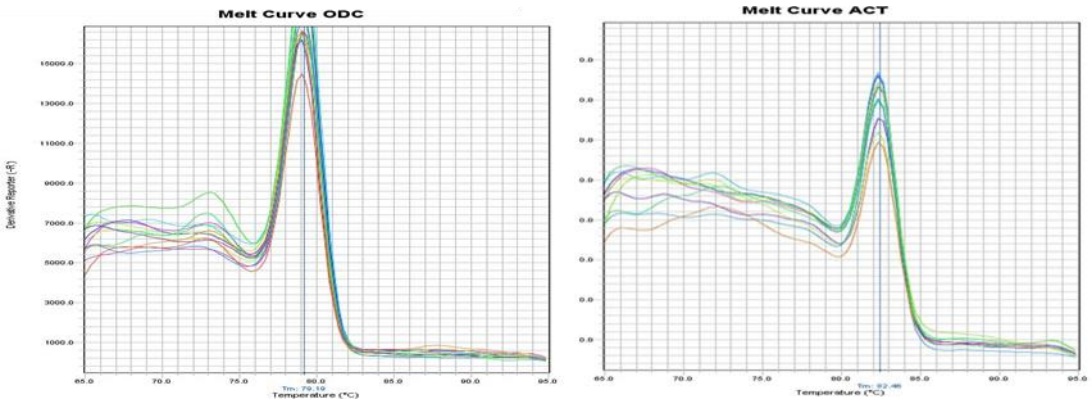
داده‌ها میانگین ۳ بار تکرار در هر غلظت هستند.

www.SID.ir

Archive of SID

۳،۲. اثر عصارهٔ ریواس بر میزان بیان نسبی ژن ODC1

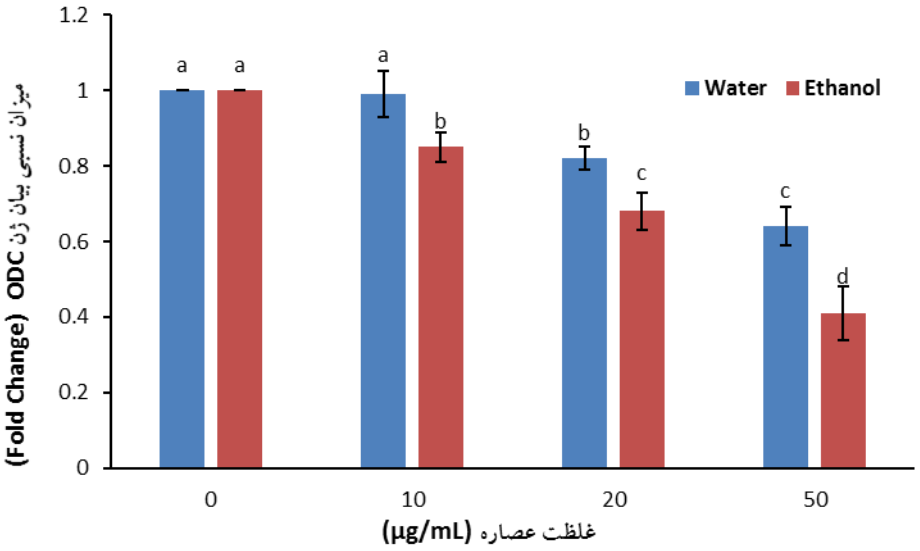
نمودارهای منحنی ذوب (شکل ۲) حاصل از واکنش qRT-PCR نشان‌دهندهٔ وجود یک پیک و عدم حضور پیک‌های اضافی بیانگر تکثیر اختصاصی قطعات مورد نظر و نمودار بازده مناسب واکنش PCR است.



شکل ۲. منحنی ذوب محصولات Real-Time PCR برای ژن‌های ACTB و ODC1

نقطهٔ ذوب تمام نمونه‌ها برای ژن ACTB حدود ۸۲ درجه سانتی‌گراد و برای ژن ODC1 حدود ۷۹ درجه سانتی‌گراد است که تکثیر اختصاصی ژن‌های مورد نظر را آشکار می‌کند.

تغییرات بیان ژن ODC1 در لاین سلولی MCF-7 تیمارشده با غلظت‌های مختلف عصارهٔ ریواس نسبت به شاهد نشانگر کاهش بیان ژن با افزایش غلظت عصاره‌هاست. عصارهٔ اتانولی در مقایسه با عصارهٔ آبی تأثیر بیشتری بر بیان ژن ODC1 داشت؛ به‌طوری که در غلظت ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر عصارهٔ اتانولی سبب کاهش ۲/۵برابری و عصارهٔ آبی باعث کاهش تنها ۱/۶برابری میزان بیان ژن ODC1 شد (شکل ۳).



شکل ۳. مقایسهٔ تغییرات بیان ژن ODC1 در ردهٔ سلولی تیمارشده با غلظت‌های مختلف عصارهٔ ریواس

میانگین‌ها حاصل ۳ تکرار و حروف غیرمشترک نشانهٔ اختلاف معنادار در سطح ۵٪ براساس آزمون دانکن است. بارها نشان‌دهندهٔ خطای استاندارد هستند.

۴. بحث و نتیجه‌گیری

نتایج به‌دست‌آمده در پژوهش حاضر مشخص کرد که عصاره‌های ریواس بر سلول‌های سرطان پستان ردهٔ MCF-7 دارای اثر سمیت سلولی به‌روش وابسته به دوز و زمان هستند. مطالعات متعدد دیگر به فعالیت زیستی و ضدتکثیری عصاره‌های گیاه ریواس پرداخته‌اند؛ برای مثال در پژوهش تارتیک و همکاران

www.SID.ir

Archive of SID

[۱۱] بررسی فعالیت بیولوژیکی عصارهٔ اتانولی ریشهٔ گیاه ریواس در سلول‌های سرطانی PC3 و HUVEC نشان داد که سلول-ها به‌صورت وابسته به دوز و زمان در مقایسه با سلول‌های کنترل تحت تأثیر قرار می‌گیرد و پایداری آن‌ها کاهش می‌یابد. همچنین مطالعهٔ شیزاده و همکاران [۱۳] که سمیت و خواص آپوپتوز عصاره‌های اتیل استات، ان هگزان و آب گونه دیگری از این گیاه (Rheum turkestanicum) را روی سلول‌های سرطانی MCF-7، Hela و لنفوسیت‌های خون بررسی کردند، نشان داد که عصارهٔ ان هگزان و اتیل استات در دوز و زمان مناسب باعث کاهش سلول‌های سرطانی بدخیم می‌شود. به‌علاوه تحقیقات یوار و همکاران [۱۴] نشان داد که عصارهٔ ریشهٔ اتیل استات ریواس دارای خواص آنتی‌اکسیدان است. با توجه به نتایج، ریواس می‌تواند به‌عنوان آنتی‌اکسیدان و ضدسرطان درنظر گرفته شود.

از بین سه عصارهٔ بررسی‌شده در این تحقیق، عصارهٔ ان هگزان بیشترین اثر سمیت سلولی را نشان داد. با توجه به قطبیت پایین ان هگزان توانایی استخراج مولکول‌های با قطبیت کم را دارد که معمولاً بهتر از غشای سلول‌ها عبور می‌کند و سمیت سلولی بیشتری دارد [۱۶].

افزایش میزان آنزیم اورنیتین دکربوکسیلاز (ODC) اثر بسیار مهمی در متابولیسم پلی‌آمین‌ها در سلول‌های سرطانی دارد. پلی‌آمین‌ها مولکول‌های فراگیری هستند که در سلول‌های یوکاریوت‌ها پیدا می‌شوند. پلی‌آمین‌ها در رشد، بقا و تمایز سلول نقش اساسی دارند [۱۷]. بنابراین شناسایی آن‌ها و مسیرهای سنتزشان در شناخت بیولوژی سلول مهم خواهد بود و درنهایت هدف مناسبی برای کنترل رشد سلول شناخته می‌شود. مطالعات مختلفی نشان داده است که آنزیم اورنیتین دکربوکسیلاز می‌تواند هدف مناسبی برای شیمی‌درمانی قرار گیرد. براساس تحقیقات انجام‌شده، کاهش در میزان و فعالیت این آنزیم باعث کاهش رشد سلول‌های سرطانی می‌شود [۱۸]. امروزه در تحقیقات ضدسرطان استفاده از ترکیبات با منشأ گیاهی یا عصاره‌های گیاهی مورد توجه بوده؛ ضمن اینکه کاهش پلی‌آمین‌ها و اورنیتین دکربوکسیلاز بیشتر در معرض توجه قرار دارد. در پژوهش گریمینجر و همکاران [۱۹] میزان mRNA ژن ODC1 در بافت‌های سرطانی و غیرسرطانی ریه مقایسه و مشخص شد میزان mRNA این ژن در بافت‌های سرطانی به‌طور چشمگیری بیشتر از بافت‌های غیرسرطانی است. در تحقیق شارما و همکاران [۲۰] استفاده از عصارهٔ گیاه ختمی چینی[۱] در بافت سرطانی موش از پیشرفت سرطان جلوگیری کرد و میزان فعالیت آنزیم اورنیتین دکربوکسیلاز در مقایسه با گروه کنترل کاهش یافت. در پژوهشی دیگر، عصارهٔ میوهٔ انگور به موش‌های مبتلا به سرطان سینه (که سلول‌های MDA-MB-231 انسانی نیز به بافت سینهٔ آن‌ها ترنسپلنت شده بود) به مدت ۳۳ روز خورانده شد. پس از آن میزان بیان چندین ژن ازجمله ODC1 اندازه‌گیری شد. نتایج کاهش ۳/۳۶برابری بیان این ژن را در موش‌های تیمارشده در مقایسه با گروه کنترل نشان داد [۲۱].

در این پژوهش، با بررسی نتایج سمیت سلولی عصاره‌ها، از بین سه عصارهٔ مورد مطالعه دو عصارهٔ آبی و اتانولی که سمیت سلولی متعادلی داشتند، برای مطالعهٔ بیان ژن به‌کار گرفته شدند. همچنین از غلظت‌های کمتر از IC_{50} استفاده شد. نتایج نشان داد که عصاره‌های این گیاه سبب کاهش بیان این ژن، در سلول‌های سرطانی، به‌روش وابسته به دوز و زمان شده‌اند. کاهش بیان ژن اورنیتین دکربوکسیلاز و درنتیجه پایین آمدن غلظت پلی‌آمین‌ها می‌تواند بر تکثیر سلول‌های سرطانی تأثیر بگذارد و عامل کاهش درصد زنده‌مانی سلول‌های MCF-7 در این تحقیق باشد.

در نتیجه‌گیری این پژوهش باید گفت در گیاه ریواس، ترکیباتی هست که خاصیت ضدسرطانی دارد و ترکیبات فنلی مهم‌ترین آن‌هاست. با استفاده از حلال‌ها می‌توان این ترکیبات را استخراج کرد. سمیت سلولی که در این پژوهش مشاهده شد، نشان‌دهندهٔ وجود مواد ضدسرطانی در ترکیبات ریواس است. شناخت مکانیسم دقیق این ترکیبات نیازمند مطالعات بیشتر است؛ اما با توجه به کاهش بیان ژن ODC1 در این مطالعه، می‌توان اثر ضدسرطانی ترکیبات گیاه ریواس را از طریق آن توجیه کرد.

References

[1]. Sharifian A, Pourhoseingholi MA, Emadedin M, Rostami Nejad M, Ashtari S, Hajizadeh N, et al. Burden of Breast Cancer in Iranian Women is Increasing. Asian Pac J Cancer Prev 2015; 16(12): 5049-52.

[2]. Homaee Shandiz F, Karimi FZ, Khosravi Anbaran Z, Abdollahi M, Rahimi N, Ghasemi M. Investigating the Quality of Life and the Related Factors in Iranian Women with Breast Cancer. Asian Pac J Cancer Prev 2017; 18(8): 2089-92.

[3]. Elmets CA, Athar M. Targeting ornithine decarboxylase for the prevention of nonmelanoma skin cancer in humans. Cancer Prev Res (Phila) 2010; 3(1): 8-11.

[4]. Zhu Q, Jin L, Casero RA, Davidson NE, Huang Y. Role of ornithine decarboxylase in regulation of estrogen receptor

۱. Hibiscus rosa

www.SID.ir

Archive of SID

alpha expression and growth in human breast cancer cells. Breast Cancer Res Treat 2012; 136(1): 57-66.
[5]. Xu CX, Yan YF, Yang YP, Liu B, Xin JX, Chen SM, et al. Downregulation of ornithine decarboxylase by pcDNA-ODCr inhibits gastric cancer cell growth in vitro. Mol Biol Rep 2011; 38(2): 949-55.
[6]. Zahedi M, Hojjati MR, Fathpour H, Rabiei Z, Alibabaei Z, Basim A. Effect of Rheum Ribes Hydro-Alcoholic Extract on Memory Impairments in Rat Model of Alzheimer's Disease. Iranian Journal of Pharmaceutical Research: IJPR. 2015; 14(4): 1197-206.
[7]. Andiç S, Tunçtürk Y, Ocak E, Köse S. Some chemical characteristics of edible wild Rhubarb species (Rheum ribes L.). Res J Agric Biol Sci 2009; 5: 973-77.
[8]. Munzuroğlu Ö, Karataş F, Gür N. A study of the levels of vitamins A, E and C and Selenium in Rhubarb (Rheum ribes L.). Turkish Journal of Biology 2000; 24(3): 397-404.
[9]. Alaadin AM, Al-Khateeb EH, Jäger AK. Antibacterial activity of the Iraqi Rheum ribes. Root. Pharmaceutical biology 2007; 45(9): 688-90.
[10]. Öztürk M, Aydoğmuş-Öztürk F, Duru ME, Topçu G. Antioxidant activity of stem and root extracts of Rhubarb (Rheum ribes): An edible medicinal plant. Food Chemistry. 2007; 103(2): 623-30.
[11]. Tartik M, Darendelioglu E, Aykutoglu G, Baydas G. The various biological activities of Rheum ribes extract on different types of cell. Türk Doğa ve Fen Dergisi.1.
[12]. Esmaeilbeig M, Kouhpayeh SA, Amirghofran Z. An Investigation of the Growth Inhibitory Capacity of Several Medicinal Plants From Iran on Tumor Cell Lines. Int J Cancer Manag 2015; 8(5): e4032.
[13]. Shiezadeh F, Mousavi SH, Amiri MS, Iranshahi M, Tayarani-Najaran Z, Karimi G. Cytotoxic and apoptotic potential of Rheum turkestanicum Janisch root extract on human cancer and normal cells. Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR. 2013; 12(4): 811.
[14]. Uyar P, Coruh N, Iscan M. Evaluation of in vitro antioxidative, cytotoxic and apoptotic activities of *Rheum ribes* ethyl acetate extracts. J. Plant Sci (Science Publ Group) 2014; 2(6): 339.
[15]. Tabin S, Gupta R, Bansal G, Kamili AN. Comparative HPLC analysis of emodin, aloe emodin and rhein in Rheum emodi of wild and in vitro raised plants. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry 2016; 5(2): 121.
[16]. Afshar AS, Nematpour FS, Meshkani M, Khafi A. Growth inhibition of human breast cancer cells and down-regulation of ODC1 and ADA genes by Nepeta binaloudensis. Revista Brasileira de Farmacognosia 2017; 27(1): 84-90.
[17]. Deng W, Jiang X, Mei Y, Sun J, Ma R, Liu X, et al. Role of ornithine decarboxylase in breast cancer. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai) 2008; 40(3): 235-43.
[18]. Miao XP, Li JS, Li HY, Zeng SP, Zhao Y, Zeng JZ. Expression of ornithine decarboxylase in precancerous and cancerous gastric lesions. World J Gastroenterol 2007; 13(20): 2867-71.
[19]. Grimminger PP, Schneider PM, Metzger R, Vallböhmer D, Danenberg KD, Danenberg PV, et al. Ornithine Decarboxylase mRNA Expression in Curatively Resected Non–Small-Cell Lung Cancer. Clinical Lung Cancer 2010; 11(2): 114-19.
[20]. Sharma S, Khan N, Sultana S. Study on prevention of two-stage skin carcinogenesis by Hibiscus rosa sinensis extract and the role of its chemical constituent, gentisic acid, in the inhibition of tumour promotion response and oxidative stress in mice. Eur J Cancer Prev 2004; 13(1): 53-63.
[21]. Hakimuddin F, Tiwari K, Paliyath G, Meckling K. Grape and wine polyphenols down-regulate the expression of signal transduction genes and inhibit the growth of estrogen receptor-negative MDA-MB231 tumors in nu/nu mouse xenografts. Nutrition Research 2008; 28(10): 702-13.

www.SID.ir

Archive of SID

Evaluation of Cytotoxic Effect of *Rheum ribes* Extracts Against MCF-7 Human Breast Cancer Cell Line and Analysis of ODC1 Gene Expression

Zeinab Noori[1], Akbar Safipour Afshar[2]*

1. MSc. Student, Department of Agriculture, Payame Noor University, Tehran, Iran
2. Assistant Professor, Department of Biology, Neyshabur Branch, Islamic Azad University, Neyshabur, Iran

Abstract

Background The characteristics of cancer cells that differentiate them from normal cells can be attributed to the increase of the ornithine decarboxylase enzyme (ODC), which has a very important role in the metabolism of polyamines in cancer cells. In this research, we tried to study the effects of cytotoxicity of Rhubarb extract on three different solvents distilled water, ethanol and n-hexane on MCF-7 cell lines. Also, the rate of expression of the ODC1 gene as one of the genes involved in breast cancer was studied under the influence of the extract of this plant.

Materials & Methods MCF-7 breast cancer cells were cultured in DMEM medium. Subsequently, they were subjected to increasing concentrations of extract from 0-200 µg/mL. The cytotoxic activity of the extract was investigated using MTT assay. The quantitative analysis of the ODC1 gene was performed using the Real Time-PCR.

Results Cell line mortality increases significantly in a concentration-dependent manner. In the rhubarb extracts, the most cytotoxicity was observed in 72 hours. Changes in ODC1 gene expression in MCF-7 cell lines treated with different concentrations of rhubarb extract indicate a decrease in gene expression with increasing concentrations of extracts.

Conclusion The results of this study indicate that Rhubarb extract has a potential influence on ODC1 gene expression in breast cancer cells and cause inhibition of cancer cell proliferation.

Received: 2018/05/14
Accepted: 2018/07/22

Keywords: Eating disorder, depression, Anticancer, Cytotoxic, Ornithine decarboxylase, Rhubarb.

www.SID.ir