Archive of SID

بررسی اثر سایتوتوکسیسیتی عصارهٔ غضروف کوسه بر رده سلولی آدنوکارسینومای پستان (MCF7)

سمیه شاهرخی[1]، دکتر طوبی غضنفری[2]، دکتر محمد علی محققی[3]، دکتر زهیر محمد حسن [4]، دکتر غلامرضا بابایی[5]

تاریخ دریافت: ۸۳/۱۱/۲۰ تاریخ پذیرش: ۸۴/۹/۷

چکیده

مقدمه: غضروف کوسه ماهی منبع ترکیبات ضدرگزایی و ضد توموری است که خاصیت ضد رگزایی آن به اثبات رسیده است. با توجه به اینکه مدارک معتبر بسیار کمی در مورد مکانیسم احتمالی این ماده در مهار مستقیم رشد سلولهای تومور وجود دارد. لذا در این مطالعه اثر آن به طور مستقیم بر رده سلولی آدنوکارسینومای پستان مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روشها: در این مطالعه آزمایشگاهی پس از کشت و تکثیر سلولهای L929 و MCF7 به منظور تعیین اثر سایتوتوکسیک عصاره غضروف کوسه ماهی، این سلولها در مجاورت دوزهای مختلف عصاره غضروف کوسه (۲۵mg، ۵۰mg، ۷۵mgو ۱۰۰ mg) قرار گرفتند و به مدت ۲۴، ۴۸، ۷۲ ساعت آنکوبه شدند. پس از پایان آنکوباسیون تست MTT انجام شد.

یافته‌های پژوهش: نتایج حاصل از تست MTT نشان داد که این عصاره، اثر سایتوتوکسیسیتی وابسته به دوز بر MCF7 دارد که این ویژگی با گذشت زمان افزایش می‌یابد به طوریکه با افزایش دوز عصاره ، رشد سلولهای توموری بیشتر میشود، مثلا در دوز ۱۰۰ mgو آنکوباسیون ۷۲ ساعته، بیشترین درصد مرگ سلولی مشاهده شد در حالی که در سلولهای طبیعی این سایتوتوکسیسیتی مشاهده نشد که بیانگر اثر سایتوتوکسیسیتی انتخابی عصاره غضروف کوسه بر سلولهای توموری می باشد.

نتیجه گیری‌نهائی: عصاره غضروف کوسه با اثر سایتوتوکسیک مستقیم بر سلولهای توموریMCF7، می تواند باعث مهار رشد این سلولها شود.

واژه‌های کلیدی: سرطان پستان، غضروف کوسه ماهی، سایتوتوکسیسیتی

۱- کارشناس ارشد ایمونولوژی دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، نویسنده مسوول E-mail: Shahrokhi_so@yahoo.com

۲- دانشیار گروه ایمولوژی دانشکده پزشکی، دانشگاه شاهد

۳- دانشیار مرکز تحقیقات سرطان انستیتو کانسر، دانشگاه علوم پزشکی تهران

۴-دانشیار ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس

۵- دانشیار گروه آماری زیستی دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

مطالعات متعددی در تأیید این نکته که غضروف منبع ترکیبات ضد رگزایی و ضد توموری است وجود دارد (۹،۶،۴،۱).

عده ای از محققین معتقدند که اسکلت غضروفی کوسه ماهی سبب محافظت آن در برابر تومور می‌شود(۱۷،۸)، چرا که تفاوت اصلی کوسه با سایر حیوانات ،اسکلت کاملاً غضروفی و بدون استخوان آنهاست(۱۰). با انتشار این نظرِیه، عده زیادی از محققین تحقیقات خود را بر غضروف کوسه ماهی متمرکز کردند (۱۶،۱۴). غضروف کوسه علاوه بر این که یک ماده مغذی است خصوصیات زیر را نیز دارا می‌باشد:

۱- حاوی مواد ضد رگزایی است که سبب مهار رشد تومورها می شود(۱۶،۱۴).

۲- سبب بهبود پاسخهای سیستم ایمنی و افزایش تولید آنتی بادی می‌گردد(۱۷،۹).

۳- خاصیت ضد التهابی در بهبودی زخمها داشته و در بیماریهای ایمنی مثل آرتریت مؤثر است(۱۷،۹).

۴- غضروف کوسه همچنین می‌تواند نقش مهمی در محافظت از جهش زایی DNA در برابر رادیکالهای آزاد داشته باشد(۷). از نظر تئوریک مکانیسم‌های مذکور در درمان سرطانها مؤثر می‌باشند.

همچنین بیشترین مطالعات پیرامون اثر عصاره غضروف کوسه ماهی برمهار رشد سلولهای آندوتلیال رگی انجام شده است و خاصیت ضد رگزایی آن اثبات شده است(۱۴،۱۱). اویکاو[1] و همکارانش در سال ۱۹۹۰از عصاره غضروف کوسه، چهار فراکشن جدا کردند و فراکشن های حاوی وزن مولکولی یک تا ده کیلو دالتون این عصاره را بر تومور VX-2 در قرنیه خرگوش تأثیر دادند و بیشترین اثر ضد رگزایی را در دو نوع از این فراکشنها یافتند(۱۴،۸).

شو[2] و همکاران در سال ۱۹۹۸ فراکشنی حاوی دو پروتئین با وزن مولکولی ۱۰ و ۱۴ کیلو دالتون با اثر ضد رگزایی و ضد تومور از غضروف کوسه ماهی جدا کردند، این فراکشن (U-995) دارای اثر مهاری بر مهاجرت و تکثیر سلولهای آندوتلیال عروقی بوده و می تواند کلاژنولیز را مهار نماید(۱۶).

اما مکانیسم احتمالی دیگر این ماده مهار مستقیم رشد سلولهای توموری در اثر خاصیت سایتوتوکسیسیتی آن می باشد، که مدرک علمی معتبری در تأیید این نظر وجود ندارد. در این مطالعه تصمیم گرفته شد که اثر سایتوتوکسیسیتی عصاره غضروف کوسه ر ا به طور مستقیم بر رده سلولی آدنوکارسینومای پستان(MCF7) بررسی کنیم.

مواد و روشها

الف) عصاره گیری از غضروف کوسه ماهی: پس از خریداری غضروف کوسه ماهی از بنادر بوشهر و پاک کردن و شستن آن با آب مقطر ، غضروفها چرخ شده و به مدت یک شب در فریزر نگه‌داری شدند. سپس با استفاده از دستگاه لیوفلیزاتور، نمونه لیوفلیزه شده وسپس پودر شد. ده گرم از پودر غضروف در ۱۰۰ سی سی بافر حاوی گوانیدیوم هیدروکلراید ۴ مولار، محلول استات سدیم ۰/۱ با۵/۸ =pH حل شد. به این بافر ۶ آنتی پروتئاز با غلظتهای زیر اضافه شد(۵):

1mM PMSF و 6.25mM EDTA
10 mM N-Ethyl malemide,

1. Oikaw
2. Sheu

www.SID.ir

Archive of SID

12.5mM 6-Aminohexanoic acid, 2mM Idoacetc acid,Hclo ./25 mM 0.25 mM Benzamidine HCL

سپس به ازای هر ۱۰ میلی لیتر از بافر، مقدار یک گرم پودر غضروف اضافه شد .محلول حاصله به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد. سپس با نیروی g۸۰۰۰۰ به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفوژ گردید(۹،۶،۴).

میزان پروتئین مایع رویی حاوی عصاره پروتئین‌های غضروف کوسه ماهی ، به روش برادفورد سنجیده شد. سپس عصاره به دست آمده، از فیلتر با قطر ۰/۲۲میکرون عبور داده شد و در حجمهای کوچک تقسیم و تا زمان مصرف در فریزر با دمای۲۰-درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

ب) شرایط کشت رده سلولی: MCF7 که یک رده سلولی آدنوکارسینومای پستان و L929 که یک رده سلولی نرمال است از انستیتو پاستور تهران خریداری شد. جهت بررسی اثر سایتوتوکسیسیتی انتخابی عصاره از سلولهای نرمال L929 استفاده شد . سلولها در محیط کشت کامل(RPMI حاوی ۱۰٪ FBS) رشد و تکثیر یافتند تا پس از رسیدن به میزان کافی، در تست سایتوتوکسیسیتی از آنها کشت داده شود.

ج) تست سایتوتوکسیسیتی: جهت تست MTT به میزان۲۰۰۰۰ عدد از سلول L929 و MCF7در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه باکف صاف به مدت یک شب کشت داده شد، پس از چسبیدن سلولها به کف پلیت، محیط کشت رویی چاهکها خالی شد و دوزهای مختلف از عصاره غضروف کوسه ماهی (۱۰۰ µg،۷۵ µg، ۵۰ µg، ۲۵ µg) به میزان۲۰۰ میکرولیتر به چاهک های تست اضافه شد . به چاهکهای کنترل منفی تنها محیط کشت RPMI حاوی ۱۰٪ FBS اضافه شد. ردیف بلانک تنها حاوی ۲۰۰ میکرولیتر محیط RPMI حاوی ۱۰٪ FBS بود(بدون سلول). پلیت‌های کشت به مدت ۴۸،۲۴و۷۲ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد حاوی CO_2 ۵٪ انکوبه شدند.

پس از پایان زمان انکوباسیون سلولها ،۱/۱۰ حجم هر چاهک (۲۰میکرولیتر) MTT به چاهکها اضافه شد. سپس مجدداً پلیت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد و در حضور CO_2 ۵٪ به مدت ۴ ساعت انکوبه شد، مایع رویی چاهکها به طور کامل خارج گردید و به جای آن ۱۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانل اسیدی ۰.۴/. مولار اضافه شد. پس از حل شدن کریستالها ، مایع بنفش رنگی حاصل شد که درطول موج ۵۴۰ نانومتر بوسیله دستگاه ELISA Reader خوانده شد(۱۱،۱۰). با استفاده از فرمول زیرمیزان مهار رشد سلولها محاسبه شد. (لازم به ذکر است آزمایشات به صورت سه تایی و هر تست ۳ بار تکرار شد).

$$\text{درصد مرگ سلولی} = \frac{\text{۱-جذب تست}}{\text{جذب کنترل}} \times ۱۰۰$$

نتایج حاصل از تست MTT که با دستگاه ELISA Reader ثبت شد و با استفاده ازفرمول فوق به درصد مرگ سلولی تبدیل و از نظر آماری آنالیز شد.

آنالیز آماری نتایج تجربی با نرم‌آفزار SPSS و تستANOVA و T student تحلیل انجام شد.

یافته های پژوهش

آنالیز آماری نتایج نشان داد که در زمان انکوباسیون ۲۴ ساعته، درصد مرگ سلولی با افزایش دوز عصاره غضروف کوسه در MCF7 افزایش یافته بود.

www.SID.ir

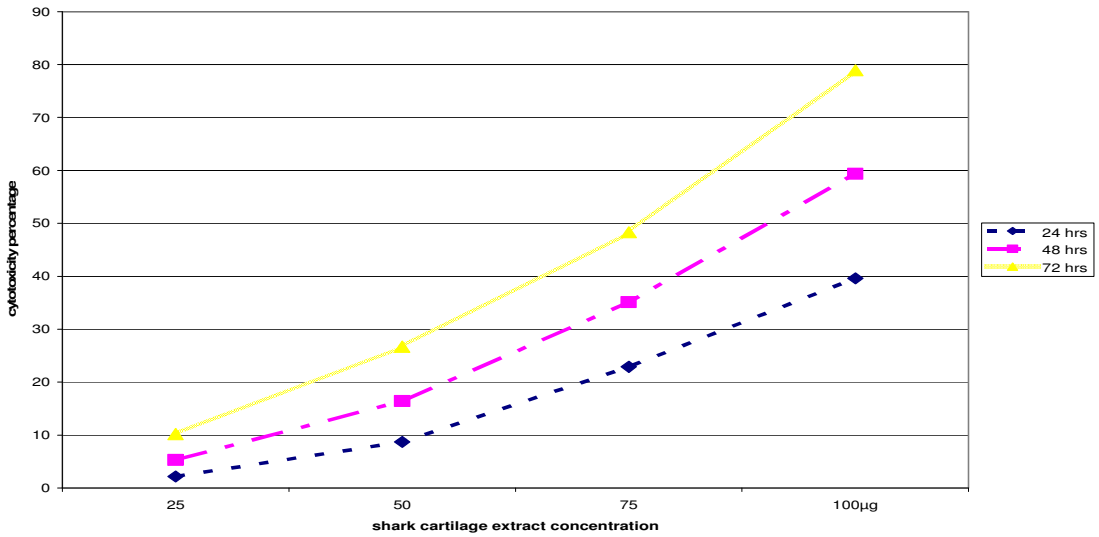
Archive of SID

همچنان که در نمودار ۱ مشاهده می شود افزایش درصد مرگ سلولی وابسته به دوز، در انکوباسیون ۴۸ ساعته سلولهای MCF7 دیده شد و این میزان در مقایسه با زمان۲۴ ساعت انکوباسیون این سلولها افزایش داشت ، ولی این افزایش از نظر آماری معنـــی‌دار نبود(p=۰/۰۵۷). در سلولهای L929 این روند افزایش بسیار کندی داشت و در مقایسه با انکوباسیون۲۴ ساعته تغییر معنی‌داری نداشت (p=۰/۱۲۶) (نمودار ۲).

در انکوباسیون ۷۲ ساعته مربوط به سلولهای MCF7 (نمودار۱)، افزایش درصد مرگ سلولی مشاهده شد که این اختلاف نسبت به انکوباسیون۲۴و ۴۸ساعته سلولها ، از نظر آماری معنی دار بود (P=/۰۲۹)، (P=۰/۰۴۱).

در سلولهای L929 نسبت به انکوباسیون ۴۸ و ۲۴ ساعتـــه اش تـغییـر معنـــی‌داری دیـده نشد (p =۰/۱۵۳) و (p =۰/۱۴۲).

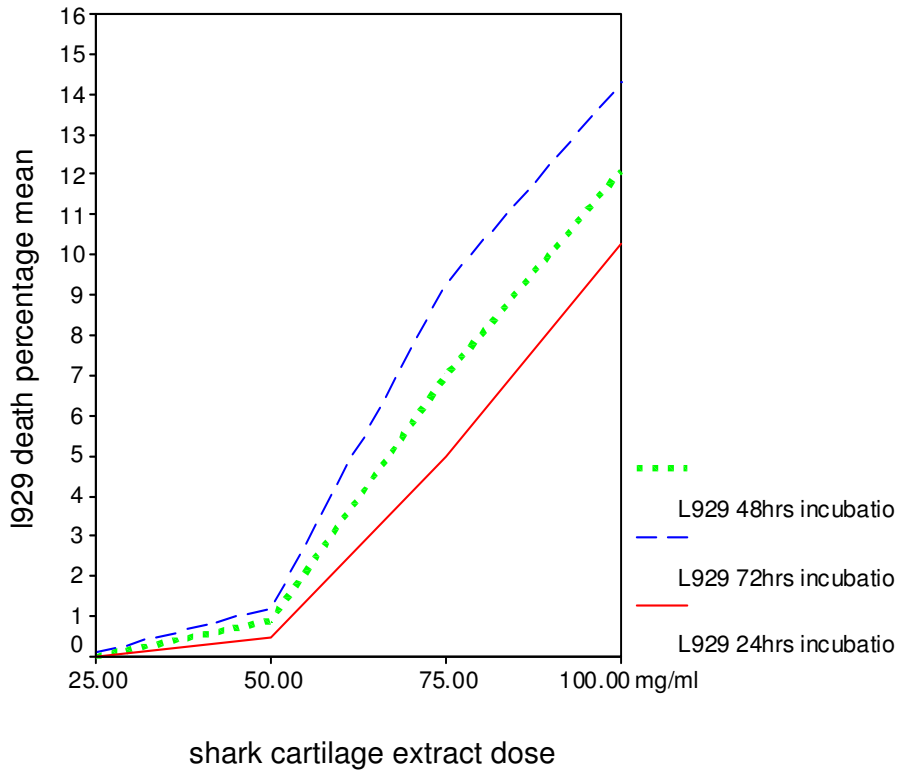
همچنانکه در نمودار۳ مشاهده می شود میزان درصد مرگ سلولی در این دو سلول روند افزایشی وابسته به دوز دارد که با گذشت زمان بیشتر می‌شود و آنالیز نتایج با استفاده ازتست ANOVA اختلاف معنی داری در تمام غلظتها و در هر سه زمان بین این دو نوع سلول را نشان داد (۰/ ۰۲۷ =P)



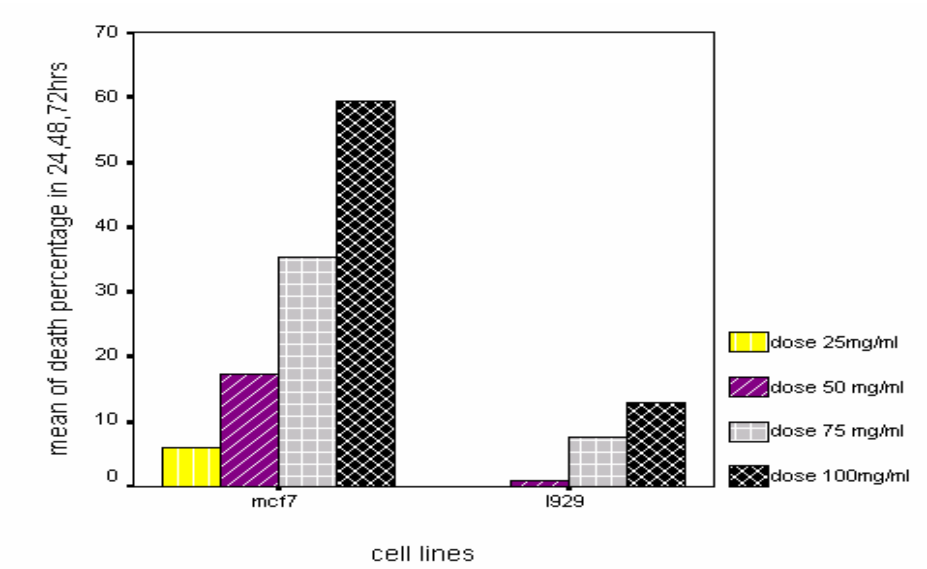
نمودار ۱- میانگین درصد مرگ سلولهای MCF7 در انکوباسیون ٤٨،٢٤و٧٢ ساعته با دوزهای مختلف عصاره غضروف کوسه

www.SID.ir

Archive of SID



نمودار۲- میانگین درصد مرگ سلولهای L929 در انکوباسیون ۲٤، ٤۸و۷۲ ساعته با دوزهای مختلف عصاره غضروف کوسه



نمودار۳- مقایسه میانگین درصد مرگ سلولهای MCF7وL929 در زمانهای مختلف انکوباسیون(ساعت٤۸،۲٤و۷۲) با دوزهای مختلف عصاره غضروف کوسه

www.SID.ir

Archive of SID

بحث و نتیجه‌گیری

فواید کلینیکی متعددی برای غضروف کوسه مطرح شده است اما ابتدا به عنوان اثر ضد سرطانی اش در درمـــان تـومـورهـــا شناخته شد(۱۵،۹). غضروف کوسه‌ماهی به طور گسترده‌ای در درمان بسیاری از تومورهای مختلف استفاده می شود (۱). اما مکانیسم اثر آنرا بیشتر به علت ویژگی ضد رگزایی‌اش می دانند .

در این تحقیق با تهیه عصاره ای از این ماده و تأثیر آن بر سلولهایMCF7 به عنوان ردهٔ سلول توموری و سلولهای L929 به عنوان سلولهای نرمال (جهت بررسی سایتوتوکسیسیتی انتخابی عصاره) ویژگی اثر مهاری عصاره غضروف کوسه ماهی بر رشد سلولهای توموری بررسی شد. نتایج حاصله نشان داد که این عصاره با اثرات سایتوتوکسیسیتی (وابسته به دوز) بر سلولهای توموری ، سبب مرگ این سلولها می گردد، به طوری که با افزایش دوز عصاره، رشد سلولهای توموری بیشتر مهار می شد مثلاً در غلظـــت µg ۱۰۰ نسبت به ســـایر غلظت ها، درصد مرگ سلولی افزایش داشت به طوری که در دوز µg ۱۰۰ این عصاره، درصد مرگ سلولـــی از ۴/ ۵۹ درصـــد در ۴۸ ساعت انکوباسیون به ۷۸/۹ درصد رسید که این اختلاف از نظر آماری معنی دار بود. در حالیکه در سلولهای طبیعی این سایتوتوکسسیتی مشاهده نشد که بیانگر اثر انتخابی عصاره غضروف کوسه ماهی بر سلولهای توموری می باشد.

در مطالعات مشابه دیگری که بر Neovastat (عصارهٔ استاندارد شدهٔ غضروف کوسه) انجام شد اثر ضد تکثیری آن بر رده سلولهای سرطانی پستان، تخمدان، پروستات و ریه گزارش شد (۳،۲).

اما برخی دیگر از محققین معتقدند که اثر ضد سرطانی غضروف کوسه ناشی از ویژگی ضد رگزایی آن است و این دارو اثر سایتوتوکسیک مستقیمی بر سلولهای توموری ندارد (۱۴).

البته تحقیقات در این زمینه بسیار اندک است ولی به نظر می رسد روش تهیهٔ عصاره و نوع کوسهٔ مورد استفاده عامل مهمی در تنوع پاسخها باشد که این مساله یکی از دلایل تفاوت نتایج گروههای تحقیق با یکدیگر است ، مثلاً ممکن است فراکشنی جدا شود که این اثر سایتوتوکسیک را نداشته باشد.

با توجه به این مطالعه و تحقیقات مشابه، علاوه بر ویژه گی ضد رگزایی این ماده، مهار رشد سلولهای تومـوری توسط عصارهٔ غضروف کوســـه می‌تواند مکانیسم دیگری از اثر این داروی ضد سرطان در مقابله با تومورها باشد که انجام تحقیقات بیشتری در این زمینه بسیار ضروری به نظر می رسد.

References

1- Anonymouse; So far, shark cartilage is a fishy treatment for cancer; Env Nutrition,1997,20(9);7.

2-Dredge K, AE-941 (AEterna). Curr Opin Investig Drugs. 2004 Jun;5(6):668-77.

3-Dupont, E. Alaoui-jamali, W.T. Angiostatic and antitumoral activity of AE941 (Neovastat), A molecular fraction derived from Shark Cartilage.88th annual meeting of the American association for cancer research, (1997), 227,12.

www.SID.ir

Archive of SID

4-Dupont E, Brazeau P, Juneau C , Maes DH; Methods of using extract of shark cartilage, United States Patents:No,6,028,118.

5- Feyzi R, Hassan ZM, Mostafaie A ; Modulation of CD4+ and CD8+ tumor infiltrating lymphocytes by a fraction from shark cartilage: Shark cartilage modulates anti tumor immunity; Int Immuno pharmacology:2002,406:1-6.

6-Gingras D, Renaud A, Mousseau N, Beliveau R;Shark cartilage extract as anti angiogenic agents :Smart drinks or bitter pills?;Cancer Metastasis Rev,2000,19(1-2):83-6.

7- Gomes EM, Souto RF, Felzeszwalb I ; Shark cartilage containing preparation protects cells against hydrogen peroxide induced damage and mutagenesis ;Mutation Res :1996,367:203-208.

8-Gonzalez RP, Leyva A , Moraes MO; Shark cartilage as source of antiangiogenic compounds: from basic to clinical research; Biol. Pharm Bull, 2001,24(10):1097-1101.

9-Kralovec JA , Guan Y , Metera K, Carr RI.; Immunomodulating principles from shark cartilage part1.Isolation and biological assessment in vitro; Int Immunoppharmacology , 2003,3 :657-669.

10- Lane IW, Comac L; Shark don't get cancer. Avery publishing group Inc.1992

11-Lee A, Langer R;Shark cartilage contains inhibitors of tumor angiogenesis. ; Science,1983, 221(4626):85-7.

12- Lian Z, Niwa K, Gao Jingchun, Tagami K , Mori H , Tamaya T;Association of cellular apoptosis with anti-tumor effects of the chinese herbal complex in endocrine–resistant cancer cell line; Cancer Detection and Prevention,2003,27:147-154.

13-Mori H, Niwa K,Zheng Q, Yamada Y, Sakata K, Yoshimi N; Cell proliferation in cancer preventtion; effects of prevention agents on estrogen–related endometrial carcinogenesis model and on in vitro human colorectal cells; Mutation Res , 2001,480(1):201-207.

14-Oikawa T, Ashino-fuse H, Shimamura M, Koide U, Iwaguchi T; A novel angiogenic inhibitor derived from Japanese shark cartilage(I), Extraction and estimation of inhibitory activities toward tumor and embryonic angiogenesis;Cancer Letters.1990,51 ,181-6.

15-Saul G; Shark cartilage therapy against cancer; Nutrition & Health forum,1997,14,1:1-5.

16-Sheu JR, Fu CC, Tsai ML, Chung WJ; Effect of U-995, a potent shark cartilage-derived inhibitor, on antiangiogenesis and antitumor activities ; Anticancer Res. 1998,18:4435-42.

17-Vae BW ;shark cartilage; total health.1993,15(4): 42.

www.SID.ir

Archive of SID

Evaluation of Cytotoxicity Effect of Shark Cartilage Extract on Breast Adenocarcinoma Cell Line(MCF7)

Shahrokhi S.[1], Dr. Ghazanfari T.[2], Dr. Mohagheghi MA.[3], Dr. Mahammad Hassan Z.[4], Dr. Babaei Gh.R.[5]

Abstract

Introduction: Several studies have supported have supported the shark cartigle contains antiagiogenic andante tumor comounds, it's antiangiogenic properties has been confirmed, which is an important mechanism in inhibiting tumor cell growth, but it's cytotoxic effect on tumor cell could be another mechanism and there is little dcientific evidence approving this. So, we evaluated this effect on human adenocarcinoma cell line(MCF7.)

Materials & methods: To assess the cytotoxicity effect of shark cartilage extract on MCF7 and L929 cell lines, they were cultured and propagated, then incubated with different doses of shark cartialige (25µg,50µg, 75 µg, 100 µg) for 24, 48 and 72 hrs. After the incubation period, MTT test was done.

Results: The results of MTT showed that this extract has dose dependent cytotoxicity on tumor cells. For example, the highest cytotoxicity was seen in incubating cell with 100 µg of extract for 72 hrs, while there was no cytotoxicity in normal cells which shows the differential cytotoxicity effect of shark cartilage extract on tumor cells.

Discussion: Considering the finds, shark cartilage extract can inhibit the tumor cell growth through a cytotoxicity as well as it's anti-angiogenicity.

* * *

Key words: *Breast adenocarcioma, Shark cartilage, Cytotoxicity.*

1. MSc., auth in chief, immunology Dep., medical faculty, Tarbiat Modares university
2. Associated Prof., immunology Dep., medical faculty, Shahed university
3. Associated Prof., cancer research center, Tehran medical university
4. Associated Prof., immunology Dep., medical faculty, Tarbiat Modares university
5. Associated Prof., bio-statistics Dep., medical faculty, Tarbiat Modares university

www.SID.ir

Archive of SID

www.SID.ir