Medical Journal
of
Tabriz University of Medical Sciences and Health Services

Original Article

The effect of *Oscillatoria* Cyanobacterium extract on breast cancer cell line and study of apoptosis, necrosis and *Noxa* gene expression

Hamid Reza Rahmatollahi[1], Ali Salehzadeh[2*], Seyed Ataollah Sadat Shandiz[3]

[1]MSc. Student in Microbial Biotechnology, Department of Biology, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran
[2]Department of Biology, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran
[3]Department of Biology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
*Corresponding author; E-mail: salehzadeh@iaurasht.ac.ir

Received: 29 April 2017 Accepted: 18 July 2017 First Published online: 20 May 2019
Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2019 June-July; 41(2):56-64

Abstract

Background: Breast cancer is the most common cause of cancer. The aim of the current study was to evaluate the cytotoxicity, apoptotic effects and *Noxa* gene expression of *Oscillatoria* extract against human breast cancer (MCF-7) cell line.

Methods: The MCF-7 cells were treated with different concentration of extracts ranging 1.56, 3.12, 6.25, 12.5, 25, 50 mg/mL for 24 and 48 hours. The cytotoxicity activity of *Oscillatoria* extract towards cancer cells were evaluated by using colorimetric MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) assay. The *Noxa* gene expression was measured via real time PCR technique. Finally, apoptotic and necrosis study of extract was analyzed using Flow-cytometry method.

Results: Cytotoxic results clarified that the desired extracts have a dose-dependent toxicity effect and viability of the cells significantly decreased. *Noxa* gene expression levels in MCF-7cells were increased to 33.93 ± 1.6 ($P<0.001$) compared to the control group. In addition, the flow-cytometry data revealed the 43.07 % apoptosis in breast cancer cell line.

Conclusion: It seems that *Oscillatoria* extract has potential uses for treatment of breast cancer and it suggested that further investigations were performed for *Oscillatoria* pharmaceutical importance.

Keyword: Oscillatoria, Breast cancer, Noxa, Apoptosis.

How to cite this article: Rahmatollahi H R, Salehzadeh A, Sadat Shandiz S A. [The effect of Oscillatoria Cyanobacterium extract on breast cancer cell line and study of apoptosis, necrosis and Noxa gene expression]. Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2019 June-July; 41(2):56-64. Persian.

© 2019 The Author(s). This is an Open Access article published by Tabriz University of Medical Sciences under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

مقاله پژوهشی

اثر عصاره سیانوباکتری *Oscillatoria* روی رده سلولی سرطان پستان و مطالعه آپوپتوز، نکروز و بیان ژن *Noxa*

حمید رضا رحمت‌اللهی[۱]، علی صالح‌زاده[۲*]، سید عطاالله سادات شاندیز[۳]

[۱] کارشناس ارشد بیوتکنولوی میکروبی، گروه زیست شناسی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران
[۲] گروه زیست شناسی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران
[۳] گروه زیست شناسی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
[*] نویسنده مسئول؛ ایمیل salehzadeh@iaurasht.ac.ir

دریافت: ۱۳۹۶/۲/۹ پذیرش: ۱۳۹۶/۴/۲۷ انتشار برخط: ۱۳۹۸/۲/۳۰
مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی تبریز. خرداد و تیر ۱۳۹۸؛ ۴۱(۲):۵۶-۶۴

چکیده

زمینه: سرطان پستان یکی از شایع‌ترین سرطان‌ها به شمار می‌رود که سالانه منجر به مرگ در بین خانم‌ها می‌شود. هدف از مطالعه حاضر، ارزیابی عصاره‌ی سیانوباکتری اسیلاتوریا (*Oscillatoria*) بر روی میزان سمیت، آپوپتوزی و بیان ژن *Noxa* در رده سلولی سرطان پستان (MCF-7) می‌باشد.

روش‌کار: در این مطالعه، رده سلولی سرطان پستان (MCF-7) با غلظت‌های مختلف عصاره اسیلاتوریا (۱/۵۶، ۳/۱۲، ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) طی زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت تیمار شد. فعالیت سمی عصاره بر روی رده سلولی سرطانی با کمک روش رنگ‌سنجی MTT ارزیابی شد. میزان بیان ژن *Noxa* با استفاده از تکنیک Real Time PCR مورد ارزیابی قرار گرفت. در نهایت، مطالعه آپوپتوز و نکروز عصاره با استفاده از روش فلوسایتومتری مورد مطالعه قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج سمیت سلولی بیانگر آن بود که عصاره مورد بررسی سمیت وابسته به دوز دارد و میزان زنده ماندن سلولها به‌طور معنی‌داری کاهش می‌یابد. بیان ژن *Noxa* در سلول های سرطانی تیمار شده با عصاره اسیلاتوریا به میزان ۱/۶±۳۳/۹۳ ($P<0/001$) نسبت به نمونه کنترل افزایش نشان داد. علاوه بر این، داده‌های فلوسایتومتری میزان آپوپتوزی ۴۳/۰۷ درصدی را در رده سلولی سرطان پستان نشان داد.

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج به نظر می‌رسد که عصاره سیانوباکتر اسیلاتوریا می‌تواند، پتانسیل بالقوه ای در درمان سرطان پستان داشته باشد و پیشنهاد می‌شود که بررسی‌های بیشتری در خصوص اهمیت دارویی عصاره اسیلاتوریا صورت گیرد.

کلید واژه‌ها: اسیلاتوریا، سرطان پستان، *NOXA*، آپوپتوز.

نحوه استناد به این مقاله: رحمت‌اللهی ح ر، صالح‌زاده ع، سادات شاندیز س ع. اثر عصاره سیانوباکتری Oscillatoria روی رده سلولی سرطان پستان و مطالعه آپوپتوز، نکروز و بیان ژن Noxa. مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی‌ـدرمانی تبریز. ۱۳۹۸؛ ۴۱(۲):۵۶-۶۴

حق تألیف برای مؤلفان محفوظ است.
این مقاله با دسترسی آزاد توسط دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی تبریز تحت مجوز کریتیو کامنز (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0) منتشر شده که طبق مفاد آن هرگونه استفاده تنها در صورتی مجاز است که به اثر اصلی به نحو مقتضی استناد و ارجاع داده شده باشد

مقدمه

سرطان پستان یکی از شایع‌ترین سرطان‌ها در بین خانم‌ها می‌باشد که در حدود ۳۰٪ از سرطان‌ها در بین خانم‌ها را در بر می‌گیرد. هر چند مرگ و میر ناشی از این سرطان از سال ۱۹۹۰ کم شده است، ولی همچنان بیشترین عامل مرگ در بین خانم‌های ۳۵ تا ۵۵ سال به شمار می‌رود (۱). با وجود آن که بالاترین فراوانی این بدخیمی مربوط به کشورهای توسعه یافته است، اما تحقیقات نشان می‌دهد که شیب افزایش شیوع سرطان پستان در کشورهای در حال توسعه بیشتر بوده و متوسط عمر بیماران مبتلا در این کشورها کمتر می‌باشد (۲). طی مطالعات انجام شده مشخص شده است که میزان شیوع سرطان پستان در کشور ایران نسبت به کشورهای توسعه یافته کمتر است، اما با این حال، این بدخیمی همچنان به عنوان شایع‌ترین سرطان در زنان ایرانی مطرح بوده و اطلاعات موجود، از افزایش شیوع این بدخیمی طی دو دهه گذشته در ایران حکایت دارد (۳). بیشترین میزان شیوع سرطان پستان در کشورهای غربی و کشورهای توسعه یافته در گروه‌های سنی ۵۰ تا ۶۰ سال است. در حالی که بیشترین میزان شیوع سرطان پستان در ایران سنین ۴۰ تا ۵۰ سال می‌باشد (۴و۵). از جمله راهکارهای درمانی این بدخیمی می توان به جراحی، شیمی‌درمانی و رادیوتراپی اشاره کرد، با این حال میزان مرگ و میر در این بیماران بالا می‌باشد که خود حکایت از ناکارآمدی این راهکارهای درمانی دارد (۶). از جمله عواملی که در بروز این سرطان موثر است می توان به تنباکو، ارگانیسمهای عفونی، تغذیه ضعیف، عوامل شیمیایی، اشعه و جهش‌های ژنتیکی اشاره نمود (۷). مشخص شده است که مصرف برخی فرآورده‌های غذایی به دلیل دارا بودن خواص آنتی‌اکسیدان در جلوگیری از بروز سرطان نقش مؤثری دارند (۸). پدیده آپوپتوز یا مرگ برنامه‌ریزی شده سلول، مهمترین شکل خودکشی فیزیولوژیک سلول به شمار می‌رود که سلول‌های ناخواسته، بدون آسیب دیدن بافت‌ها یا سلول‌های اطراف، حذف می‌شوند. سلول‌های سرطانی از مرگ برنامه‌ریزی شده فرار می‌کنند که یکی از دلایل آن تغییر در بیان ژن‌هایی است که در تنظیم این فرآیند دخیل می‌باشند. عوامل گوناگونی از قبیل آنزیم‌ها، گیرنده‌ها، مولکول‌های سیگنال و پروتئین‌های تنظیم‌کننده ژن، القا و انجام مسیر آپوپتوز را تعیین می‌نمایند. در میان آنها، پروتئین P53 و سیستم سیگنال‌دهی کاسپاز آبشاری عوامل اصلی برای اجرای آپوپتوز هستند، که توسط مولکولهای مختلفی از قبیل مهارکننده پروتئین آپوپتوز (IAP)، خانواده پروتئینهای BCL2 و کالپین تنظیم می‌شوند (۹). ژن *Noxa* به عنوان زیر خانواده پروآپوپتوتیک BCL2 می‌باشد که در آپوپتوز سلولی نقش دارد. این ژن کد کننده ۱۰۳ اسید آمینه می‌باشد و در مسیرهای وابسته به P53 و غیروابسته به P53 بعد از آسیب به DNA سلول در مرگ سلولی دخالت دارد (۱۰). با توجه به مطالعاتی که بر روی سیانوباکتری اسیلاتوریا انجام گرفته، مشاهده شده است که این سیانوباکتری مواد شیمیایی گیاهی تولید نموده که می‌تواند به‌عنوان ممانعت‌کننده سلول کارسینومایی آسیتهای ارلیخ (Ehrlich Carcinoma Ascites Cell) و رده سلولی سرطان هپاتوسلولار انسانی (HepG2) باشد (۱۱). از جمله موادی که از عصاره سیانوباکتری‌ها به دست آمده و خاصیت درمانی دارند می‌توان به بوروفیسین، آپراتوکتین A، کریپتوفیسین–۵، لارگازول و کوراسین A (۱۴–۱۲) اشاره نمود. با توجه به شیوع سرطان پستان در ایران، و شیب صعودی این بدخیمی طی دو دهه گذشته، در این تحقیق بر آن شدیم تا اثربخشی عصاره سیانوباکتری اسیلاتوریا را برروی رده سلولی MCF-7 سرطان پستان بررسی کنیم. سلول‌های MCF-7 (رده سلولی انسانی سرطان پستان)، رده سلولی بسیار مناسب در مورد سرطان پستان محسوب می‌شود. برای این منظور بیان ژن *Noxa* که از جمله ژن‌های القا کننده مسیر آپوپتوز می‌باشد توسط عصاره سیانوباکتری *Oscillatoria* در غلظت‌های مختلف بر روی رده سلولی MCF-7 سرطان پستان مورد ارزیابی قرار گرفت.

روش‌کار

ابتدا سیانوباکتری اسیلاتوریا در محیط کشت زایلندر منفی (سیگما، آلمان) کشت داده شد. سپس در شرایط استریل، سیانوباکتری‌ها به ۱۰۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت تلقیح و در دمای اتاقک ۲۶ درجه سلسیوس و شدت نور ۶۰ میکرومول فوتون بر مترمربع بر ثانیه با دوره نوری (۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت نور به همراه هوادهی ۲۰۰ میلی لیتر در دقیقه) قرار گرفت. محیط کشت از کاغذ صافی واتمن با قطر منفذ ۰/۴۵ میکرومتر عبور داده شد و مخلوط صاف شده لیوفیلیزه گردید. به منظور تهیه عصاره سیانوباکتری، ۳ گرم پودر خشک‌شده آن با ۱۰۰ میلی‌لیتر اتانول ۵۰ درصد (سیگما، آلمان) مخلوط شد و روی شیکر انکوباتور در مدت زمان ۲۴ ساعت قرار گرفت. بعد از گذشت این مدت زمان، محلول مورد نظر از کاغذ صافی عبور داده شد. عصاره پس از صاف نمودن توسط دستگاه تقطیر در خلاء تا حد خشکی تغلیظ و غلظت آن تعیین شد. بعد از این مرحله در شرایط استریل رقت‌های مختلف از عصاره تهیه شد. رده‌ی سلولی سرطانی پستان (MCF-7) از انستیتو پاستور ایران، بانک سلولی خریداری شد. سلول‌ها در محیط کشت $RPMI_{1640}$ مکمل شده با ۱۰٪ FBS، ۲ میلی‌مولار از L–گلوتامین، ۱۰ واحد بر میلی‌لیتر پنسیلین، ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر استرپتومایسین، ۰/۱ میلی‌مولار اسید آمینه‌های غیر ضروری و ۱ میلی‌مولار پیروات سدیم در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵٪ دی اکسیدکربن و رطوبت ۹۵٪ کشت داده شدند (۱۵). برای بررسی میزان زنده مانی سلول‌ها از روش

رنگ‌سنجی MTT با استفاده از پلیت ۹۶ خانه‌ای استفاده شد. سلول‌ها از فلاسک کشت سلولی جداسازی و جمع‌آوری شد سپس به آن محیط کشت دارای ۱۰٪ FBS اضافه شد و سوسپانسیون سلولی طوری رقیق شد که در هر ۱۰۰ میلی‌لیتر میزان 10^5 سلول وجود داشته باشد و به هر خانه از پلیت ۹۶ خانه‌ای ۱۰۰ میلی‌لیتر از این سوسپانسیون منتقل شد و به مدت ۲۴ ساعت در شرایط کشت انکوبه شد. پس از این زمان محیط کشت تخلیه شده و عصاره با غلظت‌های مورد نظر (۱/۵۶، ۳/۱۲، ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) به هر خانه پلیت اضافه شد. گروه کنترل شامل چاهک‌های دارای سلول‌های تیمار نشده با عصاره سیانوباکتری در نظر گرفته شد. بعد از گذشت ۲۴ و ۴۸ ساعت از زمان واکنش، مقدار ۰/۲ میکرولیتر رنگ MTT با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به هر چاهک افزوده شد و به مدت ۳ ساعت در شرایط کشت انکوباسیون انجام گرفت. سپس محلول رویی تخلیه و برای حل‌نمودن بلورهای فرمازان (شاخص مولکولی سلول‌های زنده) تولید شده به هر خانه ۱۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول اضافه شد و ظرف کشت سلول به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد. در مرحله‌ی بعد جذب نوری توسط دستگاه قرائت‌گر الایزا و در طول موج ۵۷۰ نانومتر خوانده شد (۱۶). نتایج برحسب درصد سلول‌های زنده تیمار شده نسبت به شاهد، از فرمول شماره ۱ محاسبه گردید:

درصد زنده مانی سلولی = (جذب نوری سلول های تیمار شده با عصاره/جذب نوری سلول های تیمار نشده)×۱۰۰

میزان بیان ژن‌های *Noxa* و *β-actin* با استفاده از روش کمیت سنجی Real Time PCR با استفاده از دستگاه Real Time PCR مدل ABI 7300 (Applied Biosystems ,FosterCity,CA,USA) مورد ارزیابی قرار گرفت. برای این منظور، استخراج RNA با استفاده از کیت استخراج RNA (سیناژن، ایران) طبق دستورالعمل کیت انجام گرفت. استخراج RNA با کشت سلولی تعداد 1×10^6 در هر ویال پلیت ۶ خانه‌ای آغاز گردید. پس از انکوباسیون در انکوباتور CO_2 دار با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، تیمار با غلظت عصاره انجام گرفت. برای جداسازی RNA از کلروفوم و ایزوپروپانول و شستشوی آن از اتانول ۷۵ درصد استفاده شد. در پایان کار استخراج، از دستگاه نانودراپ (IMPLEN GmbH, Germany) برای تعیین غلظت RNA استفاده گردید. برای ساخت cDNA، از مولکول‌های RNA استخراج شده با کمک کیتRevert AidTM First Strand cDNA Synthesis محصول شرکت فرمتاز آمریکا استفاده شد. مخلوط واکنش PCR شامل یک میکروگرم RNA، ۵ میکرولیتر بافر واکنش۵x، ۰/۵ میکرولیتر پرایمر الیگو (dT)، ۰/۵ میکرولیتر پرایمر هگزامر تصادفی، یک میکرولیتر مهارکننده آنزیم RNase (۲۰ واحد در میکرولیتر)، دو میکرولیتر مخلوط داکسی نوکلئوتید تری‌فسفات (۱۰ میلی‌مولار)، ۱ میکرولیتر آنزیم رونوشت بردار معکوس M-MulV (Moloney Murine Leukemia Virus) و آب دیونیزه (تا حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر) بود. سپس برنامه دمایی–زمانی دستگاه ترموسایکلر به صورت ۲۵°C به مدت ۵ دقیقه (برای اتصال پرایمر)، ۴۲°C به مدت ۶۰ دقیقه (سنتز cDNA)، ۷۰°C به مدت ۵ دقیقه (غیر فعال شدن رونوشت بردار معکوس) و۴°C به مدت ۵ دقیقه انجام شد. ابتدا غلظت های یکسانی از cDNA های سلول‌های تیمار نشده و تیمار شده به وسیله نانودراپ تهیه شد و سپس برای بررسی بیان ژن‌ها مورد استفاده قرار گرفت (۱۷). در این پژوهش، ژن *β-actin* به‌عنوان ژن مرجع (کنترل داخلی) جهت ارزیابی بیان ژن *Noxa* در رده سلولی MCF-7 تیمار شده با عصاره بررسی شد. پرایمرهای مورد استفاده برای ژن‌های *Noxa* و *β-actin* به عنوان ژن مرجع (کنترل داخلی) مورد انتخاب قرار گرفتند. بعد از سنتز cDNA به منظور بررسی بیان ژنهای *Noxa* و *β-actin* از پرایمرهای اختصاصی با توالی‌های جلوبر ۵'– GAGTGTGCTACTCAACTCAG -3'، و برگشتی ۵'– CAGAGGATGTCTGCTGATGG -3' ژن *Noxa* و توالی های ۵'– TCCTCCTGAGCGCAAGTAC -3' و ۵'– CCTGCTTGCTGATCCACATCT -3' به‌ترتیب جلوبر و برگشتی *β-actin* استفاده شد. به منظور اطمینان از عدم اتصال غیر اختصاصی پرایمرها به بخش‌های دیگر ژنوم و صحت توالی آنها از ابزار BLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) استفاده شد. ترکیب محلول واکنش Real-Time PCR شامل ۱۲/۵ میکرولیتر مخلوط واکنش PCR حاوی سایبرگرین (SYBER-Green PCR Master Mix)، ۱ میکرولیتر از هر پرایمر جلویی و برگشتی، ۵ میکرولیتر cDNA، ۵/۵ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه فاقد نوکلئاز بود. همچنین برنامه زمانی–گرمایی دستگاه برای تکثیر ژن‌ها شامل بازشدن اولیه DNA در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه و واسرشتگی در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه طی تکرار ۴۰ چرخه، اتصال پرایمرها به DNA الگو ۶۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه و طویل شدن رشته الگو در مدت زمان ۳۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد. پس از انجام واکنش PCR ، اختلاف چرخه آستانه (Ct) سلول‌های تیمار شده و تیمار نشده با عصاره به دست آمد. همچنین با استفاده از فرمول ΔΔCt، نسبت ژن هدف به ژن مرجع از طریق $2^{-\Delta\Delta Ct}$ مطابق با فرمول زیر محاسبه شد.

$\Delta Ct = Ct_{target} - Ct_{reference}$

$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{test\ sample} - \Delta Ct_{control\ sample}$

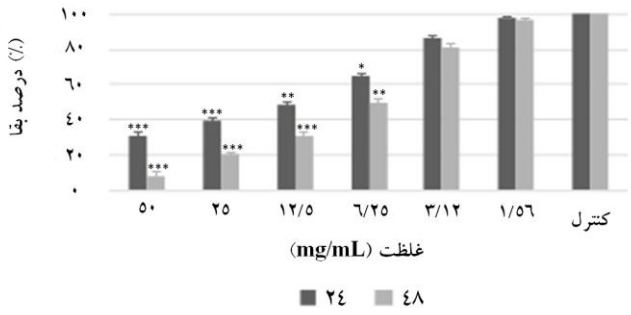
$Relative\ expression: 2^{-\Delta\Delta Ct}$

به‌منظور بررسی میزان آپوپتوز و نکروز از خاصیت رنگی ایزوتیوسیانات-انکسین۵ و پروبیوم آیودایت با استفاده از دستور کار کیت Apoptosis Annexin V/Propidium iodide(PI) detection kit, Roch, Germany انجام گرفت. سلول‌های سرطانی پستان (MCF-7) با غلظت IC_{50} عصاره تیمارشده و سلول‌های تیمار نشده سرطان پستان به عنوان کنترل به کار گرفته شدند. در نهایت ارزیابی درصد آپوپتوز/نکروز سلول‌ها با استفاده از دستگاه فلوسایتومتری انجام گرفت. تمامی نتایج بدست آمده در این مطالعه بر اساس حداقل سه بار تکرار استوار است که با گرفتن میانگین و محاسبه انحراف معیار میزان تغییرات محاسبه شد. تست‌های مقایسه‌ای داده‌ها با استفاده از آنالیز واریانس یک‌طرفه (one way ANOVA) و تست Tukey مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و محاسبه Pvalue با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۲ انجام گرفت. همچنین P<۰/۰۵ در هر تست معنی‌دار در نظر گرفته شد.

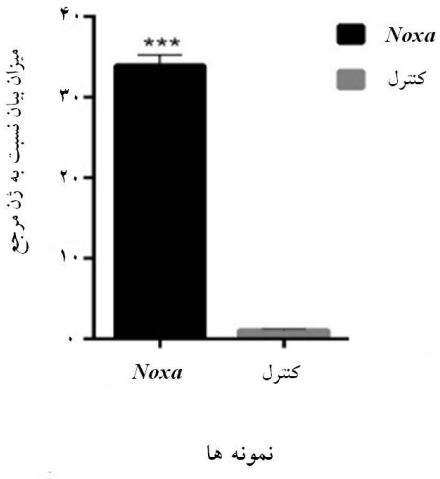
یافته‌ها

بررسی میزان بقاء سلولی با استفاده از روش MTT نشان داد که عصاره سلولی سیانوباکتری اسیلاتوریا رشد سلول‌های MCF-7 را به صورت وابسته به دوز و زمان کاهش می‌دهد (نمودار۱). به طوری که بیشترین مهار تکثیر در ۲۴ ساعت مربوط به غلظت ۵۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بوده و از لحاظ آماری معنی‌دار بوده است (P <۰/۰۰۱) این در حالی بود که غلظت ۱/۵۶ میلی‌گرم در میلی‌لیتر نسبت به گروه کنترل اختلاف معنی‌داری را نشان نداده و از نظر آماری معنی‌دار نبوده است (p=۰/۹۹). مهار تکثیر سلولی و بقای سلول‌های MCF-7 در مدت زمان ۴۸ ساعت نشان داد که بیشترین میزان مهار مربوط به غلظت‌های ۵۰ mg/ml و ۲۵ است که از لحاظ آماری معنی‌دار بود (P<۰/۰۰۱). در حالیکه غلظت mg/ml ۱/۵۶ مهار رشد کمتری از سلولها نسبت به گروه کنترل نشان داده که از نظر آماری معنی‌دار نبوده است (P=۰/۷۸). نتایج محاسبه میزان IC_{50} مربوط به عصاره سیانوباکتری اسیلاتوریا در زمان ۲۴ ساعت برابر ۱/۲۴۵ ±۱۱/۸ mg/ml (P<۰/۰۰۱) بدست آمد و در ۴۸ ساعت (P<۰/۰۰۱) mg/ml ۰/۷۴۵ ± ۶/۰۳ محاسبه شد که در مقایسه با گروه کنترل معنی‌دار می‌باشند. تغییر در بیان ژن *Noxa* در سلول‌های MCF-7 تیمار شده با عصاره سیانوباکتری *Oscillatoria* با استفاده از روش Real Time PCR بعد از ۴۸ ساعت مورد ارزیابی قرار گرفت. بدین ترتیب نسبت بیان ژن *Noxa* به ژن مرجع در رده سلولی تیمار شده با عصاره به میزان ۱/۶±۳۳/۹۳ (P<۰/۰۰۱) افزایش یافت که نشان‌دهنده تاثیر مثبت عصاره سیانوباکتری *Oscillatoria* در افزایش بیان ژن *Noxa* می‌باشد نمودار ۲.

مربع سمت چپ پایین: سلولهای زنده، مربع سمت چپ بالا: آپوپتوز اولیه، مربع سمت راست پایین: نکروز، مربع سمت راست بالا: آپوپتوز تاخیری. در نمونه‌های تحت تیمار با عصاره، سلولها وارد آپوپتوز اولیه با ۱۷/۴۳٪ و ۱۲/۱۷٪ آپوپتوز ثانویه شده‌اند.



نمودار۱: درصد بقای سلول‌های MCF-7 در برابر غلظت‌های مختلف عصاره‌ی سیانوباکتری اسیلاتوریا در مدت زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت ; نتایج به صورت درصد بقا در مقایسه با نمونه‌های کنترل گزارش شده است (*: P <۰/۰۵ ، **: P <۰/۰۱ ، *** P <۰/۰۰۱ : n=3).

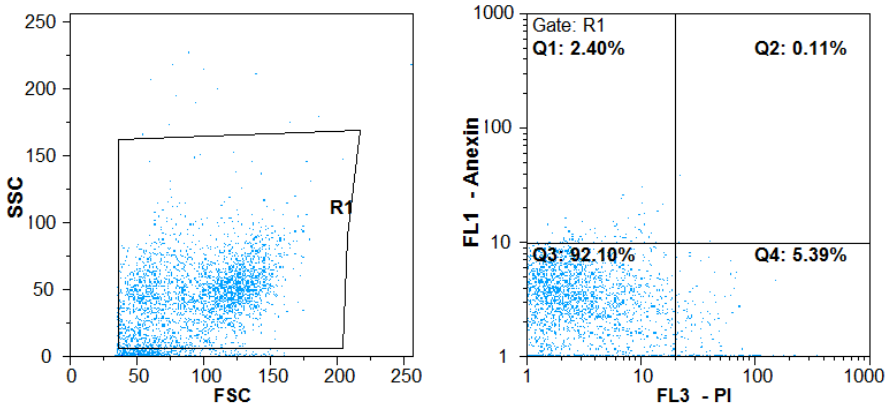


نمودار۲: بیان ژن *Noxa* : ژن *β-actin* به عنوان گروه کنترل و *Noxa* به عنوان گروه تیمار شده باغلظت IC_{50}بدست آمد

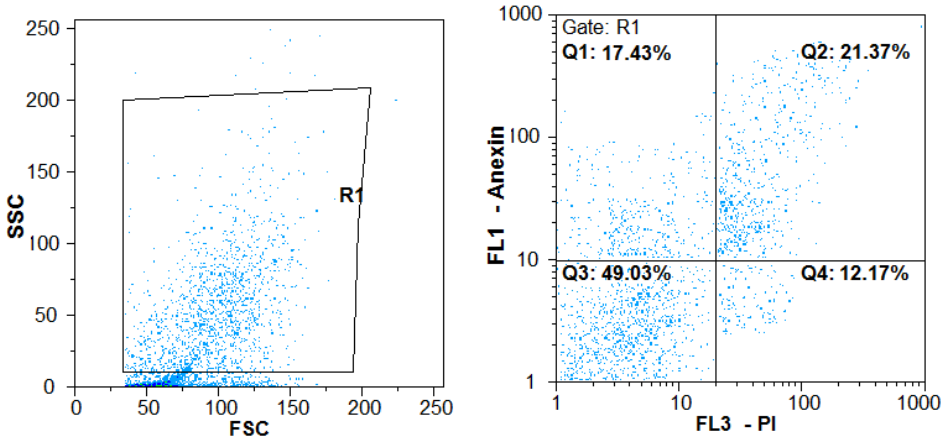
بررسی میزان درصد آپوپتوز و نکروز القاء شده در سلول‌های سرطان پستان تیمار شده با عصاره‌ی سیانوباکتری اسیلاتوریا با استفاده از کیت annexin V/PI رنگ‌آمیزی شده و سپس توسط دستگاه فلوسایتومتری مطالعه شد. در طی مرحله آپوپتوز اولیه، فسفولیپیدهای فسفاتیدیل سرین (PS) به بیرون از غشاء پلاسمایی سلول منتقل شده و توسط انکسین ۵ رنگ می‌شوند. همچنین هسته سلول نیز در زمان نکروز با معرف PI رنگ می‌گیرد. یافته‌های حاصل از بررسی فلوسایتومتری نشان داد که عصاره‌ی سلولی سیانوباکتری اوسیلاتوریا بر روی آپوپتوز و نکروز موثر می‌باشد. در خوانش اول توسط فلوسایتومتری تعداد سلول‌ها در

مناطق Q_1، Q_2، Q_3 و Q_4 به ترتیب برابر ۲/۴۰٪، ۰/۱۱٪، ۹۲/۱۰٪ و ۵/۳۹٪ بود که بعد اثر دادن عصاره سلولی به ترتیب ۱۷/۴۳٪، ۲۱/۳۷٪ ، ۴۹/۰۳٪ و ۱۲/۱۷٪ تغییر یافتند. با توجه به مقادیر بالا میزان درصد آپوپتوز و نکروز رده‌ی سلول به ترتیب برابر ۳۸/۰۸٪ و ۱۲/۱۷٪ افزایش یافت (نمودار۴).

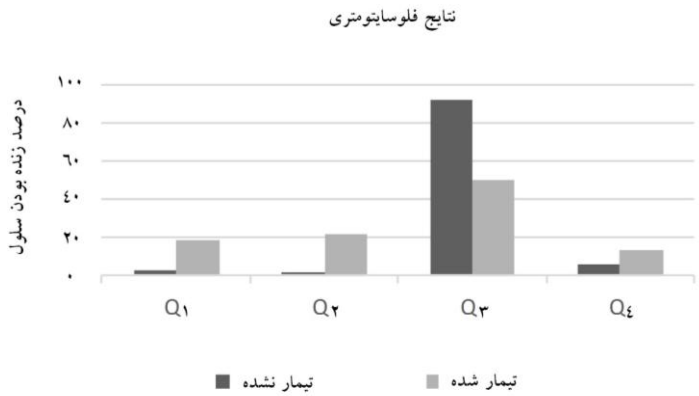
(الف)



(ب)



نمودار ۳: نتایج آنالیز فلوسایتومتری تاثیر عصاره اسیلاتوریا بر روی رده سلولی سرطان پستان. نمونه کنترل تیمار نشده (الف)، نمونه تحت تیمار با عصاره (ب)



نمودار۴ : تصویر مربوط به سلول MCF-7 تیمار شده و تیمار نشده. با توجه به نمودار میزان آپوپتوز و نکروز به طور کلی ۴۳/۰۷٪ افزایش یافته است.

بحث

سرطان پستان به عنوان یکی از انواع سرطان‌های پیشرو در تعدد موارد جدید تشخیصی بوده و به عنوان دومین عامل مرگ در بین سرطان‌های شایع می‌باشد (۱۸). یکی از مهمترین و بیشترین درمان‌هایی که امروزه برای سرطان‌ها در دسترس است، شیمی‌درمانی می‌باشد که اثرات جانبی جدی و تهدید کننده‌ای برای فرد دارد. از طرفی منجر به شکست درمان، مقاومت در برابر داروها، اثرات جانبی احتمالی و اثر بخشی محدود بر پیشرفت سلولهای سرطانی مقاوم به دارو می‌شود. کشف داروی جدید یک فرآیند طولانی و پرهزینه است که ممکن است ۱۵ تا ۲۰ سال طول بکشد و میلیاردها دلار هزینه در برداشته باشد. بنابراین رویکرد جامعه جهانی در جهت تولید داروهایی موثر، مقرون به صرفه و همچنین بکارگیری ابزارهای جدید در جهت انتقال دارو برای افزایش کارایی و کاهش اثرات جانبی آنهاست. در این میان، پژوهش‌ها نشان می‌دهد که ترکیبات طبیعی از ارگانیسم‌ها مانند سیانوباکتری‌ها دارای اثرات ضدسرطانی از طریق فعال نمودن مرگ سلولی آپوپتوز می‌باشد (۱۹). محیط زیست دریایی، منبع سرشار از فرآورده‌های طبیعی با کاربردهای درمانی گسترده بوده که مورد توجه بسیاری از محققان می‌باشد. به طوری که برخی از پپتیدها و متابولیت‌های ثانویه مشتق شده از این موجودات، تحت مراحل مختلف کارآزمایی‌های بالینی هستند. سیانوباکتریها به اشکال دریایی و به‌صورت عمومی به‌طور خاص سرشار از مواد فعال زیستی جدید (شامل توکسینها) برای کاربردهای دارویی و ضد تکثیری قوی علیه سلولهای سرطانی هستند (۲۰). در تحقیق حاضر، اثر غلظت‌های مختلف عصاره سیانوباکتری اسیلاتوریا بر روی رده سلولی سرطان پستان MCF-7 از نظر سمیت مورد بررسی قرار گرفت. نتایج بررسی زنده ماندن رده سلولی نشان داد که عصاره سیانوباکتر اسیلاتوریا پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت از زمان واکنش باعث کاهش زنده ماندن سلول‌ها تحت تاثیر عصاره می‌شود. در واقع بین غلظت‌های مختلف عصاره اختلاف معنی‌داری مشاهده شد. در این تحقیق غلظت‌های مختلف عصاره پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت مورد بررسی قرار گرفتند و نتایج معنی‌داری آنها مشاهده شد. در طی ۲۴ ساعت مشاهده شد که غلظت ۵۰ میلی‌گرم بیشترین مهار را دارا بوده و در ۴۸ ساعت، رشد MCF-7 به‌طور محسوسی کاهش می‌یابد. پژوهش‌های دیگری تاثیر مهارکنندگی عصاره سیانوباکتر بر تکثیر سلول‌های سرطانی با القا مرگ سلولی آپوپتوز را گزارش نمودند و مشاهدات آنها نشان داد که فیکوسیانین موجود در عصاره سیانوباکتری از طریق فعال نمودن پروتئین‌های کاسپاز در مسیر بیرونی آپوپتوز، مرگ سلولی را به راه می‌اندازند (۲۱). در تحقیقی دیگر که در سال ۲۰۱۴ انجام شد، Kyadari و همکاران نشان دادند گونه‌های *Lyngbya officinalis* و *Oscillatoria.sp* می‌توانند منجر به کاهش تکثیر سلول‌های سرطانی دهانه رحم انسانی شوند. در گزارش آنها مقدار IC_{50} مربوط به *L .officinalis* و *Oscillatoria* برابر ۰/۲۶۰ و ۰/۲۲۰ به دست آمد بود که غلظت‌های مختلف آن عاملی موثر بر مهار سرطان بوده است (۲۲). همچنین بررسی اثرات سمیت عصاره *Oscillatoria terebriformis* بر روی رده سلولی سرطانی ریه A549 توسط Mukund در مدت زمان ۴۸ ساعت از زمان واکنش با استفاده از روش رنگ‌سنجی MTT انجام گرفت. در گزارش آن‌ها مشخص شد که مقدار IC_{50} عصاره سیانوباکتری *Oscillatoria* بر روی رده سلولی، ۱۴/۶۷±۰/۹۸۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر می‌باشد. بنابراین مهار تکثیر سلول‌های سرطانی به طور قابل توجهی با استفاده از عصاره سیانوباکتر به اثبات رسید (۲۳). یافته‌های حاصل از تحقیق حاضر، با نتایج پژوهشگران فوق مطابقت دارد و وجود اختلاف ناچیز را می‌توان به غلظت و نوع عصاره‌های انتخاب شده که عامل تاثیرگذار در مهار سرطان دارد، مرتبط دانست. در این تحقیق، برای اولین بار ارزیابی کمی بیان ژن *Noxa* تحت تاثیر غلظت‌های مختلف عصاره سیانوباکتر اسیلاتوریا با استفاده از روش real time PCR در رده سلولی سرطان پستان نشان داد که بیان این ژن به‌طور معنی‌داری نسبت به نمونه کنترل افزایش می‌یابد. می‌توان پیشنهاد داد که اثرات مرگ سلولی عصاره سیانوباکتر اسیلاتوریا می‌تواند از طریق تنظیم بیان ژن *Noxa* اعمال شود. بنابراین افزایش بیان ژن *Noxa* و خاصیت القای مرگ سلولی را می‌توان به‌دلیل وجود ترکیبات ویژه در عصاره اسیلاتوریا نسبت داد. در این تحقیق علاوه بر ارزیابی بیان ژن، انجام تست فلوسایتومتری به منظور تایید میزان آپوپتوز و نکروز القاء شده توسط عصاره اسیلاتوریا انجام گرفت. در تست فلوسایتومتری از معرف انکسین ۵ برای تشخیص سلول‌های آپوپتوز شده و از پروبیوم یداید برای تشخیص سلول‌های نکروز شده استفاده شد. طی مرحله آپوپتوز براساس جابجایی فسفاتیدیل سرین از نیم لایه داخلی غشاءسلولی به نیم لایه خارجی آن معرف انکسین به آن متصل می‌شود. در تحقیق کنونی نتایج فلوسایتومتری نشان داد که عصاره سیانوباکتری اسیلاتوریا توانایی القاء مرگ سلولی آپوپتوز نسبت به نکروز در رده سلولی سرطان پستان را دارد که در گزارشات قبلی انجام نگرفته بود. از آنجا که مرگ سلولی از نوع نکروز با ایجاد التهاب در بافت تومور همراه است، بنابراین یافتن رویکردی جدید در جهت افزایش مرگ سلولی از نوع آپوپتوز در این سلول‌ها یکی از راه‌های موثر در درمان سرطان به شمار می‌رود.

نتیجه‌گیری

در این تحقیق برای اولین بار اثرات آپوپتوزی و ضد سرطانی عصاره سیانوباکتری اسیلاتوریا در افزایش بیان ژن *Noxa* در رده سلولی سرطانی پستان MCF-7 نشان داده شد. بنابراین با توجه به

عوارض جانبی داروهای شیمی‌درمانی سرطان، می‌توان ارگانیسم‌های دریایی مانند سیانوباکتری‌اسیلاتوریا را جهت مصرف منطقی ترکیبات این سیانوباکتری برای کمک درمانی انواع سرطان-ها مورد مطالعه قرار داد و اثرات ضد سرطانی آنها را در مدل‌های حیوانی مورد ارزیابی قرار داد. همچنین ارزیابی بیان ژن‌های دیگر مسیر آپوپتوز و درک بیشتر مکانیسم اثر، در این زمینه ضروری به نظر می‌رسد. از این رو، پتانسیل بالقوه دارویی سیانوباکتری سزاوار توجه بیشتر در تحقیقات عملی و داروسازی می‌باشد که می‌تواند نامزد خوبی در زمینه‌های مختلف درمانی از جمله سرطان باشد.

قدردانی

مقاله حاضر استنتاج شده از داده‌های پایان‌نامه مصوب دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت با شماره ۱۱۷۳۰۵۰۶۰۹۴۲۰۱۳ می‌باشد. در ضمن از تلاش کارکنان شرکت دانش بنیان جاوید بیوتیک به‌خصوص جناب آقای دکتر عسگری کمال تشکر و قدردانی را داریم.

ملاحظات اخلاقی

در این پژوهش، به علت عدم استفاده از نمونه‌های انسانی، ملاحظه اخلاقی وجود نداشت.

منابع مالی

این تحقیق با استفاده از امکانات آزمایشگاه تحقیقاتی میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت در قالب پایان نامه کارشناسی ارشد انجام گرفته است.

منافع متقابل

نویسندگان این مقاله اظهار می‌دارند که منافع متقابلی از تالیف یا انتشار این مقاله وجود ندارد.

مشارکت مولفان

ح.رحمت اللهی و ع. سادات شاندیز طراحی، اجرا و تحلیل نتایج مطالعه و همکاران نگارش مقاله را بر عهده داشتند. همچنین ع.صالح زاده نسخه نهایی مقاله را خوانده و تایید نموده‌اند.

References

1. Shandiz SAS, Khosravani M, Mohammadi S, Noorbazargan H, Mirzaie A, Inanlou DN, et al. Evaluation of imatinib mesylate (Gleevec) on *KAI1/CD82* gene expression in breast cancer MCF-7 cells using quantitative real-time PCR. *Asian Pac J Trop Biomed* 2016; **6**(2): 159-163. doi: 10.1016/j.apjtb.2015.10.006.
2. Mathers C D, Shibuya K, Boschi-Pinto C, Lopez A D, Murray C J L. Global and regional estimates of cancer mortality and incidence by site: I. Application of regional cancer survival model to estimate cancer mortality distribution by site. *BMC Cancer* 2002; **2**: 36-63. doi**:** 10.1186/1471-2407-2-36.
3. Harirchi I, Kolahdoozan S, Karbakhsh M, Chegini N, Mohseni S M, Montazeri A, et al. Twenty years of breast cancer in Iran: down staging without a formal screening program. *Ann Oncol* 2011; **22**(1): 93-97. doi: 10.1093/annonc/mdq303.
4. Mousavi S M, Montazeri A, Mohagheghi M A, Jarrahi A M, Harirchi I, Najafi M. Breast cancer in Iran: an epidemiological review. *Breast J* 2007; **13**(4): 383-391. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-03-0632.
5. Tabor M P, Brakenhoff R H, Ruijter-Schippers H J, Kummer J A, Leemans C R, Braakhuis B J. Genetically altered fields as origin of locally recurrent head and neck cancer: a retrospective study. *Clin Cancer Res* 2004; **10**(11): 3607-3613. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-03-0632.
6. Lin Y, Kikuchi S, Tamakoshi K, Kondo T, Niwa Y, Yatsuya H, et al. Active smoking, passive smoking and breast cancer risk: findings from the Japan Collaborative Cohort Study for Evaluation of Cancer Risk. *J Epidemiol* 2008; **18**(2): 77-83. doi: 10.2188/jea.18.77.
7. Cragg G M, Newman D J. Plants as a source of anticancer agents. *J Ethnopharmacol* 2005; **100**(1-2): 72-79. doi: 10.1016/j.jep.2005.05.011.
8. Niwa T, Bradlow H L, Fishman J, Swaneck G E. Induction and inhibition of estradiol hydroxylase activities in MCF-7 human breast cancer cells in culture. *Steroids* 1990; **55**(7): 297-302. doi: 10.1016/0039-128X(90)90032-7.
9. Honardoos M, Soleimanjahi H, Rajaei F. Apoptosis: programmed cell death. *JQUMS* 2013; **17**(3): 48-57. [Persian].
10. Devarajan E, Sahin A A, Chen J S, Krishnamurthy R R, Aggarwal N, Brun A M, et al. Down-regulation of caspase 3 in breast cancer: a possible mechanism for chemo resistance. *Oncogene* 2002; **21**(57): 8843-8851. doi: 10.1038/sj.onc.1206044.
11. Grinberg M, Sarig R, Zaltsman Y, Frumkin D, Grammatikakis N, Reuveny E, et al. tBID Homooligomerizes in the mitochondrial membrane to induce apoptosis. *J Biol Chem* 2002; **277**(14): 12237-12245. doi: 10.1074/jbc.M104893200.

12. Corbett T, Lowichik N, Pugh S, Polin L, Panchapor C, White K, et al. Antitumor activity of N-[[1-[[2 (diethyl amino)ethyl] amino]-9oxo-9H-Thioxanthen-4-yl]methyllmethanesulfonamide (WIN33377) and analogs. *Exp Opin Invest Drugs* 2008; **3**(12): 1281-1292. doi: 10.1517/13543784.3.12.1281.
13. Luesch H, Moore R E, Paul V J, Mooberry S L, Corbett T H. Isolation of dolastatin 10 from the marine cyanobacterium Symploca species VP642 and total stereochemistry and biological evaluation of its analogue symplostatin 1. *J Nat Prod* 2001; **64**(7): 907-910. doi: 10.1021/np010049y.
14. Xiong C, O'Keefe B R, Byrd R A, McMahon J B. Potent anti-HIV activity of scytovirin domain 1 peptide. *Peptides* 2006; **27**(7): 1668-1675. doi: 10.1016/ j.peptides.2006.03.018.
15. Ha J H, Hidaka T, Tsuno H. Quantification of toxic Microcystis and evaluation of its dominance ratio in blooms using real-time PCR. *Environ Sci & Technol* 2009; **43**(3): 812-818. doi: 10.1021/es801265f.
16. Namiki M. Antioxidants antimutagens in food. *Crit Rev Food Sci Nutr* 1990; **29**(4): 273-300. doi: 10.1080/10408399009527528.
17. Grindberg R V, Shuman C F, Sorrels C M, Wingerd J, Gerwick W H. *Neurotoxic Alkaloids from Cyanobacteria. In Modern Alkaloids, Structure, Isolation, Synthesis and Biology*;.Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.: Weinheim, Germany, 2008; 139-170. doi: 10.1002/9783527621071.ch6.
18. Tripathi A, Fang W, Leong D T, Tan L T. Biochemical studies of the lagunamides, potent cytotoxic cyclic depsipeptides from the marine cyanobacterium *Lyngbya majuscula*. *Marine drugs* 2012; **10**(5): 1126-1137. doi: 10.3390/md10051126.
19. Bajpai R, Sharma N K, Rai A K. Usha Hepatosplenomegaly and phytotoxicity of a planktonic cyanobacterium *Nostoc* sp. BHU001 isolated from agricultural pond, *World J Microbiol Biotechnol* 2009; **25**(11): 1995-2003. doi: 10.1007/s11274-009-0100-9.
20. Fleming L E, McDonough N, Austen M, Mee L, Moore M, Hess P, et al. Oceans and Human Health: A rising tide of challenges and opportunities for Europe. *Marine Environmental Res* 2014: **99**(3): 16-19. doi: 10.1016/j.marenvres.2014.05.010
21. Wang H, Liu Y, Gao X, Carter Ch, Liu Z. The recombinant b subunit of C-phycocyanin inhibits cell proliferation and induces apoptosis. *Cancer Letters* 2007; **247**(1): 150-158. doi: 10.1016/j.canlet.2006.04.002.
22. Kyadari M, Fatma T, Velpandian T, Malliga P, Bharat N, Bano F. Antiangiogenic and anti-proliferative assessment of cyanobacteria. *Indian J Exp Biol* 2014; **52**(8): 835-842.
23. Mukund S, Sivasubramanian V. Anticancer Activity of *Oscillatoria Terebriformis* Cyanobacteria in Human Lung Cancer Cell Line A549. *Int J Applied Biol Pharmaceutical Technol* 2014; **5**(2): 34-45.