مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد
دوره ۲۴، شماره ۱، فروردین ۱۳۹۵
صفحه: ۱۱-۱

Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences
Vol. 24, No.1, Apr 2016
Pages: 1-11

افزایش بیان ژن کاسپاز ۳ در رده سلولی MCF7 سرطان سینه تحت تأثیر عصاره هیدروالکلی سیاه‌دانه

فاطمه مشتاقی[۱]، صدیقه اسمعیل‌زاده‌بهابادی*[۲]، مهتا مظاهری[۳]، شهلا نجفی[۴]، فاطمه دهمرده قلعه‌نو[۵]

چکیده

مقدمه: وجود مشکلاتی نظیر شکست درمان، مقاومت در برابر دارو، سنگینی هزینه‌ها و دیگر مشکلات مرتبط با درمان سرطان، باعث شده است که گیاهان دارویی علاقه بسیاری از محققان را در این زمینه به خود جلب کند، زیرا گیاهان دارویی عوارض جانبی کمتری در مقایسه با داروهای شیمیایی دارند. مطالعات نشان داده است سیاه‌دانه دارای اثرات ضد سرطانی است ولی با این وجود، مکانیسم مولکولی اثر آن در مرگ سلولی سلول‌های سرطانی مشخص نیست. لذا در پژوهش حاضر اثر عصاره هیدروالکلی سیاه‌دانه بر میزان بقاء رده سلولی MCF7 و بیان ژن کاسپاز ۳ بررسی شد.

روش بررسی: در این مطالعه پژوهشی، سلول‌های رده MCF7 با غلظت‌های مختلف عصاره هیدروالکلی سیاه‌دانه(۰، ۲۰۰، ۴۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تیمار شدند. تاثیر عصاره بر میزان بقاء سلولی توسط روش رنگ‌آمیزی با تریپان بلو و بیان ژن کاسپاز۳ با روش واکنش زنجیره پلیمرازی در زمان واقعی(Real time PCR) بررسی شد.

نتایج: نتایج این پژوهش نشان داد با افزایش غلظت عصاره و زمان، میزان بقاء سلول‌ها به طور معنی‌داری نسبت به شاهد کاهش می‌یابد. نتایج Real time PCR نشان داد که بیان ژن کاسپاز۳ در زمان ۷۲ ساعت تحت تاثیر غلظت‌های مختلف عصاره (۲۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) نسبت به گروه شاهد افزایش معنی‌داری دارد.

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد سیاه‌دانه احتمالاً از طریق افزایش بیان ژن کاسپاز ۳ باعث مرگ سلولی شود.

واژه‌های کلیدی: سرطان سینه، سیاه‌دانه، کاسپاز ۳

۱- کارشناسی ارشد ژنتیک، گروه زیست شناسی، دانشگاه زابل
۲- استادیار فیزیولوژی گیاهی، گروه زیست شناسی، دانشگاه زابل
۳- استادیار ژنتیک پزشکی، گروه ژنتیک، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید صدوقی یزد
۴- دانشیار گیاه‌شناسی(گیاهان دارویی)، گروه زیست شناسی، دانشگاه زابل
۵- مربی زیست شناسی سلولی و مولکولی، گروه زیست شناسی، دانشگاه زابل
* (نویسنده مسئول)؛ تلفن: ۰۹۱۵۵۳۳۹۰۴۹، پست الکترونیکی: esmaeilzadeh@uoz.ac.ir
تاریخ دریافت:۱۳۹۴/۶/۲۶ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۱۱/۸

مقدمه

سرطان سینه یکی از شایع‌ترین انواع سرطان است که هر ساله باعث مرگ ومیر فراوانی در بین زنان و مردان می‌شود(۱). علی‌رغم پیشرفت‌های بسیاری که در مورد تشخیص زود هنگام و درمان مناسب این بیماری صورت گرفته کماکان به عنوان مهمترین دلیل مرگ ناشی از سرطان در زنان مطرح است(۲).

سرطان سینه یک بیماری بیولوژیکی هتروژن است که در اثر تأثیر متقابل عامل‌های خطر وراثتی و محیطی ایجاد می‌شود و به تجمع پیش‌رونده تغییرات ژنتیک و اپی‌ژنتیک در سلول‌های سرطان سینه منجر می‌شود(۳،۴). هر چند که شیوع سالانه این بدخیمی در دنیا رو به افزایش می‌باشد، با این حال میزان شیوع آن در کشورهای دنیا متفاوت گزارش شده است(۵). با وجود این که بالاترین فراوانی این بدخیمی مربوط به کشورهای توسعه‌یافته است، اما تحقیقات نشان می‌دهد که شیب افزایش شیوع سرطان در کشورهای در حال توسعه بیشتر بوده و متوسط عمر بیماران مبتلا در این کشورها کمتر است(۶).

مطالعات انجام شده در داخل کشور نشان می‌دهند سرطان سینه در ایران به عنوان شایع‌ترین سرطان در زنان ایرانی مطرح بوده و اطلاعات موجود از افزایش شیوع این بدخیمی طی دو دهه گذشته در ایران حکایت دارد(۱،۷). وضعیت جغرافیایی، نحوه زندگی، رژیم غذایی، عوامل استرس‌زا مانند بالارفتن سن ازدواج و چاقی از جمله عوامل محیطی مستعدکننده ابتلا به سرطان سینه به شمار می‌روند(۲). از جمله راهکارهای درمانی سرطان سینه می‌توان به جراحی، شیمی‌درمانی و رادیوتراپی اشاره کرد(۸). با این حال میزان مرگ و میر در این بیماران بالا می‌باشد که خود حکایت از ناکارآمدی این روش‌های درمانی دارد. با وجود این واقعیت که بسیاری از تومورها ابتدا به شیمی‌درمانی پاسخ می‌دهند، سلول‌های سرطان سینه می‌توانند پس از آن زنده بمانند و به درمان مقاوم شوند(۹). نگرانی عمده بر اساس گزارش‌های اخیر توسعه مقاومت دارویی سلول‌های سرطانی است، این وضعیت به دلیل قرارگرفتن طولانی مدت بیمار در معرض درمان است(۱۰).

آپوپتوز(مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی)، که در پاسخ به عوامل تنش‌زای گوناگون مانند عوامل فیزیولوژیک، پاتولوژیک، یا محرک‌های سیتوتوکسیک در بدن رخ می‌دهد(۱۱)، نقش اساسی و مهمی در کنترل فیزیولوژی بدن و بسیاری از شرایط پاتولوژیک ایفا می‌کند(۱۲). بیماری‌هایی با قدرت نامحدود تکثیر، مثل سرطان در نتیجه تغییر در ژنوم ایجاد می‌شود. مطالعات نشان می‌دهد که حداقل شش تغییر در فیزیولوژی سلولی موجب رشد بدخیمی می‌شود که این تغییرات شامل خودکفا بودن در تکثیر سلولی، مقاوم بودن به سیگنال‌های بازدارنده تکثیر سلولی، فرارکردن از آپوپتوز، عدم محدودیت در پتانسیل تکثیر، تقویت رگ‌زایی(آنژیوژنز) و حمله به سایر بافت‌ها هستند. یکی از این تغییرات گریز از آپوپتوز است. مقاومت به آپوپتوز از نشانه‌های سرطان است و کاهش حساسیت به آپوپتوز منجر به افزایش آستانه درمانی برای موارد کلاسیکی مانند شیمی‌درمانی و رادیوتراپی می‌شود(۱۳). بنابراین یکی از اهداف در درمان سرطان، برگرداندن دوباره مکانیسم آپوپتوز در سلول‌های سرطانی است.

وجود مشکلاتی نظیر شکست درمان، مقاومت در برابر دارو، سنگینی هزینه‌ها و دیگر مشکلات مرتبط با درمان سرطان، باعث شده است که گیاهان دارویی علاقه بسیاری از محققان را در این زمینه به خود جلب کند زیرا گیاهان دارویی دارای عوارض جانبی کمتری نسبت به داروهای شیمیایی هستند(۱۴).

سیاه‌دانه (*Nigella Sativa*) یک گیاه علفی از خانواده آلاله است. این گیاه حاوی ۴ آلکالوئید مهم به نام دلکونیدین و کاسنولیدین و دلکوسین و دلکونین و مقداری اسانس فرار است. اسانس آن شامل نیژلون، کارون، سیمن، تیموکوئینون و ترکیبات دیگر است که مهم‌ترین ترکیب دارویی اسانس آن تیموکوئینون می‌باشد(۱۵). اخیراً بسیاری از اثرات بیولوژیکی عصاره سیاه‌دانه گزارش شده است که شامل اثرات ضدقارچی،

ضد باکتری و ضدویروسی می‌باشد(۱۵). مطالعات نشان داده است که گیاه سیاه‌دانه به دلیل وجود ترکیباتی نظیر تیموکینون و لینولئیک اسید دارای خاصیت سیتوتوکسیکی و آپوپتوتیک است(۱۶)، لذا با توجه به این که یکی از مکانیسم‌های عملکردی داروهای ضدسرطان القاء آپوپتوز است، بیان ژن کاسپاز -۳ از جمله ژن‌های القاکننده مسیر آپوپتوز در رده سلولی MCF7 سرطان سینه مورد بررسی قرار گرفت.

روش بررسی

این مطالعه از نوع تجربی می‌باشد و در سال ۱۳۹۳ در دانشگاه زابل انجام شد. جامعه آماری شامل ۲۷ نمونه بود که اثر سه تیمار (غلظت‌های ۰، ۲۰۰، ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره هیدروالکلی سیاه‌دانه) با سه تکرار، در سه زمان (۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت) بر میزان بقاء رده سلولی MCF7 و بیان ژن کاسپاز ۳ بررسی شد.

تهیه عصاره هیدروالکلی سیاه‌دانه

۵۰ گرم دانه سیاه‌دانه آسیاب‌شده و به صورت پودر در آمد. سپس درون یک بشر با CC ۲۰۰ اتانول ٪۷۰ مخلوط و به مدت ۴۸ ساعت روی شیکر قرار داده شد. بعد گذشت ۴۸ ساعت بشر حاوی مخلوط اتانول و پودر سیاه‌دانه از کاغذ صافی عبور داده و سپس در روتاری قرار داده شد تا حلال آن تبخیر شود. در نهایت عصاره در آون ۴۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده تا کاملاً خشک شود. برای تهیه استوک عصاره محلول، به ۱۰ میلی‌گرم پودر خشک عصاره، ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت فاقد سرم اضافه شد و ورتکس انجام شد تا پودر کاملاً در محیط کشت حل شود. محلول به دست آمده توسط فیلتر سرسرنگی ۰/۲۲۲ میکرون فیلتر شد و غلظت‌های مختلف(۲۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) تهیه شد.

کشت سلول و اعمال تیمار

رده سلولی MCF7 از بانک سلولی انیستیتو پاستور تهران تهیه گردید. از محیط کشت RPMI 1640 حاوی ٪۱۰ سرم جنین گاوی و آنتی بیوتیک pen/strep استفاده شد. برای تهیه محیط کشت، به ۵۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت به میزان ٪۱۰ یعنی ۵۰ میلی‌لیتر FBS و به ازای هر ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت، ۱ میلی‌لیتر(یعنی ۵ میلی‌لیتر به ۵۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت) آنتی‌بیوتیک(Pen/strep: Penicillin and Streptomycin) اضافه گردید. جهت نگهداری از سلول‌ها، مقدار مناسبی از سلول‌ها را به فلاسک انتقال داده و ۶ میلی‌لیتر محلول محیط کشت به آن اضافه شد. به منظور یکنواخت شدن توزیع سلول‌ها، به آرامی در جهت مختلف تکان داده شد. سپس فلاسک حاوی سلول‌ها به داخل انکوباتور CO_2 دار انتقال داده شد تا در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد حاوی ٪۵، CO_2 و ٪۹۵ رطوبت، کشت داده شود. در هر ویال پلیت ۶ خانه‌ای تعداد ۱×۱۰^{۶} ریخته و مقدار CC ۲ محیط کشت اضافه شد. جهت اتصال سلول‌ها به کف پلیت، پلیت‌های ۶ خانه‌ای به داخل انکوباتور CO_2 دار با دمای $^{\circ}C$ ۳۷ به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شدند. پس از گذشت ۲۴ ساعت، محیط کشت قبلی سلول‌ها خارج شد و CC ۲ محیط کشت فاقد سرم حاوی غلظت‌های مختلف(۲۰۰، ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) سیاه‌دانه به چاهک‌های مربوطه اضافه گردید و برای مدت زمان ۲۴، ۴۸، ۷۲ ساعت در داخل انکوباتور قرار داده شد.

بررسی میزان بقاء سلول‌ها

پس از گذشت زمان‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲ ساعت پلیت‌ها از انکوباتور خارج شدند، محیط کشت سلول‌ها خارج و به سلول‌ها جهت جداشدن از کف پلیت ترپسین اضافه شد. پس از جداشدن سلول‌ها از کف پلیت، به نسبت ۱:۱ تریپان بلو ۰/۴ درصد به سوسپانسیون سلولی جهت شمارش سلولی اضافه شد و ۲ دقیقه در انکوباتور (٪۵ CO_2و $^{\circ}C$ ۳۷) انکوبه شدند. مقدار ۱۰ میکرولیتر از مخلوط حاصل روی لام نئوبار قرار داده شد و به زیر میکروسکوپ معکوس منتقل شد. تعداد سلول‌های زنده و مرده در هر چهار سری خانه‌های شانزده تایی شمارش شده و میانگین گرفته شد. سلول‌های زنده نسبت به ورود رنگ نفوذناپذیر بوده و حال آنکه سلول‌های مرده رنگ را جذب می‌نمایند (سلول‌های زنده به صورت شفاف و بی رنگ و سلول‌های مرده به رنگ آبی دیده شدند) و در نهایت با استفاده از فرمول شماره ۱ میزان بقاء سلول‌ها در غلظت‌های مختلف سیاه‌دانه محاسبه شد.

فرمول شماره یک:

۱۰۰ × تعداد سلول ها در نمونه تیمار نشده / تعداد سلول‌ها در نمونه تیمار شده = میزان بقاء

بررسی بیان ژن کاسپاز ۳ با روش Real time PCR

استخراج RNA از سلول‌های رده MCF7 سرطان سینه با استفاده از ترایزول انجام شد. سپس کمیت و کیفیت آن با روش اسپکتروفتومتری و الکتروفورز ژل آگارز مورد ارزیابی قرار گرفت. برای ساخت cDNA از RNA های استخراج شده از کیتkit 2- Steps RT- PCR ساخت شرکت Vivantis استفاده شد. توالی پرایمرهای اختصاصی برای بیان ژن کاسپاز ۳ و همچنین ژن *GAPDH* به عنوان استاندارد داخلی در جدول ۱ نشان داده شده است. بررسی میزانبیان ژن های مورد نظر در تیمارها و زمتن های مختلف با استفاده از روش کمیت سنجی در زمان واقعی(Real time (PCR، Real time و با استفاده از دستگاه لایت سایکلر (RG-3000 Corbett Research) انجام گرفت. محلول واکنش Real time PCR شامل ۴ میکرو لیتر Master mix Hot Taq evagreen (GenAll, Korea)، ۲ میکرولیتر cDNA، یک میکرو لیتر از هر پرایمر (۲۰ پیکو مولار) و ۱۳ میکرو لیتر آب مقطر دیونیزه فاقد نوکلئاز بود. همچنین برنامه حرارتی برای تکثیر هر دو ژن با استفاده از آغازگرهای اختصاصی هر ژن تنظیم و برای کمیت سنجی روش Real time PCR مورد استفاده قرار گرفت (جدول ۲). برای بررسی اختصاصیت محصول تکثیر شده، منحنی ذوب مورد بررسی قرار گرفت. پس از انجام واکنش تکثیر به روش qReal time PCR داده‌های خام به صورت Ct (Threshold cycle) از دستگاه استخراج شد.. در انتها برای محاسبه نسبی تعداد نسخه mRNA تکثیر شده از روش مقایسه میزان تغییرات سطح آستانه هر ژن(Ct) با میزان آن در نمونه شاهد (ΔΔCt) استفاده شد برای هر نمونه ۳ تکرار بیولوژیکی و دو تکرار تکنیکی در نظر گرفته شد.

جدول ۱: توالی پرایمرها برای بیان ژن‌های کاسپاز۳ و GAPDH

نام ژن	توالی ('۳-'۵)	طول قطعه تکثیری (جفت باز)	دمای ذوب (درجه سانتی‌گراد)	درصد CG
Caspase3	F: AAGCGAATCAATGGACTCTGG R: CTGTACCAGACCGAGATGTC	۱۳۴	۵۹/۴ ۶۰/۵	۴۷/۶۲ ۵۵/۰
GAPDH	F: CCATGAGAAGTATGACAAC R :GAGTCCTTCCACGATACC	۱۶۱	۵۳ ۵۶/۱	۴۲/۱۱ ۵۵/۵۶

جدول۲: شرایط دمایی و زمانی واکنش Real time PCR

مرحله	دما و زمان مورد استفاده
فعال‌سازی ابتدایی آنزیم	۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه
	۴۰ چرخه شامل مراحل زیر
واسرشت شدن	۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه
اتصال آغازگرها	۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه
بسط ترکیبی	۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه

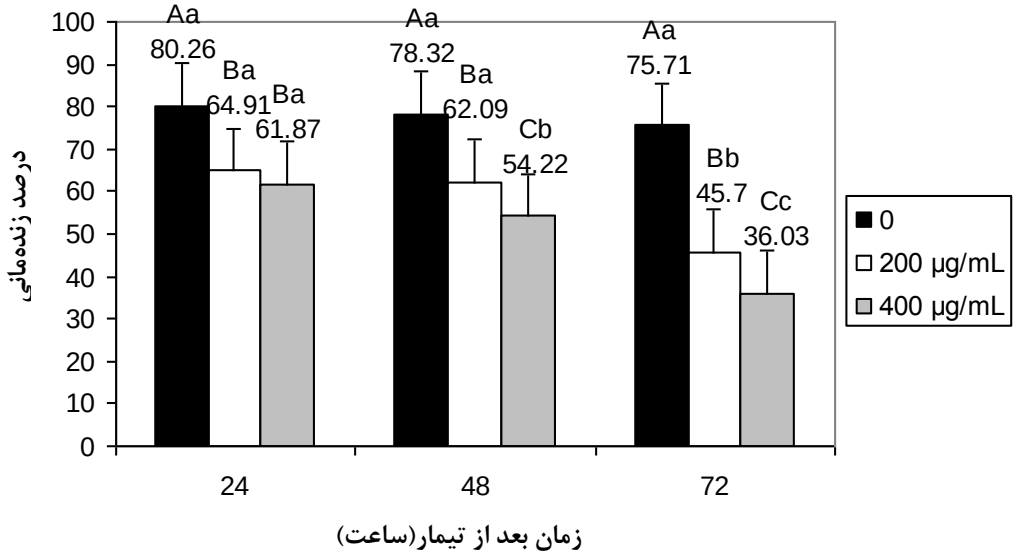
تجزیه و تحلیل داده‌ها

برای سنجش آماری داده‌ها از نرم‌افزار SPSS 19 استفاده شد. تمام نتایج به دست آمده به صورت Mean ± SD ارائه شد. برای مقایسه گروه‌ها از آزمون آماری ANOVA یک‌طرفه و به دنبال آن تست دانکن برای آزمون تفاوت بین گروه‌ها استفاده شد.

با استفاده از نرم‌افزار EXCEL نمودارهای مربوطه ترسیم گردید و در کلیه یافته‌ها P <۰/۰۵ به عنوان مرز معنی‌دار بودن از لحاظ آماری در نظر گرفته شد.

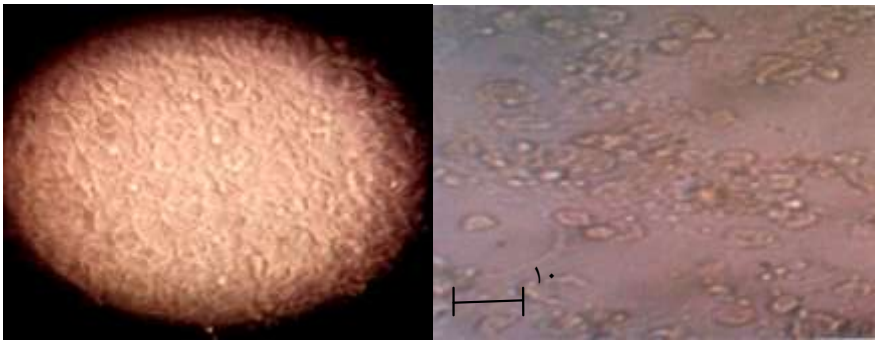
نتایج

نتایج حاصل از تیمار سلولی با عصاره الکلی سیاه‌دانه نشان داد که میزان بقاء سلول‌ها بعد از ۲۴ ساعت تحت تاثیر غلظت‌های ۲۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره، به طور معنی‌داری نسبت به شاهد کاهش یافت (P <۰/۰۵). البته میزان بقاء در غلظت‌های ۲۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر با هم اختلاف معنی‌دار نداشتند. همچنین بعد از گذشت ۴۸ ساعت از تیمار سلول‌ها، نتایج حاکی از آن بود که با افزایش غلظت عصاره الکلی سیاه‌دانه میزان بقاء سلول‌ها کاهش یافت. در زمان ۷۲ ساعت با افزایش غلظت عصاره به طور معنی‌داری کاهش میزان بقاء سلول‌ها مشاهده شد. به طور کلی میزان بقاء در سلول‌های شاهد با گذشت زمان اختلاف معنی‌داری نداشت. میزان بقاء در سلول‌های تحت تاثیر غلظت‌های۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در زمان ۴۸ ساعت تفاوت معنی‌دار با زمان ۲۴ ساعت نداشت ولی در زمان ۷۲ ساعت کاهش معنی‌دار نسبت به زمان ۴۸ ساعت مشاهده شد. میزان بقاء سلول‌ها تحت تاثیر غلظت ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در هر سه زمان بررسی اختلاف معنی‌دار داشتند و بیشترین کاهش در زمان ۷۲ ساعت مشاهده شد (P <۰/۰۵) (نمودار ۱).



نمودار ۱: میزان بقاء سلول‌های سرطان پستان MCF-7 تحت تاثیر عصاره هیدرو الکلی سیاه‌دانه در زمان‌های مختلف. مقادیر نشان داده شده میانگین ۳ تکرار و SD ± (انحراف معیار) می‌باشد. حروف بزرگ مشترک نشانه عدم تفاوت معنی‌دار سه تیمار در زمان مورد بررسی است. حروف کوچک مشترک نشانه عدم تفاوت معنی‌دار هر تیمار در زمان‌های مختلف است.

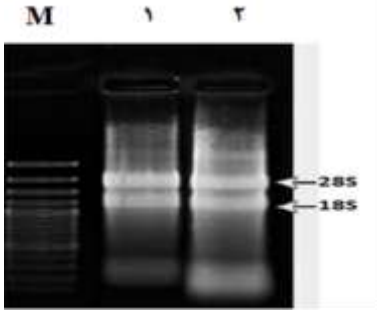
با توجه به مشاهده سلول‌های تیمار نشده (شکل A) و مقایسه مورفولوژی آنها با سلول‌های تیمار شده (شکل B) تفاوت مورفولوژی قابل رویت می‌باشد. در شکل B به خوبی کاهش حجم، متراکم شدن و تغییر شکل دیواره که نشانه‌های آپوپتوز است قابل مشاهده است (شکل ۱).



شکل ۱: مقایسه مورفولوژی سلول‌های کنترل و سلول‌های تیمار شده A: سلول‌های کنترل MCF7 B: سلول‌های تیمار شده MCF7

نتایج استخراج RNA

دو باندs28 و 18s به طور واضح قابل تشخیص هستند که حضور این باندها نشان‌دهنده سالم بودی RNA است(شکل ۲). عدم حضور باندهای اضافی نشان‌دهنده خلوص RNA است.



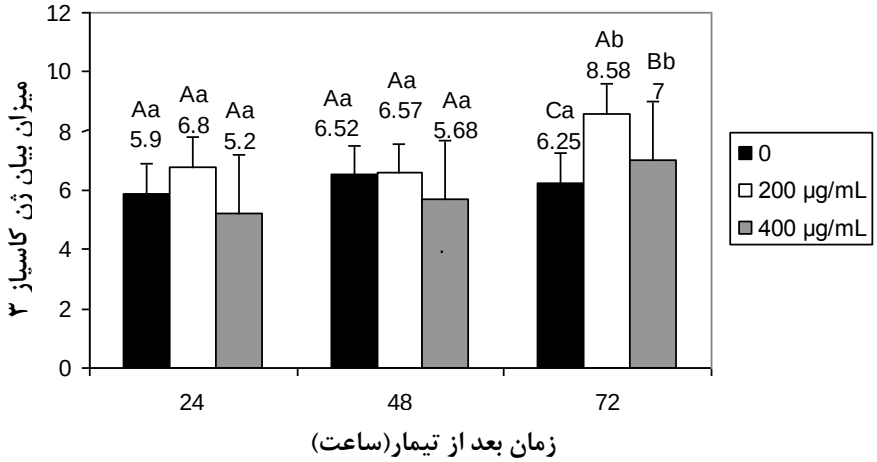
شکل ۲: نتایج چند نمونه استخراج RNA. ۱) سلول‌های تحت تیمار غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در زمان ۴۸ ساعت
۲) سلول‌های تحت تیمار غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در زمان ۷۲ ساعت

تاثیر عصاره هیدروالکلی سیاهدانه بر بیان ژن کاسپاز ۳

نتایج بررسی بیان ژن کاسپاز۳ نشان داد که بیان ژن کاسپاز۳ در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت اختلاف معنی‌داری با نمونه‌های شاهد نداشت. بیان ژن کاسپاز۳ در زمان ۷۲ ساعت تحت تاثیر غلظت‌های ۲۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره هیدروالکلی سیاه‌دانه به طور معنی‌داری نسبت به نمونه شاهد افزایش یافت (شکل ۳، نمودار ۲).

شکل ۳: تاثیر غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره هیدروالکلی سیاه‌دانه در زمان ۷۲ ساعت بر بیان ژن کاسپاز ۳.
میزان بیان نسبی mRNA ژن کاسپاز۳ پس از نرمال‌سازی با ژن GAPDH محاسبه شد.

به طور کلی نمونه‌های شاهد نسبت به هم با گذشت زمان هیچ‌گونه اختلاف معنی‌داری نشان ندادند، اما میزان بیان ژن در سلول‌های تحت تیمار غلظت‌های ۲۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در زمان ۷۲ ساعت نسبت به زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت تفاوت معنی‌دار نشان دادند ($P<0/05$). اما در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت این تفاوت، معنی‌دار نبود.



نمودار ۲: تغییرات بیان ژن کاسپاز۳ تحت تاثیر غلظت‌های مختلف عصاره هیدروالکلی سیاهدانه در زمان‌های مختلف. تغییرات بیان ژن کاسپاز ۳ تحت تاثیر تیمار نسبت به کنترل داخلی و در مقایسه با بیان همان ژن در نمونه‌های شاهد نشان داده شده است. مقادیر نشان داده شده میانگین ۳ تکرار وSD ± (انحراف معیار) می‌باشد. حروف بزرگ مشترک نشانه عدم تفاوت معنی‌دار در سه تیمار در زمان مورد بررسی است. حروف کوچک مشترک نشانه عدم تفاوت معنی‌دار هر تیمار در زمان های مختلف است.

بحث

با وجود پیشرفت‌های مهم در تشخیص و درمان سرطان، سرطان سینه از معضلات شایع زنان است. مقاومت به آپوپتوز از نشانه‌های سرطان است و کاهش حساسیت به آپوپتوز منجر به افزایش آستانه درمانی برای موارد کلاسیکی مانند شیمی‌درمانی و رادیوتراپی می‌شود. بنابراین یکی از اهداف در درمان سرطان، برگرداندن دوباره مکانیسم آپوپتوز در سلول‌های سرطانی است. نیاز به داروهای جدید همواره وجود داشته و محققان در سراسر جهان تلاش گسترده‌ای را در جهت شناسایی ترکیبات جدید طبیعی یا سنتزی با خواص ضد سرطانی معطوف داشته‌اند(۱۷). داروهای گیاهی به علت وجود عوارض جانبی کمتر نسبت به داروهای شیمیایی، اهمیت بیشتری در پیشگیری انواع سرطان دارند(۱۴). مطالعات نشان می‌دهد که سیاه‌دانه دارای اقدامات پیشگیرانه یا ضدسرطانی از طریق فعال‌کردن آپوپتوز می‌باشد(۱۸).

Tabassi و همکاران در سال ۲۰۱۲ تاثیر غلظت‌های مختلف عصاره الکلی سیاه‌دانه را بر میزان رشد و آپوپتوز سلول‌های سرطان کلیه رده ACHN و L929 (سلول سالم) کلیه بررسی کردند. نتایج بررسی آنها نشان داد که غلظت‌های ۷۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و بالاتر آن در رده سلولی ACHN و غلظت‌های ۱۲۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و بالاتر عصاره در سلول‌های رده L929 سبب کاهش معنی‌دار تعداد سلول‌های ACHN و L929 می‌شود. آنها نشان دادند که عصاره الکلی سیاه‌دانه دارای اثرات آپوپتوتیک و سایتوتوکسیک بر سلول‌های سرطانی ACHN در مقایسه با سلول‌های سالم L929 است(۱۹).

اثرات ضدسرطانی و سایتوتوکسیکی لینولئیک اسید سیاه‌دانه نیز بر رده‌های سلولی MDA-MB-231 و MCF-7 سرطان سینه نیز گزارش شده است(۲۰).

Hussein Zadegan و همکاران در سال ۲۰۱۰ اثرات سیتوتوکسیکی عصاره زیتون و چای سبز را روی رده سلولی سرطان سینه(BT474) بررسی کردند. نتایج آنها نشان داد که عصاره چای سبز با افزایش غلظت، باعث افزایش میزان لیز سلولی در ۸ و ۲۴ ساعت پس از تیمار می‌شود. بیشترین درصد لیز سلولی توسط عصاره زیتون در غلظت ۱ میلی‌گرم در دسی‌لیتر مشاهده شد و لیز سلول‌های تیمار شده با عصاره زیتون وابسته به غلظت بوده و با افزایش غلظت بیشتر می‌شد(۱).

اثر ضد سرطانی تاکسول و عصاره‌های الکلی و آبی رزماری بر سلول‌های سرطان سینه القا شده توسط DMBA در رت‌های نژاد SD بررسی شده است. عصاره الکلی رزماری و تاکسول بر

سلول‌های سرطانی دارای اثرات سمی قابل توجهی بودند ولی عصاره آبی خواص ضد سرطانی بسیار ضعیفی داشت، همچنین عصاره الکلی رزماری به صورت وابسته به غلظت قادر به از بین بردن سلول‌های سرطانی بوده و خاصیت سایتوتوکسیک قابل ملاحظه‌ای در مقایسه با داروی تاکسول دارد(۲۱).

اثر سمیت منوترپنوئید فروتینین (از گیاه رازیانه) بر روی دو رده سلولی MCF7 و $NTERA_2$ در ۳ زمان ۲۴، ۴۸، و ۷۲ ساعت گزارش شده است(۲۲). با توجه مطالعات محققین به نظر می رسد که گیاهان دارویی مختلف در انواع رده‌های سلولی سرطان‌ها اثرات سایتوتوکسیکی متفاوتی را نشان می‌دهند و پاسخ سلول‌ها بسته به غلظت عصاره گیاهی و مدت زمانی که سلول‌ها تحت تیمار قرار می‌گیرند متفاوت است. در مطالعه حاضر غلظت‌های مختلف (۰، ۲۰۰، ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) عصاره هیدروالکلی سیاه‌دانه در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بر میزان درصد زنده‌مانی سلول‌های MCF7 بررسی شد. نتایج این پژوهش نشان داد که عصاره هیدروالکلی سیاهدانه در زمان‌های مختلف سبب کاهش میزان بقاء سلول‌های سرطانی و القا پدیده آپوپتوز شد، به طوری که بیشترین میزان کاهش زنده مانی سلول‌های تحت تیمار در غلظت ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و زمان ۷۲ ساعت مشاهده شد.

در ادامه بیان ژن کاسپاز۳ با تکنیک Real time PCR در این سلول‌ها مورد بررسی قرار گرفت نتایج حاصله نشان داد که عصاره هیدروالکلی سیاه‌دانه سبب افزایش بیان ژن کاسپاز۳ بعد از گذشت ۷۲ ساعت می‌شود. بررسی منابع نشان می‌دهد مطالعات بسیار کمی در زمینه بررسی اثر عصاره گیاه سیاه‌دانه بر بیان ژن‌های مسیر آپوپتوز وجود دارد. Dilshad و همکاران در سال ۲۰۱۲ اثر عصاره الکلی سیاه‌دانه را روی تکثیر سلول‌های سرطانی MDA-MB231 و بیان ژن‌های کاسپاز۳، Bax و Bcl2 بررسی کردند. نتایج آنها نشان داد تکثیر سلولی در سلول‌های تیمار شده نسبت به نمونه‌های شاهد کاهش یافته است. همچنین بررسی بیان ژن‌ها با استفاده از روش Real-time PCR نشان داد که عصاره الکلی سیاه‌دانه سبب افزایش بیان ژن‌های Bax و کاسپاز۳ و کاهش بیان ژن Bcl2 می‌شود(۱۸). در گزارش دیگر عصاره متانولی سیاه‌دانه با افزایش غلظت و زمان در سلول‌های MCF7 سرطان سینه باعث افزایش بیان ژن‌های مسیر آپوپتوز از جمله کاسپاز ۸ و ۹ و p53 گردید(۲۳).

به طور کلی نتایج این تحقیق و سایر مطالعات انجام شده نشان دادکه عصاره هیدروالکلی سیاه‌دانه دارای اثر آپوپتوتیک و سیتوتوکسیک است. ضمن اینکه شروع اثر و شدت اثر بین رده‌های مختلف سلولی در سرطان‌های مختلف متفاوت است. برای توجیه اثرات ضدسرطانی عصاره الکلی سیاه‌دانه وترکیبات کینونی موجود در آن مکانیسم‌های مختلفی پیشنهاد شده است که بخشی از آن مربوط به تاثیر بر فعالیت آنزیم‌ها، مهار تکثیر سلولی، تغییر میزان گلوتاتیون سلولی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و از بین بردن رادیکال‌های آزاد و نیز القا آپوپتوز در سلول‌های سرطانی از طریق مسیرهای وابسته به p53 و مسیر غیروابسته به p53 می‌باشد. بنابراین به نظر می‌رسد که در میان این مکانیسم‌ها، القای مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی از مهم‌ترین مکانیسم‌های موثر در فعالیت ضد سرطانی عصاره الکلی سیاه دانه می‌باشد که یافته‌های این بررسی نیز آن را تایید می‌کند(۱۹).

در پایان قابل ذکر است که با توجه به مطالعه حاضر و سایر تحقیقات مرتبط، جهت مصرف منطقی این ترکیب به عنوان کمک درمانی انواع سرطان پیشنهاد می‌گردد مطالعات بیشتری روی این گیاه انجام شده و القای آپوپتوز به کمک تکنیک‌های دیگر نیز بررسی شود. همچنین بررسی بیان دیگر ژن‌های مسیر آپوپتوز و شناخت بیشتر مکانیسم اثر، مطالعه دیگر غلظت‌های عصاره و دفعات مصرف نیز در این زمینه ضروری به نظر می‌رسد.

References:

1- Hussein zadegan H, Ezat pour B, Abdollah pour F, Motamedi M, Rashidi pour M. ***Cytotoxic effects of olive and green tea extract on breast cancer cell lines.*** J Ardabil Univ Med Sci Health Serv 2010; 10(4): 287-94.

2- Moheghi N, Afshari JT, Brook A. ***The Cytotoxic Effect of Zingiber Afficinale in Breast Cancer (MCF7) Cell Line.*** J Ofogh Danesh 2011; 17(3): 28-34.

3- Antoniou AC, Easton DF. ***Models of genetic susceptibility to breast cancer.*** Oncogene 2006; 25(43): 5898-905.

4- Liu CY, Hung MH, Wang DS, Chu PY, Su JC, Teng TH, et al. ***Amoxifen induces apoptosis through cancerous inhibitor of protein phosphatase 2A–dependent phospho-Akt inactivation in estrogen receptor–negative human breast cancer cells.*** Breast Cancer Res 2014, 16: 431.

5- Farooq S, Coleman MP. ***Breast cancer survival in South Asian women in England and Wales.*** J Epidemiol Comm Health 2005; 59(5): 402-06.

6- Shibuya K, Mathers CD, Boschi-Pinto C, Lopez AD, Murray CJ. ***Global and regional estimates of cancer mortality and incidence by site: II. Results for the global burden of disease 2000.*** BMC Cancer 2002; 2(1): 1.

7- Harirchi I, Kolahdoozan S, Karbakhsh M, Chegini N, Mohseni SM, Montazeri A, et al. ***Twenty years of breast cancer in Iran: downstaging without a formal screening program.*** Ann Oncol 2011; 22(1): 93-7.

8- Guo J, Bourre L, Declan M, Soden, Gerald CO, Driscoll C. ***Can Non-Viral Technologies Knockdown the Barriers to siRNA Delivery and Achieve the Next Generation of Cancer Therapeutics?*** Biotechnol Adv 2011; 29(4): 402-17.

9- Yang HL, Chen CS, Chang WH, Lu FJ, Lai YC, Chen CC, et al. ***Growth inhibition and induction of apoptosis in MCF-7 breast cancer cells by Antrodia camphorate.*** Cancer Lett 2006; 231(2): 215-27.

10- Motaghed M, Al-Hassan FM, Hamid SS. ***Cellular responses with thymoquinone treatment in human breast cancer cell line MCF7.*** Pharmacognosy Res 2013; 5(3): 200-06.

11- Honardoos M, Soleimanjahi H, Rajaei F. ***Apoptosis: programmed cell death.*** JQUMS 2013; 17(3): 48-57.

12- Devarajan E, Sahin AA, Chen JS, Krishnamurthy RR, Aggarwal N, Brun AM, et al. ***Down-regulation of caspase 3 in breast cancer: a possible mechanism for chemoresistance***. Oncogene 2002; 21(57): 8843-51.

13- Habibi RM, Mohammadi RA, Delazar A, Halabian R, Soleimani RJ, Mehdipour A, et al. ***Effects of polygonum aviculare herbal extract on proliferation and apoptotic gene expression of MCF-7.*** DARU 2011; 19(5): 327-31.

14- Graidist P, Martla M, Sukpondma Y. ***Cytotoxic Activity of Piper cubeba Extract in Breast Cancer Cell Lines.*** Nutrients 2015; 7(4): 2707-18.

15- Musa D, Dilsiz N, Gumushan H, Ulakoglu G, Bitire M. ***Antitumor activity of an ethanol extract of Nigella sativa seeds.*** Biologia, Bratislava 2004; 59(6): 735-40.

16- Salomi MJ, Panikkar KR, Kesavan M, Donata SrK, Rajagopalan K. ***Anti-cancer activity of nigella sativa, Ancient Science of Life.*** 1989; 8(3-4): 262-66.

17- Tiecher B, Andrew PA. ***Anticancer drug development guide: preclinical screening clinical trials, and approval.*** Humana Press 2004; 2: 4-6.

18- Dilshad A, Abulkhair O, Nemenqani D, Tamimi W. ***Antiproliferative Properties of Methanolic Extract of Nigella sativa against the MDA-MB-231 Cancer Cell Line.*** Asian Pacific J Cancer Prev 2012; 13(11): 5839-42.

19- Tabassi N, Khajavi-Rad A, Mahmoudi M, Bahar-Ara J, Rastin M, HosainPour-Mashhadi M. ***Effect of alcoholic extract of Nigella sativa on proliferation and apoptosis of cells ACHN renal cancer Category.*** J Shahrekord Univ Med Sci 2010; 12(3): 7-14.

20- Ghahramanloo KH, Latiff LA, Hanachi P, Lajis NH. ***Inhabitation effect of linoleic acid, the ingredient of Nigella sativa (Black seed) on MDA–MB–231 and MCF–7 human breast cancer cells.*** J Fam Rep Health 2010; 4(4): 179-85.

21- Hamta A, Parvini P. ***Study of Cytotoxic Effects of Taxol and Rosemary Extracts on Cancerous Cells Derived From DMBA-induced Breast Cancer in SD.*** J Cell Tissue 2011; 2(2): 117-26.

22- Matin MM, Nakhaeizadeh H, Bahrami AR, Iranshahi M, Arghiani NN, Rassouli FB. ***Ferutinin, an Apoptosis Inducing Terpenoid from Ferula ovina.*** Asian Pac J Cancer Prev 2014; 15(5): 2123-28.

23- Alhazmi MI, Hasan TN, Shafi G, Al-Assaf AH, Alfawaz MA, Alshatwi AA. ***Roles of p53 and caspases in induction of apoptosis in MCF- 7 breast cancer cells treated with a methanolic extract of Nigella sativa seeds.*** Asian Pac J Cancer Prev 2013; 15(22): 9655-60.

Increasing Caspase3 Gene Expression in Mcf7 Breast Cancer Cell Line by Nigella Sativa Hydro Alcoholic Extract

Moshtaghi Fateme(MSc) [1], Esmaeilzade Bahabadi Sedighe (PhD) *[2], Mazaheri Mahta (MD) [3]
Najafi Shahla (PhD) [4] , Dahmardeh Ghalenoo Fateme (MSc) [5]

[1,2,4,5] *Department of Biology, University of Zabol, Zabol, Iran.*
[3] *Department of Genetics, Faculty of Medicine, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran.*

Received: 17 Sep 2015 ***Accepted:*** 28 Feb 2016

Abstract

Introduction: Problems related to cancer treatment such as treatment failure, drug resistance, heavy costs, etc. have attracted the interest of many researchers to the medicinal herbs, since they have fewer side effects than chemical drugs. The findings of different studies have demonstrated that although *Nigella Sativa* has anticancer effects, molecular mechanism of its effect on cell death of cancer cells is not yet well-recognized. Therefore, the present study aimed to explore the effect of *Nigella Sativa* on the viability of MCF7 breast cancer cell line as well as caspase3 gene expression.

Methods: In this study, MCF7 cell lines were treated with different concentrations of hydro alcoholic extracts of *Nigella sativa* (0, 200, 400 µg/mL) for 24, 48 and 72 h. Effects of the extract on cell viability and caspase-3 gene expression were analyzed by trypan blue staining and Real time PCR, respectively.

Results: The results of the current study revealed that cell viability significantly decreased in a dose and time dependent manner compared to the controls ($p < 0.05$). Real time PCR results showed that the expression of Caspase-3 under different concentrations of extract (200 and 400 µg/ml) significantly increased compared to the control group ($p < 0.05$).

Conclusion: *Nigella sativa* seems to cause cell death via increasing caspase-3 gene expression.

Keywords: Breast cancer; Caspase-3; *Nigella sativa*

This paper should be cited as:
Moshtaghi Fateme, Esmaeilzadeh Bahabadi Sedighe, Mazaheri Mahta, Najafi Shahla, Dahmardeh Ghalenoo Fateme. ***Increasing caspase3 gene expression in mcf7 breast cancer cell line by nigella sativa hydro alcoholic extract.*** J Shahid Sadoughi Univ Med Sci 2016; 24(1): 1-11.

Corresponding author: Tel: 09155339049, email: esmaeilzadeh@uoz.ac.ir