مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد
دوره ۲۳، شماره ۵، مرداد ۱۳۹۴
صفحه: ۵۱۸ -۵۰۸

Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences
Vol. 23, No.5, Jul-Aug 2015
Pages: 508-518

اثر عصاره هیدروالکلی میوه هندوانه ابوجهل بر بیان ژن کاسپاز ۳ در رده سلولی سرطان پستان MCF-۷

رقیه داودی[۱]، صدیقه اسمعیل زاده بهابادی[۲]، شهلا نجفی[۳]، مهتا مظاهری نائینی[*۴]

چکیده

مقدمه: سرطان پستان یکی از شایع‌ترین سرطان‌های زنان در سراسر جهان است. تلاش‌های زیادی به منظور درمان سرطان پستان صورت گرفته که از آن جمله می‌توان به روش‌هایی چون جراحی، رادیوتراپی و شیمی‌درمانی اشاره کرد. اثربخشی بالینی شیمی‌درمانی به واسطه اثرات جانبی، سمیت و مقاومت دارویی محدود شده است. بنابراین، علاقه رو به‌رشدی برای استفاده از گیاهان به عنوان یک منبع امیدوارکننده از درمان با داروهای جدید ضدسرطان و با کارایی بیشتر وجود دارد. هندوانه ابوجهل دارای اثرات سیتوتوکسیک و ضدسرطانی است ولی با این وجود، مکانیسم مولکولی اثر هندوانه ابوجهل در بروز مرگ سلولی سلول‌های سرطانی مشخص نیست.

روش بررسی: در این پژوهش آزمایشگاهی، اثر عصاره هیدروالکلی میوه هندوانه ابوجهل بر زنده‌مانی و بیان ژن کاسپاز ۳ در سلول‌های سرطان پستان MCF-۷ بررسی شد. بدین منظور سلول‌های سرطان پستان رده MCF-۷ کشت شده و توسط عصاره هیدروالکلی میوه هندوانه ابوجهل(با غلظت‌های مختلف)، به مدت ۲۴، ۴۸و ۷۲ ساعت تیمار شدند. تاثیر عصاره بر زنده‌مانی سلول‌ها توسط رنگ‌آمیزی تریپان بلو ارزیابی شد. در ادامه استخراج RNA انجام و پس از ساخت cDNA برای سنجش میزان بیان ژن کاسپاز ۳، Real-Time PCR انجام شد.

نتایج: این پژوهش نشان داد که با افزایش غلظت و زمان، زنده‌مانی سلول‌ها کاهش قابل ملاحظه و معنی‌داری نسبت به نمونه‌های کنترل داشته‌اند و همچنین نتایج Real-Time PCR نشان داد که بیان ژن کاسپاز ۳ در زمان‌های ۴۸ و ۷۲ ساعت به‌طور معنی‌داری نسبت به نمونه کنترل افزایش یافت.

نتیجه گیری: عصاره هیدروالکلی میوه هندوانه ابوجهل قادر به از بین بردن سلول‌های سرطانی MCF-۷ است که این می‌تواند ناشی از افزایش بیان ژن کاسپاز ۳ نسبت به نمونه‌های شاهد باشد.

واژه‌های کلیدی: سرطان پستان، هندوانه ابوجهل، کاسپاز ۳

۱- داشنجوی کارشناسی ارشد زیست شناسی، دانشگاه زابل، زابل، ایران
۲،۳- استادیار گروه زیست شناسی، دانشگاه زابل، زابل، ایران
۴- استادیار گروه ژنتیک، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید صدوقی، یزد، ایران
[*](نویسنده مسئول)؛ تلفن: ۰۹۱۲۴۵۴۷۰۳۰، پست الکترونیکی: mazaheri54@gmail.com
تاریخ دریافت:۱۳۹۴/۲/۲ تاریخ پذیرش:۱۳۹۴/۳/۲۱

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-25]

مقدمه

امروزه سرطان یکی از مهمترین مشکلات بهداشتی در سراسر جهان محسوب می‌شود و طبق آمار سازمان بهداشت جهانی، سرطان پس از بیماری‌های قلبی و عروقی دومین عامل مرگ و میر در جهان است و در هر دقیقه یک نفر(در جهان) در اثر بیماری سرطان جان خود را از دست می‌دهد(۱). طبق گزارش مرکز آمار سرطان ایران، سالانه بالغ بر ۵۱۰۰۰ مورد جدید ابتلا به سرطان در کشور شناسایی می‌شود و ۳۵۰۰۰ مرگ ناشی از سرطان در کشور رخ می‌دهد(۲). از بین سرطان‌های زنان، سرطان سینه مهمترین عامل نگران‌کننده سلامتی است، زیرا شایع‌ترین نوع سرطان و بعد از سرطان ریه دومین عامل مرگ و میر ناشی از سرطان در بین زنان است(۳). هر سال بیش از یک میلیون زن در جهان به این سرطان مبتلا می‌شوند از این تعداد سالیانه ۴۰۰۰۰۰ نفر فوت می‌کنند(۴). به گفته انجمن سرطان آمریکا، ۲۳۲۳۴۰ نفر مبتلا وجود دارد و از این تعداد، ۳۹۶۲۰ مورد در هر سال از سرطان سینه جان خود را از دست می‌دهند(۵). اگر چه سرطان پستان دارای کمترین نرخ ابتلا در ایران در مقایسه با سایر کشورهای آسیایی می‌باشد ولی در طی چهار دهه گذشته افزایش میزان ابتلا به این بیماری باعث شده که سرطان پستان به عنوان یکی از بیماری‌های بدخیم با فراوانی بسیار بالا در بین زنان ایرانی شناخته شود(۸-۶). بیشترین میزان شیوع سرطان سینه در کشورهای غربی و کشورهای توسعه‌یافته در گروه‌های سنی ۵۰ تا ۶۰ سال است در حالی‌که بیشترین میزان شیوع سرطان سینه در ایران سنین ۴۰ تا ۵۰ سال است(۱۱-۹). سرطان سینه یک بیماری پیچیده بوده که تعدادی عوامل خطرناک در پیدایش و گسترش آن دخیل هستند. این بدخیمی تا حد زیادی در برابر استراتژی‌های درمانی فعلی مقاوم باقی مانده و بسیاری از بیماران مبتلا به سرطان پستان دچار متاستاز شده و در نهایت جان خود را از دست می‌دهند(۱۲). علیرغم پیشرفت‌های فراوان در زمینه کنترل و درمان بیماری‌های بدخیم از جمله سرطان‌ها، پژوهش‌های زیادی در جهت شناخت مکانیسم‌های درگیر در رشد آنها(از طریق تکثیر سلولی یا رگ‌زایی) و ساخت و تولید داروهای مؤثر صورت می‌گیرد. از طرفی گیاهان دارویی بخش وسیعی از این پژوهش‌ها را به خود اختصاص داده‌اند. یکی از مکانیسم‌های ضدسرطانی، داروهای ضدسرطان آپوپتوزیس یا مرگ برنامه ریزی شده سلول است. هندوانه ابوجهل از جمله گیاهان دارویی است که دارای ترکیبات آنتی‌توموری و آنتی‌اکسیدانی است. هندوانه ابوجهل از خانواده کدویان، بومی نواحی گرم آفریقا و آسیا می‌باشد که در ایران در مناطق آذربایجان، لرستان، خوزستان، فارس، کرمان، بوشهر، جزیره قشم، بندرعباس، بلوچستان، خراسان و یزد به صورت وحشی می‌روید(۱۳). از مواد تشکیل‌دهنده هندوانه ابوجهل می‌توان به ترکیبات مهمی از جمله ساپونین‌ها، کولوسینتین‌ها، آلکالوئیدها، گلیکوزیدها و سیترولین اشاره کرد(۱۴). خاصیت ضدالتهابی و ضد درد عصاره آبدار میوه و دانه هندوانه ابوجهل(۱۵) و فعالیت ضدباکتریایی و ضدکاندیدایی آن(۱۶) و همچنین نقش آن در درمان دیابت و کاهنده کلسترول خون(۱۷) مورد مطالعه قرار گرفته و به اثبات رسیده است. در این پژوهش، تاثیر عصاره هیدروالکلی میوه هندوانه ابوجهل روی روند رشد رده سلولی سرطان پستان MCF-۷ و نقش بازدارندگی آن بر روی سلول‌های سرطانی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه آزمایشگاهی، جهت تهیه عصاره، ۵۰ گرم پودر میوه خشک شده هندوانه ابوجهل با ۲۰۰ سی سی اتانول ۷۰٪ مخلوط و روی شیکر قرار گرفت. پس از ۲۴ ساعت، مخلوط از کاغذ صافی عبور داده شد. محلول صاف شده در دستگاه روتاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت تا تغلیظ شده و سپس در آون با دمای ۶۰ درجه سانتی گراد خشک شد. برای تهیه استوک عصاره محلول، به ۲۰ میلی‌گرم پودر خشک عصاره،۱۰ میکرولیتر محیط کشت فاقد سرم اضافه و به آرامی تکان داده شد تا پودر کاملاً حل شود. محلول به‌دست آمده توسط فیلتر سرسرنگی ۰/۲ میکرون فیلتر شد و غلظت‌های ۲۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تهیه گردید.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-25]

رده سلولیMCF۷ از انستیتو پاستور تهران تهیه گردید. پس از اطمینان از عدم آلودگی محیط کشت سلولی، مقدار مناسبی از سلول‌ها را به فلاسک منتقل کرده و۶ میلی‌لیتر محیط کشت کره،(آلدریچ- سیگما، RPMI1640) به همراه ۵ درصد سرم جنین گاوی، ۱۰۰ واحد بر میلی‌لیتر پنی‌سیلین و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر استرپتومایسین اضافه شد. سپس فلاسک به انکوباتور کشت سلول انتقال داده شده تا در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و حاوی CO_2 ۵٪ و ۹۵٪ رطوبت کشت داده شود. تعداد ۱۰۰۰۰۰۰ سلول در هر ویال پلیت ۶ خانه‌ای کشت داده شد و به هر خانه ۲ میلی لیتر محیط کشت اضافه گردید. به منظور اتصال سلول‌ها به کف پلیت، پلیت به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور حاوی CO_2 در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شد. سپس محیط رویی سلول‌ها خارج و محیط کشت فاقد سرم حاوی غلظت‌های ۲۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از میوه هندوانه ابوجهل به هر چاهک اضافه شد. پلیت‌ها به مدت ۲۴ و ۴۸ و ۷۲ ساعت به انکوباتور منتقل و به ترتیب پس از ۲۴ و ۴۸ و۷۲ ساعت تمام خانه‌های پلیت‌ها تریپسین‌زنی شد. سپس با افزودن محیط کشت کامل، تریپسین غیرفعال شده و به نسبت۱:۱ تریپان بلو ۰/۴ درصد به هر خانه اضافه و پلیت‌ها به مدت ۲ دقیقه در انکوباتور ۳۷ درجه انکوبه شد. با استفاده از لام نئوبار، شمارش سلولی صورت گرفت. سلول‌های آبی رنگ به‌عنوان سلول‌های مرده و سلول‌های بی‌رنگ به عنوان سلول‌های زنده در نظر گرفته شد. سپس با استفاده از فرمول مربوطه درصد حیات سلول‌ها در غلظت‌های مختلف محاسبه گشت.

توالی mRNA ژن کاسپاز ۳ از سایت NCBI(National Center for Biotechnology Information) گرفته و با توجه به آن، توالی پرایمرهای مورد نظر طراحی شد. در طراحی پرایمرها سعی شد که هیچ اتصالی بین پرایمر یا پرایمرهای همسان صورت نگیرد. لذا دمای ذوب(Tm) و درصد بازهای سیتوزین و گوانین پرایمرها(GC) مورد توجه قرار گرفت. پرایمرها توسط نرم افزارBeacondesigner طراحی و توسط BLASTNCBI از مفرد بودن محل جفت شدن پرایمرها اطمینان حاصل گردید. پرایمرها از شرکت پیشگام بصورت لیوفیلیزه تهیه گرفته شد. مشخصات پرایمرها در جدول ۱ آورده شده است.

جدول۱: آغازگرهای مورد استفاده در این مطالعه

Gene	5'-3'	اندازه تولید	دمای ذوب	درصد
Cas;pase3	F AAGCGAATCAATGGACTCTGG R CTGTACCAGACCGAGATGTC	134	59.4	47.62
GAPDH	F CCATGAGAAGTATGACAAC R GAGTCCTTCCACGATACC	161	53.0	42.11

برای استخراج RNA، ۲ میلی‌لیتر ترایزول به سلول‌های تیمار شده با غلظت‌های مختلف اضافه گردید و نمونه به مدت ۵ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس میزان ۴۰۰ میکرولیتر کلروفرم به هر نمونه اضافه شد و پس از تکان دادن شدید در دمای اتاق به مدت ۱۵ دقیقه نگه داشته و سپس با سرعت ۱۲۰۰۰ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شد. بخش آبی بالایی با سمپلر به یک تیوب استریل منتقل و با ۵۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول مخلوط شد. پس از مدت زمان ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۱۲۰۰۰ سانتریفوژ شد. با خارج کردن فاز بالایی تیوب، یک میلی‌لیتر اتانول ۷۵ درصد به رسوب RNA اضافه شد. در ادامه، ترکیبات به مدت ۵ دقیقه در در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-25]

سرعت ۷۵۰۰ سانتریفوژ شده تا RNA شسته شود و بتوان فاز بالایی را خارج کرد. به منظور از بین بردن آلودگی‌های DNA به رسوب RNA، ۲۰ میکرولیتر DNase1 اضافه گردید. در مرحله آخر، RNA در ۳۰ میکرولیتر آب مقطر استریل حل شد. کیفیت و کمیت مکولکول‌های RNA به ترتیب با الکتروفورز ژل آگارز ۱/۵ درصد و با دستگاه طیف سنجی (اسکن دراپ- آلمان- آنالیتکا) مورد بررسی قرار گرفت. RNA حاصل شده برای استفاده در مطالعه بیان ژن، در دمای ۸۰- سانتی‌گراد نگهداری شد.

ساخت cDNA از RNAهای استخراج شده توسط کیت Steps RT – PCR kit – ۲ ساخت شرکت ویوانتیس به صورت زیر انجام شد. ابتدا مخلوط شماره یک مطابق جدول ۲ روی یخ آماده شد.

جدول۲: مواد مورد استفاده در سنتز رشته اول cDNA

مقدار	ماده
۵ میکرولیتر	Template
۱میکرولیتر	Primeroligodt
۱میکرولیتر	PrimerrandomHexamers
۱میکرولیتر	10MmdNTpsmix
تاحجم۱۰میکرولیتر	Noclease–freewater

رشته اول پس از سنتز، به مدت ۵ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه و سپس به مدت ۲ دقیقه روی یخ خشک قرار داده شد جهت سنتز رشته دوم از مواد ارائه شده در جدول ۳ استفاده‌گردید.

جدول ۳: مخلوط دوم جهت ساخت cDNA

مقدار	ماده
۲ میکرولیتر	BufferM-MulV10X
۰/۵میکرولیتر	M-MulV
تاحجم۱۰میکرولیتر	Nuclease-freewater

مولکول‌های cDNA جهت آنالیز بیان ژن در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد.

برای به دست آوردن دمای بهینه اتصال پرایمرها و اطمینان از بیان ژن واکنش زنجیره‌ای پلیمرازی با شیب دمایی، توسط دستگاه ترموسایکلر ساخت شرکت mastercycler (–gradient) eppendorf انجام گرفت. دما از۵۰ تا۶۰ درجه سانتی‌گراد در نظر گرفته شد. در دمای بهینه مربوط به هر پرایمر واکنش زنجیره ای پلیمراز توسط کیت ۲stepRT-PCR(سیناژن- ایران) انجام گردید.

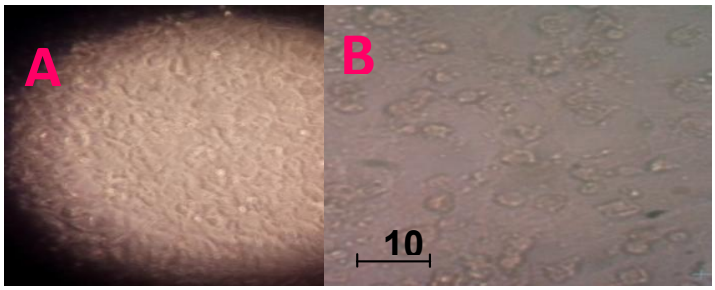
بررسی بیان ژن مورد مطالعه در حالت القاء به‌وسیله عصاره هندوانه ابوجهل با استفاده از روش کمیت سنجی با استفاده از دستگاه لایت سایکلر ساخت شرکت کوربت (استرالیا- کوربت ۳۰۰۰) انجام شد. محلول واکنش با حجم ۲۰ میکرولیتر در تیوب‌های مخصوص تهیه گردید. این محلول شامل ۲ میکرولیتر(۵۰ نانوگرمcDNA) ۱ میکرولیتر از هر آغازگر(۲۰ پیکومولار)،۱۰ میکرولیتر Hot Tag EvaGreen qPCR premix[with Rox dye (Biotium,- USA) ساخت شرکت سینا ژن و حجم محلول واکنش با استفاده از آب مقطر دو بار تقطیر عاری از آنزیم RNase به۲۰ میکرولیتر تنظیم و برای انجام واکنش مورد استفاده قرار گرفت. چرخه‌های حرارتی واکنش شامل $^{\circ}C$ ۹۴ به مدت ۱۵ دقیقه و ۴۰ چرخه $^{\circ}C$ ۹۴ به مدت ۲۰ ثانیه، $^{\circ}C$ ۶۰ به مدت۲۰ ثانیه و $^{\circ}C$ ۷۲ به مدت۳۰ ثانیه تنظیم گردید. هر آزمایش در چهار تکرار بیولوژیکی و دو تکرار تکنیکی انجام شد، داده‌های حاصل از سطح آستانه چرخه‌های هر واکنش با استفاده از روش pffafl و معادله زیر مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت(۱۸). در این معادله، نسبت سطح بیان ژن هدف براساس راندمان واکنش زنجیره‌ای پلیمراز(E) برای ژن هدف(GOI) و مرجع(GHK) و همچنین تفاوت(Δ) نقطه تقاطع(CP) یا محل برخورد نمودار خطی تکثیر با خط مربوط به سطح آستانه تکثیر(Ct) یک نمونه در مقابل کنترل محاسبه می‌شود.

$$\text{Ratio}=\frac{\text{Efficiency}_{\text{GOI}}{}^{\Delta cp(\text{control-sample})}}{\text{Efficiency}_{\text{GHK}}{}^{\Delta cp(\text{control-sample})}}$$

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-25]

یافته‌ها

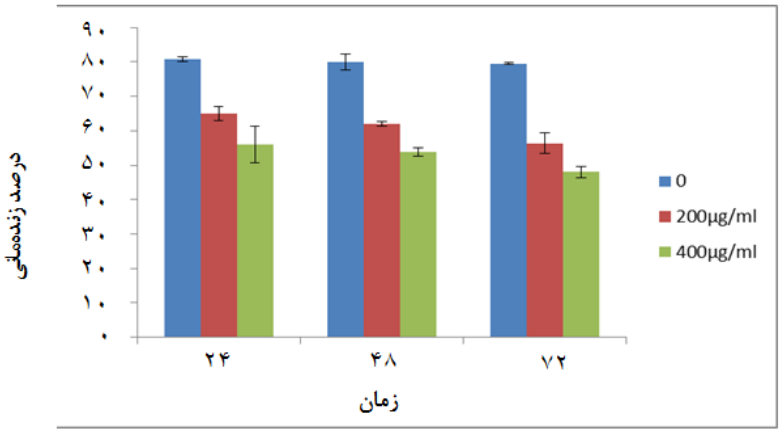
نتایج مورفولوژی رده سلولی MCF-۷ نشان داد که عصاره میوه هندوانه ابوجهل تغییرات قابل توجهی در مقایسه با سلول‌های کنترل(فاقد عصاره) در خصوصیات مورفولوژی سلول‌ها ایجاد نموده است شکل(۱).



شکل ۱: مورفولوژی سلول‌های MCF-۷ در سلول‌های شاهد(A) و سلول‌های تحت تیمار عصاره هیدروالکلی میوه هندوانه ابوجهل(B)

نتایج بررسی زنده‌مانی نشان داد که پس از ۲۴ ساعت، کاهش زنده مانی سلول‌ها تحت تاثیر عصاره الکلی هندوانه ابوجهل رخ داده است. درواقع بین غلظت‌های مختلف عصاره(۰ و ۲۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) پس از ۲۴ ساعت در این زمان اختلاف معنی‌داری مشاهده شد. بعد از گذشت ۴۸ ساعت، زنده‌مانی با افزایش غلظت عصاره الکلی کاهش یافت و اختلاف معنی‌داری بین غلظت‌ها مشاهده گردید.

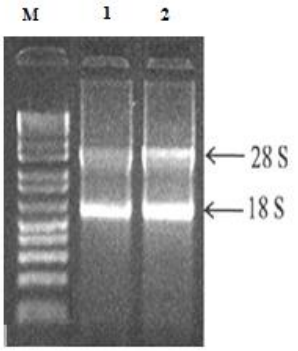
در زمان ۷۲ ساعت نیز با مشاهده نتایج، کاهش زنده مانی سلول‌ها مشاهده شد و غلظت صفر نسبت به غلظت ۲۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر اختلاف معنی‌داری را نشان داد. به طور کلی مقایسه زنده‌مانی تحت تاثیر غلظت‌های مختلف عصاره حاکی نشان داد زنده مانی در سلول‌های شاهد با گذشت زمان، اختلاف معنی‌داری ندارد. زنده‌مانی در سلول‌های تیمار شده با غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر پس از ۲۴ ، ۴۸ فاصله و ۷۲ ساعت نسبت به هم دارای اختلاف معنی‌داری بودند. زنده‌مانی در غلظت ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تنها پس از ۲۴ و ۷۲ ساعت اختلاف معناداری نشان داد. شکل(۲)



شکل ۲: درصد زنده‌مانی سلول‌های سرطان پستان MCF-۷ تحت تاثیر عصاره هیدرو الکلی میوه هندوانه ابوجهل در زمان‌های مختلف

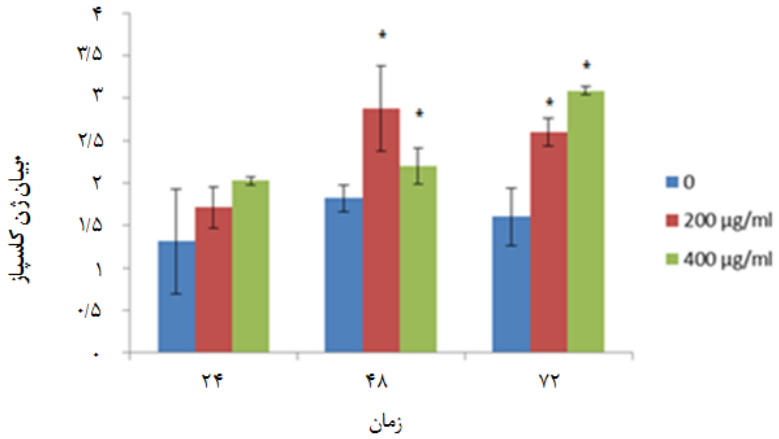
همان‌طور که در فصل ۳ بیان شد RNA از سلول‌ها استخراج شد و کیفیت RNAهای نمونه روی ژل بررسی شد. در شکل ۳، دو باند ۱۸ s و ۲۸ s به‌طور واضح قابل تشخیص هستند که حضور این باندها نشان‌دهنده سالم‌بودن RNA است.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-25]



شکل۳: نتایج استخراج RNA روی ژل آگارز ۱ درصدLadder 50 bp (M)

داده‌های حاصل از تجزیه و تحلیل آماری نشان داد که بیان ژن کاسپاز ۳ در زمان ۲۴ ساعت، بین غلظت‌های مختلف، اختلاف معنی‌داری ندارد. پس از ۴۸ و ۷۲ ساعت، سلول‌های تحت تیمار غلظت‌های۲۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نسبت به نمونه کنترل به طور معنی‌داری افزایش یافت. بیان ژن در سلول‌های شاهد در زمان‌های مختلف معنی‌دار نبود. بیان ژن سلول‌های تحت تیمار با غلظت‌های ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر پس از ۴۸ و۷۲ ساعت نسبت به کنترل به طور معنی‌داری افزایش داشت. در حالی‌که این رابطه پس از ۴۸ و ۷۲ ساعت معنادار نبود و سلول‌های تحت تیمار با غلظت‌های۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت نسبت به سلول‌های تحت تیمار با غلظت ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر پس از ۷۲ ساعت معنی‌دار بوده و افزایش را نشان داد شکل(۳).



شکل ۳: تغییرات بیان ژن کاسپاز۳ تحت تاثیر غلظت‌های مختلف عصاره هیدروالکلی میوه هندوانه ابوجهل در زمان‌های مختلف.

از نظر آماری در سطح ۰/۰۵ تفاوت معنی‌داری در زمان‌های ۴۸ و ۷۲ ساعت در سلول‌های تحت تیمار با غلظت‌های ۲۰۰ و۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نسبت به نمونه کنترل وجود داشت.

بحث و نتیجه‌گیری

از مزیت‌های شناخته شده عصاره‌های گیاهی، عدم وجود عوارض جانبی خطرناک و گستردگی طیف اثر آن‌ها می‌باشد(۱۹،۲۰). سرطان پستان شایع‌ترین سرطان و علت اصلی مرگ ناشی از سرطان در میان زنان است(۲۱). سرطان پستان در زنان ایرانی در مقایسه با زنان کشورهای غربی، حداقل یک دهه زودتر بروز می‌کند. رخداد آن در بین زنان ایرانی۱۲۰ نفر در۱۰۰۰۰۰ زن است(۲۲). هندوانه ابوجهل از جمله گیاهانی است که دارای اثرات سیتوتوکسیک و ضدسرطانی می‌باشد Tavakol afshari و همکاران اثر عصاره الکلی میوه هندوانه ابوجهل را در شرایط آزمایشگاهی روی دو رده سلولی سرطان حنجره و فیبروبلاست نرمال موشیL929 بررسی کرده و نشان دادند که اثرات سیتوتوکسیک هندوانه ابوجهل در رده سلولی سرطان حنجره وابسته به غلظت است، یعنی با افزایش غلظت، اثر سایتوتوکسیسیتی عصاره بیشتر قابل مشاهده است و اثر ممانعت بیشتری بر رشد سلول دارند. در رده سلولی L929، نتایج مورفولوژی و پرولیفراسیون سلولی عصاره هندوانه ابوجهل

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-25]

هیچگونه اثر سیتوتاکسیکی را بر روی رده ی سلولی L۹۲۹ نشان نداد(۲۳). Memon و همکاران برای عصاره این گیاه اثر بازدارندگی بر رشد استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس پومیلوس، باسیلوس سوبتیلیس مطرح و آن را به عنوان داروی سیتوتوکسیک و آنتی‌بیوتیکی غالب بر علیه میکروب‌ها برشمردند(۲۴). Torkey و همکاران ماده موثر هندوانه ابوجهل که به عنوان ضد سرطان شناخته شده را کوکوربیتاسین‌ها معرفی کردند(۲۵). کوکوربیتاسین‌ها ترکیباتی از گیاهان خانواده کوکوربیتاس هستند که در کشورهایی مانند هند و چین به علت طیف وسیع فعالیت‌های فارماکولوژیکی آنها درطب سنتی مورد استفاده بوده‌اند(۲۶). مطالعات Li و همکاران نشان داد که کوکوربیتاسیون E از طریق القای فسفریلاسیون فاکتور آغازین ترجمه یوکاریوتی۲ و القای آپوپتوزیس، از رشد سلول‌های سرطانی و تکثیر آنها جلوگیری می‌کند(۲۷). همچنین Li و همکاران نشان دادند که کوکوربیتاسیون B استخراج شده از هندوانه ابوجهل با القای آپوپتوزیسو مانع از چرخه سلولیاثر ضد سرطانی بر سلول‌های هپای۲ دارد(۲۷). Carossman و همکاران اثرات کوکوربیتاسین گلیکوزید استخراج شده از برگ‌های هندوانه ابوجهل را روی رشد سلول‌های سرطانی پستان مطالعه کوکوربیتاسیون گلیکوزید، B وEg را شناسایی کردند(۲۸). ترکیب کوکوربیتاسین گلیکوزید رشد سلول‌های سرطانی پستان انسان -ER(-)MDA MB-231 و MCF-7 ER(+) را مهار کرد. آنالیز چرخه سلول نشان داد که کوکوربیتاسین گلیکوزید منجر به تجمع سلول‌ها در فاز G(۲)/M چرخه سلولی می‌شود. تیمار کوکوربیتاسین گلیکوزید همچنین باعث تغییراتی در ریخت شناسی کلی سلول از حالت کشیده به حالت دایره‌ای شده و تیمار کوکوربیتاسین باعث اختلال در سازماندهی فیلامنت‌های اکتین می‌شود. این تغییرات عمیق مورفولوژیکی(ممکن است روی سیگنال‌های داخل سلولی ناشی از مولکول‌هایی مانند PKB تاثیر گذاشته و منجر به مهار انتقال سیگنال‌های حیاتی شود. کوکوربیتاسین گلیکوزید با ایجاد آپوپتوزیس و توقف چرخه سلول در درمان علیه سلول‌های سرطان پستان موثراست(۲۸).

Kumar و همکاران عصاره متانولی میوه هندوانه ابوجهل را مطالعه و خواص حذف رادیکال‌های آزاد را بررسی کردند. اثر پاک‌سازی رادیکال‌های آزاد عصاره کامل هندوانه ابوجهل با افزایش غلظت افزایش یافت و بیشترین خاصیت آنتی اکسیدانی و ربایش رادیکال‌های آزاد در غلظت ۲۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر مشاهده شد. فعالیت آنتی‌اکسیدانی می‌تواند به علت ترکیبات فنولیک در هندوانه ابوجهل باشد(۲۹).

Bashash و همکاران به منظور بررسی اثر سیلیبینین بدست آمده از عصاره گیاه خار مریم در سرطان سینه، سلول‌های رده MCF-۷ را در حضور غلظت‌های ۵۰،۱۰۰و ۲۰۰ میکرومولار پس از ۲۴، ۴۸، ۷۲ ساعت با داروی Silibinin تیمار کردند که نشان داد غلظت ۵۰ میکرو مولار دارو تأثیر چندانی بر بقاء سلول‌ها ندارد. در حالی که غلظت ۲۰۰ میکرومولار به طور موثری موجب مرگ سلول‌های MCF-۷ با ۲۰۰ IC ۵۰ میکرومولار در ۲۴ ساعت می‌شود(۳۰).

Hosseini-Zijoud و همکاران سلول‌های سرطان پستان MCF-۷ را کشت داده و اثر سایتوتوکسیسیتی غلظت‌های مختلف آلوئه امودین، در زمان‌های مختلف بررسی کردند. نتایج نشان داد آلوئه امودین با توجه به غلظت و زمان، توان زیستی سلول‌ها را کاهش می‌دهد، به طوریکه بیشترین تأثیر آلوئه امودین مربوط به غلظت ۱۰۰ میکرومولارو پس از ۷۲ ساعت پس از تیمار سلول‌ها بود(۳۱). Rezaei و همکاران عصاره هیدروالکلی میوه نارس و رسیده زغال اخته بر فعالیت ضدسرطانی در غلظت‌های مختلف عصاره (۰،۱۰،۵۰،۱۰۰،۱۵۰،۲۰۰،۲۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) روی سه رده سلولی MCF-۷ سرطان سینه، HepG2 سرطان کبد و CHO نرمال تخمدان هم ستر به روش MTT مورد ارزیابی قرار دادند و نشان دادند که در بین تمامی رده‌های سلولی در هر سه زمان مورد مطالعه بیشترین IC۵۰ مربوط به رده سلولی نرمال تخمدان هم ستر(CHO) و کم‌ترین میزان آن مربوط به رده سلولی سرطانی سینه(MCF۷) بوده است که نشان دهنده اثر نسبی مهارکنندگی رشد و سمیت سلولی عصاره هیدروالکلی میوه زغال اخته روی رده MCF-۷ در مقایسه با رده سلولی نرمال بوده

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-25]

است(۳۲). Lan و همکاران اثرات بازدارندگی کوکوربیتاسین E روی تکثیر سلول‌های Bcap۳۷ و MDA-MB- ۲۳۱ و بیان ژن‌های پروکاسپاز ۳، برش کاسپاز ۳، P۲۱، P۲۷ و فسفوریلاسیون پروتئین‌های سیگنال‌دهی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد کوکوربیتاسینE، رشد سلول‌های سرطانی پستان انسانی را با در نظر گرفتن غلظت و زمان باز می‌دارد. آنالیز FCM نشان داد که CuE توقف فاز G2/M و آپوپتوز سلولی را القاء می‌کند. تیمار با CuE، برش کاسپاز ۳ و تنظیم مثبت P۲۱ وP۲۷ را افزایش داد. CuE علاوه بر ایجاد برش و فعال‌سازی پروکاسپاز ۳، همچنین توان بیان P۲۱ و P۲۷ را در سلول‌های سرطان پستان به طور مثبت تنظیم می‌کند(۵).

با مقایسه کار این محققین می‌توان دریافت که عصاره‌های گیاهی، اثرات ضدسرطانی متفاوتی را در سرطان‌های مختلف و حتی بر روی یک رده سلولی یکسان از خود نشان می‌دهند. ترکیبات فلاونوئیدی و فنولی به وفور در گیاهان وجود دارد که دارای اثرات بیولوژیکی چندگانه شامل آنتی‌اکسیدانی و توانایی حذف‌کنندگی گونه‌های اکسیژن واکنشی است(۲۹). نتایج به دست آمده نشان‌دهنده این است که در زمان‌های مختلف، با افزایش غلظت، میزان زنده‌مانی سلول‌های سرطانی کاهش می‌یابد که احتمالاً به دلیل تأثیر عصاره بر مسیر آپوپتوز است. مکانیسم مولـکولی

اثرات سیتوتوکسیک عصاره هیدروالکلی میوه هندوانه ابوجهل می‌توان از طریق تنظیم بیان ژن کاسپاز ۳ اعمال شود. بیـــان ژن کـــاســپاز ۳ پس از ۴۸ و ۷۲ ســاعت تحـــت تأثـــیر غلظت‌های ۲۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به طور معنی‌داری نسبت به نمونه کنترل افزایش یافت. خاصیت القای مرگ سلولی و افزایش بیان ژن کاسپاز ۳ را می‌توان به وجود ترکیبات خاص در میوه هندوانه ابوجهل نسبت داد. خاصیت القای مرگ سلولی را می‌توان به دلیل وجود ترکیبات خاص در میوه هندوانه ابوجهل دانست. ترکیبات فنولیک جداشده از این گیاه دارای فعالیت‌های یوگلیسمیک، آنتی‌اکسیدانی وآنتی‌کارسینوژنی می‌باشد که نقش مهمی در حذف و خنثی کردن رادیکال‌های آزاد دارند(۳۰). عصاره این گیاه حاوی گلیکوزیدها و ساپونین است و بر طبق گزارش‌ها موجب مهار پراکسیداسیون لیپید و توقف تولید گونه‌های فعال اکسیژن می‌شود(۳۳). همچنین بررسی منابع نشان داد که مطالعات بسیار کمی در زمینه بررسی اثر عصاره گیاه هندوانه ابوجهل بر بیان ژن‌های مسیر آپوپتوز صورت گرفته است. با توجه به اینکه این گیاه در مورد اندکی از سرطان‌ها مورد ارزیابی قرار گرفته لازم است به‌طور گسترده بر روی خواص ضدسرطانی این گیاه و مکانیسم‌های اثر آن در مهار تکثیر سلولی بررسی‌های بالینی و آزمایشگاهی صورت گیرد.

سپاسگزاری

این تحقیق در پژوهشکده زیست فناوری دانشگاه زابل انجام شد. در اینجا لازم است از زحمات جناب آقای دکتر سید کاظم صباغ رییس پژوهشکده و سرکار خانم مهندس حمیده خواجه به خاطر در اختیار گذاشتن وسایل آزمایشگاهی و کمک در آنالیز داده‌های بیان ژن تقدیر و تشکر به عمل آید.

References:

1- Ilkhani M. ***Core Ways on Cancer Patients.*** Tehran: Ghazi Jahani Pub; 1990.

2- Mohagheghi MA, Mosani-Jarrahi A. ***The 3rd annual report of Tehran Metropolitan Area cancer Registry.*** Tehran: Can Inst Res Cen Pub; 2002.

3- Kruk J, Aboul-Enein Hy. ***Psychological stress and the Risk of breast cancer: A case-control study.*** Cancer Detec 2004; 28(6): 399-408.

4- Coughlin SS, Ekwueme DU. ***Breast cancer as a global health concern.*** Can Epidemiol 2009; 35(5): 315-8.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-25]

5- Lan.T, W angle, Xu Q, Liu W, Jin H, Mao W, et al. ***Growth inhibitory effect of Cucurbitacin E on breast cancer cells.*** Int J Clin Exp Pathol 2013; 6(9): 1799-1805.

6- Harirchi I, Ebrahimi M, Zamani N, Jarvandi S, Montazeri A**.** ***Breast cancer in Iran: a review of 903 case records.*** Pub Health. 2000; 114(2): 143-5.

7- Behjati F, Atri M, Najmabadi H, Nouri K, Zamani M, Mehdipour P. ***Prognostic value of chromosome 1 and 8 copy number in invasive ductal breast carcinoma among Iranian women: an interphase FISH analysis.*** Pathol Oncol Res 2005; 11(3): 157-63.

8- Yassaee VR, Zeinali S, Harirchi I, Jarvandi S, Mohagheghi MA, Hornby DP. ***Novel mutation in the BRCA1 and BRCA2 genes in Iranian women with early-onset breast cancer.*** Breast Cancer Res. 2002; 4(4): 71-9.

9- Mousavi SM, Montazeri A, Mohagheghi MA, Jarrahi AM, Harirchi I, Najafi M. ***Breast cancer in Iran: an epidemiological review.*** Breast J 2007; 13(4): 383-91.

10- Tabor MP, Brakenhoff RH, Ruijter-Schippers HJ, Kummer JA, Leemans CR, Braakhuis BJ. ***Genetically altered fields as origin of locally recurrent head and neck cancer: a retrospective study.*** Clin Cancer Res 2004; 10(11): 3607-13.

11- 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.

12- Ferreira E. ***Salicylic and Hsp70: Partners for in ducing apoptosis in breast cancer cells?*** Ph.D thesis. Auckland park South Africa, Johannesburg University; 2009.

13- Mahdavi R, Manual A, Rahimi AS, Delazar AS, Zadeh H. ***Bitter melon extract on plasma glucose levels in 1384.*** antidiabetic effect. Pharmaceutical Sci, 19-15.

14- Zargari A. ***Medicinal Plants.*** 4th ed. ***Tehran: Tehran University Publications;*** 1994. p. 680.

15- Marzouk B Marzouk Z Fenina N Bouraoui A Aouni M. ***Anti-inflammatory and analgesic activitiesof Tunisian Citrullus colocynthis Schrad. Imma fruit seedorg extrac.*** Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2011; 15(6): 665-72

16- Rasool K, Jahanbakhsh T. ***Anticandidal screening and antibacterial of Citrullus colocynthis in South East of Iran.*** J Horti Forest 2011; 3(13): 392-98.

17- Agarwal V Sharma A K Upadhyay A Singh G Gupta R. ***Hypoglycemic effects of Citrullus colocynthis roots***. *Acta Pol Pharm.* 2012; 69(1): 75-9.

18- Pfaffl MW. ***A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR.*** Nucl Acid Res 2001; 29(9): e 45.

19- Cabera C, Artacho R, Gimenez R. ***Beneficial effects of green tea - a review***. J AM Cell Nutr. 2006; 25(2): 79-9.

20- Mohammad A, Bano Faruqi F, Mustafa J. ***Edible compounds as antitumor agents.*** Indian J Sci Technol 2009; 2(5): 62-74.

21- Gunnarsson C, Ahnstrom M, Kirschner K, Olssen B, Nordenskjoid B, Rut qrvist LE, et al. ***Amplification of HSD17B1 and ERBB2 in primary breast cancer.*** Oncogene. 2003; 22(1): 34-40.

22- Mousavi S M, Montazeri A, Mohagheghi MA, Jarrahi AM, Harirchi L, Najafi M, et al. ***Breast cancer in Iran: an epidemiological review.*** Breast J 2007; 13(4): 383-91.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-25]

23- Tavakol afshari J, Rakhshandeh H, Zamani A, Mahdavi Shahri N, Ghazizadeh L, Nourouzi M. ***Cytotoxicity effects of citrullus colocynthis on hep2 and l929 cell lines. Hakim.*** 2005; 8(2): 47-54.

24- Memon U, Brohi AH, Ahmed SW Azhar I, Bano H. ***Antibacterial screening of Citrullus colocynthis.*** *Pak J Pharm* Sci 2003; 16(1): 1-6.

25- Torkey HM Abou-Yousef HM, Abdel Azeiz AZ, Hoda EA. ***Insecticidal Effect of Cucurbitacin E Glycoside Isolated from Citrullus colocynthis Against Aphis craccivora.*** Aust J Basic App Sci, 2009; 3(4): 4060-6

26- Dallak M, Bashir N, Elessa R, Haidara M, Khalil M, AL- Khateeb M. ***Concomitant Down Regulation of Glycolytic Enzymes Upregulation of Gluconeogenic Enzymes and Potential Hepato-Nephro-Protective Effects Following the Chronic Administration of the Hypoglycemic, Insulinotropic Citrullus colocynthis Pulp Extract.*** Am Bioch Biotechnol. 2009; 5(4): 53-61.

27- Li Y, Wang R, Ma E, Deng Y, Xiao J, Jing Y. ***The induction of G2/M cell-cycle arrest and apoptosis by cucurbitacin E is associated with increased phosphorylation of eIF2alpha in leukemia cells***. Anticanr Drugs. 2010; 21(4): 389-400.

28- Tannin- Spilz T, Grossman S, Dovrat S, Gottlieb HE Bergman M. ***Growth inhibitoryactivity of cucurbitacin glucosidesisolated from Citrullus colocynthis onhuman breast cancer cells.*** Biochem Pharmacol. 2007; 73(1): 56-67.

29- Kumar S, Kumar D, Man Jusha, Saroha K, Singh N, Vashishta B. ***Antioxidant andfree radical scavenging potential ofCitrullus colocynthis (L.) Schrad.Methanolic fruit extract.*** Acta Pharm.2008; 58(2): 215-220.

30- Bashash D, Safa M, Shahbazi A, Mohammedan M, Shah Mohammad N. ***Apoptotic effects of milk thistle extract on breast cancer cell line MCF-7***. J Complement Med, 2012; 2(1): 95-85. [persian]

31- Hosseini-zijoud SM. ***Apoptosis Effects of Aloe-emodin against MCF-7 Cell Line.*** J Rafsanjan Univ Med Sci, 2014; 13 (1): 41-52.

32- Rezaei, P. Shkrzadh, M. Majd, A. ***Effect of cytotoxic cranberry fruit extract on cancer cells and CHO.*** J Mazandaran Univ Med Sci. 24(113): 130-138.

34- Barth A, Muler D, Durrlingk K. ***In vitro investigation of a standardized dried extract of Citrulus colocynthis on liver toxicity in adult rats.*** Exp Toxicol Pathol 2002; 54(3): 223-30.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-25]

Effect of Hydro Alcoholic Extract of Citrullus Colocynthis Fruit on Caspase 3 Gene Expression in MCF-7 Breast Cancer Cell Line

Davoodi R(MSc student)[1], Esmaeilzade Bahabadi S(PhD)[2], Najafi Sh(PhD)[2], Mazaheri Naeeini M(PhD)*[3]

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

Received: 22 Apr 2015 ***Accepted:*** 11 Jun 2015

Abstract:

Introduction: Breast cancer is regarded as one of the most common female cancers in the world. Many efforts have been made to treat the breast cancer, among which surgery, radiation, and chemotherapy can be mentioned. There is an increasing interest regarding using herbal preparations as a promising source of new anti-cancer drugs because of their safety profile and efficient pharmaceutical potentials. Since citrullus colocynthis proposes some cytotoxic effects against cancer, the present study aimed to explore the effect of hydro alcoholic extract of C. colocynthis fruit on the viability and expression level of Caspase-*3* in MCF-7 cell line.

Methods: In this laboratory study, the MCF-7 breast cancer cells were treated by different concentrations of Citrullus Colocynthis ethanol extract for 24, 48 and 72 h. The extract effect on cell viability was assessed by trypan blue staining. The RNA extraction was performed, and after the construction of cDNA, expression of Caspase *3* was analyzed via Real-Time PCR.

Results: The obtained results revealed a noticeable dose and time dependent reduction in viability of *C.* colocynthis in the treatment group compared to the control samples. Moreover Real-Time PCR results demonstrated that the expression of Caspase3 gene at 48 and 72 hours after extract treatment significantly increased compared to the control cells.

Conclusion: It can be concluded that citrullus colocynthis fruit extract can destroy cancer MCF-7 cells, which is resulted from an increase in caspase 3 gene expression.

Keywords: Breast cancer; Caspase3; Citrullus colocynthis

This paper should be cited as:
Davoodi R, Esmaeilzade Bahabadi S, Najafi Sh, Mazaheri Naeeini M. ***Effect of hydro alcoholic extract of citrullus colocynthis fruit on caspase 3 gene expression in MCF-7 breast cancer cell line***. J Shahid Sadoughi Univ Med Sci 2015; 23(5): 508-18

Corresponding author: Tel: +989124547030, Email: Mazaheri54@gmail.com

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-25]