مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد
دوره سی و دو، شماره هفت، مهر ۱۴۰۳
تاریخ دریافت:۱۴۰۲/۱۰/۲۱
تاریخ پذیرش:۱۴۰۳/۰۴/۱۳

بررسی اثرعصاره هیدروالکلی دافنه بر و سطح بیان ژن‌های MAPK8 و PTK2 و زنده‌مانی در رده سلولی سرطان تخمدان A2780S

فائزه بفرویی زاده[۱]، سید کاظم صباغ*[۱]، مهتا مظاهری نایینی[۲و۳]، محمدرضا سرافراز اردکانی[۱]، فرزانه شتابی[۱]

مقاله پژوهشی

مقدمه: سرطان تخمدان، یک تومور اپیتلیال تهاجمی، همچنان یکی از علل اصلی مرگ و میر ناشی از سرطان در زنان است. با توجه به اثرات مضر داروهای شیمیایی، اخیراً گیاهان دارویی با توجه به خواص منحصربه‌فردشان مانند ارزان، طبیعی و در دسترس بودن و بدون هیچ‌گونه عوارض جانبی مشخصی در پیشگیری از بیماری‌ها مورد توجه قرار گرفته‌اند. در این تحقیق آزمایشگاهی، اثر کشندگی عصاره هیدروالکلی گیاه دافنه بر روی زنده‌مانی سلول‌های سرطانی رده A2780s و بیان ژن‌هایMAPK8 و PTK2 در سلول‌های تیمار شده با عصاره گیاه دافنه در ۳ بازه زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از تیمار مورد بررسی قرار گرفت.

روش بررسی: بررسی اثر بازدارندگی عصاره هیدروالکلی دافنه بر روی سلول های هدف با استفاده از روش MTTassay انجام و سپس بیان دو ژنMAPK8 و PTK2 در سلول های تیمار شده با عصاره گیاهی با استفاده از روش qRT-PcR مورد بررسی قرار گرفت. آنالیز داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار GraphPad Prism انجام شد.

نتایج: با توجه نتایج حاصل از زنده‌مانی، مقدار IC50 به ترتیب برای بازه‌های زمانی ۴۸،۲۴ و ۷۲ ساعت بعد از تیمار مقادیر ۱۰۵/۴۰، ۸۵/۹۸ و ۸۱/۳۸ میکروگرم/ میلی‌لیتر تعیین گردید. بررسی بیان ژن‌های مورد آزمایش نشان داد که عصاره هیدروالکلی دافنه در سطح معنی‌داری (P Value≤0/05) اثر قابل توجهی در بیان ژن‌های هدف نداشته است. به‌طوری که نسبت به شاهد اختلاف بیان معنی‌دار نبود.

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج حاصل چنین نتیجه گیری می‌شود که عصاره دافنه بر روی سلول‌های سرطانی A2870s تیمار شده اثر بازدارندگی معنی‌داری داشته است ولی قادر به تغییر در میزان بیان ژن¬های دخیل در فعالیت‌های ضد سرطانی و مسیرهای مولکولی نبوده است. استفاده از نشان‌گرها و مسیرهای ژنی دیگر برای مطالعات تکمیلی پیشنهاد می‌شود.

واژه‌های کلیدی: سرطان تخمدان، بیان ژن،گیاهان دارویی، زنده‌مانی

ارجاع: بفرویی‌زاده فائزه، صباغ سیدکاظم، مظاهری نایینی مهتا، سرافراز اردکانی محمدرضا، شتابی فرزانه. **بررسی اثرعصاره هیدروالکلی دافنه بر و سطح بیان ژن‌های MAPK8 و PTK2 و زنده‌مانی در رده سلولی سرطان تخمدان A2780S**. مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد ۱۴۰۳؛ ۳۲ (۷): ۵۵-۸۰۴۵.

۱- گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه یزد، یزد، ایران.
۲- گروه ژنتیک، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی دانشگاه شهید صدوقی، یزد، ایران.
۳- مرکز تحقیقات سلامت مادر و نوزاد، دانشگاه علوم پزشکی دانشگاه شهید صدوقی، یزد، ایران.
*(نویسنده مسئول)؛ تلفن: ۰۹۱۳۳۷۳۱۰۶۹، پست الکترونیکی: sksabbagh@yazd.ac.ir، صندوق پستی: ۸۹۱۵۸۱۸۴۱۱

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2025-01-14]

[DOI: 10.18502/ssu.v32i7.16569]

مقدمه

سرطان تخمدان، یک تومور اپیتلیال تهاجمی، همچنان یکی از علل اصلی مرگ و میر ناشی از سرطان در زنان است و باعث مرگ و میر بیشتر از هر سرطان دستگاه تناسلی زنان می‌شود. اکثر بیماران مبتلا به سرطان تخمدان در مرحله پیشرفته بیماری تشخیص داده می‌شوند و علیرغم پیشرفت استراتژی‌های جراحی و شیمی‌درمانی، میزان بقای ۵ ساله کمتر از ۲۵٪ است (۱). این بیماری معمولاً در زنان یائسه با چند ماه درد و اتساع شکم ظاهر می شود (۲). روش‌های درمان انواع مختلف سرطان به مراحل پاتولوژیک آن بستگی دارد. تشخیص زودهنگام به درمان کمک می کند. روش‌های درمانی فعلی، ترکیبی از جراحی و دارو درمانی و پرتودرمانی است که اثرات بعد از درمان ممکن است بیمار را تحت تاثیر قرار دهد. با توجه به اثرات مضر عوامل شیمیایی، اخیراً داروهای گیاهی با خواص منحصربه فرد مانند ارزان، طبیعی و در دسترس بودن و بدون هیچ‌گونه عوارض جانبی قابل‌توجهی، مورد پذیرش قرار گرفته است در حال حاضر تلاش برای یافتن روش‌های درمانی جایگزین و داروهای ضدسرطان ادامه دارد. ترکیبات فعال از داروهای گیاهی، مانند کورکومین، در برابر سرطان موثر هستند. (۳, ۴). گونه گیاه دافنه با نام علمی *Daphne mucronata* Royle درختچه‌ای همیشه سبز از خانواده *Thymelaeaceae* که تقریباً از ۹۰ گونه تشکیل شده است و بومی پاکستان است این گیاه در برخی از مناطق کوهستانی ایران یافت می‌شود. عصاره برگی دافنه دارای خواص ضد باکتریایی و ضد قارچی بوده و دارای ترکیباتی نظیر فلاونوئیدها، کومارین‌ها، کورستین، کاتچین‌ها و اسید فرولیک هستند. (۵-۷). اثرات ضد تکثیری ۶ نوع عصاره برگی از گیاه *Daphne altaica* در چهار رده سلول سرطانی انسان شامل سرطان مری، معده، هپاتوم و دهانه رحم، مورد بررسی قرار گرفته و نتایج نشان داده است که همه عصاره‌ها بجز عصاره آبی، دارای اثر بازدارندگی در همه رده‌های سلولی مورد آزمایش داشته است. (۸). پژوهشی با هدف بررسی فعالیت سیتوتوکسیک دو عصاره هیدروالکلی و کلروفرمی *D. mucronate* بر روی هفت رده سلولی مختلف شامل رده‌های سلولی SK-Br-3، MDA-MB-435، Hela، K562 ، U937، Ag.8 و Vero مورد بررسی قرار گرفته است و نشان داده است که بیشترین فعالیت بازدارندگی مربوط به عصاره هیدروالکلی *D. mucronata* روی رده‌های سلولی سرطان پستان می باشد (۹). شانگ و همکاران اثر عصاره گیاه *D. giraldii* را روی رده سلولی سرطان کبد آزمایش و فعالیت سیتوتوکسیک آن را مشاهده کرد و نشان دادند که این ماده باعث توقف سلول در G0/G1 و کاهش بیان سیکلین E1، CDK2 و CDK4 و برش کاسپاز ۳ و PARP در سلول‌های Hep3B و HepG2 می‌شود (۱۰). در مطالعات بعدی نشان داده شد که فلاونوئید موجود در عصاره گیاه *D. giraldii* باعث القای استرس اکسیداتیو و نیتروزاتیو می‌شود که در سلول‌های Hep3B و HepG2 منجر به افزایش آپوپتوز با واسطه p38 می‌شود (۱۱). در سال ۲۰۱۶ گروهی از محققان اثر ضد سرطانی فلاونوئیدهای کل در *D. genkwa* بر روی سلول‌های سرطان کولورکتال انسانی HT-29 و SW-480 موش مورد بررسی قرار گرفت. نتایج آزمایش سلولی نشان داد که عصاره این گیاه دارای اثرات مهاری قابل‌توجهی بر سلول‌های سرطانی فوق داشته است و بیان ژن های مرتبط با اینترلوکین α-1(IL)، IL-1β، IL-6 (عامل محرک کلنی گرانولوسیت) بافت روده با کاربرد این عصاره کاهش یافته است (۱۲). با توجه به بررسی منابع انجام شده، نقش موثر این گیاه در درمان بیماری های سرطانی به اثبات رسیده است ولی تاثیر آن بر روی رده سلولی سرطان رحم در بررسی منابع دیده نشد. بدین جهت تلاش شد تا اثر کشندگی عصاره هیدروالکلی عصاره دافنه بر روی زنده‌مانی سلول های سرطانی رده A2780S و بررسی بیان ژن *MAPkinase8* و *PK2* در سلول های تیمار شده با عصاره در ۳ بازه زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت مورد بررسی قرار گیرد.

روش بررسی

در این پژوهش آزمایشگاهی، از سلول‌های سرطان تخمدان انسان (رده سلولی A2780s) خریداری شد. از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران استفاده شد. از محیط کشت DMEM

CC BY-NC 4.0

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2025-01-14]
[DOI: 10.18502/ssu.v32i7.16569]

High Glucose (۴/۵ گرم در لیتر) همراه با ال آلانین جهت بازیابی و کشت مجدد سلول‌ها استفاده شد. از تریپسین برای جدا کردن سلول‌ها از کف فلاسک استفاده شد. کشت سلولی مرتب بازبینی وقتی که تراکم سلول‌ها به بیش از ۷۰ درصد رسید پاساژ سلولی انجام گردید. جهت تهیه عصاره گیاهی در ابتدا مقدار تقریبی تقریباً ۱۰۰ گرم بافت برگی خشک شده گیاه دافنه برای تهیه عصاره الکلی مورد استفاده قرار گرفت. برگها به‌وسیله هاون چینی سائیده و پودر حاصل درون کاغذ صافی مخروطی شکل ریخته و تمام محتویات را درون دستگاه سوکسله حاوی۳۰۰ میلی‌لیتر محلول هیدروالکلی ۲۰ درصد قرار داده شد. عمل تبخیر و تقطیر انجام و در پایان عصاره غلیظ شده گیاه دافنه تهیه گردید. میزان ۴ میلی گرم از عصاره به‌دست آمده در یک میلی‌لیتر آب جهت تهیه غلظت اولیه (استوک) مورد استفاده قرار گرفت. سپس رقت‌های ۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۱۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر با محیط کشت ۱۰ درصد استفاده شده در آزمایش (مواد و روش‌ها) تهیه گردید. عصاره‌های به‌دست آمده با استفاده از فیلتر سر سرنگی ۰/۲۲ میکرومتری، استریل و در ویال های جداگانه نگهداری شدند. برای بررسی تاثیر عصاره دافنه بر زنده‌مانی سلول‌های سرطان رحم رده A2870s و تعیین غلظتی از عصاره که موجب از بین رفتن ۵۰ درصد از سلول‌ها می‌شود (IC50) از روش سنجش MTT استفاده شد. بدین منظور در ابتدا محلول MTT با غلظت ۵mg/ml، (۰/۰۲ گرم از پودر تترازولیوم/ ۴ میلی‌لیتر PBS) تهیه و در فالکون با جداره تاریک نگهداری گردید.

$$Cell\ viability\% = 100 - \frac{[(ODtreated - OD\ Blank)^{-}(ODcontrol - OD\ Blank)]}{(ODtreated - OD\ Blank)} * 100$$

جهت سنجشMTT، در ابتدا مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از سلول های تازه (حاوی 10^4 سلول/ میلی‌لیتر) درون چاهک های سینی ۹۶ تایی ریخته و در داخل انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد (رطوبت ۹۵٪ و Co2 5%) قرار داده شد تا سلول های به خوبی تثبیت شوند. بعد از سپری شدن ۲۴ ساعت مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از رقت‌های مختلف عصاره تهیه و در هر جاهک ریخته شد (به‌جز چاهک‌های کنترل). برای تیمار کنترل ۱۰۰ میکرولیتر سلول و محیط کشت و برای تیمار بلانک ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت بدون سلول ریخته شد و در نهایت، پلیت‌ها داخل انکوباتور (با شرایط فوق). قرار داده و بسته به زمان سنجشMTT (۴۸،۲۴و۷۲ساعت) از انکوباتور خارج شدند. پس از گذشت زمان مورد نظر (مثلاً ۲۴ ساعت)، محیط روی سلول‌ها خارج و ۲۰ میکرولیتر محلول (۵ میلی‌گرم/میلی‌لیتر) MTT به هر چاهک اضافه ریخته و سینی ها داخل یک فویل آلومینیوم پیچیده و به مدت ۴ ساعت داخل انکوباتور قرار داده شد. برای حل کریستال‌های فورمازان در سلول‌های زنده مقدار۱۵۰ میکرولیتر DMSO به هر چاهک اضافه شد و پس از ۱۵ دقیقه، پلیت میزان تغییر رنگ با استفاده از دستگاه الایزا خوان با طول موج ۵۷۰ نانومتر خوانده شد. نتایج حاصل وارد فایل اکسل و مقدارا IC50 محاسبه شد. بررسی میزان بیان ژن در سلول های تیمار شده با غلظت های مختلف عصاره و مقایسه آن‌ها با سلول های تیمار نشده استخراج RNA توسط کیت SinaPure TM RNa (SinaClon, iran) انجام شد. از آنزیم DNase I جهت از بین بردن مولکول‌های DNA استفاده شد و در آخر کمیت و کیفیت مولکول‌های به‌دست آمده به‌ترتیب با استفاده از دستگاه نانودراپ و الکتروفورز ژل آگارز مورد ارزیابی قرار گرفت. سنتز cDNA توسط cDNA synthesis kit برند یکتاتجهیز انجام شد. برای اطمینان از ساخت مولکول‌های cdNA، با استفاده از آغازگر ژن مورد نظر تکثیر مولکول‌های cDNA انجام و محصول PCR با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز و با استفاده از دستگاه Gel document مشاهده شد. cDNA تولیدی تا زمان بررسی بیان ژن در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. سنتز آغازگرهای مورد نیاز در تکثیر قطعات ژنی، در ابتدا

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2025-01-14]

[DOI: 10.18502/ssu.v32i7.16569]

CC BY-NC 4.0

توالی ژن‌های *MAPK8,PTK2* و GAPDH از پایگاه داده Ensemble گرفته شد و سپس به‌وسیله نرم‌افزار Gene Runner طراحی آغازگرها انجام شد. احتمال تشکیل ساختار ثانویه و دایمر با استفاده از نرم‌افزار Oligo Analyzer بررسی و سپس با استفاده از پایگاه داده UCSC/In silico PCR شبیه‌سازی PCR انجام شد. اختصاصی بودن آغازگرها با استفاده از NCBI/Primer Blast مورد تائید قرار گرفت. مشخصات آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق در جدول ۱ درج شده است.

جدول ۱: مشخصات توالی آغازگرهای مورد استفاده در بررسی میزان بیان ژن‌های *PTK2* و *MAPK8*

نوع پرایمر	Seauence (5'-3')	Primer lenght	Tm	GC%
MAPK8	AAGAATGGTGCTGCTCCTGAC	۲۱	۵۹/۸۲	۵۲/۳۸
	ACCTTGTTGCTTATGTGAGTATGC	۲۴	۵۹/۳۰	۴۱/۶۷
PTK2	AGATCCTGTCTCCAGTCTAC	۲۰	۵۷/۳	۵۰
	AATGGTTTGCACTTGAGTGA	۲۰	۵۸/۴	۴۰
GAPDH	F-CAAGAGCACAAGAGGAAGAGAGAG	۲۴	۶۲/۷۲	۵۰
	F-TCTACATGGCAACTGTGAGGAG	۲۲	۶۰/۲۵	۵۰

آنالیز بیان ژن‌های مورد نظر در این آزمون با استفاده از روش qRT-PCR و با استفاده از دستگاه لایت سایکل (Rotor-Gene, Qiagene, Germany) انجام گردید. در این پژوهش از SYBR Green master mix برند یکتاتجهیز آزما و از دستگاه Real-time PCR مدل استفاده شد. مخلوط واکنش qRT-PCR به حجم ۲۵ میکرولیتر شامل، ۸ میکرولیتر SYBR Green master mix (Pishgam, Iran)، ۱ میکرولیتر آغازگر رفت و ۱ میکرولیتر آغازگر برگشت (۱۰پیکومولار)، ۳ میکرولیتر از مولکولهی cDNA و ۱۲ میکرولیتر آب مقطر دیونیز استریل بود که در زیر هود بیولوژیکی آماده گردید. مراحل شرایط دمایی و زمانی شامل دمای واسرشتگی (Denaturation) اولیه ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه و سپس برای ۳۸ چرخه دمای واسرشتگی ۹۵ درجه سانتی‌گراد، دمای ذوب و اتصال آغازگر ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه جهت بسط قطعات تکثیری استفاده گردید. از مخلوط واکنش بدون توالی هدف به عنوان کنترل منفی استفاده گردید. آنالیز داده‌های به‌دست آمده از روش MTT assay با استفاده از نرم‌افزار Graphpad Prism version 8.4.3 استفاده شد. تجزیه و تحلیل داده‌های مربوط به غلظت بهینه (IC50) با استفاده از آزمون Anova و مقایسه اثر غلظت‌های مختلف دارو در زمان‌های مختلف با استفاده از تست Tukey انجام شد. داده‌های حاصل از بیان ژن با استفاده از روش ΔΔCt آنالیز گردید. از ژن *GAPDH* به عنوان ژن رفرانس و نرمال سازی داده‌ها استفاده شد.

تجزیه و تحلیل آماری

برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون LSD استفاده گردید. رسم نمودارها به‌وسیله نرم افزار Graphpad Prism انجام شد. در این پژوهش ملاک معنادار بودن تمام آنالیزها و محاسبات، $P \leq ۰/۰۵$ در نظر گرفته شد.

نتایج

بررسی اثر عصاره دافنه به غلظت‌های مختلف و زمان‌های مختلف: در این تحقیق اثر سمیت عصاره الکلی دافنه در غلظت‌های مختلف به‌طور جداگانه و مستقل از هم در زمان‌های مختلف با استفاده از روش‌های آماری و آنالیز تنوعات یا ANOVA مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس نتایج به‌دست

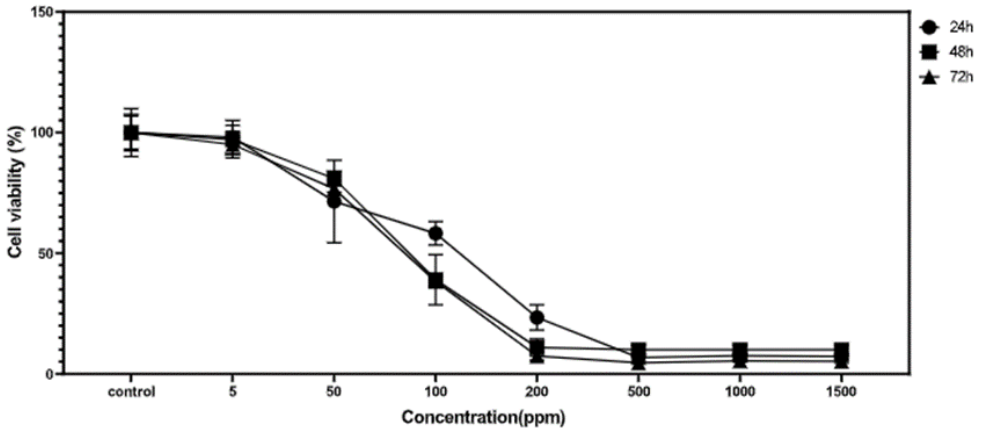
CC BY-NC 4.0

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2025-01-14]
[DOI: 10.18502/ssu.v32i7.16569]

آمده غلظت‌های مختلف عصاره دافنه بر روی میزان زنده‌مانی سلول‌های A2780s اثر معنی‌دار داشته است که نشان‌دهنده وابستگی اثر عصاره دافنه به غلظت می‌باشد. زمان‌های متفاوت نیز اثر معنی‌داری بر روی میزان زنده‌مانی سلول‌ها داشته‌اند که بیانگر وابستگی اثر عصاره دافنه به زمان نیز بوده است. هم‌چنین بررسی اثر غلظت و زمان به‌صورت همزمان نیز بر روی میزان زنده‌مانی سلول‌ها اثر معنی‌داری را گزارش نمود.

محاسبه IC50 عصاره گیاه دافنه در زمان‌های مختلف بر رده سلولی A2780s: بررسی زنده‌مانی سلول‌های سرطان تخمدان رده A2870s در ۳ بازه زمانی ۲۴،۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از تیمار با استفاده از سنجش MTT نشان داد که تمام تیمارهای عصاره گیاه دافنه در سطوح معنی‌داری بر روی زنده‌مانی سلول‌ها اثر داشته‌اند. برای هر تیمار غلظتی ۳ تکرار اعمال گردید و از میانگین داده‌های مشاهده شده (با احتساب انحراف معیار) برای رسم نمودار IC50 در نرم‌افزار Graphpad استفاده شد. رسم منحنی اثر سمیت عصاره دافنه بر روی رده سلولی با غلظت‌های مختلف نشان می‌دهد که با افزایش غلظت عصاره گیاهی درصد زنده‌مانی سلول‌ها کاهش یافته است که شیب این تاثیر در بازه‌های زمانی ۲۴ و ۴۸ ساعت مشهودتر است (شکل ۱). بررسی میزان تغییرات IC50 سلول‌های تیمار شده با عصاره نشان داد که عصاره دافنه اثر معنی داری را در کشندگی سلول‌هاس تیمار شده داشته است (جدول ۲). داروی دافنه بر رده A2780s در زمان‌های مختلف به صورت جدول زیر است و از این غلظت‌ها برای بررسی بیان ژن استفاده شد. نتایج حاصل از تست MTT نشان می¬دهد که بهترین غلظت برای از بین بردن نیمی از سلول¬ها در بازه¬های زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به ترتیب ۱۰۵/۴، ۸۵/۹۸ و ۸۱/۳۸ می¬باشد.

مقایسه مورفولوژی سلول‌های A2780s تحت تیمار در زمان‌های مختلف: تغییرات مورفولوژی سلول‌ها پس از گذشت زمان‌های مختلف در شکل‌های زیر آمده است. سلول‌های تیمار شده در مقایسه با سلول‌ها قبل از تیمار تغییرات ظاهری را نشان می دهند. سلول‌ها بعد از تیمار با دافنه از حالت چسبنده خارج شدند و به صورت کروی درون محیط معلق شدند و رشد آن‌ها نسبت به قبل کاهش قابل ملاحظه‌ای پیدا کرده بود.



شکل ۱: نمودار بررسی درصد زنده‌مانی سلول‌ها با استفاده از روش MTT در غلظت‌های مختلف عصاره گیاه دافنه (۱۵۰۰-۵ میکروگرم برمیلی‌لیتر) طی زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت سپری شده از تیمار. مقادیر میانگین سه تکرار ± انحراف استاندارد است.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2025-01-14]

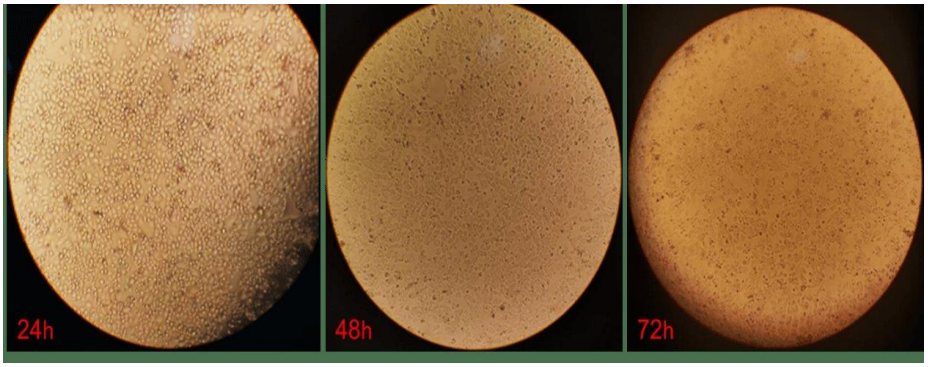
[DOI: 10.18502/ssu.v32i7.16569]

CC BY-NC 4.0

جدول۲: بررسی اختلاف میانگین IC50 تأثیر عصاره گیاهی بر درصد زنده‌مانی سلول‌های سرطانی، در بازه‌های زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در غلظت های ۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره گیاهی با استفاده از آزمون tukey

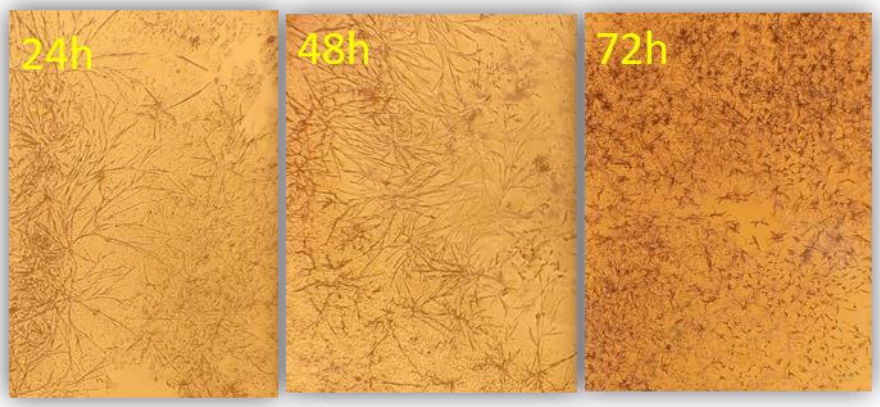
Adjusted P-Value	Summary	Mean diff	Time proportion	Concentration (µg/ml)
۰/۵۵۳۱	ns	۱/۶۶۷	۴۸/۲۴	
<۰/۰۰۰۱	****	۲۱/۶۷	۷۲/۲۴	
<۰/۰۰۰۱	****	۲۲/۰۰	۷۲/۴۸	۵
۰.۰۱۱۵	*	۴/۸۰	۴۸/۲۴	
<۰/۰۰۰۱	****	۲۰/۲۷	۷۲/۲۴	
<۰/۰۰۰۱	****	۱۵/۴۷	۷۲/۴۸	۵۰
۰.۰۰۶۹	**	-۵/۱۰	۴۸/۲۴	
۰.۱۳۸۱	ns	۳/۱۰	۷۲/۲۴	
<۰/۰۰۰۱	****	۸/۲۰	۷۲/۴۸	۱۰۰

ns: نشان دهنده عدم معنی‌داری در سطح خطای ۵ درصد و ستاره ها نشان دهنده میزان معنی‌دار بودن هستند.).



شکل ۲: سلول‌های تیمار شده با عصاره دافنه در غلظت IC50 بعد از گذشت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت غلظت های مختلف عصاره گیاه دافنه بر روی سلول‌های سرطان تخمدان رده A2870s در ۳ بازه زمانی ۲۴،۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از تیمار

در شکل زیر کریستال‌های فورمازان بعد از زمان‌های مختلف مشاهده می‌شوند که کم‌کم میزان آن‌ها کاهش یافته است.



شکل۳: تصویر کریستال‌های فورمازان در سلول‌های تیمار شده با عصاره دافنه در غلظت IC50 . از چپ به راست به ترتیب بعد از گذشت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت.

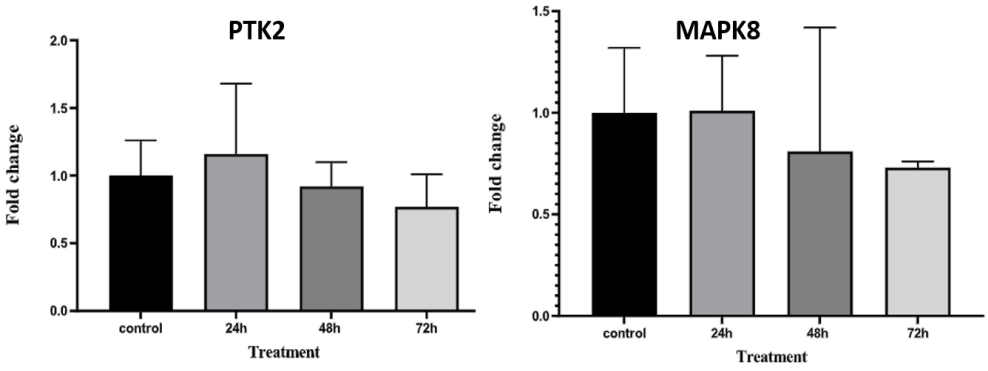
CC BY-NC 4.0

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2025-01-14]
[DOI: 10.18502/ssu.v32i7.16569]

بررسی کیفیت و کمیت RNA استخراج شده: نتایج طیف‌سنجی با دستگاه نانودراپ نشان داد که مقدار عددی ۲۶۰ به ۲۸۰ نیز برای RNA در همه نمونه‌ها بین ۱/۸ تا ۲/۲ می‌باشد که نشان از درجه بالای RNA استخراج شده و عدم آلودگی پروتئینی می‌دهد. برای بررسی کیفیت RNA استخراج شده از ژل آگارز ۲ درصد استفاده شد و هر سه باند ۲۸rRNA، ۱۸s rRNA و ۵/۸s rRNA مشاهده شد که نشان دهنده کیفیت و سالم بودن RNA استخراج شده بود.

بیان ژن‌های *PTK2* و *MAPK8* در نمونه‌های تیمار شده با داروی دافنه و تیمار نشده (کنترل): واکنش بررسی بیان نسبی هر ژن با استفاده از روش qRT-PCR برای تمام ژن‌ها در شرایط بیولوژیکی و تکنیکی یکسان با تکرارهای مشابه انجام و نتایج حاصل از این آزمون نشان داد که غلظت IC50 برای هر بازه زمانی بر روی بیان هر ژن تاثیرات متفاوتی را داشته است. نتایج حاصله نشان داد که بیان ژن *PTK2* تحت تاثیر عصاره گیاهی قرار نگرفته و تغییرات معنی‌داری نسبت به تیمارهای شاهد مشاهده نشده است. همان‌طور که در شکل ۴ نشان‌داده شده است در بازه زمانی ۲۴ ساعت بعد از تیمار، میزان بیان تقریباً با گروه کنترل یکسان بوده و در بازه‌های زمانی ۴۸ و ۷۲ ساعت میزان بیان ژن *PTK2* دچار کاهش بسیار جزئی نسبت به تیمار کنترل بوده است ولی میزان کاهش در بازه زمانی ۷۲ ساعت نسبت به بازه زمانی ۴۸ ساعت بعد از تیمار بیشتر بوده است. بررسی نتایج بیان ژن *MAPK8* در حالت تیمار با دافنه در سه زمان مختلف نسبت به گروه کنترل نشان داد که تیمار سلول‌ها با دافنه تغییری معنی‌دار در میزان بیان ژن *MAPK8* ایجاد می‌کند. همین‌طور که از نمودار بالا مشخص شده است در گروه ۲۴ ساعت بعد از تیمار تقریباً با گروه کنترل یکسان بوده ولی در گروه‌های ۴۸ ساعت و ۷۲ ساعت ، میزان بیان ژن *MAPK8* دچار کاهش معنی‌داری نسبت به گروه کنترل شده است و این کاهش در زمان ۷۲ ساعت نسبت به ۴۸ ساعت بیشتر بوده است.

منحنی ذوب و تکثیر ژن‌ها: نتایج بررسی منحنی‌های ذوب و تکثیر ژن‌ها با استفاده از دستگاه لایت سایکر در روش Real-Time PCR نشان از اختصاصی بودن آغازگرها در تکثیر نواحی ژنی مورد نظر بوده است. عدم وجود منحنی‌های متعدد در دماهای کمتر و بیشتر تائید کننده این موضوع می‌باشد.



شکل ۴: نمودار بررسی میزان بیان نسبی ژن‌های *PTK2* و *MAPK8* در سلول‌های تیمار شده با عصاره دافنه در ۳ بازه زمانی بعد از تیمار بر اساس غلظت بهینه IC50

بحث

سرطان تخمدان، یک تومور اپیتلیال تهاجمی، همچنان یکی از علل اصلی مرگ و میر ناشی از سرطان در زنان است و باعث مرگ و میر بیشتر از هر سرطان دستگاه تناسلی زنان در ایالات متحده می‌شود. استفاده از گیاهان دارویی از دیر زمان در طب سنتی توصیه شده است. جهت استفاده از گیاهان دارویی در موارد درمانی لازم است اثرات سلولی و مولکولی آن‌ها بر روی سلول‌های سرطانی و هدف در شرایط آزمایشگاه مورد بررسی

CC BY-NC 4.0

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2025-01-14]
[DOI: 10.18502/ssu.v32i7.16569]

قرار گیرد. بدین منظور در این مطالعه اثر عصاره هیدوالکلی و خام گیاه دافنه بر روی سلول‌های رده A2780s سرطان تخمدان مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج آزمون سلولی نشان داد که عصاره دافنه در ساعت‌های مختلف بعد از تیمار اثر کشندگی قابل‌ملاحظه‌ای بر روی سلول‌های هدف داشته است. پژوهش‌های زیادی در زمینه تاثیر عصاره‌های گیاهی بر روی سرطان‌های مختلف انجام شده مانند پژوهشی که در سال ۲۰۱۳ توسط جمعی از محققین بر روی اثر ضد سرطانی عصاره گیاه *Pao pereira (Pao)* روی سرطان تخمدان انجام شد و این عصاره باعث مرگ درصد بالایی از سلول‌های سرطان تخمدان شد (۱۳) که تا حدودی با نتایج این تحقیق مطابقت نشان می‌دهد با توجه به ماهیت متشابه گیاهان با همدیگر نتایج اثر بخشی آن‌ها بر سلول‌ها می تواند تا حدودی مشابه باشد. ولی مهم‌تر از همه، مقدار ماده مورد استفاده و خالص‌سازی آن‌ها برای استفاده در داروسازی می‌باشد. به هر تقدیر نتایج این تحقیق با اغلب مطالعات مشابه مطابقت دارد. در این پایان نامه برای انتخاب غلظت‌های مختلف از عصاره دافنه جهت انجام تست MTT و به‌دست آوردن IC50 از بعضی مقالات مشابه استفاده شد (۸). در این تحقیق مقدار غلظت IC50 در سه زمان مختلف (۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت) بعد از تیمار با استفاده از آزمون MTT به‌دست امد که از این غلظت ها به عنوان غلظت متعادل در بررسی بیان ژن مورد استفاده قرار گرفت. با تاثیر غلظت های مختلف از داروی دافنه بر روی سلول‌های A2780s مشاهده شد که با افزایش غلظت دارو، زنده مانی سلول ها به‌طور کاملا محسوسی کاهش می‌یابد. و عصاره خام دافنه باعث از بین رفتن سلول‌های سرطان تخمدان شده است که این نتیجه با نتایج به‌دست آمده از پژوهش کیزایبک و همکارانش که ۶ نوع عصاره با قطبیت مختلف از گیاه *Daphne altaica* را روی ۴ نوع رده سلول سرطانی انسان (کارسینوم سلول سنگفرشی مری، کارسینوم معده، هپاتوم و سلول‌های سرطان دهانه رحم) مورد آزمایش قرار دادند و متوجه اثر بازدارندگی از رشد این عصاره شدند، مطابقت دارد (۸). باتوجه به پژوهشی که در سال ۲۰۰۱ با هدف بررسی فعالیت اثر سمیت سلولی دو عصاره هیدروالکلی و کلروفرمی *D. mucronate* بر روی هفت رده سلولی مختلف از جمله سرطان سینه، کارسینوم اپیتلوید دهانه رحم، لوسمی میلوژن، لوسمی مونوبلاستیک، میلوم موش و غیره انجام شده است نشان داده شد که عصاره هیدروالکلی *D. mucronata* فعالیت ضد توموری به ویژه در برابر رده‌های سلولی پستان و سرطان خون دارد (۹). با توجه به اینکه در این تحقیق از روده سلولی A2870s استفاده شده است نمی توان این نتایج را نتایج قبلی قیاس مطلق نمود ولی می توان اثربخشی عصاره دافنه را در بازدارنگی رشد سلول‌های سرطانی که دارای ماهیت رشدی (رشد خارج از کنترل) مشابه می باشند نشان داده و اثر کشندگی عصاره هیدرو الکلی *D. mucronata* را بر روی رده‌های سلولی دیگر مورد بررسی قرار داد. بنابراین با توجه به این پیش فرض، در این مطالعه اثر سیتوژنیک عصاره دافنه بر روی رده سلولی مورد بررسی قرار گرفت و نتایج مشابهی به‌دست آمد هر چند در میزان غلظت و زمان‌های تیمار تفاوت‌هایی وجود دارد ولی در اصل اثربخشی ماده خام این گیاه بر روی زنده مانی سلول‌های سرطانی مورد مطالعه به اثبات رسید. با توجه به نمودار زنده‌مانی سلول‌ها با استفاده از روش MTT تا غلظت ۵ میکروگرم/میلی‌لیتر دارو تاثیر چندانی نداشته، ولی از محدوده غلظتی ۲۰۰-۵ میکروگرم/میلی‌لیتر کاهش چشم‌گیری در میزان سلول ها مشاهده می‌شود و بعد از غلظت ۲۰۰ میکروگرم/میلی‌لیتر، تعداد سلول‌ها تقریباً به صفر می‌رسد و این نتایج نشان دهنده این است که عصاره خام دافنه بر زنده‌مانی سلول‌های A2780s اثر زیادی داشته و به نوعی وابسته به دز دارویی می باشد. روند کاهشی در بازه‌های زمانی ۴۸ و ۷۲ ساعت نسبت به ۲۴ ساعت شیب بیشتری داشته است. بیشترین تاثیر دارو در محدوده غلظت ۲۰۰-۵ مشاهده شده و دوزهای IC50 به‌دست آمده در هر سه بازه زمانی نیز در این محدوده غلظت است. بیشترین میزان کشندگی دارو در زمان‌های ۴۸ و ۷۲ ساعت است که می‌توان علت آن را زمان

CC BY-NC 4.0

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2025-01-14]
[DOI: 10.18502/ssu.v32i7.16569]

کافی برای تاثیر دارو دانست، البته نباید از دلایلی مثل افزایش مواد سمی ناشی از رشد سلول‌ها و نبودن فضای کافی به‌ویژه در زمان ۷۲ ساعت، به راحتی عبور کرد. (۱۴). یکی از فرضیه‌های این پایان‌نامه تاثیر عصاره خام دافنه بر مسیر ژن‌های *PTK2* و *MAPK8* بود که با تحقیقی که شانگ و همکارانش با عصاره گیاه *D. giraldii* روی رده سلولی سرطان کبد انجام دادند و مشاهده کردند که این ماده باعث توقف سلول در G0/G1 و کاهش سطح JNK فسفریله شده و از طریق مسیرهای JNK و MAPK8می‌شود و به‌طور انتخابی از تکثیر سلول‌های کبدی جلوگیری می‌کند مطابقت نداشت و هیچ تاثیر معناداری بر بیان ژن‌های *PTK2* و *MAPK8* نداشت (۱۰). یکی از دلایل عدم تطبیق داده‌ها می‌تواند ناشی از نوع و واریته گیاه دافنه باشد که با توجه به متغیر بودن ترکیبات عصاره، اثرپذیری آن روی مسیرهای ژنی می تواند متفاوت باشد. نوع سلول مورد تیمار هم می‌تواند این اثرپذیری را تحت تاثیر قرار دهد. نحوه تهیه عصاره و خالص‌سازی آن نیز می تواند یکی از دلایل عدم این تاثیرپذیری باشد. استفاده از عصاره های خالص و یا مواد شیمیایی خالص‌سازی شده حتی فیتوهورمون های تولیدی در آزمایشگاه ها تحت عنوان ترکیبات آنالوگ مانند سورگولاکتون و استریگولاکتون ها می تواند اثرات مختلفی با آنچه در این مطالعه دیده شد بر روی مسیرهای ژنی داشته باشد. در یک مطالعه نشان داده شد که اثر GR24 بر روی بیان این ژن ها باعث افزایش میزان بیان ژن‌های مورد ارزیابی شده است (۱۵).

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج حاصل در این تحقیق چنین نتیجه‌گیری می‌شود که گیاه دافنه توانسته است اثر مطلوب و معنی داری بر روی زنده مانی سلول ها داشته باشد که این نتایج می‌تواند در مطالعات تکمیلی امید بخش باشد. بازه های زمانی و میزان غلظت‌های دارو می‌تواند در اثرپذیری سلول‌ها و میزان مرگ و میر موثر باشد. بررسی بیان ژن‌ها نشان داد که عصاره خام گیاه دافنه اثر قابل ملاحظه‌ای را نسبت به تیمارهای شاهد بر روی بیان ژن‌های مورد آزمایش نشان نداده است. دلایل مختلفی نظیر دست‌ورزی، آغازگرهای مورد استفاده، نوع مواد داخل عصاره (اثر بازدارندگی واکنش زنجیره ای پلی مراز به وسیله بعضی از ترکیبات عصاره) و حتی نژاد و واریته گیاه در این فعالیت مولکولی تاثیرگذار بوده باشد. استفاده از سنتز نانوذرات به عنوان حامل عصاره برای هدف‌گذاری بیشتر سلول‌ها پیشنهاد می‌شود هر چند انجام آزمون گازکروماتوگرافی برای تعیین ساختار ترکیب عصاره در راستای مطالعات فارماکولوژی صنعتی و داروسازی توصیه می‌شود. هم‌چنین استفاده از ژن‌های مختلف درگیر در سرطان برای تکمیل بخش مولکولی مطالعه پیشنهاد می‌شود.

سپاس‌گزاری

این مطالعه در قالب پایان‌نامه کارشناسی ارشد ژنتیک و با حمایت مالی حوزه معاونت مالی دانشگاه یزد انجام شد.

حامی مالی: حوزه معاونت مالی دانشگاه یزد.

تعارض در منافع: وجود ندارد.

ملاحظات اخلاقی

پروپوزال این تحقیق توسط دانشگاه یزد تایید است (کد اخلاق IR.YAZD.REC.1401/09/01).

مشارکت نویسندگان

سید کاظم صباغ در ارائه ایده، مهتا مظاهری.در طراحی مطالعه، فایزه بفرویی‌زاده و فرزانه شتابی در جمع‌آوری داده‌ها، محمد رضا سرافراز اردکانی در تجزیه و تحلیل داده‌ها مشارکت داشته و همه نویسندگان در تدوین، ویرایش اولیه و نهایی مقاله و پاسخگویی به سوالات مرتبط با مقاله سهیم هستند.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2025-01-14]

[DOI: 10.18502/ssu.v32i7.16569]

CC BY-NC 4.0

References:

1-Matei D, Nephew KP. ***Epigenetic Attire in Ovarian Cancer: The Emperor's New Clothes***. Cancer Res 2020; 80(18): 3775-85.

2-Jayson GC, Kohn EC, Kitchener HC, Ledermann JA. ***Ovarian Cancer***. The Lancet 2014; 384(9951): 1376-88.

3-Wang S, Long S, Deng Z, Wu W. ***Positive Role of Chinese Herbal Medicine in Cancer Immune Regulation***. The American Journal of Chinese Med 2020; 48(7): 1577-92.

4-Mahato M, Patra S, Gogoi M. ***Herbal Nanocarriers for Cancer Therapy.*** Nanopharmaceuticals: Principles and Applications 2021; 2: 41-75.

5-Aljelehawy Q, Karimi N, Alavi M. ***Comparison of Antibacterial and Cytotoxic Activities of Phytosynthesized Znonps by Leaves Extract of Daphne Mucronata at Different Salt Sources.*** Materials Technology 2021; 36(12): 747-59.

6-Nazir N, Muhammad J, Ghaffar R, Nisar M, Zahoor M, Uddin F, et al. ***Phytochemical Profiling and Antioxidant Potential of Daphne Mucronata Royle and Action Against Paracetamol-Induced Hepatotoxicity and Nephrotoxicity in Rabbits***. Saudi Journal of Biological Sciences 2021; 28(9): 5290-301.

7-Fazal N, Khawaja H, Naseer N, Khan AJ, Latief N. ***Daphne Mucronata Enhances Cell Proliferation and Protects Human Adipose Stem Cells Against Monosodium Iodoacetate Induced Oxidative Stress in Vitro***. Adipocyte 2020; 9(1): 495-508.

8- Murat K, Marzia D, Lin L, Halmurat U. ***Antiproliferative Activity of Different Extracts from Daphne Altaica Pall. On Selected Cancer Cells***. Journal of Medicinal Plants Research 2011; 5(15): 3448-52.

9- AMIR GZ, Miri R, Javidnia K, Davoudi M. ***Study of Cytotoxic Activity of Daphne Mucronata Royle Grown in Iran***. Iranian Journal of Medical Science 2001; 26(1): 146-51.

10-Wang D, Sun Q, Wu J, Wang W, Yao G, Li T, et al. ***A New Prenylated Flavonoid Induces G0/G1 Arrest and Apoptosis Through P38/JNK MAPK Pathways in Human Hepatocellular Carcinoma Cells***. Scientific Reports 2017; 7(1): 5736.

11-Shang XY, Chen JJ, Song XY, Wang W, Chen Y, Yao GD, et al. ***Daphnegiravone D from Daphne Giraldii Nitsche Induces P38-Dependent Apoptosis Via Oxidative And Nitrosative Stress in Hepatocellular Carcinoma Cells.*** Biomedicine & Pharmacotherapy 2018; 107: 1426-33.

12-Du WJ, Yang XL, Song ZJ, Wang JY, Zhang WJ, He X, et al. ***Antitumor Activity of Total Flavonoids From Daphne Genkwa in Colorectal Cancer.*** Phytother Res 2016; 30(2): 323-30.

13-Yu J, Chen Q. ***The Plant Extract of Pao Pereira Potentiates Carboplatin Effects Against Ovarian Cancer***. Pharmaceutical Biology 2014; 52(1): 36-43.

14- Li J, Jiang K, Zhao F. ***Icariin Regulates the Proliferation and Apoptosis of Human Ovarian Cancer Cells through Microrna-21 by Targeting Pten, Reck and Bcl-2***. Oncol Rep 2015; 33(6): 2829-36.

15-Shetabi F. ***The Effect of Gr24 on Cell Viability an Expression of Mir155 and Mapkinase14 in A2780s Cancer Cell Line***:Yazd University; 2022.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2025-01-14]

[DOI: 10.18502/ssu.v32i7.16569]

CC BY-NC 4.0

Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences
Vol 32| NO 7 | Sep 2024
Received: 11 Jan 2024
Accepted: 3 Jul 2024

Effect of Hydralcoholic Extract of Dafneh on Expressin Level of MAPK8 and PTK2 Genes and Cell Viability of Ovarian Cancercell Lines (A2870S)

Faezeh Bafrouizadeh[1], Seyed Kazem Sabbagh[†1], Mahta Mazaheri[2,3], Mohammad Reza Sarafraz-ardakani[1], Farzaneh Shetabi[1]

Original Article

Introduction: Ovarian cancer, as an aggressive epithelial tumor, remains one of the leading causes of cancer-related mortality in women. Regarding to the side effects of chemical drugs, medicinal plants, according to their unique properties such as cheapness, naturalness and availability, and without any significant side effects, medicinal plants have recently been considered in the prevention of diseases. In this laboratory research, the cytotoxic effect of hydroalkolic extract of *Daphne mucronata* Royle on cell viability of A2780 cancer cell and the expression of MAPK8 and PTK2 genes in the cells treated with the Ephedra plant extract during three-time interval 24,48 and 72 hours after treatment were investigated.

Methods: The inhibitory effect of hydroalcholic extact of *D. mucronato* on targeted cells was done using MTTassay then, expression level of MAPK8 and PTK2 genes in cells treated with plant extract were investigated using qRT-PCR method. Data analyses were done using GraphPad prism software.

Results: Regarding to the results of cell viability, IC50 rate for 24, 48 and 72h after treatment were determined as 105.40, 85.98 and 81.38µg/mL, respectively. Expression analysis of tested genes showed that hydroalcoholic plant extract of *D. mucronato* had not significant effect on expression of targeted genes (Pvalue≤0.05) so that there was no significant difference on their expression level compared to the control.

Conclusion: According to the results, it can be concluded that *D. mucronato* extract had a significant inhibitory effect on treated A2870s cancer cells, but it was not able to change the expression level of genes involved in anticancer activities and its molecular pathways. The use of bio-markers and other gene pathways is suggested for additional studies.

Keywords: Ovarian cancer, Gene expression, Medicinal Plants, Cell viability.

Citation: Bafrouizadeh F, Sabbagh S.K, Mazaheri M, Sarafraz-ardakani M.R, Shetabi F. **Effect of Hydralcoholic Extract of Dafneh on Expressin Level of MAPK8 and PTK2 Genes and Cell Viability of Ovarian Cancercell Lines (A2870S).** J Shahid Sadoughi Uni Med Sci 2024; 32(7): 8045-55.

[1]Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Yazd University, Yazd, Iran.
[2]Department of Medicl Genetics, Faculty of Medicine, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran.
[3]Mother and Newborn Health Research Center, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran.
***Corresponding author: Tel:** 09133731069**, email:** sksabbagh@yazd.ac.ir

CC BY-NC 4.0

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2025-01-14]
[DOI: 10.18502/ssu.v32i7.16569]