

بررسی اثر زایموزان استخراج شده از ساکاروماایسس سرویسیه بر رشد تومور و القاء آپوپتوز در سلول‌های توموری ملانوما

مهدی تقوی^۱، صمد فراشی بناب^۲، علیرضا خسروی^{*۱}

۱- استاد مرکز تحقیقات قارچ شناسی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران

۲- گروه ایمنی شناسی، دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

تاریخ پذیرش ۹۴/۱۱/۲۴

تاریخ دریافت: ۹۴/۱۰/۲۷

چکیده

ملانوما بدخیم‌ترین فرم سرطان پوست است که از سلول‌های پیگمانی ملانوسیتی منشأ می‌گیرد. زایموزان ترکیب غیر محلول از دیواره سلولی مخمر ساکاروماایسس سرویسیه می‌باشد که ساختاری تشکیل شده از بتاگلوکان متصل به پروتئین دارد. در این مطالعه اثر زایموزان استخراج شده از ساکاروماایسس سرویسیه بر میزان رشد و آپوپتوز در رده سلولی ملانوما مورد بررسی قرار گرفت. سلول‌های توموری در محیط کشت RPMI ۱۶۴۰ حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاو در دمای ۳۷°C و اتمسفر دارای ۵ درصد دی اکسید کربن و ۹۵٪ رطوبت کشت شدند. بعد از ۲۴ ساعت، سلول‌ها با زایموزان در غلظت‌های مختلف به مدت ۴۸ ساعت و ۷۲ ساعت تیمار شدند. میزان رشد سلولی با روش MTT مورد بررسی قرار گرفت. میزان مرگ سلولی با کیت Annexin-V و پروید یوم یداید و با استفاده از دستگاه فلوسیتومتری بررسی گردید. نتایج نشان داد که زایموزان بطور معنی‌داری از رشد سلول‌های سرطانی در محیط کشت جلوگیری می‌کند. زایموزان همچنین در غلظت‌های ۲۵ µg/ml و ۵۰ µg/ml باعث القاء آپوپتوز در سلول‌های سرطانی شد و از رشد تومور ممانعت کرد. با توجه به اینکه زایموزان توانایی القاء آپوپتوز در سلول‌های توموری دارد به نظر می‌رسد ترکیب مناسبی جهت استفاده برای مهار رشد سلول‌های توموری باشد و تحقیقات بیشتر در این زمینه به منظور استفاده از آن در بیوتراپی سرطان امیدبخش است.

کلمات کلیدی: زایموزان، رشد تومور، آپوپتوز، ملانوما

* نویسنده مسئول: علیرضا خسروی

آدرس: مرکز تحقیقات قارچ شناسی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران. تلفن: ۰۲۱-۶۱۱۱۷۱۵۱

پست الکترونیک: khosravi@ut.ac.ir

مقدمه

تومور و سرطان در اثر رشد و تکثیر کنترل نشده و غیرطبیعی سلول‌های بدن ایجاد می‌شود. در حال حاضر سرطان‌ها از عوامل اصلی مرگ و میر در جوامع بشری شده‌اند (۱۱). ملانوما بدخیم‌ترین فرم سرطان پوست است که از سلول‌های پیگمانی ملانوسیتی منشأ می‌گیرد و عوامل مختلف محیطی و ژنتیکی در رشد و گسترش آن نقش دارند (۱۰). روش‌های درمانی رایج سرطان شیمی‌درمانی، رادیوتراپی و جراحی می‌باشد ولی اکثر مبتلایان نیاز به درمان ترکیبی دارند و ابداع و توسعه روش‌های درمانی جدید و موثرتر برای سرطان‌ها ضرورت دارد (۱۷).

از مهمترین تغییراتی که در فیزیولوژی سلولی می‌تواند منجر به رشد تومور شود، گریز از آپوپتوز است به طوری که یکی از هدف‌های مهم در درمان سرطان، القاء آپوپتوز در سلول‌های بدخیم است. آپوپتوز نوعی مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی می‌باشد که بدون ایجاد التهاب باعث حذف سلول‌های غیرطبیعی می‌شود و در هومئوستاز بافت‌ها نقش اساسی دارد (۴). امروزه استفاده از مواد با منشأ طبیعی در درمان، پیشگیری و یا کند کردن سیر بیماری با تقویت سیستم ایمنی میزبان دارای اهمیت ویژه‌ای است (۱۴). زایموزان جزئی از دیواره سلولی مخمر ساکارومایسس سرویسیه (*Saccharomyces cerevisiae*) است که ۵۷٪-۵۰٪ آن را بتاگلوکان تشکیل می‌دهد (۵). بتاگلوکان‌ها پلیمرهایی از دی-گلوکز هستند که ساختار اصلی دیواره سلولی قارچی را تشکیل می‌دهند (۱۳). طیف وسیعی از انواع سلول‌های ایمنی از قبیل ماکروفاژها و سلول‌های کشنده طبیعی (NK) می‌توانند به وسیله زایموزان فعال شوند (۱، ۶ و ۲۴). واکنش ماکروفاژها با زایموزان به عنوان اولین قدم در شروع پاسخ‌های

ایمنی ناشی از زایموزان محسوب می‌شود. پذیرنده‌های گلوکان در اتصال ماکروفاژ به زایموزان نقش مهمی را ایفا می‌کنند (۲۵). تولید محصولات التهابی مختلفی از جمله سیتوکین‌ها، پراکسید هیدروژن و اسید آراشیدونیک توسط زایموزان القاء می‌شود (۳ و ۲۲). گیرنده‌های جزء ۳ کمپلمان (CR۳)، لاکتوزیل سرامید، گیرنده‌های رفتگر انتخابی و دکتین-۱ در اتصال و شناسایی زایموزان نقش دارند (۲۱، ۲۶، ۲۸ و ۳۱). علاوه بر این، گیرنده شبه ابراز ۲ (TLR۲) در القاء پاسخ‌های ایمنی به وسیله زایموزان دخالت دارد (۸). مطالعه حاضر با هدف بررسی اثر ضد سرطانی زایموزان استخراج شده از ساکارومایسس سرویسیه بر روی سلول‌های ملانوما انجام شد.

مواد و روش کار

آماده سازی زایموزان

زایموزان پلی‌ساکارید تهیه شده از دیواره ساکارومایسس سرویسیه می‌باشد که از کشور آمریکا (Biosynth International Inc, Itasca, IL, USA) خریداری شد. پودر زایموزان به صورت ۱٪ در سرم فیزیولوژی نرمال حل شده و به مدت یک ساعت در بن ماری ۳۷°C قرار داده شد، سپس به مدت ۳۰ دقیقه با دور ۴۰۰۰ rpm سانتریفوژ گردید. بعد از حذف مایع رویی، سوسپانسیون حاصل از رسوب در دمای ۴°C نگهداری شد.

کشت سلولی

رده سلولی B۱۶F۱۰ مربوط به تومور ملانوما با منشأ موشی در محیط کشت RPMI۱۶۴۰ حاوی ۱۰٪ سرم جنین گاو (FBS)، ۲mM L-گلوتامین، ۱۰۰IU/ml پنی‌سیلین و ۱۰۰µg/ml استرپتومایسین کشت داده

بررسی تأثیر زایموزان بر القاء آپوپتوز در

سلول‌های توموری به روش فلوسیتومتری

بررسی آپوپتوز توسط کیت تشخیصی Annexin V/Propidium iodide (PI) (شرکت بکتون دیکینسون-آمریکا) انجام گرفت. در طی آپوپتوز، فسفاتیدیل سرین از سطح داخلی به سطح خارجی غشای سلول منتقل و Annexin-V به آن متصل می‌شود. رنگ آمیزی PI نیز بر اساس خاصیت نفوذپذیری و عبور آن از غشای سلول‌های مرده می‌باشد که به DNA قطعه قطعه شده هسته متصل می‌شود. برای بررسی تأثیر زایموزان بر القاء آپوپتوز در سلول‌های توموری ملانوما، سلول‌های B16F10 پس از ۲۴ ساعت کشت در پلیت کشت سلول شش‌خانه به تعداد 2×10^4 به ازای هر خانه، تحت تیمار با غلظت‌های مختلف زایموزان ($25 \mu\text{g/ml}$ و $50 \mu\text{g/ml}$) به مدت ۴۸ ساعت قرار گرفتند. سلول‌های گروه کنترل و گروه‌های تیمار از پلیت‌ها جمع‌آوری شدند و پس از شستشو، بافر بایندینگ و سپس محلول‌های Annexin-V و PI اضافه شد. سلول‌ها پس از انکوباسیون به مدت ۳۰ دقیقه در دمای 37°C در تاریکی، با دستگاه فلوسیتومتری آنالیز شدند.

بررسی درون‌تنی تأثیر زایموزان بر رشد تومور

جهت بررسی تأثیر زایموزان بر رشد تومور در شرایط درون‌تنی (*In vivo*)، تعداد ۱۴ سر موش هم‌خون C57BL/6 ماده شش هفته به دو گروه هفت‌تایی تقسیم شدند و در حیوان‌خانه ایزوله در دمای $22-27^\circ\text{C}$ و سیکل روشنایی-تاریکی ۱۲ ساعت روشنایی-۱۲ ساعت تاریکی و با دسترسی آزاد به آب و غذا نگهداری شدند. پس از یک هفته، سلول‌های توموری ملانوما پس از ارزیابی زنده بودن به تعداد 5×10^5 سلول در بافر PBS استریل به صورت زیرجلدی به ناحیه

شدند. سلول‌ها در انکوباتور با دمای 37°C و اتمسفر واجد $5\% \text{CO}_2$ و 95% رطوبت نگهداری شدند.

بررسی تأثیر زایموزان بر میزان زنده‌مانی

(سیتوتوکسی سیتی) سلول‌های توموری با

روش MTT

پودر MTT (4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-3-(2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) زرد رنگ و محلول در آب بوده که توسط میتوکندری سلول‌های زنده احیا شده و به فورمازان (Formazan) غیر محلول در آب تبدیل می‌شود. میزان تجزیه شدن MTT و تشکیل فورمازان با میزان تکثیر سلول‌ها ارتباط دارد به طوری که هر قدر میزان رسوب فورمازان بیشتر باشد، ماده رنگی تولید شده بیشتر و تعداد سلول‌های زنده بیشتر خواهد بود. برای بررسی تأثیر زایموزان بر زنده‌مانی یا سیتوتوکسی سیتی سلول‌های توموری، سلول‌های ملانوما B16F10 به تعداد 1×10^4 سلول به ازای هر چاهک از پلیت ۹۶ خانه کشت سلول کشت داده شدند. بعد از گذشت ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای 37°C و اتمسفر واجد $5\% \text{CO}_2$ و 95% رطوبت، غلظت‌های مختلفی از زایموزان (۰، ۱، ۵، ۱۰، ۲۵ و $50 \mu\text{g/ml}$) به سلول‌ها اضافه شده و پلیت‌ها به مدت ۴۸ و ۷۲ ساعت انکوبه شدند. پس از اتمام دوره انکوباسیون، $100 \mu\text{l}$ از محلول MTT (1 mg/ml) (شرکت سیگما-آمریکا) به هر گوده اضافه شد. پلیت‌ها دوباره به مدت ۴ ساعت انکوبه شدند. پس از اتمام زمان انکوباسیون، محلول رویی خالی گردید و به هر چاهک $150 \mu\text{l}$ محلول دی‌متیل‌سولفوکسید (DMSO، شرکت سیگما، آمریکا) اضافه شد تا کریستال‌های فورمازان حل شوند و پس از یک ساعت پلیت‌ها با استفاده از دستگاه الایزا ریدر با طول موج 570 nm نانومتر بررسی شدند.

آزمایشات در محیط کشت به صورت سه بار تکرار انجام شدند.

نتایج

اثر زایموزان بر زنده ماندن (سیتوتوکسی سیتی) سلول های توموری ملانوما

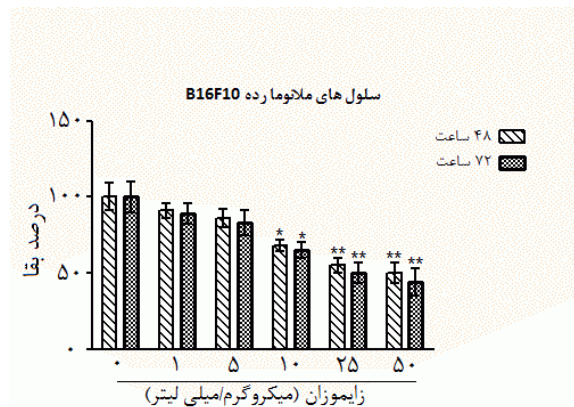
زنده ماندن سلول ها با استفاده از روش MTT ارزیابی شد. نتایج حاصل MTT مبنی بر تأثیر زایموزان بر زنده ماندن (سیتوتوکسی سیتی) سلول های توموری ملانوما در غلظت های ۰، ۱، ۵، ۱۰، ۲۵ و ۵۰ $\mu\text{g/ml}$ در زمان های ۴۸ و ۷۲ ساعت در نمودار ۱ نشان داده شده است. نتایج نشان داد که زایموزان با الگوی وابسته به غلظت و زمان منجر به القاء سیتوتوکسی سیتی در سلول های توموری می گردد.

پهلوی چپ هر موش تلقیح گردید. از روز ۱۵ پس از تلقیح سلول های توموری، به گروه اول روزانه $10\mu\text{g}$ زایموزان به مدت ۴ روز متوالی به صورت داخل صفاقی تزریق شد و گروه دوم به عنوان گروه کنترل توموری در نظر گرفته شد.

در روز ۲۵، ابعاد تومور با استفاده از کولیس دیجیتال اندازه گیری شد و با استفاده از فرمول زیر حجم تومور بر حسب mm^3 محاسبه گردید: $\text{حجم تومور} = \text{طول تومور} \times (\text{عرض تومور})^2 \times 0.5$

تجزیه و تحلیل آماری

برای تجزیه و تحلیل داده ها از آزمون آماری ANOVA استفاده شد و تعیین اختلاف بین گروه ها با آزمون Tukey-HSD بررسی شد. در ارزیابی آپوپتوز توسط فلوسیتومتری از نرم افزار Flowjo-v10 استفاده شد. کلیه

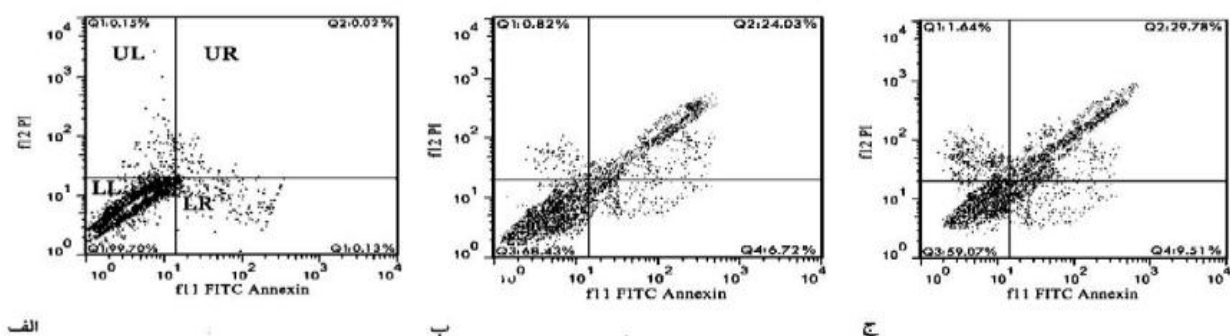


نمودار ۱. اثر سیتوتوکسیک زایموزان بر روی سلول های توموری ملانوما در زمان های ۴۸ و ۷۲ ساعت: * و ** نشان دهنده معنی دار بودن اختلاف در میزان زنده ماندن سلول ها در گروه تیمار و گروه کنترل است (به ترتیب $p < 0.05$ و $p < 0.01$).

اثر زایموزان در القاء آپوپتوز در سلول های توموری

به منظور بررسی القاء آپوپتوز در سلول های ملانوما پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون با زایموزان در غلظت های $25\mu\text{g/ml}$ و $50\mu\text{g/ml}$ از روش رنگ آمیزی Annexin V/PI استفاده شد. نتایج فلوسیتومتری در نمودار ۲ نشان داده شده است. سلول های رنگ شده با Annexin V در مرحله آپوپتوز اولیه قرار دارند، سلول های رنگ شده با PI دچار نکروز شده اند و سلول های رنگ شده با هر دو رنگ در مرحله آپوپتوز نهایی قرار دارند. بر اساس نتایج فلوسیتومتری، بیشترین میزان آپوپتوز در سلول های ملانوما تیمار شده با بیشترین غلظت زایموزان مشاهده شد.

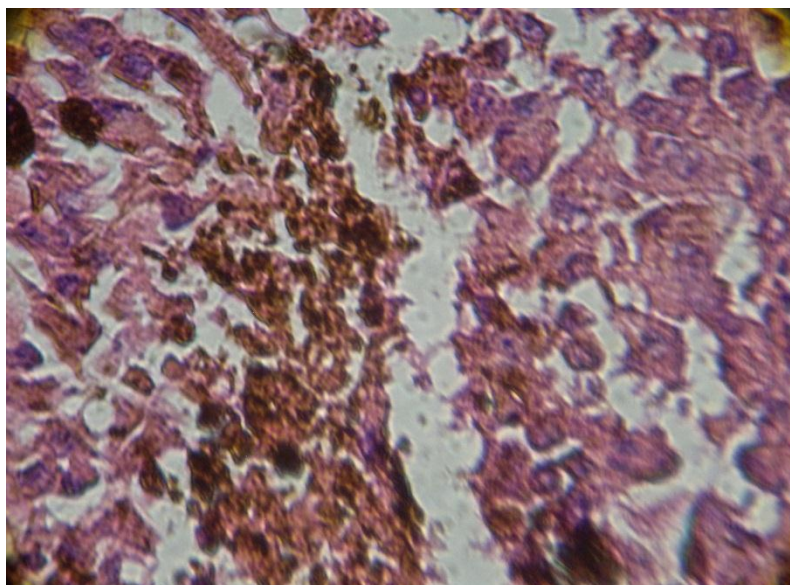
بررسی اثر زایموزان استخراج شده... ۵



نمودار ۲. بررسی تأثیر زایموزان بر القاء آپوپتوز در سلول‌های توموری ملانوما: نمودار دات پلات جمعیت سلول‌های زنده، سلول‌های در مرحله آپوپتوتیک اولیه، سلول‌های در مرحله آپوپتوتیک نهایی و سلول‌های نکروتیک را نشان می‌دهد. الف) نمودار دات پلات سلول‌های گروه کنترل، ب) نمودار دات پلات سلول‌هایی که با $25 \mu\text{g/ml}$ زایموزان به مدت ۴۸ ساعت انکوبه شده‌اند، ج) نمودار دات پلات سلول‌هایی که با $50 \mu\text{g/ml}$ زایموزان به مدت ۴۸ ساعت انکوبه شده‌اند.

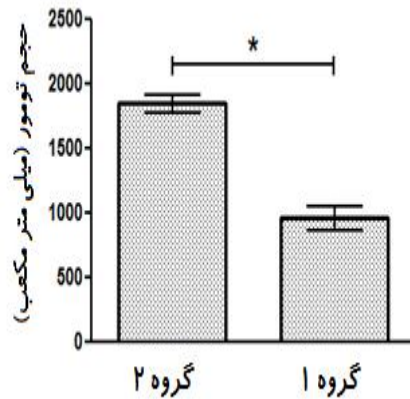
اثر زایموزان بر رشد تومور در میزبان‌های توموری

پس از تلقیح سلول‌های توموری ملانوما و رشد تومورها، جهت تأیید نوع تومور از بافت توموری لام پاتولوژیک تهیه گردید. در رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین (H&E)، سلول‌های توموری به شکل گرد تا بیضی با پلئومورفیسم واضح سلولی و هسته‌ای مشاهده شدند که دارای مقادیر متغیری از ملانین بودند. اندیکس میتوزی تومور بالا بود، مناطق نکروتیک چندکانونی و آنژیوژنز گسترده مشاهده شد (شکل ۱).



شکل ۱. مقطع پاتولوژیک از بافت تومور ملانوما: در رنگ آمیزی H&E سلول‌های توموری به شکل گرد تا بیضی که دارای مقادیر متغیری از ملانین هستند مشاهده می‌شوند.

در پایان مطالعه، حجم تومور در موش‌های گروه کنترل و گروه تیمار با زایموزان اندازه‌گیری شد که در نمودار ۳ نشان داده شده است. حجم تومور در گروه توموری تیمار شده با زایموزان به طور معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل توموری کمتر بود ($p < 0.05$).



نمودار ۳. میانگین حجم تومور در گروه کنترل و گروه تیمار شده با زایموزان: حجم تومور در گروه تیمار شده با زایموزان (گروه ۱) در مقایسه با حجم تومور در گروه کنترل تومور (گروه ۲) به طور معنی داری کمتر است ($p < 0.05$).

بحث

شیمی درمانی، پرتودرمانی و جراحی در اکثر سرطان‌ها به عنوان درمان اصلی به کار می‌روند اما به دلیل عوارض جانبی بالایی که دارند و در مورد برخی سرطان‌ها کارایی خوبی ندارند، ابداع روش‌های درمانی جدید و با کارایی بهتر لازم است. در سال‌های اخیر تحقیقات زیادی برای یافتن ترکیبات طبیعی با خواص ضد توموری انجام شده است. ملانوما تهاجمی‌ترین شکل سرطان پوست است و علی‌رغم اینکه تنها ۴٪ سرطان‌های پوست را شامل می‌شود اما مسئول ۷۴٪ از مرگ و میرهای ناشی از سرطان پوست می‌باشد. ملانوما بدخیم به قسمت‌های عمیق پوست و اندام‌های داخلی نفوذ می‌کند و نسبت به درمان‌های متداول و آپوتوز مقاوم است. امروزه بیوترابی با ترکیبات میکروبی به عنوان نوعی استراتژی درمانی نوین برای انواع سرطان‌ها مخصوصاً ملانوما مورد توجه قرار گرفته است. در این ارتباط در چند سال اخیر نقش ترکیبات مختلف میکروبی در تحریک سیستم ایمنی مورد مطالعه قرار گرفته است. زایموزان ترکیبی در دیواره سلولی

مخمر است که فعالیت‌های بیولوژیکی متنوعی را نشان می‌دهد و با پاسخ‌های ایمنی و التهابی مرتبط است (۱۴ و ۵). بخش اصلی زایموزان، بتاگلوکان است اما دیگر اجزای زایموزان عبارتند از مانان، پروتئین و اسید نوکلئیک (۱۵). در این مطالعه اثر زایموزان استخراج شده از ساکارومایسس سرویسیه بر تکثیر سلول‌های ملانوما مورد بررسی قرار گرفت. یافته‌های حاضر نشان داد زایموزان اثر مهاري بر رشد سلول‌های توموری ملانوما B16F10 دارد و باعث افزایش مرگ برنامه-ریزی شده سلولی می‌شود. تأثیر مهاري زایموزان به صورت وابسته به دز و زمان بود. در واقع زایموزان دارای اثرات سمیت سلولی در محیط کشت می‌باشد. در مطالعه Zhang و همکاران (۲۰۰۶) نیز مشاهده شد بتاگلوکان استخراج شده از میسلیم قارچی باعث کاهش تکثیر و زنده‌مانی سلول‌های سرطان پستان انسان به صورت وابسته به دز می‌شود و این اثر به دلیل توقف سیکل سلولی اتفاق می‌افتد (۳۰).

اکثر بدخیمی‌ها در اثر اختلال در سیستم آپوتوزی سلول ممکن است ایجاد شوند (۱۲). در مطالعه حاضر،

بررسی اثر زایموزان استخراج شده... ۷

کمکی نوع ۱ (TH1) و تمایز سلول‌های $CD4^+ T$ به سلول‌های T اجرایی را تحریک می‌کند و پیشنهاد شده است از بتاگلوکان به عنوان یک ادجوان قوی جهت تقویت پاسخ‌های ضد توموری TH1 و لنفوسیت‌های T سیتوتوکسیک در کارآزمایی‌های بالینی استفاده شود (۱۹). در مطالعه Young و همکاران (۲۰۰۱) برای شناسایی مکانیسم القاء بیان فاکتور نکروز دهنده-آلفا (TNF- α) به وسیله زایموزان مشاهده شد NF- κ B در بیان TNF- α القا شده به وسیله زایموزان نقش دارد (۲۹). زایموزان به واسطه TLR۲ می‌تواند موجب فعال شدن NF- κ B و در نتیجه تولید TNF- α شود (۲۷) و TNF به طور مستقیم اثرات ضد تکثیری و سیتوتوکسیک بر روی سلول‌ها به خصوص سلول‌های توموری دارد (۹). همچنین باعث کاهش جریان خون تومور و آسیب عروق تومور می‌گردد (۱۶). زایموزان بر روی تولید سایر سیتوکین‌ها و عوامل مهم در پاسخ‌های ایمنی ضد تومور نیز می‌تواند نقش داشته باشد.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که زایموزان بر رشد تومور و القاء آپوپتوز در سلول‌های سرطانی ملانوما در محیط کشت مؤثر است. همچنین تأثیر زایموزان بر رشد تومور در شرایط درون‌تنی نیز تأیید شد. بنابراین زایموزان می‌تواند به عنوان یک ترکیب تأثیرگذار در پیشگیری و درمان سرطان مطرح باشد ولی مطالعه‌های تکمیلی جهت تأیید اثربخشی آن در درمان سرطان ضروری می‌باشد.

سپاسگزاری

این مقاله برگرفته از پایان‌نامه دکتری تخصصی مصوب دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران است. بدین وسیله مراتب قدردانی خود را از مسئولین و کارشناسان محترم

بررسی آپوپتوز سلولی با استفاده از Annexin V و PI نشان داد زایموزان می‌تواند آپوپتوز را در سلول‌های توموری ملانوما القاء کند و با افزایش غلظت زایموزان میزان سلول‌های آپوپتوتیک افزایش یافت. در مطالعه انجام شده توسط Fullerton و همکاران (۱۹۹۹) نیز اثرات آپوپتوتیک بتاگلوکان بر روی رده سلولی سرطان پروستات انسانی بررسی شد که نتایج به دست آمده نشان داد این ترکیب باعث مرگ سلولی آپوپتوتیک می‌شود (۷). در مطالعه Parzonco و همکاران (۲۰۱۵) مشاهده شد که بتاگلوکان جدا شده از دانه غلات باعث نمایان شدن فسفاتیدیل سرین بر روی سطح خارجی غشای سلولی (القاء آپوپتوز) در سلول‌های ملانومای انسانی در محیط کشت می‌شود که به دلیل کاهش سطح ATP داخل سلولی پیشنهاد شد که القاء آپوپتوز از طریق مسیر میتوکندریایی ایجاد می‌شود (۱۸). همچنین Queiroz و همکاران (۲۰۱۵) نشان دادند که بتاگلوکان فارچی از طریق فعال کردن پروتئین کیناز فعال شده با AMP، FOXO۳a، Bax و کاهش فعالیت $p70S6K$ باعث افزایش آپوپتوز در سلول‌های توموری پستان می‌شود و به واسطه افزایش استرس اکسیداتیو موجب کاهش زنده‌مانی این سلول‌ها می‌گردد (۲۰).

در این مطالعه، در موش‌های تیمار شده با زایموزان حجم تومور نسبت به موش‌های تیمار نشده کاهش یافته بود. این یافته نشان می‌دهد که زایموزان می‌تواند در رشد سلول‌های سرطانی در داخل بدن اختلال ایجاد کند. نتایج تحقیقات Ohno و همکاران (۲۰۱۱) هم نشان داد که استفاده از زایموزان به صورت داخل وریدی در مدل موش توموری شده با سارکوما اندازه تومور را کاهش می‌دهد (۱۵). مشاهده شده است بتاگلوکان مشتق از مخمر به طور غالب پاسخ‌های T

malignant myelopoiesis: Synergism with interferon-gamma. *The International Journal of Cell Cloning* 6:241-61.

10. Hossini, A.M., Eberle, J., Fecker, L.F., Orfanos, C.E., Geilen, C.C. (2003). Conditional expression of exogenous Bcl-X_s triggers apoptosis in human melanoma cells in vitro and delays growth of melanoma xenografts. *FEBS letters* 553:250-56.
11. Jena, J., Ranjan, R., Ranjan, P., Sarangi, M.K. (2012). A Study on Natural Anticancer Plants. *International Journal of Pharmaceutical Chemistry* 1:365-68.
12. Leist, M., Jäätelä, M. (2001). Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2:589-98.
13. Manners, D.J., Masson, A.J., Patterson, J.C. (1973). The structure of a beta-(1->3)-D-glucan from yeast cell walls. *Biochemical Journal* 135:19-30.
14. Nobili, S., Lippi, D., Witort, E., Donnini, M., Bausi, L., Mini, E., Capaccioli, S. (2009). Natural compounds for cancer treatment and prevention. *Pharmacological Research* 59:365-78.
15. Ohno, N., Miura, T., Miura, N., Adachi, Y., Yadomae, T. (2001). Structure and biological activities of hypochlorite oxidized zymosan. *Carbohydrate Polymers* 44:339-49.
16. Palladino, M.A., Shalaby, M.R., Kramer, S.M., Ferraiolo, B.L., Baughman, R.A., Deleo, A., Crase, D., Marafino, B., Aggarwal, B., Figari, I. (1987). Characterization of the antitumor activities of human tumor necrosis factor-alpha and the comparison with other cytokines: induction of tumor-specific immunity. *The Journal of Immunology* 138:4023-32.
17. Park, H.J., su Han, E., Park, D.K. (2010). The ethyl acetate extract of PGP (*Phellinus linteus* grown on *Panax ginseng*) suppresses B16F10 melanoma cell proliferation through inducing cellular differentiation and apoptosis. *Journal of Ethnopharmacology* 132:115-21.
18. Parzonko, A., Makarewicz-Wujec, M., Jaszewska, E., Harasym, J., Kozłowska-Wojciechowska, M. (2015). Pro-apoptotic

مرکز تحقیقات قارچ‌شناسی دانشگاه تهران اعلام می‌داریم.

منابع

1. Adachi, Y., Okazaki, M., Ohno, N., Yadomae, T. (1997). Leukocyte activation by (1→3)-β-D glucans. *Mediators of Inflammation* 6:251-56.
2. Chiba, N., Ohno, N., Terui, T., Adachi, Y., Yadomae, T. (1996). Effect of highly branched (1->3)-β-D-glucan, OL-2, on zymosan-mediated hydrogen peroxide production by murine peritoneal macrophages. *Pharmaceutical and Pharmacological Letters* 6:12-15.
3. Daum, T., Rohrbach, M.S. (1992). Zymosan induces selective release of arachidonic acid from rabbit alveolar macrophages via stimulation of a beta-glucan receptor. *FEBS Letters* 309:119-22.
4. Denicourt, C., Dowdy, S.F. (2004). Targeting apoptotic pathways in cancer cells. *Science* 305:1411-13.
5. Di Carlo, F. J., Fiore, J.V. (1958). On the composition of zymosan. *Science* 127:756-57.
6. Duan, X., Ackerly, M., Vivier, E., Anderson, P. (1994). Evidence for involvement of β-glucan-binding cell surface lectins in human natural killer cell function. *Cellular Immunology* 157:393-402.
7. Fullerton, S., Samadi, A., Tortorelis, D., Choudhury, M., Mallouh, C., Tazaki, H., Konno, S. (1999). Induction of apoptosis in human prostatic cancer cells with beta-glucan (Maitake mushroom polysaccharide). *Molecular Urology* 4:7-13.
8. Gantner, B.N., Simmons, R.M., Canavera, S.J., Akira, S., Underhill, D.M. (2003). Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like receptor 2. *The Journal of Experimental Medicine* 197:1107-17.
9. Herrmann, F., Bambach, T., Bonifer, R., Lindemann, A., Riedel, D., Oster, W., Mertelsmann, R. (1988). The suppressive effects of recombinant human tumor necrosis factor-alpha on normal and



26. Taylor, P.R., Tsoni, S.V., Willment, J.A., Dennehy, K.M., Rosas, M., Findon, H., Haynes, K., Steele, C., Botto, M., Gordon, S. (2007). Dectin-1 is required for β -glucan recognition and control of fungal infection. *Nature Immunology* **8**:31-38.
27. Underhill, D.M., Ozinsky, A., Hajjar, A.M., Stevens, A., Wilson, C.B., Bassetti, M., Aderem, A. (1999). The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. *Nature* **401**:811-15.
28. Xia, Y., Větvíčka, V., Yan, J., Hanikýřová, M., Mayadas, T., Ross, G.D. (1999). The β -glucan-binding lectin site of mouse CR3 (CD11b/CD18) and its function in generating a primed state of the receptor that mediates cytotoxic activation in response to iC3b-opsonized target cells. *The Journal of Immunology* **162**:2281-90.
29. Young, S.H., Ye, J., Frazer, D.G., Shi, X., Castranova, V. (2001). Molecular mechanism of tumor necrosis factor- α production in 1 \rightarrow 3- β -glucan (zymosan)-activated macrophages. *Journal of Biological Chemistry* **276**:20781-87.
30. Zhang, M., Chiu, L. C.M., Cheung, P.C., Ooi, V.E. (2006). Growth-inhibitory effects of a β -glucan from the mycelium of *Poria cocos* on human breast carcinoma MCF-7 cells: Cell-cycle arrest and apoptosis induction. *Oncology Reports* **15**:637-43.
31. Zimmerman, J.W., Lindermuth, J., Fish, P.A., Palace, G.P., Stevenson, T.T., DeMong, D. E. (1998). A novel carbohydrate-glycosphingolipid interaction between a β -(1-3)-glucan immunomodulator, PGG-glucan, and lactosylceramide of human leukocytes. *Journal of Biological Chemistry* **273**:22014-20.
- properties of (1,3)(1,4)- β -d-glucan from *Avena sativa* on human melanoma HTB-140 cells in vitro. *International Journal of Biological Macromolecules* **72**:757-63.
19. Qi, C., Cai, Y., Gunn, L., Ding, C., Li, B., Kloecker, G., Qian, K., Vasilakos, J., Saijo, S., Iwakura, Y. (2011). Differential pathways regulating innate and adaptive anti-tumor immune responses by particulate and soluble yeast-derived β -glucans. *Blood* **117**:6825-36.
20. Queiroz, E.A., Fortes, Z.B., da Cunha, M.A., Barbosa, A.M., Khaper, N., Dekker, R.F. (2015). Antiproliferative and pro-apoptotic effects of three fungal exocellular β -glucans in MCF-7 breast cancer cells is mediated by oxidative stress, AMP-activated protein kinase (AMPK) and the Forkhead transcription factor, FOXO3a. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **67**:14-24.
21. Rice, P.J., Kelley, J.L., Kogan, G., Ensley, H.E., Kalbfleisch, J.H., Browder, I.W., Williams, D.L. (2002). Human monocyte scavenger receptors are pattern recognition receptors for (1 \rightarrow 3)- β -D-glucans. *Journal of Leukocyte Biology* **72**:140-46.
22. Sakurai, T., Kaise, T., Yadomae, T., Matsubara, C. (1997). Different role of serum components and cytokines on alveolar macrophage activation by soluble fungal (1 \rightarrow 3)- β -d-glucan. *European Journal of Pharmacology* **334**:255-63.
23. Sato, M., Sano, H., Iwaki, D., Kudo, K., Konishi, M., Takahashi, H., Takahashi, T., Imaizumi, H., Asai, Y., Kuroki, Y. (2003). Direct binding of Toll-like receptor 2 to zymosan, and zymosan-induced NF- κ B activation and TNF- α secretion are down-regulated by lung collectin surfactant protein A. *The Journal of Immunology* **171**:417-25.
24. Sorenson, W., Shahan, T.A., Simpson, J. (1998). Cell wall preparations from environmental yeasts: effect on alveolar macrophage function in vitro. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* **5**:65-72.
25. Tapper, H., Sundler, R. (1995). Glucan receptor and zymosan-induced lysosomal enzyme secretion in macrophages. *Biochemical Journal* **306**:829-35.

Evaluation of the effects of Zymosan from *Saccharomyces Cerevisiae* on Tumor Growth and Apoptosis Induction in Melanoma Cells

Taghavi, M.¹, Farashi Bonab, S.², Khosravi, A.R.^{1,*}

1- Professor, Mycology Research Center, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

2- Department of Immunology, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Received Date: 17 January 2016

Accepted Date: 13 February 2016

Abstract: Melanoma is a malignancy that initiates from melanocytes. Zymosan is an insoluble compound prepared from yeast cell wall and consists of protein-carbohydrate complexes. In this study, we assessed the effects of zymosan on tumor cell viability, growth and apoptosis in melanoma cell line B16F10. Melanoma cells were cultured in RPMI1640 medium with 10% fetal bovine serum. After one day, the cells were treated by zymosan with different concentrations for 48 and 72 hours. Cell proliferation was assessed by MTT assay. Apoptosis induction was evaluated by flow cytometric analysis using Annexin V/Propidium iodide apoptosis kit. Zymosan noticeably inhibited cancer cells growth in vitro. In addition, zymosan induced apoptosis in a dose dependent manner, mainly at doses of 25µg/ml and 50µg/ml, and reduced tumor growth in vivo. Since zymosan can induce apoptosis and reduce tumor growth, it seems to be an appropriate component for cancer biotherapy and further investigation on antitumor effects of this microbial element may be beneficial.

Keywords: Zymosan, Tumor growth, Apoptosis, Melanoma

*Corresponding author: Khosravi, A.R.

Address: Mycology Research Center, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran. Tel: +98-21-61117151

Email: Khosravi@ut.ac.ir