فصلنامه (علمی – پژوهشی)

زیست شناسی تکوینی

سال یازدهم، شماره ۱، زمستان ۱۳۹۷

مقایسه اثرات آپوپتوزی S14161 و عصاره هیدروالکلی برگ‌های لیمو بر رده سلول‌های سرطانی سینه MCF-7

کیاوش هوشمندی[۱]، سعد گورانی‌نژاد[۲*]، الهام حویزی[۳و۴]، محمدرضا تابنده[۴و۵]

۱- دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

۲- گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

۳- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

۴- مرکز تحقیقات سلول های بنیادی و فناوری ترانسژنیک دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

۵- بخش بیوشیمی و بیولوژی مولکولی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

[*] Email: goorani_s@scu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۷/۱۰/۱۶ تاریخ پذیرش: ۹۷/۱۲/۲۶

چکیده

سرطان سینه یک بیماری چندعاملی است که ژنتیک، عوامل هورمونی و محیط در ایجاد آن نقش دارد. در تحقیق و بررسی حاضر سعی بر آن است که با استخراج عصاره برگ‌های لیموترش، و همچنین استفاده از کوچک مولکول S14161، تاثیر هر دو ترکیب را در آپوپتوز سلول‌های سرطانی سینه رده MCF-7 مورد مقایسه قرار گیرد. اثرات آپوپتوزی S14161 و عصاره هیدروالکلی برگ‌های لیموترش بر رده سلول‌های سرطانی سینه MCF-7 با استفاده از روش MTT، مورفولوژی سلول‌ها با رنگ آمیزی آکریدین اورنج با استفاده از میکروسکوپ فلوئورسنت بررسی شد. نتایج نشان داد که S14161 و عصاره برگ‌های لیمو به صورت وابسته به دوز و زمان، میزان بقاء و تکثیر سلول‌های MCF-7 را کاهش می‌دهند. براساس نتایج تست MTT غلظت ۱۰ میکرومولار S14161 و غلظت۶ میلی مولار عصاره برگ لیمو درمدت زمان ۲۴ ساعت به عنوان غلظت IC50 سلول‌های MCF-7 تعیین گردید. مقایسه عصاره لیموترش وS14161 نشان می‌دهد که میزان سمیت سلولی کوچک مولکول نسبت به عصاره لیموترش بیشتر بوده و اختلاف معنی‌داری میان درصد بقای سلول های سرطانی تیمار شده با S14161 و سلول‌های تیمار شده با عصاره لیموترش در روز اول، سوم و پنجم دیده می‌شود ($P<۰/۰۵$). همچنین تغییرات مورفولوژی بارزی نظیرکاهش سیتوپلاسم، پیگمانته شدن هسته و قطعه قطعه شدن کروماتین در سلول‌های تیمار شده دیده شد. اثر اختصاصی S14161 بر مهار رشد سلولی و نیز عدم مشاهده عوارض سمی تا غلظت‌های بسیار بالا این کوچک مولکول را بعنوان راهکاری اساسی در درمان سرطان سینه معرفی میکند.

کلیدواژه‌ها: کوچک مولکول، S14161، عصاره‌ی لیمو ترش، رده سلولی MCF-7.

مقدمه

سرطان‌ها از بدو پیدایش بشر وجود داشته‌اند و همچنان درمان سرطان یکی از شایع‌ترین و طاقت‌فرساترین مسائل طب بالینی است [۲۷]. سرطان پستان شایع‌ترین بدخیمی زنان در سراسر دنیاست به‌طوری که ۳ درصد از کل سرطان‌ها و ۱۵ درصد از مرگ‌های ناشی از سرطان در میان زنان می‌باشد. 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 از آن دارد [۱٦، ۱۷]. از جمله راه کارهای درمانی سرطان سینه می‌توان به جراحی، شیمی درمانی و رادیوتراپی اشاره کرد [۱٤]. با این وجود، معایب مختلفی از جمله عود بیماری ناشی از متاستاز در چندماه پس از درمان، اثرات ناشی از مصرف داروها بر روی متابولیسم گلوکوکورتیکوئیدها و خطرات سرطان بعد از شیمی درمانی سرطان پستان، سبب محدودیت استفاده از این سیستم‌های درمانی شده است [۱۰، ۳۰]. بنابراین مطالعه و بررسی عواملی‌با اثرات مضر کمتر، یکی از مهم ترین اهداف تحقیق در حوزه درمان سرطان است [۳۱]. یکی از مهمترین عوامل هورمونی در بروز سرطان سینه بیان بیش از حد رسپتورهای استروژنی می‌باشد [۳]. بسیاری از اثرهای بیولوژیکی استروژن در سلول‌های اپیتلیال رحم و پستان بواسطه‌ی گیرنده‌ی استروژن (Estrogen receptor, ER) صورت می‌پذیرد [۷]. استروژن یک فاکتور اساسی نه تنها در گسترش غده‌ی پستانی می‌باشد بلکه در گسترش و پیشرفت سرطان پستان و رحم در مراحل اولیه و پیشرفته نقش دارد بگونه‌ای که، ۷۰ درصد از سرطان‌های پستان بدخیم سطح بالایی از ER را بیان می‌کنند [۱۹، ۲۵].

کوچک مولکول‌ها از سال‌ها پیش به‌عنوان پروب‌های شیمیایی و یا به‌عنوان عوامل ایجاد موتاسیون در علم ژنتیک شیمیایی وارد زیست‌شناسی شده‌اند. ازاین گذشته در جریان گسترش علم شیمی سنتز مولکول‌های بسیار زیادی هر روزه در حال تولید و اضافه شدن به مجموعه مولکول‌های شناخته شده توسط انسان می‌باشد. برای کوچک مولکول‌ها تعریف دقیقی ارائه نشده است اما می توان آنها را به دو دسته طبیعی و مصنوعی تقسیم کرد [۸]. امروزه کوچک مولکول‌های مؤثر در درمان سرطان با اثرات جانبی اندک شناسایی شده است. خصوصیات مهم کوچک مولکول‌ها شامل تمایل زیاد برای اتصال به پلیمرهای زیستی، ایجاد تغییر در فعالیت پلیمرهای زیستی پس از اتصال به آن‌ها، قابلیت انتشار سریع از غشاهای زیستی بدلیل اندازه کوچک، هزینه پائین و ساده‌تر بودن تولید کوچک مولکول‌ها در مقایسه با همتاهای پروتئینی آن‌ها می‌باشد. شود [۲۰]. یکی از این کوچک ملکول‌های شناخته شده S14161 (6-Boromo-8-ethoxy-3-nitro-2H-chromene) می‌باشد که در مطالعات متعدد مورد بررسی قرار گرفته شده است. S14161 باعث مهار مستقیم PI3K (مقدار PI3K در اغلب سرطان‌ها بطور معنی‌داری افزایش می‌یابد که باعث افزایش تکثیر سلول‌های سرطانی می‌گردد) در مسیر سیگنالینگ PI3K/AKT می‌گردد [۵، ۳۳]. تعداد زیادی از مواد مغذی گیاهی موجود در میوه‌ها، سبزی‌ها، ادویه‌جات، با جلوگیری از ایجاد مواد شیمیایی سمی مانند رادیکال‌های آزاد و بهبود فرایندهای سم‌زدایی در بدن به‌عنوان عوامل قوی

پیشگیرانه در برابر سرطان عمل می‌کنند [۳۲]. مرکبات یکی از میوه‌های تجاری هستند و شامل چندین میوه مهم از جمله پرتقال، لیمو، گریپ فروت و نارنگی می‌باشد از آنجا که پوست این میوه غنی از فلاوون‌ها و پلی‌متوکسیلات‌ها و فیتوکمیکال‌ها می‌باشد که در گیاهان دیگر بسیار نادر است (A, 2008). مانتی و همکاران او گزارش داده‌اند که فلاونوئید های موجود در مرکبات موجب مهار رشد سلول‌های سرطانی در لوسمی می‌شوند. اثر کامپفرول، که آن هم یک نوع فلاونوئید است برای مهار رشد خطوط سرطان تخمدان با غلظت ۲۰و ٤۰ میکرومولار و همچنین رده سلول‌های سرطان پستان نشان داده شده است [۱۳].

در تحقیق و بررسی حاضر سعی بر آن است که با استخراج عصاره برگ‌های لیموترش، و همچنین استفاده از کوچک مولکول S14161، تاثیر هر دو ترکیب را در آپوپتوز سلول‌های سرطانی سینه رده MCF-7 مورد مقایسه قرار گیرد.

مواد و روش کار

تهیه کوچک مولکول S14161

برای تهیه این کوچک مولکول، غلظت‌های ۲،۱، ۵، ۱۰ و ۱۵ میکرومولار از S14161 (SML-0232-5MG Sigma) تهیه و پس از فیلتر نمودن توسط فیلتر سرسرنگی ۰/۲۲ میکرومتر در دمای ٤ درجه تا زمان استفاده نگهداری شد.

تهیه عصاره لیموترش

در این آزمایش برگ‌های گیاه لیموترش از باغ‌های اطراف شهرستان دزفول در بهار ۱۳۹۷جمع‌آوری گردید. برای عصاره‌گیری، در ابتدا برگ‌های درخت جمع‌آوری و با آب مقطر به خوبی شستشو داده شدند. سپس در دمای اتاق خشک و پس از آن با قیچی خورد و توسط هاون پودر گردید. سپس ۵۰ گرم پودر از هر کدام در ۵۰۰ سی سی اتانول۵۰٪ حل گردید و به مدت ۳ شبانه روز روی استیرر قرار گرفت و سپس با استفاده از کاغذ واتمن شماره ۱ فیلتر و با استفاده از روتاری خشک گردید و پودر حاصله برای استفاده‌های بعدی در دمای یخچال نگهداری شد.

آماده سازی محلول‌عصاره لیموترش

ابتدا برای تهیه غلظت‌های ۲، ٤، ٦، ۸ و ۱۰ میلی‌مولار برگ لیموترش مقدار لازم از پودر تهیه شده برای هر غلظت، در محیط‌کشت حل و پس از فیلتر نمودن در دمای یخچال تا زمان استفاده نگهداری شد.

کشت و پاساژ سلولی

سلول‌های رده MCF-7 از بانک سلولی انستیتو پاستور تهران خریداری گردید و پس از شمارش و تعیین درصد بقا در محیط‌کشت DMEM (Gibco, USA) حاوی ۱۰٪ FBS (Gibco, USA) کشت و در انکوباتور (شرکت سینا، ایران) با ۵٪ CO_2، ۹۵٪ رطوبت و دمای ۳۷ °C نگهداری شدند. زمانی که تراکم سلول‌ها در فلاسک به ۸۰ درصد رسید، پاساژ سلولی صورت گرفت. سلول‌های MCF-7 در پلیت ۹٦ خانه‌ای و در هرخانه به تعداد $۱۰^{٤}$× ۱سلول حاوی محیط کشت کامل کشت داده شدند. ۲٤ ساعت بعد سلول‌ها با غلظت‌های متفاوت از کوچک ملکول‌ها تیمار شده و در روزهای ۱، ۳ و ۵ بقای سلول‌ها ارزیابی شد.

ارزیابی بقاء سلولی

به‌منظور تعیین IC50 از ارزیابی فعالیت حیاتی

سلول از آزمون احیا MTT (3-(4, 5 Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltertrazolium Bromide) استفاده شد. سلول‌های سرطانی تعداد حدود 1×10^4 cells/Well در هر چاهک از پلیت ۹۶ چاهکی حاوی محیط‌کشت مرسوم کشت شدند. ۲۴ ساعت بعد سلول‌ها با غلظت‌های ۲،۱، ۵، ۱۰ و ۱۵ میکرومولار از کوچک مولکول S14161 و غلظت‌های ۲، ٤، ٦، ۸ و ۱۰ میلی مولار برگ لیموترش به مدت ۱، ۳ و ۵ روز تیمار شدند. برای هر سلول یک گروه کنترل هم در نظر گرفته شد که تیمار نشدند. همچنین سپس آزمون MTT به صورت زیر انجام شد. به این صورت که در زمان‌های مورد نظر، محیط‌کشت از چاهک‌های حاوی سلول خارج و به هر خانه حدود ۱۰۰ میکرولیتر محیط تازه حاوی ۱۰ میکرومولار محلول MTT (با غلظت ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) اضافه شد، سلول‌ها به مدت ۳ ساعت در دمای ۳۷ °C انکوبه شدند و سپس محلول MTT خارج و به هر چاهک ۱۰۰ میکرومولار DMSO (Merck, USA, 100%) اضافه شد و جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۵۷۰ نانومتر با استفاده از دستگاه میکروپلیت ریدر(Biotek، آلمان) اندازه گیری شد.

بررسی مورفولوژیکی

برای بررسی و مقایسه مورفولوژیکی سلول‌ها، در هر کدام از سلول‌های گروه کنترل (تیمار نشده) و گروه‌های تیمار شده با غلظت‌های ۲،۱، ۵ ، ۱۰ و ۱۵ میکرومولار از S14161 و غلظت‌های ۲، ٤، ٦، ۸ و ۱۰ میلی‌مولار برگ لیموترش پس از ۱ و ۳ و ۵ روز با دوربین دیجیتال متصل به میکروسکوپ اینورت و میکروسکوپ فلورسنت عکس گرفته شد و تصاویر میکروسکوپی در گروه‌های کنترل و تیمار بررسی و مقایسه شدند.

بررسی تغییرات سلول‌های سرطانی با رنگ‌آمیزی آکریدین اورنج

جهت بررسی کیفی زنده ماندن سلول‌ها از رنگ امیزی آکریدین اورنج/ اتیدیوم بروماید (شرکت Sigma) استفاده شد. برای این منظور سلول‌ها با غلظت‌های ذکر شده و در زمان‌های ذکر شده با عصاره برگ‌های لیموترش و کوچک مولکول S14161 تیمار و بعد از ۲٤ ساعت رنگ‌آمیزی شدند. در ابتدا استوک ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر رنگ آکریدین اورنج و استوک ۱ میلی‌گرم بر میلی لیتر رنگ اتیدیوم بروماید تهیه و به نسبت مساوی ترکیب شدند. سپس سلول‌ها با این ترکیب رنگ و در زیر میکروسکوپ فلوروسنت عکس‌برداری شدند.

بررسی آماری

داده‌های حاصل از آزمون MTT، با کمک نسخه ۱۸ نرم‌افزار SPSS (IBM SPSS, Armonk, NY, USA) و آزمون آماری (ANOVA) تجزیه و تحلیل شدند. نمودارهای لازم با کمک نرم‌افزار Microsoft Excel 2016 (Microsoft Corp., Redmond, WA, USA) رسم و تفاوت‌ها در سطح $P<۰/۰۵$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

ارزیابی بقای سلولی در سلول‌های تیمارشده با S14161

براساس نتایج تست MTT غلظت ۱۰ میکرومولار S14161 در مدت زمان ۲٤ ساعت به‌عنوان IC50 سلول‌های MCF-7 تعیین گردید. درصد زنده ماندن

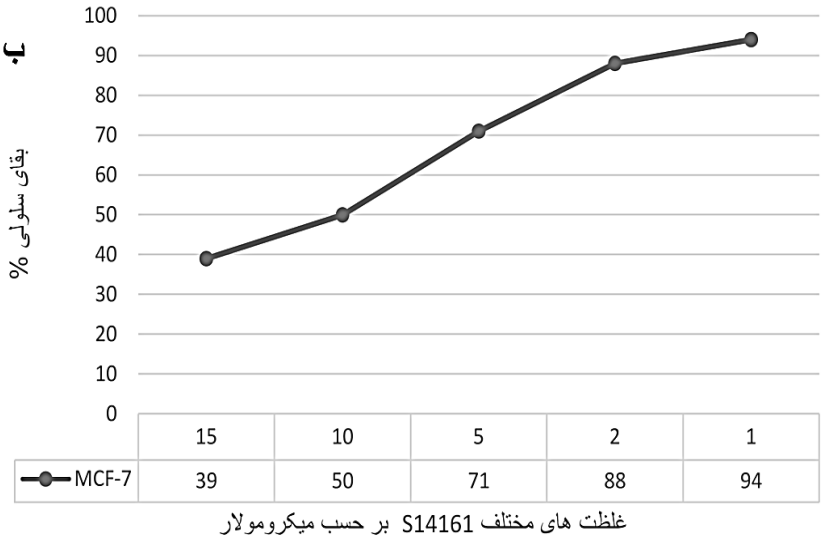
سلول‌ها بر اساس تست MTT در سلول های تحت تیمار با غلظت‌های ۲،۱، ۵، ۱۰ و ۱۵ میکرومولار از S14161 به ترتیب ۹۴، ۸۸، ۷۱، ۵۰، ۳۹ درصد بود که درشکل۱ آمده است که در این تحقیق حداکثر سمیت سلولی (کاهش بقای سلولی) در غلظت ۱۵ میکرومولار S14161 دیده شد. همچنین کمترین میزان سمیت سلولی در غلظت ۱ میکرومولار S14161 دیده شد (P<۰/۰۵) (شکل ۱).

ارزیابی بقای سلولی در سلول های تیمار شده با عصاره لیموترش

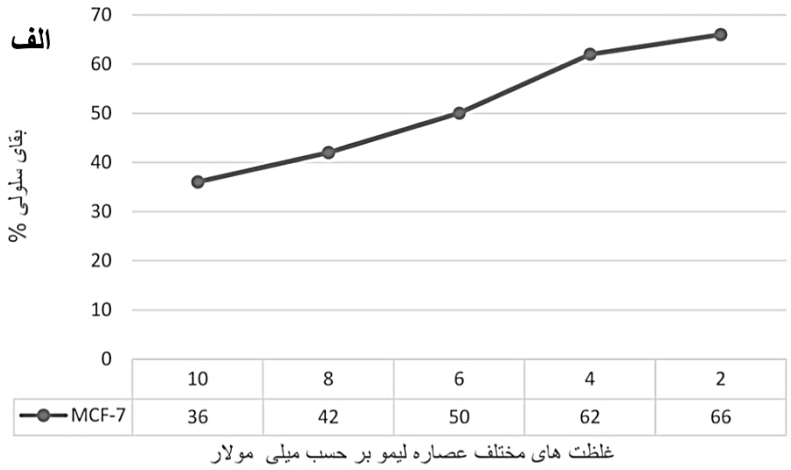
براساس نتایج تست MTT غلظت ٦ میلی مولار از عصاره لیموترش در مدت ٢٤ ساعت به عنوان IC50 سلول‌های MCF-7 تعیین گردید. درصد زنده ماندن سلول‌ها بر اساس تست MTT در سلول های تحت تیمار با غلظت های۲، ٤، ٦، ۸ و ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر عصاره لیموترش به ترتیب ٦٦، ٦٢، ٥٠، ٤٢، ٣٦ می‌باشد که در شکل ۲ آمده است. حداکثر سمیت سلولی(کاهش بقای سلولی) در غلظت ۱۰ میلی‌مولار دیده شد. و همچنین کمترین میزان سمیت سلولی در غلظت ۲ میلی مولار دیده شد(P<۰/۰۵) (نمودار ۲).

مقایسه میزان سمیت سلولی عصاره لیموترش و S14161

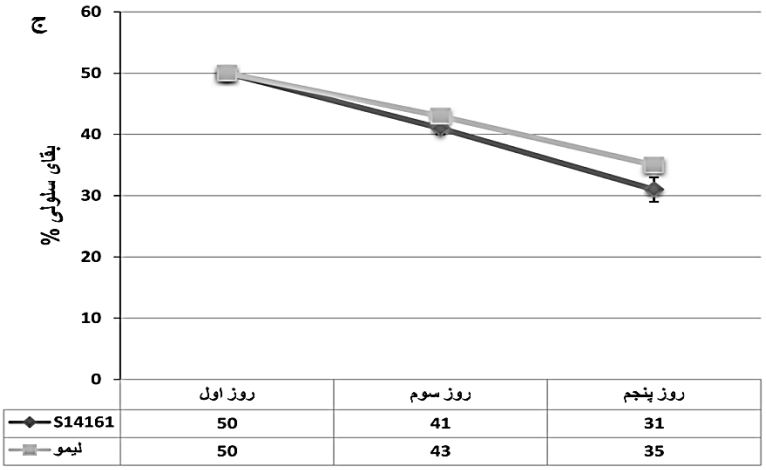
براساس نتایج تست MTT، درصد زنده‌مانی سلول‌های رده MCF-7 هنگام تیمار با غلظت‌های تعیین شده عصاره لیموترش و کوچک مولکول S14161 در روزهای ۱، ۲ و ۳ در شکل۳ آمده است. مقایسه عصاره لیموترش و S14161 نشان می‌دهد که میزان سمیت سلولی کوچک مولکول نسبت به عصاره لیموترش بطور قابل توجهی بیشتر بوده است و اختلاف معنی‌داری میان درصد بقای سلول‌های سرطانی تیمار شده با S14161 و سلول‌های تیمار شده با عصاره لیموترش در روز اول، سوم و پنجم دیده می‌شود (P<۰/۰۵)(شکل۳).



شکل ۱. درصد بقای سلول های سرطانی MCF-7 در غلظت‌های تعیین شده کوچک مولکول S14161 با استفاده از روش MTT (آزمون ANOVA)



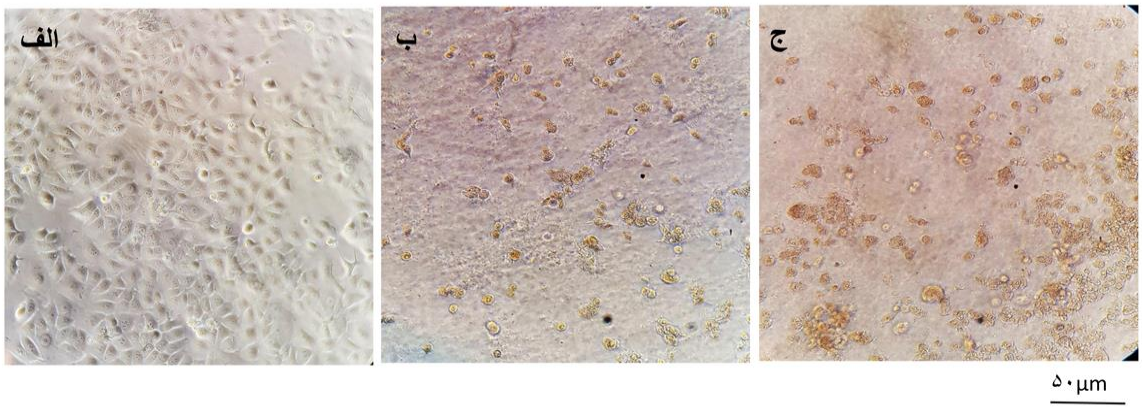
شکل۲. درصد بقای سلول های سرطانی MCF-7 در غلظت‌های تعیین شده عصاره لیموترش با استفاده از روش MTT (آزمون ANOVA)



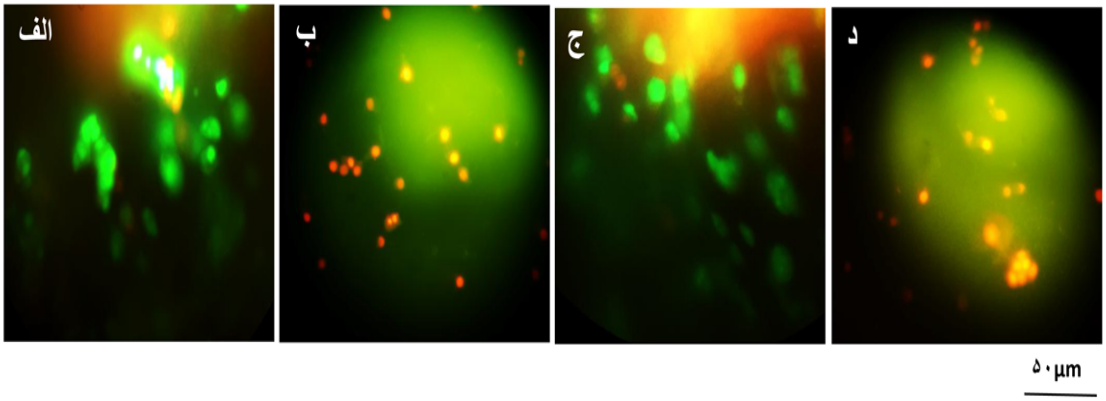
نمودار۳. مقایسه میزان سمیت سلولی عصاره لیموترش و S14161 با استفاده از روش MTT

نتایج مورفولوژی سلول‌ها

رنگ آمیزی آکریدین اورنج/ اتیدیوم بروماید برای بررسی مورفولوژی سلول‌های سالم و آپوپتوز یافته انجام شد. در این رنگ آمیزی سلول‌های اپوپتوز یافته به رنگ نارنجی دیده می‌شوند. نتایج مورفولوژی با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت و میکروسکوپ اینورت معمولی نشان می‌دهد سلول‌های MCF-7 تیمار شده با عصاره لیموترش و همچنین S14161 نسبت به نمونه کنترل، تغییرات مورفولوژیکی قابل توجهی داشتند شکل سلول‌ها تحت اثر عصاره و کوچک مولکول تفاوت‌های بارزی و وابسته به دوزی با یکدیگر نشان دادند از جمله که هسته سلول‌ها منقبض شده و غشای آنها آسیب دیده در حالی که سلول‌های سالم با غشای دست نخورده و رنگ سبز مشاهده می‌شدند. مشاهدات ما همسو با نتایج MTT بود به‌طوری که سلول‌ها اپوپتوز یافته در گروه تیمار شده با کوچک‌مولکول S14161 نسبت به عصاره لیمو بیشتر بود (شکل ۳ و ٤).



شکل ۳. بررسی مورفولوژی سلول‌ها با میکروسکوپ اینورت: الف نمونه کنترل سلول‌های MCF-7 ب – تأثیرکوچک مولکول S14161 با غلظت ۱۰ میکرومولار به عنوان IC50 بر روی رده سلول سرطانی MCF-7 ج – تأثیر عصاره لیمو با غلظت ٦ میلی‌مولار به عنوان IC50 بر روی سلول سرطانی MCF-7



شکل ٤. بررسی مورفولوژی سلول‌های رنگ‌آمیزی شده با رنگ اکریدین اورنج/ اتیدیوم بروماید زیر میکروسکوپ فلورسنت: الف- نمونه کنترل کوچک مولکول S14161 و ب – رنگ‌آمیزی اکریدین/اورنج کوچک مولکول S14161 ج -کنترل عصاره برگ لیمو د – رنگ‌آمیزی اکریدین/اورنج عصاره برگ لیمو

بحث

سرطان سینه شایع ترین بدخیمی نئوپلاستیک زنان در دنیا است و به عنوان مهمترین دلیل مرگ ناشی از سرطان در خانم‌ها مطرح می‌باشد [٤، ۹]. علی‌رغم پیشرفت‌های فراوانی که در حوضه‌ی درمان سرطان صورت پذیرفته است سالانه میلیون‌ها مرگ ناشی از سرطان در جهان رخ می‌دهد که اغلب مرگ و میرها در ارتباط با افزایش مقاومت بدن این افراد در برابر داروهای درمانی می‌باشد. همچنین گران قیمت بودن این داروها و اثر جانبی فراوان این داروها علاوه بر خاصیت آنتی‌توموری آنها محدودیت‌هایی در استفاده از این داروها ایجاد کرده است. در این شرایط، کوشش در جهت یافتن یک عامل فارماکولوژیک مؤثر با حداقل اثر جانبی و ارزان‌تر بویژه در دو بافت سینه و رحم که نسبت به عوامل اندوکراین بسیار حساس می‌باشند امری اجتناب‌ناپذیر می‌باشد. یکی از مهمترین عوامل هورمونی در بروز سرطان سینه بیان بیش از حد رسپتورهای استروژنی می‌باشد [۳، ۱۱]. بسیاری از

اثرهای بیولوژیکی استروژن در سلول‌های اپیتلیال رحم و پستان بواسطه‌ی گیرنده‌ی استروژن (ER) صورت می‌پذیرد [۷]. استروژن یک فاکتور اساسی نه تنها در گسترش غده‌ی پستانی می‌باشد بلکه در گسترش و پیشرفت سرطان پستان و رحم در مراحل اولیه و پیشرفته نقش دارد [۱۹، ۲۵]. درمان اندوکراین به عنوان اولین راهکار درمانی در بیماران سرطان پستان در ۳۰ سال گذشته بوده است. با این وجود، مقاومت زیر گروه‌های مختلفی از این سرطان نسبت به درمان اندوکراین [۲۳، ۲٤] لزوم همراهی یک عامل شیمیایی را با درمان اندوکراین مشخص نمود.

امروزه کوچک مولکول‌های مؤثر در درمان سرطان با اثرات جانبی اندک شناسایی شده است. تقریبا تمامی داروهایی که امروزه از آن‌ها در درمان بیماری‌ها استفاده می‌شود «کوچک مولکول» هستند [۸، ۲۰]. یکی از این کوچک ملکول‌های شناخته شده S14161 می‌باشد که در مطالعه حاضر مورد بررسی قرار گرفته شده است. همچنین مطالعات نشان داده است که گیاهان دارای ترکیبات دارویی فعالی هستند که در شرایط آزمایشگاهی می‌توان این ترکیبات را استخراج و به عنوان دارو جهت مطالعات ضد سرطان مورد استفاده قرار داد. همچون مرکبات که فلانونوئیدهای موجود در آنها موجب مهار رشد سلول‌های سرطانی در لوسمی می‌شوند. اثر کامپفرول، که آن هم یک نوع فلاونوئید است برای مهار رشد خطوط سرطان تخمدان و همچنین رده سلول‌های سرطان پستان نشان داده شده است [۱۳]. لذا در تحقیق حاضر خواص ضد سرطانی عصاره برگ‌های لیموترش و کوچک مولکول S14161 درآپوپتوز سلول‌های سرطانی سینه رده MCF-7 مورد مقایسه قرار گرفت. براساس نتایج تست MTT، درصد زنده مانی سلول‌های رده MCF-7 هنگام تیمار با غلظت‌های تعیین شده عصاره لیموترش و کوچک مولکول S14161 در روزهای ۱، ۳ و ۵ نشان داد که میزان سمیت سلولی کوچک مولکول نسبت به عصاره لیموترش بطور قابل توجهی بیشتر بوده است و اختلاف معنی‌داری میان درصد بقای سلول‌های سرطانی تیمار شده با S14161 و سلول‌های تیمار شده با عصاره لیموترش دیده می شود. تغییرات مورفولوژی بارزی در سلول‌های تیمار شده از جمله هسته سلولی منقبض شده و غشای آسیب دیده شد.

چندین اثر بیولوژیکی متعاقب با افزایش سطوح ER در سلول‌های سرطانی که در معرض استروژن می‌باشند مشاهده می‌شود که برخی از آنها عبارتند از افزایش تکثیر سلولهای سرطانی در انواع سرطان‌های پستان و رحم: یکی از مهمترین مسیرهای سیگنالینگ درگیر در این روند مسیر سیگنالینگ (Phosphatidylinositol 3 kinase/AKT) PI3K/AKT می‌باشد. AKT یکی از فاکتورهای مهم در تنظیم سیکل و تکثیر سلولی، محافظت سلول‌ها از مرگ برنامه‌ریزی شده‌ی سلول یا آپوپتوز و تشکیل و رشد عروق خونی می‌باشد. این مسیر در سلول‌های سرطانی به طور واضحی افزایش می‌یابد [۱۲، ۲۱].

در مطالعات دیده شده که کوچک مولکول‌ها قادر به بلوکه کردن استروژن وابسته به رشد سلول‌های سرطانی هستند. همچنین اینکه اثر S14161 بعنوان مهارکننده‌ی PI3K و متعاقباً کاهش سیکلین D در درمان میلوما و لوکمی توسط Mao و همکارانش بررسی شده است اثر اختصاصی این مهارکننده بر PI3K و نیز عدم مشاهده عوارض سمی تا غلظت‌های بسیار بالا این مهار کننده را بعنوان راهکاری اساسی در درمان انواع سرطان‌ها معرفی کرده است. مطالعات متعدد ارتباط بین PI3K و میزان رونویسی سیکلین D

را مشخص نموده‌اند بگونه‌ای که، مهار PI3K/AKT باعث کاهش سایکلین D می‌گردد [۵، ۳۳]. همچنین Kunkun طی مطالعه‌ای آنالوگ S14161 (BENC-511) را بعنوان ترکیبی مؤثر در درمان میلوما و لوکمی معرفی کرد (Han et al., 2014). مهار مسیر سیگنالینگ PI3K در پلاکت ها و اثر مهاری S14161 بر تشکیل ترومبوز (بدون افزایش احتمال ایجاد خونریزی) نیز توسط Wenxiu گزارش شد [۳٤]. نتایج این مطالعات، نتایج پژوهش حاضر را تقویت می‌کند و می‌توان با تایید بیشتری اثر آپوپتوزی S14161 را بر روی سلول‌های سرطانی بیان کرد. با این وجود بررسی این فاکتور در سرطان رحم توسط Shu و همکاران نشان داد این فاکتور اثر ناچیزی بر فسفوریلاسیون و غیرفعال سازی AKT ایفا می‌کند [۵].

Mao Chengjian و همکاران نیز در مطالعه خود بر روی کوچک مولکول‌های مهارکننده رسپتور استروژن در سلول‌های سرطانی، بیان کردند که این کوچک مولکول‌ها به طور اختصاصی و به طور موثری قادر به بلوکه کردن استروژن وابسته به رشد سلول‌های سرطانی هستند [۲۲]. همچنین پژوهش دیگر درارتباط با مهار غیر رقابتی کوچک مولکول TPSF بر روی ژن تنظیم کننده بیان استروژن و رشد سلول‌های سرطان سینه بیان میکند که اثر سمیت این کوچک مولکول به طور اختصاصی و موثری باعث مهار فعالیت رسپتور و رشد سلول‌های سرطانی سینه می‌شود [۲۸].

لیموترش میوه‌ای از گروه مرکبات است. پوست این میوه‌ها غنی از فلاوون‌ها و پلی‌متوکسیلات‌ها و فیتوکمیکال ها می‌باشد که در گیاهان دیگر بسیار نادر است. پوست مرکبات محتوی مقدار زیادی اسانس است که دارای لیمونن، دی سایکلیک آلدئید، لینالول، دی ال ترپی نئول و ... می‌باشند. در بین ترکیبات نام برده شده فلاونوئیدها و لیمونن از جمله ترکیبات مهم در پوست مرکبات هستند که نقش مهم آنها در پیشگیری و درمان سرطان است [۲٦]. چندین مطالعه، فعالیت ضد التهابی قابل توجه کورستین، که نوعی دیگر از فلاونوئیدها است را به علت مهار مستقیم فرآیندهای اولیه در التهاب نشان می‌دهد. آنها گسترش انواع سرطان را با جلوگیری از تقسیم سلول‌های سرطانی، تنظیم نمایان ژن‌ها، جلوگیری از رسیدن خون به تومور و کاهش آسیب ناشی از رادیکال های آزاد و التهاب، کندتر کرده و اغلب متوقف می‌کند. تحقیقی که بر روی خاصیت ضد میکروبی مرکبات صورت گرفته، نتایج آن نشان داد که عصاره آبی پوست پرتقال رشد اشریشیاکلی، استافیلوکوکوس اورئوس و کاندیدا آلبیکانس را در شرایط آزمایشگاهی و در شیر مهار می‌کند [۲۹]. در مطالعه حاضر نیز دیده شده که عصاره برگ‌های لیموترش توانسته است که درصد بقای سلول های سرطانی سینه را کاهش دهند. در سال‌های اخیر مطالعات بسیاری در خصوص اثرات ضد سرطانی عصاره‌های گیاهی صورت گرفته است که نشان می‌دهند که گیاهان نیز می‌توانند جز داروهای ضد سرطانی باشند [٦]. همچون ماده طبیعی ضد توموری ترانس سینامیک اسیدکه اخیرا در مطالعات بررسی شده است نشان می‌دهد که اثر مهاری سلولی سرطانی ترانس سینامیک اسید بر رشد تومورهای کارسینوما رحم، آدنوکارسینوما کلون وسارکومای استخوان [۳۵] لوکمی و سرویکس ،گلیوبلاستوما، ملانوما، پروستات، کارسینوم ریه [۱۸] در شرایط مدل‌های حیوانی مورد تأیید قرارگرفته است. در مطالعه امینی و همکاران، اثر ضد سرطانی عصاره

آناناس بر روی سلول‌های کارسینومای انسانی کولون ومعده باعث مهار رشد و تکثیر سلول‌های سرطانی شد و مکانسیم اثر ضد سرطانی برومیلین موجود درعصاره از طریق فعال‌سازی مسیرهای آپوپتوز و مهار هم زمان بقای سلول شناخته شد [۱].

نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر در بررسی مقایسه اثر این دو ترکیب دیده شده که کوچک مولکول S14161 نسبت به عصاره لیموترش بهتر عمل کرده است. ازآنجایی که غلظت عصاره لیموترش (میلی‌مولار) نسبت به کوچک مولکول (میکرومولار) در این بررسی بیشتر بوده است، میتوان نتیجه گرفت که کوچک مولکول در کمترین مقدار بیشترین اثر سمیت سلولی را بر رده سلولی MCF-7 سرطان سینه داشته است و تأثیر آپوپتوزی قابل توجهی را نشان داد. تغییرات مورفولوژیکی در شکل سلول‌ها تحت اثر عصاره و کوچک مولکول تفاوت‌های بارز و وابسته به دوزی با یکدیگر نشان دادند.

Reference

[1] Amini, A., Ehteda, A., Moghaddam, S. M., Akhter, J., Pillai, K., & Morris, D. L. 2013, Cytotoxic effects of bromelain in human gastrointestinal carcinoma cell lines (MKN45, KATO-III, HT29-5F12, and HT29-5M21). OncoTargets and therapy, 6**:** 403-410.

[2] Available on the: 7 Thttp://www.salamatnew.com/viewNews.aspx, 2008, Directed by Anonymous.

[3] Bojrab, M. J., Waldron, D. R., & Toombs, J. P., 2014, Current Techniques in Small Animal Surgery, Fifth Edition, Teton NewMedia.

[4] Bray, F., McCarron, P., & Parkin, D. M, 2004, The changing global patterns of female breast cancer incidence and mortality. Breast cancer research, 6**:** 229.

[5] Brennan, P., Mehl, A. M., Jones, M., & Rowe, M., 2002, Phosphatidylinositol 3-kinase is essential for the proliferation of lymphoblastoid cells. Oncogene, 21**,** 1263-1271.

[6] Carvalho, A. A., Andrade, L. N., de Sousa, É. B. V., & de Sousa, D. P., 2015, Antitumor phenylpropanoids found in essential oils. BioMed research international, 2015 :392674.

[7] Dickson, R. B., & Stancel, G. M., 2000, Chapter 8: Estrogen receptor-mediated processes in normal and cancer cells. JNCI Monographs, 2000**,** 135-145.

[8] Ding, S., & Schultz, P. G., 2004, A role for chemistry in stem cell biology. Nature biotechnology, 22(7):833-40.

[9] Fisch, T., Pury, P., Probst, N., Bordoni, A., Bouchardy, C., Frick, H., et al., 2005, Variation in survival after diagnosis of breast cancer in Switzerland. Annals of oncology, 16**,** 1882-1888.

[10] Fisher, B., Costantino, J. P., Wickerham, D. L., Cecchini, R. S., Cronin, W. M., Robidoux, A., 2005, Tamoxifen for the prevention of breast cancer: current status of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project P-1 study. Journal of the national cancer institute, 97**,** 1652-1662.

[11] Fossum, T. W., Hedlund, C.S., Hulse, D.A., Johnson, A.L., Schulz, K.S., Seim, H.B., et al., 2007, surgery of the female reproductive tract. In: Small animal surgery, St. Louis, Mosby.

[12] Fruman, D. A., Chiu, H., Hopkins, B. D., Bagrodia, S., Cantley, L. C., & Abraham, R. T., 2017, The PI3K Pathway in Human Disease. Cell, 170**,** 605-635.

[13] Ghasemzadeh, A., & Ghasemzadeh, N., 2011, Flavonoids and phenolic acids: Role and biochemical activity in plants and human. Journal of medicinal plants research, 5**,** 6697-6703.

[14] Guo, J., Bourre, L., Soden, D. M., O'Sullivan, G. C., & O'Driscoll, C., 2011, Can non-viral technologies knockdown the barriers to siRNA delivery and achieve the next generation of cancer therapeutics? Biotechnology Advances, 29**,** 402-417.

[15] Han, K., Xu, X., Chen, G., Zeng, Y., Zhu, J., Du, X., et al., 2014, Identification of a promising PI3K inhibitor for the treatment of multiple myeloma through the structural

optimization. Journal of hematology & oncology, 15, 7:9.
[16] Harirchi, I., Kolahdoozan, S., Karbakhsh, M., Chegini, N., Mohseni, S., Montazeri, A., et al., 2010, Twenty years of breast cancer in Iran: downstaging without a formal screening program. Annals of oncology, 22**,** 93-97.
[17] Hosainzadegan, H., Ezzetpor, B., Abdollahpor, F., Motamedy, M., & Rashidipor, M., 2010, Study of Cytotoxic Activity of Olive and Green Tea Extracts on Breast Tumor Cell Line. Journal of Ardabil University of Medical Sciences, 10**,** 287-294.
[18] Liu, L., Hudgins, W. R., Shack, S., Yin, M. Q., & Samid, D., 1995, Cinnamic acid: a natural product with potential use in cancer intervention. International journal of cancer, 62**,** 345-350.
[19] Loi, S., Haibe-Kains, B., Desmedt, C., Lallemand, F., Tutt, A. M., Gillet, C., et al., 2007, Definition of clinically distinct molecular subtypes in estrogen receptor-positive breast carcinomas through genomic grade. Journal of clinical oncology, 25, 1239.
[20] Lyssiotis, C. A., Lairson, L. L., Boitano, A. E., Wurdak, H., Zhu, S., & Schultz, P. G., 2011, Chemical control of stem cell fate and developmental potential. Angewandte Chemie International Edition, 50, 200-242.
[21] Manning, B. D., & Cantley, L. C., 2007, AKT/PKB Signaling: Navigating Downstream. Cell, 129**,** 1261-1274.
[22] Mao, C., Patterson, N. M., Cherian, M. T., Aninye, I. O., Zhang, C., Montoya, J. B., et al., 2008a, A new small molecule inhibitor of estrogen receptor α binding to estrogen response elements blocks estrogen-dependent growth of cancer cells. Journal of Biological Chemistry, 283, 12819-12830.
[23] Mao, X., Cao, B., Wood, T. E., Hurren, R., Tong, J., Wang, X., et al., 2011, A small-molecule inhibitor of D-cyclin transactivation displays preclinical efficacy in myeloma and leukemia via phosphoinositide 3-kinase pathway. Blood, 117**,** 1986-1997.
[24] Mao, X., Liang, S.-b., Hurren, R., Gronda, M., Chow, S., Xu, G. W., et al., 2008b, Cyproheptadine displays preclinical activity in myeloma and leukemia. Blood, 112**,** 760-769.
[25] Miyoshi, Y., Murase, K., Saito, M., Imamura, M., & Oh, K., 2010, Mechanisms of estrogen receptor-α upregulation in breast cancers. Medical molecular morphology, 43**,** 193-196.
[26] Moshaedi Sh., 2012, Antioxidant and antimicrobial activities of essential oils from Zataria multiflora bois, Origanum vulgare and Mentha pulegium and some growth factor on anterococos fekalis [dissertation]. Tehran: Shahid Beheshti University.
[27] Naser, P., 2012, Genetic disorders of cancers in humans. Special Issue of the Twelfth Iranian Congress of Genetics. Tehran-IRI.
[28] Patterson, N. M., Cherian, M. T., Mao, C., Aninye, I. O., Reynolds, P. D., Schiff, R., et al., 2010, A noncompetitive small molecule inhibitor of estrogen-regulated gene expression and breast cancer cell growth that enhances proteasome-dependent degradation of estrogen receptor α. Journal of Biological Chemistry, 31, 285 (53): 41863-73.
[29] Razmjoo, M., Khaki, P., Nasiri, M., & Rezaei, K. 2016, Possibility study of multilayer encapsulation by external gelation procedure on the survival of probiotic bacteria undergoing orange juice pasteurization. Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology, 11**,** 59-66.
[30] Rubino, C., de Vathaire, F., Diallo, I., Shamsaldin, A., Grimaud, E., Labbe, M., et al., 2002, Radiation Dose, Chemotherapy and Risk of Lung Cancer After Breast Cancer Treatment. Breast Cancer Research and Treatment, 75, 15-24.
[31] Taraphdar, A. K., Roy, M., & Bhattacharya, R., 2001, Natural products as inducers of apoptosis: Implication for cancer therapy and prevention. Current science**,** 1387-1396.
[32] Tayarani-Najaran, Z., & Emami, S. A., 2011, Cytotoxic Plants: Potential Uses in Prevention and Treatment of Cancer, INTECH Open Access Publisher, 651-692.
[33] White, P. C., Shore, A. M., Clement, M., McLaren, J., Soeiro, I., Lam, E. W. F., & Brennan, P., 2006, Regulation of cyclin D2 and the cyclin D2 promoter by protein

kinase A and CREB in lymphocytes. Oncogene, 25, 2170-80.

[34] Yi, W., Li, Q., Shen, J., Ren, L., Liu, X., Wang, Q., et al., 2014, Modulation of platelet activation and thrombus formation using a pan-PI3K inhibitor S14161. PLoS One, 12; 9 (8): e102394.

[35] Zhang, Y., Yang, XY., Kunag, ZS., Xiao, C., 2010, Inhibitory effect of cinnamon acid germanium on growth of uterocervical carcinoma (U_ (14)) cells in mice [J]. Chinese Journal of Clinical and Experimental Pathology, 4, 026.

Comparison of Apoptotic Effects of S14161 and *Citrus limon* Leaves Hydroalcoholic Extracts on Breast Cancer Cells MCF-7

Hushmandi K.[1],Gooraninejad S.[2*], Hoveizi E. [3,4], Tabandeh M.R.[4,5]

[1] Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
[2] Department of Clinical Science, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
[3] Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
[4] Stem cells and transgenic technology research center (STTRC), Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
[5] Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

[*] Email: goorani_s@scu.ac.ir

Received: 6 January 2019 Accepted: 17 March 2019

Abstract

Breast cancer is a multifactorial disease in which genetics, hormonal factors and the interaction between individuals and the environment contribute to it. In the present study, we try to compare the effect of lime leaves extract and S14161 small molecule on apoptosis of MCF-7 breast cancer cells. Apoptotic effects of S14161 and hydroalcoholic extract of Lime leaves on MCF-7 cells were investigated using MTT method, the morphology of cells with acridine orange staining using the fluorescent microscope. The results showed that the S14161 and Lime leave extract decreases the survival rate and proliferation of MCF-7 cells in a time and dose-dependent manner. Based on the results of the MTT test, 10 μM concentration of S14161 and 6 mM concentration of Lime extract was determined within 24 hours as IC50 concentration of MCF-7 cells. Comparison of Lime extract and S14161 showed that the amount of small molecule cytotoxicity was higher than that of Lime leaves extract and there was a significant difference between survival percentage of cancer cells treated with S14161 and cells treated with lime leaves extracts on day 1, 3 and 5 ($P < 0.05$). Also, there were significant morphological changes such as shrinkage and increasing size of vacuoles, cytoplasmic loss, nucleus pigmentation and fragmentation of chromatin in treated cancer cells. The specific effect of this inhibitor on cell growth, as well as the lack of observation of toxic effects to high concentrations, has been described as a major strategy for treating breast cancers.

Keywords: Small molecule, S14161, Sour Lime Extract, MCF-7 Cell Line.