مجله دانشکده علوم پزشکی نیشابور

www.journalnums.ac.ir

Downloaded from journal.nums.ac.ir at 16:15 IRST on Saturday February 16th 2019

بررسی اثرات عصاره عناب بر آپوپتوز و تغییر بیان ژن BAX در رده سلولی سرطان سینه Sk-Br-3

حامد حسینیان*[1]، سید مهدی کلانتر[2]، سید محسن میر اسماعیلی[1]

۱- گروه ژنتیک، دانشکده فنی و مهندسی، دانشگاه علم و هنر، یزد، ایران

۲- گروه ژنتیک، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی، یزد، ایران

پژوهشی اصیل

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۹/۱۳

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۰/۴

***نویسنده مسئول:** حامد حسینیان، گروه ژنتیک، دانشکده فنی و مهندسی، دانشگاه علم و هنر، یزد، ایران

تلفن: ۳۸۲۶۴۰۸۰-۳۵ ۹۸+

پست الکترونیک:

Hamedhosseinian.h2@gmail.com

چکیده

مقدمه

سرطان سینه ناشی از رشد خارج از قاعده سلول‌های طبیعی در پستان است. هدف اصلی این تحقیق بررسی اثرات ضدتکثیری عصاره عناب بر رشد و تکثیر رده سلولی سرطانی سینه Sk-Br-3 و ارزیابی تغییرات ژن آپوپتوزی BAX بعد از تیمار می‌باشد.

مواد و روش‌ها

پس از تهیه عصاره هیدرو الکلی میوه عناب، رده سلولی Sk-Br-3 در گروه‌های متفاوت با عصاره حاصل به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تیمار شدند. در ادامه با استفاده از MTT مورد سنجش قرار گرفتند و میزان آپوپتوز ثبت گردید. در نهایت از دو گروه کنترل و تحت تأثیر قرار گرفته به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت با غلظت‌های ۲/۱ (دوز بیشتر از ۱/۵ میلی‌گرم/میلی‌لیتر)، ۱/۵ (۰/۵- ۱/۵) و ۰/۷ میلی-گرم/میلی‌لیتر (دوز کمتر از ۰/۵ میلی‌گرم/میلی‌لیتر) استخراج RNA انجام‌گرفت، سنتز cDNA انجام شد و با سیستم Real-Time PCR میزان تغییر بیان ژن BAX با در نظر گرفتن ژن GAPDH به عنوان ژن سراگردان مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها

با استفاده از نتایج بدست آمده از MTT، غلظت‌های ۲/۱، ۱/۵ و ۰/۷ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به عنوان IC50 برای زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت انتخاب شدند که در نهایت موجب افزایش آپوپتوز شده، وابسته به زمان بوده و بیان ژن BAX را افزایش داده است.

نتیجه‌گیری

در این مطالعه برای اولین بار از عصاره هیدرو-الکلی عناب بر روی رده سلولی سرطانی سینه Sk-Br-3 استفاده شد. با توجه به نتایج به‌دست‌آمده می‌توان عصاره هیدرو الکلی عناب را به‌عنوان پروتکل درمانی رده سلولی Sk-Br-3 پیشنهاد داد.

کلیدواژه‌ها

سرطان سینه، عصاره عناب، رده سلولی Sk-Br-3، ژن BAX، MTT

Downloaded from journal.nums.ac.ir at 16:15 IRST on Saturday February 16th 2019

مقدمه

در بین همه سرطان‌های زنان، بدخیمی‌های پستان بیشترین بحث‌های بالینی را به خود اختصاص داده است (۱). سرطان سینه شایع‌ترین سرطان در میان زنان ایرانی است (۲). سرطان سینه در ایران نسبت به کشورهای توسعه‌یافته، حداقل ۱۰ سال زودتر زندگی زنان را تحت تأثیر قرار می‌دهد (۳). نرخ مرگ ناشی از سرطان سینه در سال ۱۹۹۸ در تهران ۵/۸ در هر ۱۰۰۰۰ نفر (۴) و در سال ۲۰۰۱، ۲/۵ نفر در هر ۱۰۰۰۰۰۰ نفر و به‌طورکلی مسئول ۷۷۶۲ سال زندگی از دست رفته (بر اساس سن امید به زندگی در ایران) در ۱۸ استان ایران بوده است (۵). کشورهای درحال‌توسعه امیدوارند که بتوانند سرطان سینه را به عنوان یک تهدیدکننده جدی حیات جامعه کنترل کنند (۶).

رده سلولی Sk-Br-3 برای اولین بار از یک خانم ۴۳ ساله قفقازی که مبتلابه آدنوکارسینوما با منشأ سینه بود گرفته شد. این رده از سلول‌های اپی تلیال سینه و به‌صورت تک لایه کشت و رشد داده می‌شود. از دیگر خصوصیات این رده می‌توان به مثبت بودن گیرنده ERBB2 یا همان گیرنده HER2 اشاره کرد و این در حالی است که برای گیرنده استروژن و پروژسترون منفی می‌باشد. از این رده سلولی معمولاً برای غلبه هرسپتین علیه سرطان سینه در مطالعات استفاده می‌شود. رده سلولی Sk-Br-3 دارای رده‌بندی محافظتی شماره ۱ می‌باشد (۷).

مشتقات گیاهی به‌طور سنتی نقش بسیار مهمی را در درمان بیماری‌های انسانی داشته است. هزاران سال است گیاهان‌که اساس طب سنتی را تشکیل می‌دهند، در کشورهایی با تمدن کهن مانند چین، هند و تایلند استفاده می‌شده است. امروزه حدود ۸۰ درصد از جمعیت کشورهای جهان سوم هنوز برای مراقبت‌های اولیه بهداشتی خود به واردات محصولات گیاهی نیازمندند. سازمان بهداشت جهانی، تخمین زده است که حدود ۸۰ درصد از مردم جهان برای مراقبت‌های اولیه بهداشتی خود به طب سنتی اعتماد می‌کنند. حداقل ۱۱۹ محصول شیمیایی مشتق شده از ۹۰ گونه گیاهی به‌عنوان داروهای مهم در کشورهای مختلف بررسی شده است (۱۰-۸). گیاهان نه فقط برای ترکیبات مؤثرشان، بلکه همچنین برای مواد معدنی، ویتامین‌ها، آلکالوئیدها و روغن‌های فرارشان نیز مؤثرند. طب مکمل و جایگزین، به هر درمانی گفته می‌شود که در ترکیب یا جایگزینی درمان‌های پزشکی استاندارد به کار می‌رود. گیاهان دارویی که ترکیبات مؤثرشان شناسایی شده است به‌سرعت در درمان بیماری‌ها، مخصوصاً بیماری‌هایی که با روش‌های درمانی جدید قابل درمان نیستند، استفاده می‌شود. گیاهان مخازن غنی از ترکیبات ارگانیک ضروری‌اند و مدت‌هاست به‌عنوان منابع پزشکی استفاده می‌شوند (۱۱).

عناب میوه‌ای درختی متعلق به خانواده رامناسه[۱] می‌باشد. عناب با ویژگی‌ها و طعم‌های متفاوت در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیر آسیا، آمریکا و مدیترانه رشد می‌کند. از این میوه به عنوان غذا و مصارف پزشکی استفاده‌شده است (۱۲). میوه عناب به طرق متفاوت مثل میوه تازه، خشک‌شده و فرآوری شده (مربا، قند، کیک، ژله) استفاده می‌شود (۱۳, ۱۴). عناب حاوی ویتامین‌های A، C، B، کربوهیدرات‌ها، آمینواسیدها، فسفر، کلسیم، آهن و فنول می‌باشد (۱۵). قسمت‌های مختلف عناب به مدت زیادی برای مصارف انسان‌ها و پزشکی سنتی برای درمان بیماری‌ها مانند سرطان، تومورها و بیماری‌های قلبی-عروقی کاربرد داشته است (۱۶).

در مطالعه‌ای دانه‌های عناب به‌عنوان داروی سنتی مورد استفاده گرفته‌اند. مواد متفاوتی از عناب قابل استخراج می‌باشند که بعضی از این مواد فعالیت‌های دارویی متمایزی

[۱] Rhamnaceae

Downloaded from journal.nums.ac.ir at 16:15 IRST on Saturday February 16th 2019

از خود نشان می‌دهند (۱۷). علاوه بر این گزارش‌شده است که قسمت‌های مختلف عناب می‌تواند برای بیماری‌های متفاوت مفید واقع شود، به‌عنوان‌مثال برای درمان بیماری دیابت (عصاره اتانولی ۹۶ درصد از برگ عناب) (۱۸)، اسهال (عصاره متانولی ریشه) (۱۹)، فعالیت ضدقارچی (عصاره اتانولی عناب)(۲۰) و افزایش نفوذپذیری درکشت سلول‌های تک لایه (عصاره آبی عناب) (۲۱). سان یان فانگ[1] و همکاران در مطالعه خود خاطر نشان کردند که نتایج بررسی ژن و پروتئین نشان می‌دهد که افزایش بیان ژن BAX وابسته به دوز بوده است. همچنین فعالیت شدید کاسپاز ۳ و ۹ را نیز گزارش کرده‌اند. تمامی گزارشات ایشان بر روی ردهی سلولی MCF-7 انجام و گزارش شده است (۲۲).

هدف اصلی این تحقیق بررسی اثرات ضدتکثیری عصاره عناب بر رشد و تکثیر رده سلولی سرطانی سینه Sk-Br-3 و ارزیابی ژن آپوپتوزی BAX می‌باشد.

مواد و روش‌ها

ابتدا میوه عناب از باغات شهرستان تفت تهیه و این نمونه‌ها با کد هرباریومی ۳۳۶۷ در مرکز هرباریوم دانشگاه یزد ثبت گردید. در انتخاب میوه‌ها دقت گردید تا تمامی آن‌ها بصورت یکسان و یک دست انتخاب شوند. در ادامه دانه از میوه جدا گردید و گوشته میوه در سایه خشک و توسط آسیاب برقی (Braun AR1066Q) پودر گردید. ۲۰ گرم از عناب پودر شده با نسبت ۱:۱ حلال آبی اتانولی مخلوط گردید. برای عصاره‌گیری از روش سوکسله استفاده گردید که ازجمله روش‌های قدیمی معتبر برای عصاره‌گیری بر پایه قرار گرفتن در حلال مورد نظر می‌باشد.

در این روش با حرارت دادن مداوم باعث افزایش سرعت فرآیند در حال انجام می‌شویم. بدین گونه که ابتدا ۲۰ گرم پودر عناب با ترازوی دیجیتال وزن کرده و به داخل کاغذ کارتوش ریخته و از حلال آب و اتانول برای عصاره‌گیری عناب استفاده شد. عصاره‌گیری به مدت ۶ ساعت ادامه پیدا کرد و درنهایت عصاره ژله‌ای بدست آمده را در میکروتیوب-های مورد نظر تقسیم کرده و برای انجام آزمایش‌های بعدی داخل فریزر نگهداری و برای تهیه غلظت‌های متفاوت استفاده شد.

کشت سلول

در این مطالعه رده سلولی Sk-Br-3 سرطان پستان از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه و طبق پروتکل‌های مربوطه کشت داده شد. بطور خلاصه؛ رده سلولی خریداری زیر هود دفریز شده و برای اولین بار در محیط ۲۰ درصد حاوی ۸۰ درصد محیط کشت DMEM و ۲۰ درصد FBS (سرم جنین گاوی) رشد داده شد، همچنین به منظور بهبود در رشد سلول‌ها محیط کشت اولیه پس از دو روز تعویض شده و به فلاسک حاوی سلول‌ها محیط ۱۰ درصد افزوده شد. سلول‌ها در انکوباتور (Memmert, Germany) با شرایط دمای ۳۷ درجه، رطوبت ۹۰ درصد و غلظت CO_2 ۵ درصد رشد داده شدند. پس از رشد سلول‌ها و پر کردن ۸۰ درصد از کف فلاسک، سلول‌ها پاساژ داده شده و در صورت نیاز از سلول‌ها برای مراحل بعدی فریز تهیه شد. در مرحله‌ی بعد سلول‌ها برای انجام تست‌های زنده مانی به پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای انتقال داده شدند و با استفاده از این پلیت‌ها و تست MTT سنجش میزان IC50 برای عصاره هیدرو-الکلی عناب انجام شد. تمام مراحل کشت، پاساژ و تیمار سلول‌ها در شرایط استریل و بدون آلودگی انجام شد.

[1] Sun Yan-Fang

Downloaded from journal.nums.ac.ir at 16:15 IRST on Saturday February 16th 2019

تست MTT

با توجه به مقالات قبلی (۲۰و۲۳و۲۴) و دستورالعمل‌های ارائه شده رقت‌های متفاوتی از عصاره هیدرو-الکلی عناب به ترتیب از ۰/۱-۳/۱ میلی گرم در میلی لیتر در هر مرحله تهیه شد. ۱ گرم نمک MTT در ۲۰۰ میلی‌لیتر PBS با غلظت 5 میلی‌گرم/میلی‌لیتر حل و پس از الیکوت در دمای منفی ۲۰ درجه نگهداری شد. به منظور استفاده برای تست MTT، ۲۰ میکرولیتر از محلول تهیه شده به هر چاهک از پلیت ۹۶ خانه (حاوی تقریباً ۲۰۰۰۰۰ سلول) اضافه شده و برای ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه انکوبه شد تا سلول‌های زنده از طریق واکنش‌های فعال در چرخه میتوکندریایی خود رنگ MTT را به رنگ غیر محلول فورمازان تبدیل کنند، (MTT که یک محلول زرد رنگ است در مجاورت با سلول‌های زنده و انجام واکنش‌های بیوشیمیایی به یک رنگ آبی تیره تغییر رنگ می‌دهد بنابراین میزان رنگ تولید شده ارتباط مستقیمی با بقاء سلول‌ها و ارتباط غیرمستقیمی با دز داروی استفاده شده، دارد) در مرحله بعد به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر محلول DMSO افزوده شد و به مدت ۱۵ دقیقه روی دستگاه شیکر قرار داده شد (پلت حاوی MTT و DMSO به منظور عدم تماس مستقیم نور و تأثیر آن بر رنگ تولید شده، درون فویل پیچیده شد) تا بلورهای فورمازان کاملاً حل شوند و در نهایت جذب نوری چاهک‌ها توسط دستگاه الایزا ریدر در طول موج ۵۷۰ نانومتر ثبت و پس از تکرارهای متوالی به ترتیب برای زمان های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از تیمار با عصاره هیدرو-الکلی عناب IC50 معادل با ۲/۱، ۱/۵ و ۰/۷ میلی گرم در میلی‌لیتر محاسبه شد.

استخراج RNA

پس از به دست آمدن IC50 سلول‌ها برای مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در مجاورت دوز بدست آمده، از سلول های درون پلیت‌های شش خانه‌ای (تقریبا ۱ ملیون سلول در هر چاهک) کشت داده شده تا میزان مناسب وکافی از سلول برای استخراج RNA به‌دست آید. در کنار هرکدام از چاهک‌های مربوط به عصاره عناب یک چاهک از همان سلول و برای همان مدت زمان به عنوان کنترل کشت داده شد. استخراج RNA از سلول‌ها با استفاده از کیت Gene all و دستورالعمل‌های ارائه شده، صورت پذیرفت. غلظت RNA استخراج شده با استفاده از دستگاه نانودراپ و تعیین نسبت جذب ۲۶۰ به ۲۸۰ محاسبه و کیفیت سنجی RNA روی ژل انجام شد. به گونه‌ای که نمونه‌های دارای جذب مناسب (۲/۸-۲/۱) در طول موج ۲۶۰ نانومتر به ۲۸۰ نانومتر به منظور صحت از استخراج روی ژل آگارز ۱ درصد برده شده و درصورت مشاهده باند شارپ 28srRNA و باند 18srRNA و صحت از اطمینان استخراج و عدم آلودگی به DNA ژنومی، RNA استخراج شده تا زمان انجام ادامه مراحل به دمای نزدیک به منفی ۸۰ درجه منتقل شد. همچنین سنتز cDNA توسط کیت Thermo fisher و طبق دستورالعمل‌های ارائه شده، صورت گرفت. cDNAهای سنتز شده تا زمان انجام بقیه مراحل به دمای منفی ۲۰ درجه منتقل شدند. تمام مراحل استخراج RNA و ستنز cDNA زیر هود لامینار و در شرایط استریل انجام شد. پس از سنتز cDNA مواد واکنش برای انجام واکنش Real-Time PCR به صورت زیر تهیه شد؛ ۱۰ میکرو لیتر مستر میکس 2x، ۱ میکرولیتر پرایمر فوروارد، ۱ میکرولیتر پرایمر ریورس، ۱ میکرولیتر cDNA و در نهایت با ۷ میکرولیتر آب Nuclease-Free به حجم ۲۰ میکرولیتر رسانده شد و واکنش Real-Time PCR انجام گرفت. ژن GADPH به عنوان کنترل مثبت واکنش qRT-PCR برای ژن BAX استفاده شد. پرایمرهای فوروارد و ریورس ژن BAX توسط نرم‌افزار Primer3 طراحی شد (جدول ۱) (۲۵). نتایج پس از

Downloaded from journal.nums.ac.ir at 16:15 IRST on Saturday February 16th 2019

حصول اطمینان از توزیع طبیعی داده‌ها بوسیله آزمون آماری آنالیز واریانس یکطرفه (ANOVA) و با استفاده از نرم‌افزار SPSS تحلیل شد (۲۶). اختلاف بین گروه‌ها در سطح $P<۰/۰۵$ معنی‌دار در نظر گرفته شدند.

جدول ۱- پرایمرهای طراحی شده جهت انجام Real-Time PCR برای ژن BAX و GAPDH

نام پرایمر	پرایمر برگشت	پرایمر رفت
BAX	5'-AGCTTCTTGGTGGACGCATC-3'	5'-TTGCTTCAGGGTTTCATCCAG-3'
GAPDH	5'-TCAACCTTCGCTCGTCTGCT-3'	5'-CTCATTTCCTGGTATGAGAG-3'

یافته‌ها

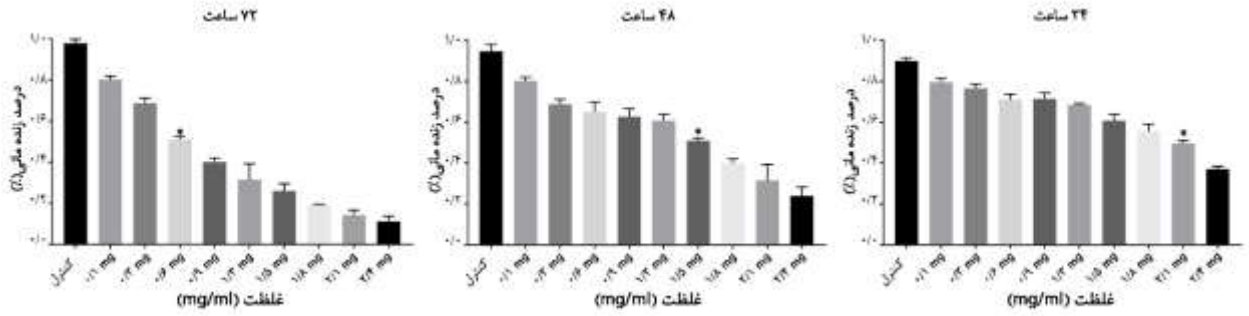
در جدول شماره ۲ غلظت‌های مختلف از عصاره عناب و میزان سمیت و کشندگی آن در رده سلولی Sk-Br-3 نشان داده شده است. این نمودار مربوط به تیمار ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت رده سلولی Sk-Br-3 است. در نمودار شماره ۱ بالاترین میزان بقاء سلول‌ها در غلظت ۰/۱ میلی گرم در میلی لیتر (حدود ۸۰ درصد) دیده شد که از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری نشان داد ($P<۰/۰۵$) و بیشترین میزان کشندگی در غلظت ۲/۴ میلی گرم در میلی لیتر (نزدیک به ۴۰ درصد) مشاهده شد که از لحاظ آماری معنی‌دار نبود ($P>۰/۰۵$). در این شرایط IC50 مربوط به عصاره عناب ۲/۱ میلی گرم در میلی لیتر برای مدت زمان ۲۴ ساعت بدست آمد و در ادامه مراحل آزمایش از این غلظت استفاده شد. پس از تیمار ۲۴ ساعته با عصاره عناب بیان ژن BAX افزایش یافت ($P<۰/۰۵$). پس از تیمار ۴۸ ساعته بیان ژن BAX نیز افزایش یافته بود که در این شرایط IC50 مربوط به عصاره عناب ۱/۵ میلی گرم در میلی لیتر برای مدت زمان ۴۸ ساعت بدست آمد ($P<۰/۰۵$). در تیمار ۷۲ ساعته نیز بیان ژن BAX همچنان افزایش یافت که در این شرایط IC50 مربوط به عصاره عناب ۰/۷ میلی گرم در میلی لیتر برای مدت زمان ۷۲ ساعت بدست آمد ($P<۰/۰۵$) (نمودار ۲).

جدول ۲- میانگین توان زیستی سلول‌های رده Sk-Br-3 با عصاره هیدرو-الکلی عناب در مدت زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت

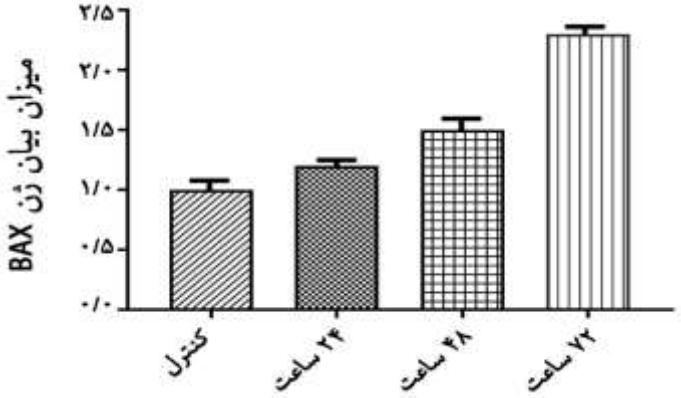
زمان	۰/۱mg/ml	۰/۶ mg/ml	۱/۳ mg/ml	۱/۸ mg/ml	۲/۴mg/ml
۲۴ ساعت	۸۱±۰/۰۷	۷۱±۰/۰۶	۶۷/۶±۰/۰۲	۵۷±۰/۱۴	۳۷/۱۲±۰/۰۹
۴۸ ساعت	۸۰±۰/۴	۶۳/۰۹±۰/۰۷	۵۹/۰۱±۰/۱۹	۴۱/۰۳±۰/۳	۲۱/۱±۰/۱۴
۷۲ ساعت	۸۰/۲۵±۰/۰۴	۵۷/۳۶±۰/۰۵	۳۱/۰۵±۰/۱۴	۱۹/۲۵±۰/۰۱	۱۱/۲۲±۰/۱۶
P-value	۰/۰۳	۰/۰۱	۰/۰۰۴	۰/۰۰۱	۰/۰۰۰۷

مقادیر به دست آمده بر اساس میانگین±انحراف از معیار و تفاوت میانگین‌ها در سطح $P<۰/۰۵$ در نظر گرفته شده است.(ANOVA and t-test)

Downloaded from journal.nums.ac.ir at 16:15 IRST on Saturday February 16th 2019



نمودار ۱-درصد بقای سلول‌های Sk-Br-3 در برابر غلظت‌های متفاوت عصاره عناب در مدت زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از تیمار در مقایسه با نمونه‌های کنترل گزارش شده است.



نمودار ۲- میزان بیان ژن BAX در مقایسه با ژن GAPDH

بحث

یکی از روش‌هایی که به طور سنتی برای کنترل پیشرفت بیماری سرطان استفاده می‌شود، استفاده از محصولات طبیعی است. در مطالعه حاضر، اثر سیتوتوکسیسیتی عصاره هیدروالکلی عناب بر سلول‌های سرطانی سینه رده SK-BR-3 مورد بررسی قرار گرفت. عناب دارای خواص درمانی از قبیل تقویت کننده سیستم ایمنی، کاهش کلسترول، کاهش قند خون بوده و همچنین دارای فعالیت سیتوتوکسیسیتی نیز می‌باشد. در این مطالعه، از روش کالریمتری بوسیله MTT برای بررسی زنده ماندن سلول‌های SK-BR-3 در برابر عصاره عناب استفاده شد. طبق نتایج بدست آمده، عناب منجر به مرگ سلولی وابسته به زمان در سلول‌های SK-BR-3 می‌شود. IC50 عصاره عناب برای زمان ۲۴ ساعت ۲/۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر، برای ۴۸ ساعت ۱/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و برای ۷۲ ساعت ۰/۷ میلی‌گرم در میلی‌لیتر می‌باشد. همچنین در این مطالعه بیان ژن BAX با

Downloaded from journal.nums.ac.ir at 16:15 IRST on Saturday February 16th 2019

روش Real-Time PCR مورد بررسی قرار گرفت. نتایج Real-Time PCR جهت بررسی میزان بیان ژن موردنظر در محیط کشت نشان داد که تیمار سلول‌ها با عصاره عناب در زمان‌های ۴۸ و ۷۲ منجر به افزایش بیان ژن BAX نسبت به زمان ۲۴ ساعت و همچنین گروه کنترل شده است.

در مطالعه عابدینی و همکاران در سال ۲۰۱۶ عصاره عناب به طرز فزاینده‌ای بر روی زنده مانی سلول‌های رده سرطان سینه از طریق وابسته به دوز و زمان تاثیر گذاشته و باعث افزایش بیان ژن BAX و کاهش بیان ژن Bcl2 شد و در نهایت باعث افزایش شش برابری وابسته به زمان در نسبت BAX به Bcl-2 گردید (۲۴). در مطالعه هشیار و همکاران عصاره آبی عناب اثرات ضدتکثیری وابستگی به دوز و زمان بر روی رده سلولی MDA-MB-468 را نشان می‌دهد و همچنین این تیمار ظرفیت آنتی اکسیدانی را به میزان قابل توجهی در مقایسه با گروه کنترل افزایش داده است. نتایج تحقیقات ایشان نشان دهنده مفید بودن عصاره عناب برای درمان سلول‌های سرطانی انسانی می‌باشد (۲۷). در مطالعه‌ای دیگر درمان گیاهی با عصاره عناب بر روی رده سلولی PC-12 برای بررسی آپوپتوز القا شده‌ی اکسیداتیو نشان بر وابسته بودن به زمان این رده سلولی بوده است. همچنین این عصاره باعث افزایش بیان ژن‌های مرتبط با آنتی اکسیدان‌ها می‌شود (۲۸).

در مطالعه چن[1] و همکاران تاثیر عصاره آبی عناب بر روی رده سلولی Hep3B بررسی و در نهایت باعث تحریک بیان اریتروپروتئین وابسته به دوز گردید. بعد تیمار این رده با عصاره آبی عناب فاکتور hypoxia-inducible factor-1α افزایش یافت. این نتایج عملکرد عصاره عناب بر هموگلبین-های بیان شده در سلول‌های کبد را مورد تایید قرار می‌دهد (۲۹). در مطالعه‌ای دیگر کیا[2] و همکاران تاثیر تریترپن‌های مستخرج شده از عناب را بر روی سه رده سلولی جداگانه HepG2، MCF-7 و MDA-MB-231 را بررسی کردند. نتایج نشان دهنده فعالیت ضدتکثیری و آنتی اکسیدانی موجود در عناب بودند (۳۰). که همگی این نتایج تا حد زیادی با نتیجه بدست آمده در این مطالعه همخوانی دارد، یعنی عصاره عناب نیز در سایر مطالعات باعث افزایش آپوپتوز گردیده است. به عبارتی همگی تاییدی بر تاثیرات سیتوتوکسیک و ضد تکثیری عصاره عناب می‌باشند.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که عصاره هیدرو الکلی میوه عناب بصورت وابسته به زمان (با افزایش زمان و ثابت ماندن دوز عصاره) به طور معنادار موجب کاهش حیات سلولی شده است. همچنین این عصاره باعث تغییرات مورفولوژیک سلولی نظیر تغییر چسبندگی سلول‌ها به سطح پلیت، کاهش حجم، متراکم شدن و تغییر شکل دیواره سلولی شد که به نوبه خود نشانگر آپوپتوز هستند. از طرفی، با توجه به تاثیر عصاره عناب بر روی بیان ژن BAX در این مطالعه، می توان این نتیجه را گرفت که عصاره عناب بر روی رده سلولی Sk-Br-3 اثرات سایتوتوکسیسیتی داشته و باعث افزایش بیان ژن BAX می‌شود، که این خود دال بر تاثیرات ضدتکثیری و ضد سرطانی عصاره عناب می‌باشد. در نهایت همه اینها می-توانند نوید بخش آینده‌ای روشن و امیدوار کننده برای یافتن درمان قطعی سرطان از دل طبیعت باشند.

تشکر و قدردانی

[1] Chen

[2] Qiao

این مقاله حاصل از پایان نامه کارشناسی ارشد رشته ژنتیک، دانشکده فنی و مهندسی دانشگاه علم و هنر یزد به راهنمایی دکتر سید مهدی کلانتر و مشاوره سید محسن میر اسماعیلی می‌باشد.

Downloaded from journal.nums.ac.ir at 16:15 IRST on Saturday February 16th 2019

References

1. Tiwari A, Hadley JA, Hendricks III GL, Elkin RG, Cooper T, Ramachandran R. Characterization of ascites-derived ovarian tumor cells from spontaneously occurring ovarian tumors of the chicken: evidence for E-cadherin upregulation. PloS one 2013;8(2):e57582.
2. Goya M. Iranian annual cancer registration report 2005/2006. Ministry of Health and Medical Education, Health Deputy. Center Disease Control Prevention. 2007. [Persian]
3. Harirchi I, Karbakhsh M, Kashefi A, Momtahen AJ. Breast cancer in Iran: results of a multi-center study. Asian Pac J Cancer Prev 2004;5(1):24-7.
4. Mousavi SM, Somi MH. Gastric cancer in Iran 1966-2006. Asian Pac J Cancer Prev 2009;10(3):407-12.
5. Mousavi SM, Gouya MM, Ramazani R, Davanlou M, Hajsadeghi N, Seddighi Z. Cancer incidence and mortality in Iran. Ann Oncol 2008;20(3):556-63.
6. Cady B. Breast cancer in the third millennium. Breast J 2000;6(5):280-7.
7. Fogh J, Trempe G. New human tumor cell lines. Human tumor cells in vitro: Springer; 1975. p. 115-59.
8. DeNardo DG, Andreu P, Coussens LM. Interactions between lymphocytes and myeloid cells regulate pro-versus anti-tumor immunity. Cancer Metastasis Rev 2010;29(2):309-16.
9. Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. Cell 2010;140(6):883-99.
10. Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. Cell Proliferat 2003;36(3):131-49.
11. Sharma H, Parihar L, Parihar P. Review on cancer and anticancerous properties of some medicinal plants. J Med Plants Res 2011;5(10):1818-35.
12. Gao Q-H, Wu P-T, Liu J-R, Wu C-S, Parry JW, Wang M. Physico-chemical properties and antioxidant capacity of different jujube (Ziziphus jujuba Mill.) cultivars grown in loess plateau of China. Sci Hort 2011;130(1):67-72.
13. San B, Yildirim AN. Phenolic, alpha-tocopherol, beta-carotene and fatty acid composition of four promising jujube (Ziziphus jujuba Miller) selections. J Food Compost Anal 2010;23(7):706-10.
14. Zhang H, Jiang L, Ye S, Ye Y, Ren F. Systematic evaluation of antioxidant capacities of the ethanolic extract of different tissues of jujube (Ziziphus jujuba Mill.) from China. Food Chem Toxicol 2010;48(6):1461-5.
15. Li J-W, Fan L-P, Ding S-D, Ding X-L. Nutritional composition of five cultivars of Chinese jujube. Food Chem 2007;103(2):454-60.
16. Abdel-Zaher AO, Salim SY, Assaf MH, Abdel-Hady RH. Antidiabetic activity and toxicity of Zizyphus spina-christi leaves. J Ethnopharmacol 2005;101(1-3):129-38.
17. Duke J, Ayensu E. Medicinal plants of China. Reference Publ.: Algonac, USA. 2 vols. 670pp. Review by Prance, GT in Brittonia 1985;37:194.
18. Shirdel Z, Maadani H, Mirbadalzadeh R. Investigation into the hypoglycemic effect of hydroalcoholic extract of Ziziphus Jujuba Leaves on blood glucose and lipids in Alloxan-Induced diabetes in rats. J Diabetes Metab Disord 2009;8:2.
19. Dahiru D, Sini J, John-Africa L. Antidiarrhoeal activity of Ziziphus mauritiana root extract in rodents. Afr J Biotechnol 2006;5(10).
20. Taechakulwanijya N, Weerapreeyakul N, Barusrux S, Siriamornpun S. Apoptosis induction effect of three jujube cultivars in HepG2 and Jurkat cell lines. Int J Biosci Biochem Bioinforma 2013;3(6):540.
21. Eley JG, Dovlatabadi H. Permeability enhancement activity from Ziziphus jujuba. Pharm Biol 2002;40(2):149-53.
22. Vahedi F, Najafi MF, Bozari K. Evaluation of inhibitory effect and apoptosis induction of Zyzyphus Jujube on tumor cell lines, an in vitro preliminary study. Cytotechnol 2008;56(2):105-11.
23. Abedini MR, Erfanian N, Nazem H, Jamali S, Hoshyar R. Anti-proliferative and apoptotic effects of Ziziphus Jujube on cervical and breast cancer cells. Avicenna J Phytomed 2016;6(2):142.

24. Sun Y-F, Song C-K, Viernstein H, Unger F, Liang Z-S. Apoptosis of human breast cancer cells induced by microencapsulated betulinic acid from sour jujube fruits through the mitochondria transduction pathway. Food Chem 2013;138(2-3):1998-2007.
25. Hoshyar R, Mohaghegh Z, Torabi N, Abolghasemi A. Antitumor activity of aqueous extract of Ziziphus jujube fruit in breast cancer: an in vitro and in vivo study. Asia Pac J Rural Dev 2015;4(2):116-22.
26. Lam CT, Gong AG, Lam KY, Zhang LM, Chen J-P, Dong TT, *et al*. Jujube-containing herbal decoctions induce neuronal differentiation and the expression of anti-oxidant enzymes in cultured PC12 cells. J Ethnopharmacol 2016; 188:275-83.
27. Chen J, Lam CT, Kong AY, Zhang WL, Zhan JY, Bi CW, *et al*. The extract of Ziziphus jujuba fruit (jujube) induces expression of erythropoietin via hypoxia-inducible factor-1α in cultured Hep3B cells. Planta Med 2014;80(17):1622-7.
28. Qiao A, Wang Y, Xiang L, Zhang Z, He X. Triterpenoids of sour jujube show pronounced inhibitory effect on human tumor cells and antioxidant activity. Fitoterapia 2014;98:137-42.

Downloaded from journal.nums.ac.ir at 16:15 IRST on Saturday February 16th 2019

Journal of Neyshabur University of Medical Sciences

www.journalnums.ac.ir

Evaluating the effects of Ziziphus Jujube extract on apoptosis and BAX gene expression in Sk-Br-3 breast cancer cell line

Hamed Hosseinian*[1], Mehdi Kalantar[2], Mohsen Miresmaeili[1]

1. Biology Department, Science and Engineering Faculty, Science and Arts University, Yazd, Iran
2. Department of Genetics, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran

Original Article

Received: Dec 4, 2018
Accepted: Dec 25, 2018

***Corresponding Author:**
Hamed Hosseinian, Biology Department, Science and Engineering faculty, Science and Arts University, Yazd, Iran
TEL: +98 35-38264080
Email:
Hamedhosseinian.h2@gmail.com

A B S T R A C T

Introduction

Breast cancer originates from abnormal growth of normal cells in the chest. Like any other types of cancers, breast cancer starts with a single cell. The main aim of this study was to investigate the anti-proliferative effects of Jujube extracts on growth and proliferation of Sk-Br-3 tumor cell line and assessment of BAX expression.

Materials and Methods

After preparing Jujube hydro-alcoholic extract, Sk-Br-3 cell line was treated with Jujube extract in different groups for 24, 48 and 72 hours. Subsequently, it was measured by MTT assay and the rate of apoptosis was recorded. Finally, RNA was extracted from control and treated group by 2.1 (higher than 1.5 mg/ml), 1.5 (between 0.5-1.5 mg/ml) and 0.7 mg/ml (lower than 0.5 mg/ml), transformed into cDNA and the level of BAX gene expression was measured according to the GAPDH gene as a housekeeping gene by Real-Time PCR system.

Results

According to MTT results, 2.1, 1.5 and 0.7 mg/ml concentrations were selected as an IC50 for 24, 48 and 72 hours, which was time-dependent and has increased rate of apoptosis and BAX gene expression.

Conclusion

In this study, Jujube hydro-alcoholic extract was used for the first time on Sk-Br-3 cell line ever. According to the results, Jujube hydro-alcoholic extract could be suggested as the Sk-Br-3 cell line treatment protocol.

Keywords

Breast Cancer, Jujube extract, Sk-Br-3 cell line, BAX gene, MTT

► ***Please cite this article as:*** Hosseinian H, Kalantar M, Miresmaeili M. Evaluating the effects of Ziziphus Jujube extract on apoptosis and BAX gene expression in Sk-Br-3 breast cancer cell line. J Neyshabur Univ Med Sci 2019;6(4):1-10.

Downloaded from journal.nums.ac.ir at 16:15 IRST on Saturday February 16th 2019