

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۰/۲۱ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۲/۲۱

وب سایت نشریه: <https://jab.alzahra.ac.ir>



10.22051/JAB.2021.34309.1398

اثر سیتوتوکسیک عصاره هیدرو الکلی میوه زرشک ر سلول های سرطان پستان انسانی رده MCF-7

زهرا میر بهالدین؛ غلامرضا مطلب*

چکیده

مقدمه: سرطان پستان دارای بیشترین نرخ ابتلا در زنان است. در این پژوهش برای اولین بار فعالیت سیتوتوکسیک عصاره میوه بربریس ولگاریس بر روی سلول های سرطانی رده MCF-7 بررسی گردید.

مواد و روش ها: در این مطالعه آزمایشگاهی، سلول های سرطانی رده MCF-7 در غلظت های مختلف عصاره میوه زرشک (۳۱/۲۵، ۶۲/۵، ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ میکروگرم در میلی لیتر) ۲۴ ساعت انکوبه و اندازه سیتوتوکسیسیته با روش ام تی تی، آپوپتوزیس با روش فلوسیتومتری به کمک کیت، میکروسکوپی فلورسانس با استفاده از رنگ هوخست؛ بیان ژن های TP53 و MDM4 با روش ریل تایم پی سی آر؛ فعالیت کاسپازهای ۳ و ۸ و ۹ توسط کیت آپکام مورد بررسی قرار گرفت. تفسیر نتایج با آزمون آنالیز واریانس یک طرفه انجام شد. $P < 0.05$ معنی دار گزارش گردید.

نتایج: اثر عصاره میوه زرشک بر روی سلول های MCF-7 وابسته به دوز بوده و بیشترین تاثیر عصاره در غلظت ۲۰۰۰ میکروگرم در میلی لیتر در مدت ۲۴ ساعت رخ داده است (۱۶۸۱ میکروگرم در میلی لیتر = IC_{50}). نتایج نشان داد میزان بیان نسبی ژن های P53 و MDM4 در مقایسه با گروه کنترل (غیر تیمار) افزایش معنی داری دارد ($P < 0.001$). درصد سلول های آپوپتوزی بیش از ۸۱ برابر نسبت به گروه کنترل (غیر تیمار شده) افزایش یافت. فعالیت کاسپازهای ۳ و ۸ و ۹ در سلول های MCF-7 تیمار شده افزایش یافت ($P < 0.001$).

نتیجه گیری: عصاره میوه زرشک در غلظت های معین موجب کاهش رشد سلولی و افزایش القای آپوپتوزیس در سلول های سرطانی MCF-7 می شود. عصاره میوه زرشک توانایی ضد سرطانی در درمان سرطان سینه دارد.

واژه های کلیدی: آپوپتوزیس، بربریس ولگاریس، سرطان پستان، سیتوتوکسیسیته

۱. فارغ التحصیل کارشناسی ارشد زیست شناسی - ژنتیک ملکولی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، پردیس خودگردان، دانشگاه زابل، زابل، ایران

۲. دانشیار بیولوژی ملکولی، واحد سلولی و ملکولی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه زابل، زابل، ایران * نویسنده مسئول:

مقدمه

سرطان یک مشکل عمده بهداشت عمومی در سراسر جهان و دومین عامل مرگ و میر در ایالات متحده است. در سال ۲۰۲۰، تشخیص و درمان سرطان تحت تأثیر همه‌گیری بیماری کرونا و پروس ۲۰۱۹ (COVID-19) قرار گرفت (Yabroff *et al.*, 2022).

سیزده میلیون مرگ ناشی از سرطان و بیش از ۲۱ میلیون مورد جدید سرطان در جهان تا سال ۲۰۳۰ پیش بینی می شود (Ashta *et al.*, 2020). سرطان سینه شایع ترین سرطان در زنان و به طور کلی شایع ترین سرطان است. در سال ۲۰۲۰ بیش از ۲ میلیون مورد جدید سرطان سینه در زنان ثبت شد (WHO, 2022).

بر اساس تشخیص بیان گیرنده های استروژن توسط ایمونوهیستوشیمی در حداقل یک درصد از سلول های تومور، بیش از هفتاد درصد از تمام سرطان های سینه به عنوان ER+ طبقه بندی می شوند. عواملی مانند قاعدگی زودرس، یائسگی دیررس، و بارداری های دیررس شناخته شده اند که از طریق تغییر هورمون های تخمدان، β -۱۷-استرادیول (E2) و پروژسترون (P4) بر خطر سرطان سینه تأثیر می گذارند (Colditz *et al.*, 2004). استفاده از آگونیست های گیرنده هورمون خارجی نیز با خطر سرطان سینه و پیشرفت تومور مرتبط است (Scabia *et al.*, 2022). از آنجایی که سرطان سینه جهش های متعددی را به دست می آورد، هر تومور احتمالاً دارای سیگنال دهی و زمینه اپی ژنتیکی متفاوتی است که هر دو می توانند بر نتیجه سیگنال دهی گیرنده های هورمونی تأثیر بگذارند (Scabia *et al.*, 2022).

سرطان سینه یک بیماری بدخیم است که از سلول های سینه شروع می شود. مانند سایر تومورهای بدخیم، دلایل متعددی وجود دارد که می تواند احتمال ابتلا به سرطان سینه را افزایش دهد. آسیب به اسید دئوکسی ریبونوکلیتیک (DNA) و تغییرات ارثی می تواند منجر به سرطان سینه شود. برخی از بیماران، نقص در اسید دئوکسی ریبونوکلیتیک (DNA) و ژن هایی مانند *BRCA1*، *P53* و *BRCA2* را به ارث می برند. بیماران که سابقه خانوادگی سرطان سینه یا تخمدان دارند، احتمال ابتلا به سرطان سینه را دارند (Scabia *et al.*, 2022).

سرطان سینه به دو دسته سرطان سینه تهاجمی و غیرتهاجمی (Lobular and Ductal carcinoma in situ) تقسیم می شود (Akram *et al.*, 2017). مدیریت درمان سرطان تهاجمی پستان به درمان چند وجهی تجویز شده برای مرحله I تا III بیماری، از جمله جراحی پستان، رادیوتراپی، و درمان سیستمیک کمکی / نئوادجوانت (شیمی درمانی سیتوتوکسیک، درمان غدد درون ریز، و عوامل هدفمند) همراه با مراقبت های حمایتی مناسب اشاره دارد. ولی در همه موارد درد مرتبط با سرطان و سمی بودن داروها برای سلول های سالم و عوارض جانبی درمان ها وجود دارد (Mutebi *et al.*, 2020). به همین دلیل یافتن و معرفی عوامل و یا ترکیباتی که فاقد اثرات جانبی نامطلوب و یا سمی بر روی سلول های سالم باشند ضروری است. اما نکته مهم در این زمینه القای آپوپتوزیس یا مرگ برنامه ریزی شده سلولی توسط عامل معرفی شده دارویی است که توسط سلول ها و تومورهای سرطانی خاموش و یا بسیار کاهش یافته است.

مرگ برنامه ریزی شده سلولی یا آپوپتوز معمولاً با تغییرات ساختاری مختلف و مکانیسم های بیوشیمیایی وابسته به انرژی نشان داده می شود. آپوپتوز به عنوان یک نوع متمایز و مهم مرگ سلولی "برنامه ریزی شده" شناخته شده که بر حذف ژنتیکی اختصاصی سلول ها تأثیر می گذارد (Elmore, 2007).

تعداد زیادی ژن، آنزیم، پروتئین، و مسیرهای علامت دهی بیوشیمیایی در فرایند آپوپتوزیس شناسایی و یا معرفی شده اند. یکی از مهم ترین ژن های آپوپتوز، ژن *P53* است. فرآیند آپوپتوز ناشی از *P53* ترمیم DNA را در مراحل اولیه تحریک می کند (Elmore, 2007).

یافته های ژنتیکی نشان میدهد *Murine double minute-type 4 (MDM4)* مانند *MDM2* برای کنترل فعالیت *P53* در طول رشد جنینی ضروری است (Marine & Jochemsen, 2016). از سوی دیگر آپوپتوز یک مکانیسم هماهنگ و منظم وابسته به انرژی است که شامل شروع فعال شدن یک دسته از سیستمین پروتئازها به نام کاسپازها و یک آبشار چند وجهی از اقداماتی است که محرک های آغازین را به مرگ سلول متصل می کند (Elmore, 2007).

اعتقاد بر این است که کاسپاز-۳ مهم ترین کاسپازهای مؤثر اجرایی است که توسط کاسپازهای آغازگر مانند کاسپاز-۸ و کاسپاز-۹ تحریک می شود (Elmore, 2007).

زرشک (*Berberis vulgaris L., Var. Asperma Don., family Berberidaceae*) در آسیا و اروپا رشد می کند. این گیاه در ایران کاملا شناخته شده بوده و در طب سنتی ایران بعنوان یک گیاه دارویی بسیار مصرف می شود (Motalleb *et al.*, 2008). تمام قسمت های گیاه زرشک دارای خواص دارویی است از جمله خواص ضد میکروبی، ضد استفراغ، تب بر، ضد خارش گزارش شده است و درموردی برای کوله سیستیت، کوله لیتیاژیس، یرقان، اسهال خونی، لیثمانیوز، مالاریا و سنگ های صفاوی استفاده شده است (Motalleb *et al.*, 2006).

مطلب در سال ۲۰۰۵ برای اولین بار خواص ضد توموری عصاره میوه زرشک را بر علیه سرطان کبد القاء شده در مدل حیوانی تأیید نمود (Motalleb, 2006). در پژوهش حاضر برای اولین بار اثر سیتوتوکسیک عصاره میوه زرشک بر روی سلول های سرطانی رده MCF-7 بررسی گردید. همچنین، مطالعه حاضر به ارائه اثبات مفهومی بر مکانیسم اثر بیان ژن های *P53* و *MDM4* و کاسپاز-۳، ۸ و ۹ و فعالیت های آنها در مسیر آپوپتوز پس از درمان توسط عصاره میوه زرشک پرداخت.

مواد و روش ها

ترکیبات شیمیایی

مواد و ترکیبات شیمیایی مورد استفاده در مقیاس ملکولی در این پژوهش شامل: محیط کشت RPMI-۱۶۴۰ () (England, Gibco)؛ پنی سیلین- استرپتومایسین (Germany, Capricorn)؛ MTT (USA, Sigma)؛ FBS (Capricorn)؛ DMSO (Germany, Merck)؛ PBS و بیکربنات سدیم (Germany, Merck)؛ تریپسین (England, Gibco)؛ EDTA (Germany, Merck)؛ آلان، (Germany, Merck)؛ تریپان بلو (Germany, Merck; USA, Sigma)؛ آب دیونیزه (Germany, Merck; USA, Sigma).

گیاه زرشک

میوه زرشک کاملاً ارگانیک از روستای فال شهرستان سربیشه در استان خراسان جنوبی تهیه و توسط گروه زیست شناسی دانشکده علوم پایه دانشگاه زابل شناسایی گردید.

کشت سلول

در این پژوهش از سلول های سرطان پستان انسانی رده MCF-7 استفاده گردید. این سلول ها از بانک سلولی واقع در انستیتو پاستورایران (تهران) خریداری شد. سلول ها در فلاسک های ۲۵ سانتی متر مکعب و در انکوباتور پنج درصد دی اکسید کربن و دمای سی و هفت درجه سانتی گراد و رطوبت نود و پنج درصد و محیط کشت DMSO و ده درصد FBS کشت گردید.

تهیه عصاره میوه زرشک

عصاره هیدرو الکلی میوه زرشک طبق روش مطلب و همکاران تهیه شد (Motalleb *et al.*, 2005).

تست MTT

۵×۱۰^۳ سلول در میلی لیتر به پلیت ۹۶ خانه منتقل شدند. به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت افزوده گردید. سپس سلول ها به مدت ۲۴ ساعت گرماگذاری شدند (Kutlu *et al.*, 2018) تا به کف ظرف بچسبند. در مرحله بعد غلظت های مختلف عصاره میوه زرشک (۳۱/۲۵، ۶۲/۵، ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ میکروگرم در میلی لیتر) به حجم ۱۰۰ میکرو لیتر به گروه تیمار و کنترل اضافه گردید. سپس محلول MTT با غلظت ۵ میلی گرم در میلی لیتر در طول موج ۵۷۰ نانومتر توسط دستگاه (ELISA MicroPlate Reader StatFax 2100 (USA) خوانده شد. جهت مشخص نمودن درصد زنده مانی سلول ها متوسط جذب نوری سلول های تیمار شده با عصاره میوه زرشک بر متوسط جذب نوری با DMSO محاسبه گردید. IC₅₀ عصاره میوه زرشک توسط نرم افزار (GraphPad Prism 6.07 (USA) محاسبه گردید.

ارزیابی بیان ژن های P53 و MDM4

تغییرات بیان ژن های P53 و MDM4 پس از تیمار با IC₅₀ عصاره میوه زرشک به مدت ۲۴ ساعت، برای سلول های MCF-7 تیمار شده و گروه کنترل انجام گردید. جهت حصول اطمینان از وجود مقادیر تقریباً یکسان از RNA در همه ی نمونه ها، غلظت آن توسط دستگاه Nanodrop 1000 spectrophotometer (Thermo Fisher, USA) اندازه گیری شد. آغازگرهای اختصاصی ژن های P53 (NC_000017.11) و MDM4 (NC_000001.11) و (Endogenous control, NC_000012.12) توسط نرم افزار Primer3 طراحی و سپس ویژگی پرایمرها با استفاده از ابزار آنلاین Primer-BLAST پیش بینی شد. سطوح بیان ژن های P53 و MDM4 با استفاده از کیت Real Time PCR SYBR Green I (Sigma-Aldrich, USA) و روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ انجام گردید. سنتز cDNA بوسیله cDNA Takara Kit (Takara Bio, USA) صورت گرفت. خصوصیات پرایمرها برای ژن های به کار رفته در جدول ۱ نشان داده شده است. ویژگی پرایمرها با استفاده از ابزار آنلاین Primer-BLAST پیش بینی شد

جدول ۱- توالی پرایمرهای طراحی شده برای ژن های *P53* و *MDM4*.

Table 1. Sequence of the primers designed for *P53* and *MDM4*

نام آغازگر	توالی ۵' → ۳'	طول نوکلئوتیدی	دمای ذوب (C°)	طول قطعه تکثیر شده
P53-FW	CATCTACAAGCAGTCACAGCACAT	۲۴	۸۴/۶۷	۱۹۴
P53-RV	CAACCTCAGGCGGCTCATAG	۲۰	۸۴/۶۷	
MDM4-W	TGGAAGGACGGGCCATCT	۱۸	۸۶/۹	۱۱۸
MDM4-FV	TGCTATAAAAAACCTTAATAACCAGCTGAA	۲۹	۸۶/۹	
GAPDH-FW	CCCCTCCTCCACCTTTGAC	۲۰	۸۱/۳۹	۷۵
GAPDH-FV	CATACCAGGAAATGAGCTTGACAA	۲۴	۸۱/۳۹	

بیان ژن ها با استفاده از دستگاه (ABI, USA) ABI One Step صورت پذیرفت. cDNA تحت شرایط پانزده دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، پنج ثانیه در درمای ۸۵ درجه سانتی گراد و ده دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد سنتز گردید. واکنش های qRT-PCR در شرایط ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه و ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت یک دقیقه (۴۰ سیکل) برای تمامی ژن ها انجام گردید. نتایج qRT-PCR و پارامترهای مورد نظر محاسبه و توسط نرم افزار Beacon Designer (PREMIER Biosoft, USA) بررسی گردید.

تست فلوسایتومتری

فلوسایتومتری بوسیله FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit PI (Biolegend, USA) انجام گرفت. سلول ها با دانسیته $1 \times 10^4 \times 25$ هزار سلول در میلی لیتر به چاهک های پلیت ۹۶ تایی اضافه و پس از حداقل ۲۰ ساعت انکوباسیون تحت اثر غلظت IC_{50} عصاره میوه زرشک به مدت ۲۴ ساعت تیمار گردیدند. محلول رویی چاهک ها جدا و سلول های چسبنده توسط تریپسین از کف پلیت جدا شدند. در مرحله بعد سلول ها به مدت ۵ دقیقه در ۹۵۰ دور سانتریفیوژ گردیدند. رسوب سلولی در فسفات بافر سالین سرد سوسپانسیون و به میکروتیوب منتقل گردید. مجدداً میکروتیوب ها به مدت ۵ دقیقه در ۹۵۰ دور سانتریفیوژ شده و ۴۰۰ میکرو لیتر Binding Buffer به هر میکروتیوب اضافه گردید. سپس سلول ها توسط سمپلر پیپتاژ تا بافر و سلول ها به خوبی مخلوط شده و به مدت ۳ دقیقه در دمای اتاق انکوبه گردیدند. سپس ۵ میکرو لیتر Annexin V به هر میکروتیوب اضافه شد و سلول ها دوباره توسط سمپلر به آرامی مخلوط شدند. در مرحله بعد انکوباسیون به مدت ۱۵ دقیقه در تاریکی انجام گرفت. در انتها ۵ میکرو لیتر رنگ PI به هر میکروتیوب اضافه و مجدداً به مدت ۱۵ دقیقه در تاریکی و دمای اتاق انکوباسیون گردید. پس از سانتریفیوژ مجدد و دور ریختن محلول رویی و حل کردن رسوب سلولی در ۱۰۰۰ میکرو لیتر محلول ایزوتونیک، سوپانسیون حاصل به لوله های پلاستیکی مخصوص فلوسایتومتری منتقل و دور از نور نگهداری شده و توسط فلوسایتومتر (PARTEC PA II Flow Cytometry Particle Analyzing System (Germany) انجام گردید.

فلورسانس میکروسکوپی

تغییرات مورفولوژیکی سلول های MCF-7 تحت تاثیر عصاره میوه زرشک (IC_{50}) با استفاده میکروسکوپ فلورسانس (Nikon Eclipse Ti-S, USA) انجام گرفت (Heidarzadeh *et al.*, 2019). سلول های MCF-7 (5×10^5) با عصاره میوه زرشک IC_{50} به مدت ۲۴ ساعت تیمار و متعاقبا در استون ۸۰ درصد و در دمای ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۲۰ دقیقه تثبیت شدند. سپس سلول ها توسط Hoechst 33342 در تاریکی به مدت پنج دقیقه رنگ آمیزی و سپس با بافر فسفات سالین (PBS) شستشو گردیدند. در نهایت، تغییرات مورفولوژی در سلول های MCF-7 توسط میکروسکوپ فلورسانس مشاهده شد.

بررسی فعالیت کاسپازهای ۳ و ۸ و ۹

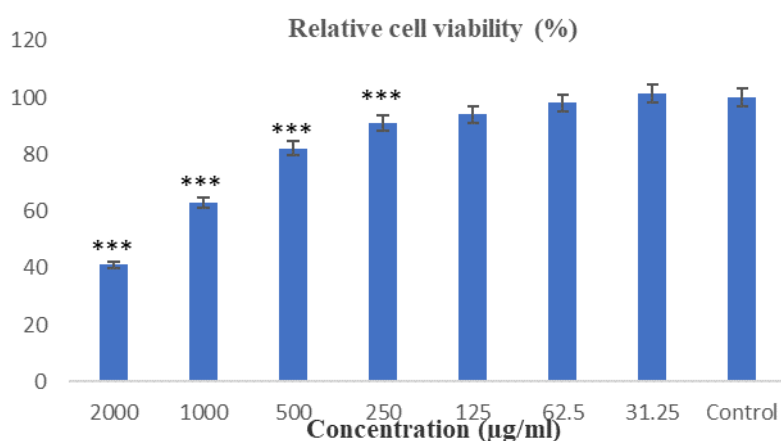
فعالیت کاسپازها توسط Caspase assay kit (Colorimetric, abcam) طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام گرفت (Zhang *et al.*, 2018).

آنالیز آماری

به منظور تجزیه و تحلیل داده ها از آزمون پارامتریک واریانس یک طرف (One way-ANOVA) و غیر پارامتریک Post Hoc Tukey استفاده گردید. نتایج به صورت $Mean \pm SEM$ گزارش و $P < 0.05$ معنی دار در نظر گرفته شد.

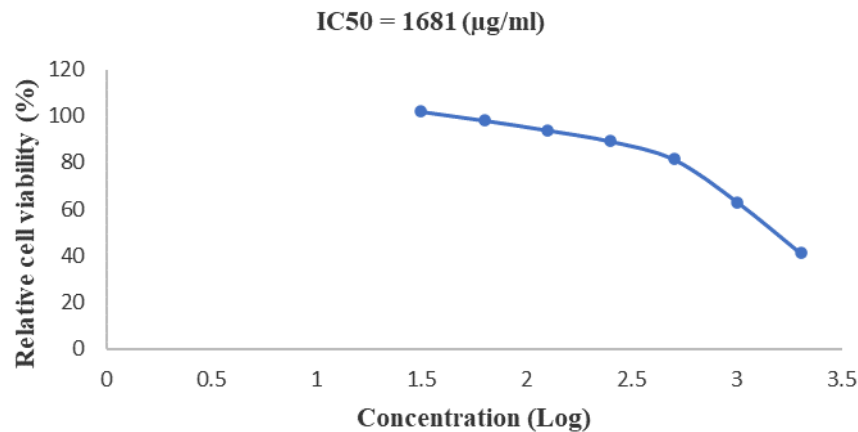
نتایج و بحث

در این مطالعه آزمایشگاهی، اندازه سیتوتوکسیسیته عصاره میوه زرشک در غلظت های مختلف (۳۱/۲۵، ۶۲/۵، ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ میکروگرم در میلی لیتر) با روش MTT بر روی سلول های MCF-7 بررسی گردید. شکل شماره ۱ و ۲ نشان میدهد اثر عصاره میوه زرشک بر روی سلول های MCF-7 وابسته به دوز بوده و بیشترین تاثیر عصاره در غلظت ۲۰۰۰ میکروگرم در میلی لیتر در مدت ۲۴ ساعت رخ داده است (۱۶۸۱ میکروگرم در میلی لیتر = IC_{50}).



شکل ۱- اثر سمیت سلولی عصاره میوه زرشک بر روی سلول های بدخیم سرطان پستان انسانی (MCF-7) پس از ۲۴ ساعت. ***: $P < 0.001$

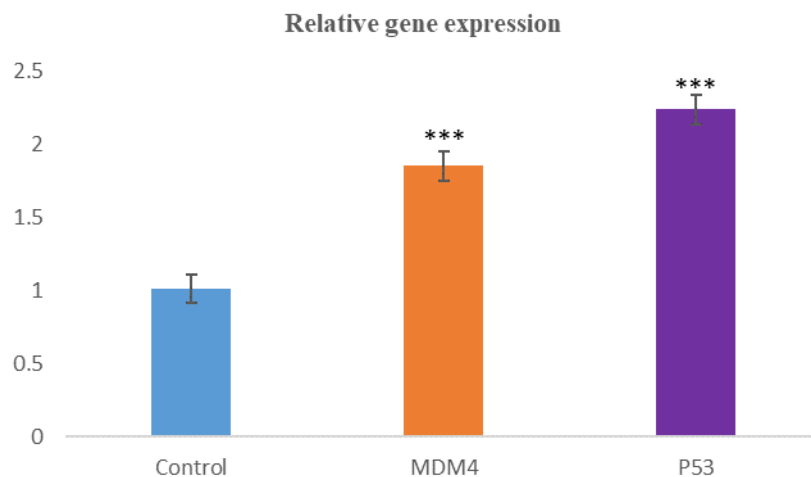
Figure 1. Cytotoxic effect of barberry fruit extract on malignant human breast cancer cells (MCF-7) after 24 hours. ***: $P < 0.001$.



شکل ۲- IC_{50} عصاره میوه زرشک در غلظت های مختلف. نتایج ۱۶۸۱ میکرو گرم در میلی لیتر غلظت IC_{50} را نشان داد.

Figure 2. IC_{50} of barberry fruit extract in different concentrations. The results showed an IC_{50} concentration of 1681 $\mu\text{g/ml}$.

پس از تیمار سلول ها با مقادیر IC_{50} مرتبط با عصاره میوه زرشک برای رده سلولی MCF-7 در ۲۴ ساعت تغییرات بیان ژن های *P53* و *MDM4* با روش qRT-PCR مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد میزان بیان نسبی ژن های *P53* و *MDM4* در مقایسه با گروه کنترل (غیر تیمار) افزایش معنی داری داشت ($P < 0.001$) (شکل ۳).



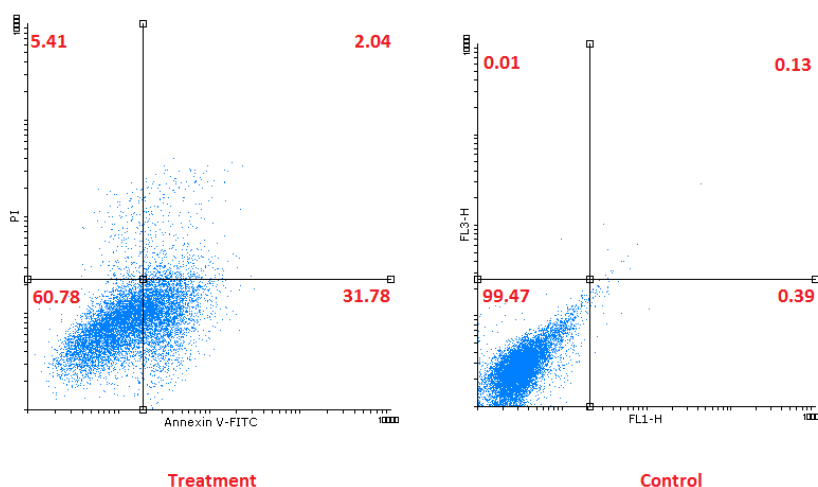
شکل ۳- تغییرات نسبی بیان ژن های *P53* و *MDM4* در سلول های MCF-7 در گروه کنترل (تیمار نشده) و گروه تیمار شده با

عصاره میوه زرشک (۱۶۸۱ میکرو گرم در میلی لیتر) پس از ۲۴ ساعت. ***: $P < 0.001$

Figure 3. Changes in expression levels of *P53* and *MDM4* genes in MCF-7 cells in the control group (untreated) and the group treated with barberry fruit extract (1681 $\mu\text{g/ml}$) after 24 hours. *: $P < 0.001$**

در پژوهش حاضر جهت تشخیص آپتوز از روش فلوسایتومتری استفاده گردید. با تیمار سلول های MCF-7 بوسیله عصاره میوه زرشک (۱۶۸۱ میکروگرم در میلی لیتر = IC_{50}) درصد سلول های آپتوزی بیش از ۸۱ برابر نسبت به گروه کنترل (غیر تیمار شده) افزایش یافت. بطور خیلی جالب درصد سلول های زنده تقریباً ۳۹ درصد کاهش در سلول های تیمار شده در

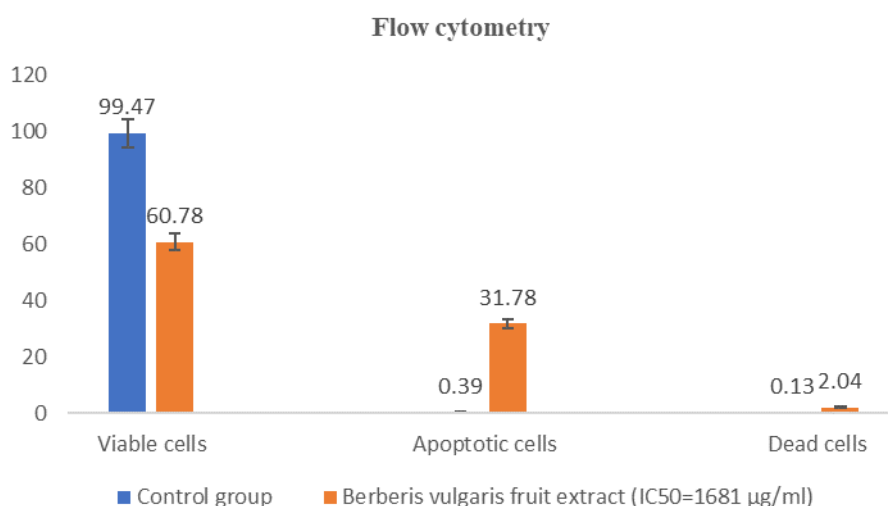
مدت ۲۴ ساعت نشان داد. تمام نتایج فلوسایتومتری تقویت کننده و نیز تایید کننده نتایج ارزیابی بیان ژن های مورد مطالعه در پژوهش ما است.



شکل ۴- نمودار درصد تراکمی خروجی دستگاه فلوسایتومتری سلول های MCF-7 تیمار شده و تیمار نشده با غلظت (۱۶۸۱ میکروگرم در میلی لیتر = IC_{50}) عصاره میوه زرشک بعد از ۲۴ ساعت.

Treatment: سلول های سرطانی MCF-7 تیمار شده با ۱۶۸۱ میکروگرم در میلی لیتر عصاره میوه زرشک; **Control:** گروه سلول های سرطانی MCF-7 بدون اثر عصاره میوه زرشک بعد از ۲۴ ساعت.

Figure 4. Flow cytometry output concentration diagram of treated and untreated MCF-7 cells with the concentration ($IC_{50}=1681 \mu\text{g/ml}$) of barberry fruit extract after 24. **Treatment:** MCF-7 cancer cells treated with 1681 $\mu\text{g/ml}$ barberry fruit extract; **Control:** MCF-7 cancer cells without the effect of barberry fruit extract after 24 hours.

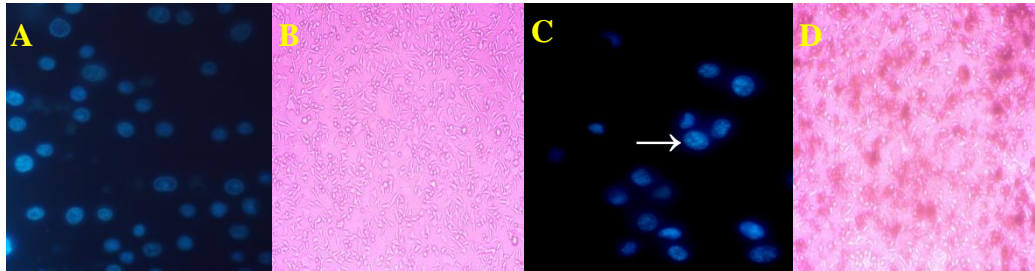


شکل ۵- نمودار درصد آپوپتوزیس در آزمایش فلوسایتومتری در گروه های کنترل و تیمار شده با عصاره میوه زرشک

Figure 5. Percentage of apoptosis in flow cytometry test in control and treated groups with barberry fruit extract

تغییرات موفولوژیکی سلول های MCF-7 تحت تاثیر عصاره میوه زرشک (IC_{50}) در مدت ۲۴ ساعت با استفاده از میکروسکوپ فلورسانس مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۵). شکل ۵A تصویر میکروسکوپ فلورسانس سلول های گروه کنترل (غیر تیمار) و شکل ۵B میکروسکوپ نوری گروه کنترل (غیر تیمار) را نشان می دهد.

همانطور که در گروه کنترل مشاهده می گردد، هسته های نرمال با فلورسانس آبی روشن کمتر رنگ آمیزی شدند (شکل ۵A). پس از تیمار با عصاره میوه زرشک، هسته های سلولی آپوپتوز متراکم و تکه تکه شدند (شکل ۵C). در شکل ۵D (میکروسکوپ نوری) سلول های متراکم (Condensed cells) نیز کاملا مشهود است. از سوی دیگر سلول های تیمار شده MCF-7 از کف فلاسک حاوی عصاره میوه زرشک جدا شده و بصورت شناور مشاهده گردیدند.

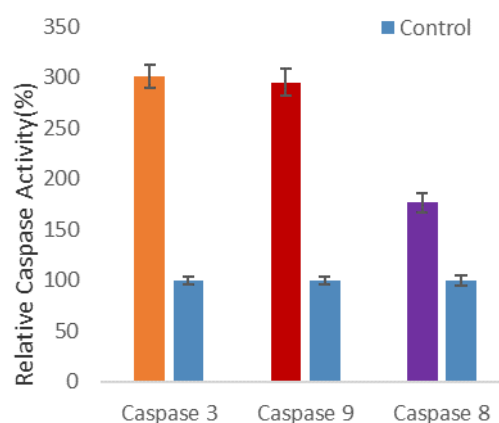


شکل ۵- تصاویر نمونه از میکروسکوپ فلورسانس (A, C) و میکروسکوپ نوری (B, D) از سلول های سرطانی MCF-7 تیمار شده با ۱۶۸۱ میکروگرم در میلی لیتر عصاره میوه زرشک پس از ۲۴ ساعت. پیکان سفید نشان دهنده سلول آپوپتوزی که دارای هسته های سلولی آپوپتوز متراکم و تکه تکه شده است. A, B: سلول های تیمار نشده. C, D: سلول های تیمار شده. بزرگنمایی ۴۰X.

Figure 5. Representative images from fluorescent microscope (A and C) and light microscope (B and D) of MCF-7 cancer cells treated with 1681 µg/ml barberry fruit extract after 24 hours. The white arrow head indicates an apoptotic cell that has dense and fragmented apoptotic cell nuclei.

A, B: untreated cells. C, D: treated cells. Magnification 40.X

در این پژوهش فعالیت کاسپازهای ۳ و ۸ و ۹ در سلول های MCF-7 تیمار شده با ۱۶۸۱ میکروگرم در میلی لیتر عصاره میوه زرشک پس از ۲۴ ساعت افزایش یافت ($P < 0.001$) (شکل ۶).



شکل ۶- تحریک فعالیت کاسپازهای ۳ و ۸ و ۹ توسط ۱۶۸۱ میکروگرم در میلی لیتر عصاره میوه زرشک پس از ۲۴ ساعت در سلول های MCF-7

Figure 6. Stimulation of the activity of caspases 3, 8 and 9 by 1681 µg/ml barberry fruit extract after 24 hours in MCF-7 cells

در این پژوهش فعالیت سیتوتوکسیک عصاره میوه بربریس ولگاریس بر روی سلول های سرطانی رده MCF-7 بررسی گردید. مهمترین نتیجه این مطالعه آن است که عصاره میوه زرشک در غلظت های معین موجب کاهش رشد سلولی و افزایش القای آپوپتوزیس در سلول های سرطانی MCF-7 در مدت ۲۴ ساعت می شود. عصاره میوه زرشک توانایی ضد سرطانی در درمان سرطان سینه دارد.

درمان سرطان سینه چند وجهی و پیچیده است (Kutlu et al., 2018). اکثر زنان مبتلا به سرطان پستان در مراحل اولیه، کاندید عمل جراحی حفظ پستان با رادیوتراپی یا ماستکتومی هستند. خطر عود موضعی و شانس بقا با این رویکردها همیشه وجود دارد. بیوپسی گره نگهبان (Sentinel node) برای مرحله بندی استفاده می شود.

درمان برنامه ریزی شده کمکی یا ادجوانت در اکثر زنان برای بقای بیشتر استفاده می شود. پروفایل مولکولی برای فردی کردن درمان بدلیل اثرات جانبی روش های جاری اکنون یک واقعیت بالینی برای بیماران مبتلا به سرطان های گیرنده هورمونی مثبت است. نظارت بعدی شامل شرح حال، معاینه فیزیکی و ماموگرافی سالانه است (Moo et al., 2018). ترکیب دوگانه تراستوزوماب و پرتوزوماب در شیمی درمانی، درمان خط اول توصیه شده برای سرطان سینه متاستاتیک (mBC) با گیرنده فاکتور رشد اپیدرمی ۲ (HER2) مثبت است (Celik et al., 2022). با این حال، بسیاری از بیماران به دلیل مقاومت در برابر شیمی درمانی، وخامت بیماری را تجربه می کنند یا تسلیم بیماری می شوند.

هدف قرار دادن سلول های سرطانی در عین پرهیز از اثر گزاری مخرب بر روی سلول های غیر سرطانی کلید طلایی درمان سرطان است (Nounou et al., 2015). داروهای مکمل و جایگزین (Complementary and alternative medicines) منابع مختلفی را نشان می دهند که مکمل یا جایگزین درمان های مرسوم هستند. استراتژی سازمان جهانی بهداشت (WHO) 2014-2023، با هدف تقویت نقش طب سنتی، با تاکید بر اهمیت ترویج و گنجاندن استفاده از گیاهان دارویی در سیستم های بهداشتی کشورهای عضو آن است (Sánchez et al., 2020).

Berberis vulgaris به طور سنتی در ایران (به ویژه در بیرجند و قاین) کشت می شود که به «زرشک» معروف است. همچنین در جنوب اروپا و شمال شرق ایالات متحده رشد می کند. این گیاه به طور گسترده در طب سنتی برای درمان اختلالات قلبی عروقی و متابولیسم استفاده می شود. خواص دارویی برای تمام قسمت های گیاه زرشک گزارش شده است، از جمله اثرات ضد میکروبی، آنتی اکسیدانی، ضد التهابی و آنتی کولینرژیک (Kapitonova et al., 2022).

نتایج پژوهش ما نشان داد که اثر عصاره میوه زرشک بر روی سلول های MCF-7 وابسته به دوز بوده و بیشترین تاثیر عصاره در غلظت ۲۰۰۰ میکروگرم در میلی لیتر در مدت ۲۴ ساعت رخ داده است (۱۶۸۱ میکروگرم در میلی لیتر = IC₅₀). این مهم با نتایج بررسی های El khalki و همکارانش در سال ۲۰۱۸ مطابقت دارد (Gogal et al., 2018). آنها گزارش نمودند که سمیت سلولی برجسته عصاره ریشه گیاه زرشک در شرایط آزمایشگاهی در برابر رده سلولی MCF-7 وابسته به دوز است. از سوی دیگر آنها گزارش نمودند که عصاره ریشه گیاه زرشک بدون اثر سمیت بر سلول های طبیعی بوده و اینکه این اثر سیتوتوکسیک بر روی سلول های MCF-7 ممکن است به دلیل ترکیب اصلی آن بربرین باشد. به همین دلیل مهم، ما در پژوهش مان فقط کنترل منفی بکار بردیم. تغییرات بیان ژن های *P53* و *MDM4* پس از تیمار با IC₅₀ عصاره میوه زرشک به مدت ۲۴ ساعت برای سلول های MCF-7 تیمار شده و گروه کنترل انجام گردید.

نتایج ما نشان داد میزان بیان ژن های P53 و MDM4 در مقایسه با گروه کنترل (غیر تیمار) افزایش معنی داری داشت ($P < 0.001$). افزایش بیان ژن P53 در مطالعه ما، با نتایج Suk Choi در سال ۲۰۰۸ که نشان دادند بربرین موجود در زرشک باعث افزایش معنی دار ژن P53 می شود مطابقت دارد (Myoung *et al.*, 2008). در این نتایج به طور خاص، گزارش شده است که P53 بعنوان یک سرکوب کننده تومور، نقش کلیدی در عملکرد ضد تومور بربرین دارد (Nounou *et al.*, 2015). یک مطالعه اخیر نشان داده است که بربرین ممکن است بیان P53 را با سرکوب مهارکننده داخلی MDM2 در سطح پس از رونویسی تنظیم کند. با این حال، هیچ مطالعه ای وجود ندارد که گزارش دهد چگونه بربرین فعالیت رونویسی P53 را برای فعال کردن اهداف پایین دست خود تنظیم می کند (Wang *et al.*, 2014).

MDM4 که در انسان MDMX یا HDMX نیز نامیده می شود، تنظیم کننده منفی مهم ژن سرکوب کننده تومور P53 است (Mandke *et al.*, 2012). MDM4 در حدود ۱۷ درصد از همه سرطان ها و بیشتر در سرطان روده بزرگ یا رتینوبلاستوما بیان می شود. این مسیله شناخته شده است که MDM4 پس از ترجمه توسط یوبی کوئیتیناسیون با واسطه MDM2 تنظیم می شود تا سطح پروتئین آن را در پاسخ به استرس ژنوتوکسیک کاهش دهد و منجر به تجمع و فعال شدن P53 شود. در سطح رونویسی، تنظیم ژن MDM4 به وضوح کمتر شناخته شده است (Mandke *et al.*, 2012).

ژن MDM4 به یک هدف خاص در درمان سرطان تبدیل شده است. MDM4 به عنوان یک تنظیم کننده منفی مهم ژن سرکوب کننده تومور P53 عمل می کند. از طریق دامنه RING در انتهای C، MDM4 به P53 متصل می شود و توانایی آن را در تنظیم رونویسی بیان ژن مهار می کند. ولی خیلی جالب آن است که اخیرا نشان داده شده است که MDM4 با عمل به عنوان داربست در میتوکندری برای گرد هم آوردن P53 و BCL2 و تقویت آپوپتوز، نقش بیشتری در آپوپتوز ایفا می کند (Mandke *et al.*, 2012). و این دلیلی منطقی در جهت توجیه افزایش بیان ژن MDM4 در پژوهش ما است. لذا با این تفاسیر و دلایلی که بیان گردید عصاره میوه زرشک بسیار عالی در مطالعه آزمایشگاهی ما عمل نموده است.

در این پژوهش فعالیت کاسپازهای ۳ و ۸ و ۹ در سلول های MCF-7 تیمار شده با ۱۶۸۱ میکروگرم در میلی لیتر عصاره میوه زرشک پس از ۲۴ ساعت افزایش یافت ($P < 0.001$). این مهم با نتایج Yung-Tsuan و همکارانش مطابقت دارد (Myoung *et al.*, 2009). آنها نشان دادند که بربرین بیان ژن و پروتئین کاسپازهای ۳ و ۸ و ۹ و عامل القا کننده آپوپتوز را در سلول های سرطانی سنگفرشی زبان انسان SCC-4 تحریک می کند.

نتیجه گیری کلی

عصاره میوه زرشک در غلظت های معین بخوبی موجب کاهش رشد سلولی و افزایش القای آپوپتوزیس در سلول های سرطانی MCF-7 گردید. عصاره میوه زرشک توانایی ضد سرطانی در درمان سرطان سینه دارد. بنابراین پیشنهاد می گردد در فاز پریکلینیکال و کلینیکال نتایج مهم ما مورد ارزیابی جدی قرار گیرد.

سپاسگزاری

از دانشگاه زابل و آزمایشگاه زیست فناوری جاوید وابسته به انستیتو پاستور ایران و همینطور آقای دکتر عسکری تشکر

می گردد.

تعارض منافع

هیچگونه تعارض منافع بین نویسندگان وجود ندارد.

منابع

- Akram, M., Iqbal, M., Daniyal, M., Khan, A.U., (2017). Awareness and current knowledge of breast cancer. *Biol Res.*, 50(1), 33.
- Ashta, A., Motalleb, G., Ahmadi-Zeidabadi, M., (2020). Evaluation of frequency magnetic field, static field, and Temozolomide on viability, free radical production and gene expression (p53) in the human glioblastoma cell line (A172). *Electro. Magn. Biol. Med.*, 39(4), 298-309.
- Celik, A., Berg, T., Nielsen, L.B., Jensen, M.B., Ejlersen, B., Knoop, A., Andersson, M., (2022). First-Line Treatment of HER2-Positive Metastatic Breast Cancer with Dual Blockade Including Biosimilar Trastuzumab (SB3): Population-Based Real-World Data From the DBCG. *Breast Cancer (Auckl)*, 24, 16:11782234221086992. doi:10.1177/11782234221086992.
- Colditz, G.A., Rosner, B.A., Chen, W.Y., Holmes, M.D., Hankinson, S.E., (2004). Risk factors for breast cancer according to estrogen and progesterone receptor status. *J. Natl. Cancer Inst.* 96, 218-228.
- Elmore S., (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol. Pathol.* 35(4), 495-516. <https://doi.org/10.1080/01926230701320337>.
- Motalleb, G., Hanachi, P., Kua, S.H., Fauziah, O., Asmah, R., (2005). Evaluation of Phenolic Content and Total Antioxidant Activity in *Berberis vulgaris* Fruit Extract. *J. Biol. Sci.* 5, 648-653. <https://doi:10.3923/jbs.2005.648.653>.
- Global Cancer Observatory. World Health Organization. International Agency for Research on Cancer 2022.
- Gogal, R., El khalki, L., Tilaoui, M., Jaafari, A., Ait Mouse, H., Ziyad, A., (2018). Studies on the Dual Cytotoxicity and Antioxidant Properties of *Berberis vulgaris* Extracts and Its Main Constituent Berberine. *Adv. Pharmacol. Pharm. Sci.* <https://doi.org/10.1155/2018/3018498>.
- Heidarzadeh, S., Motalleb, G.H., Zorriehzadra, M.J., (2019). Evaluation of Tumor Regulatory Genes and Apoptotic Pathways in The Cytotoxic Effect of Cytochalasin H on Malignant Human Glioma Cell Line (U87MG). *Cell J.*, 21(1), 62-69. <https://doi: 10.22074/cellj.2019.5948>.
- Yung-Tsuan, H., Chi-Cheng, L., Jai-Sing, Y., Jo-Hua, C., Tsai-chung, L., Wang, S., TE-Chun, H., Ching-lung, L., Jaung-Geng, L., Gibson, W., Jing-Gung, C., (2009). Berberine Induced Apoptosis via Promoting the Expression of Caspase-8, -9 and -3, Apoptosis-inducing Factor and Endonuclease G in SCC-4 Human Tongue Squamous Carcinoma. *Cancer Cells. Anticancer Res.*, 29(10), 4063-4070.
- Kutlu, H.M., Çömlekçi, E., Izzördü, H., Vejselova, SC., Kuş, G., (2018). Evaluation the cytotoxic effect of carmofur on MCF-7 human breast cancer cell line. *E.S.M.O.*, 3(2), A48.
- Kapitonova, M., Gupalo, S., Alyautdin, R., Ibrahim, IAA., Salim, N., Ahmad, A., Talip, SB., New, TM., Morokhina, S. (2022). Gastroprotective effect of *Berberis vulgaris* on ethanol-induced gastric mucosal injury: Histopathological evaluations. *Avicenna. J. Phytomed.*, 12(1), 30-41. doi: 10.22038/AJP.2021.18113.
- Marine, JC., Jochemsen, AG., (2016). MDMX (MDM4), a Promising Target for p53 Reactivation Therapy and Beyond. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, 1,6(7). a026237. <https://doi.10.1101/cshperspect.a026237>.
- Mutebi, M., Anderson, BO., Duggan, C., Adebamowo, C., Agarwal, G., Ali, Z., Bird, P., Bourque, JM., DeBoer, R., Gebrim, LH., Masetti, R., Masood, S., Menon, M., Nakigudde, G., Ng'ang'a, A., Niyonzima, N., Rositch, AF., Unger-Saldaña, K., Villarreal-Garza, C., Dvaladze, A., El Saghir, NS., Gralow, JR., Eniu, A., (2020). Breast cancer treatment: A phased approach to implementation. *Cancer*, 126, 2365-2378.
- Motalleb, G., Hanachi, P., Fauziah, O., Asmah, R., (2008). Effect of *Berberis vulgaris* fruit extract on alpha-fetoprotein gene expression and chemical carcinogen metabolizing enzymes activities in hepatocarcinogenesis rats. *Int. J. Cancer Manag.*, 1(1), e80395.

- Motalleb, G., (2006). Effects of Berberis Vulgaris (L.) Fruit Extract on Antioxidantenzyme Activities, A-Fetoprotein Content and Histology of Hepatocarcinogenic Rats. Master's thesis, University Putra Malaysia.
- Moo, TA., Sanford, R., Dang, C., Morrow, M., (2018). Overview of Breast Cancer Therapy. *PET. Clin.*, 13(3), 339-354. doi: 10.1016/j.cpet.2018.02.006.
- Myoung, SC., Dong, YY., Ju, Ho., Hai, YJ., Sang, BH., Dong, CM., Jin, TH., (2008). Berberine Inhibits Human Neuroblastoma Cell Growth through Induction of p53-dependent Apoptosis. *Anticancer Res.*, 28, (6A) 3777-3784.
- Mandke, P., Wyatt, N., Fraser, J., Bates, B., Berberich, SJ., Markey, MP., (2012). MicroRNA-34a modulates MDM4 expression via a target site in the open reading frame. *PLoS One*, 7(8), e42034. doi: 10.1371/journal.pone.0042034.
- Nounou, MI., ElAmrawy, F., Ahmed, N., Abdelraouf, K., Goda, S., Syed-Sha-Qhattal, H., (2015). Breast Cancer: Conventional Diagnosis and Treatment Modalities and Recent Patents and Technologies. *Breast Cancer (Auckl)*, 27,9(Suppl 2):17-34. doi: 10.4137/BCBCR.S29420.
- Sánchez, M., González-Burgos, E., Iglesias, I. et al., (2020). Current uses and knowledge of medicinal plants in the Autonomous Community of Madrid (Spain): a descriptive cross-sectional study. *BMC Complement Med. Ther.* 20, 306. <https://doi.org/10.1186/s12906-020-03089-x>.
- Scabia, V., Ayyanan, A., De Martino, F., et al., (2022). Estrogen receptor positive breast cancers have patient specific hormone sensitivities and rely on progesterone receptor. *Nat. Commun.*, 13:3127.
- Wang, N., Zhu, M., Wang, X., Tan, HY., Tsao, SW., Feng, Y., (2014). Berberine-induced tumor suppressor p53 up-regulation gets involved in the regulatory network of MIR-23a in hepatocellular carcinoma. *BBA*, 1839(9), 849-857. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2014.05.027>.
- Yabroff, K. R., Wu, X. C., Negoita, S., Stevens, J., Coyle, L., Zhao, J., Mumphrey, B. J., Jemal, A., & Ward, K. C. (2022). Association of the COVID-19 Pandemic with Patterns of Statewide Cancer Services. *Journal of the National Cancer Institute*, 114(6), 907–909. <https://doi.org/10.1093/jnci/djab122>
- Zhang, L., Cheng, H., Yue, Y., et al., (2018). H19 knockdown suppresses proliferation and induces apoptosis by regulating miR-148b/WNT/ β -catenin in ox-LDL -stimulated vascular smooth muscle cells. *J. Biomed. Sci.*, 25, 11. <https://doi.org/10.1186/s12929-018-0418-4>.

Berberis vulgaris Fruit Hydroalcoholic Extract Cytotoxic Effect on Human Breast Cancer Cell Line (MCF-7)

Z. Mirbahaaldin,¹ G. Motaleb^{2*}

Received:2022.1.11

Accepted:2022.3.12

Abstract

Introduction: Breast cancer has the highest rate of cancer in women. It is expected that the incidence of breast cancer will increase significantly in Iran in the next decade. In this research, for the first time, the cytotoxic activity of *Berberis vulgaris* fruit extract was investigated on MCF-7 cancer cells.

Materials and Methods: In this laboratory study, MCF-7 cancer cells were incubated in different concentrations of barberry fruit extract (31.25, 62.5, 125, 250, 500, 1000, and 2000 micrograms/ml) for 24 hours, and cytotoxicity was measured by the MTT method. Apoptosis by flow cytometry method using Annexin V/FITC/PI kit, fluorescence microscopy using Hoechst dye, expression of *TP53* and *MDM4* genes by real-time PCR method, the activity of caspases 3, 8, and 9 by Abcom kit was investigated. The interpretation of the results was made with one-way analysis of variance. $P < 0.05$ was reported as significant.

Results: The effect of barberry fruit extract on MCF-7 cells is dose-dependent, and the highest effect of the extract occurred at a concentration of 2000 $\mu\text{g/ml}$ ($\text{IC}_{50} = 1681 \mu\text{g/ml}$). The results showed a significant increase in the relative expression of *P53* and *MDM4* genes compared to the control group (non-treated). The percentage of apoptotic cells increased more than 81 times compared to the control group. The activity of caspases 3, 8, and 9 were increased in treated MCF-7 cells.

Conclusion: Barberry fruit extract in specific doses reduces cell growth and increases apoptosis induction in MCF-7 cancer cells. The barberry fruit extract has anti-cancer ability in breast cancer treatment.

Keywords: Apoptosis, *Berberis vulgaris*, Breast cancer, Cytotoxicity

1M.Sc. Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Campus of University, University of Zabol, Zabol, I.R. of Iran

2. Associate Professor, Division of Cell and Molecular Biology, Department of Biology, Faculty of Science, University of Zabol, Zabol, I.R. of Iran (*corresponding author: reza.motaleb@uoz.ac.ir; rezamotaleb@gmail.com)