

بررسی اثر ضد سرطانی عصاره هیدروالکلی بذر خارسنبل (*Blepharis persica*) بر رده سلول‌های سرطانی سینه و پروستات و اثر هم‌افزایی آن با داروی دوکسوروبیسین

کیان آقاعباسی^۱، حسن حسنی کومله^۲، ناهید عسکری^۳، مسعود ترک زاده ماهانی^۴
^۱Ph.D.، عبدالله رضانی قرا^۲ Ph.D.

- ۱- دانشجوی دکتری بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه گیلان، پردیس دانشگاهی، بخش بیوتکنولوژی کشاورزی، رشت، ایران
- ۲- دانشگاه گیلان، دانشکده علوم کشاورزی، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، رشت، ایران
- ۳- دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، گروه بیوتکنولوژی، کرمان، ایران
- ۴- دانشگاه چیرفت، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی گیاهی، کرمان، ایران

* پست الکترونیک نویسنده مسئول: kumleh@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۰/۱۸

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۵/۲

چکیده

هدف: در این تحقیق اثرات ضدسرطانی و آپوپتوزیسی عصاره هیدروالکلی بذر خارسنبل *Blepharis persica* بر روی سلول‌های سرطانی سینه و پروستات و اثر هم‌افزایی آن با دارو دوکسوروبیسین مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: عصاره هیدروالکلی بذر با روش خیساندن و با اتانول ۷۰٪ تهیه شد. ۸ غلظت عصاره و ۴ غلظت ترکیبی از دوکسوروبیسین (۱۲۵ و ۶۲/۵ نانوگرم بر میلی‌لیتر) با عصاره غلظت‌های (۰/۳۱۵ و ۰/۶۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) تهیه شد. سلول‌های سرطانی سینه (MCF-7)، پروستات (LNCaP) و سلول‌های فیبروبلاست (SKM) کشت داده شدند. درصد زنده‌مانی رده‌های سلولی با تست MTT اندازه‌گیری و میزان آپوپتوزیس در رده‌های سلولی از روش Annexin/PI سنجیده شد و بررسی بیان ژن *BCL2* در مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت با روش Real-Time quantitative RT-PCR (RT-qPCR) صورت گرفت.

نتایج: عصاره به‌ترتیب بر رده‌های سلولی پروستات، پستان و فیبروبلاست بیشترین اثر بازدارندگی رشد را نشان داد. اثر ترکیبی دوکسوروبیسین با عصاره در هر سه رده سلولی با کنترل هیچ‌گونه تفاوت معناداری نداشت. نتایج Annexin/PI نشان‌داد میزان آپوپتوزیس اولیه، تاخیری و نکروز در رده‌های سلولی تیمار شده نسبت به کنترل افزایش داشته است. بیان ژن *BCL2* در رده‌های سلولی با تیمار غلظت ۱/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره گیاه در مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت نسبت به ژن کنترل بتا‌کتین به‌طور معنی‌داری کاهش یافته بود ($p < 0.01$).

نتیجه‌گیری: عصاره هیدروالکلی بذر خارسنبل توانایی کاهش تکثیر سلول‌های سرطانی سینه و پروستات و القا آپوپتوزیس در سلول‌های سرطانی را دارد و هرچند که در غلظت کم موجب افزایش اثرات ضد سرطانی دوکسوروبیسین نمی‌شود، ولی می‌تواند جایگزینی برای آن با عوارض جانبی کمتر باشد.

واژگان کلیدی: آپوپتوزیس، خارسنبل، *BCL2*، *LNCaP*، *MCF-7*

مقدمه

سرطان به‌عنوان یکی از کشنده‌ترین عوامل مرگ و میر در دنیا، سالیانه بیش از ۷/۵ میلیون نفر را در به کام مرگ می‌کشد (۱). بر اساس پیش‌بینی سازمان بهداشت جهانی بروز سرطان در ایران تقریباً ۸۶۰۰۰ نفر در سال ۱۳۹۹ شمسی خواهد بود که میزان مرگ و میر ناشی از آن حدود ۶۳۰۰۰ مورد خواهد رسید (۲ و ۳). در کشورهای در حال توسعه سرطان پستان از جمله شایع‌ترین سرطان‌ها در بین زنان است (۴). این سرطان از عوامل اصلی به خطر انداختن سلامتی در میان زنان است و اولین عامل مرگ و میر بر اثر سرطان در بین زنان محسوب می‌شود (۵). بر اساس آمار وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی در سال ۱۳۹۲ بیش از ۴۰۰۰۰ نفر در ایران دچار این بیماری شده‌اند و بر این تعداد هر ساله افزوده می‌شود (۶). از سوی دیگر پروستات یکی از غدد مهم دستگاه تولید مثل در مردان است و بیماری‌های ناشی از آن دارای اهمیت فراوانی هستند (۷). سرطان پروستات شایع‌ترین سرطان بدخیم در میان مردان است، بیشترین مورد بروز سرطان در مردان (حدود ۲۸ درصد) و دومین عامل مرگ‌ومیر (حدود ۱۱ درصد) را به‌خود اختصاص داده است. فاکتورهای ژنی و عوامل محیطی از مهم‌ترین فاکتورهای هستند که در بروز سرطان سینه و پروستات نقش دارند، از طرف دیگر عواملی محیطی مانند رژیم غذایی، نحوه زندگی، شرایط جغرافیایی، عوامل استرس‌زا، سن و چاقی در بروز این بیماری دخیل هستند (۸-۱۱). متخصصین بالینی از روش‌های متعددی در تشخیص و درمان انواع سرطان‌ها استفاده می‌کنند که شیمی درمانی، پرتو درمانی، جراحی و هورمون درمانی عمده‌ترین آن‌ها

هستند ولی مهم‌ترین روش مبارزه با سرطان، شیمی‌درمانی است که عوارض جانبی زیادی از جمله خستگی، حالت تهوع و ریزش مو و غیره را برای بیمار ایجاد می‌کند، این عوارض می‌تواند بر روی کیفیت زندگی بیمار تاثیر زیادی داشته باشد (۱۲ و ۱۳). داروی دوکسوروبیسین با نام تجاری آدریامایسین یکی از قوی‌ترین و اصلی‌ترین داروهای شیمی‌درمانی گروه آنتراسیکلین است. این دارو در درمان بسیاری از سرطان‌ها نظیر معده، پستان، ریه، تخمدان، استخوان، بیماری هوچکین و سرطان خون مورد استفاده قرار می‌گیرد، این دارو همانند دیگر داروهای شیمی‌درمانی دارای عوارض جانبی بسیار زیادی است که می‌توان به تب، مسمومیت قلبی و غیره اشاره کرد (۱۴-۱۶). چندین مکانیسم برای اعمال خاصیت سمیت این دارو در نظر گرفته می‌شود که مهم‌ترین آن‌ها آسیب به DNA می‌باشد. دوکسوروبیسین با پایداری اتصال کمپلکس آنزیم توپوایزومراز II به DNA از اتصال مجدد رشته‌های شکسته شده جلوگیری می‌کند. آسیب به DNA به‌عنوان یک محرک سلولی باعث فعال شدن پروتئین‌های مسیر آپوپتوزیس می‌شود (۱۷). پروتئین‌های خانواده BCL₂، یک گروه از تنظیم‌کننده‌های داخل سلولی آپوپتوزیس یا مرگ برنامه‌ریزی شده سلول هستند. تعدادی از پروتئین‌ها خانواده BCL₂، پروآپوپتوتیک هستند یعنی آپوپتوزیس به‌وسیله افزایش بیان این پروتئین‌ها راه اندازی می‌شود و BAX جز این گروه است. تعداد دیگری از پروتئین‌های خانواده BCL₂ آنتی‌آپوپتوتیک هستند یعنی آپوپتوزیس به‌وسیله مهار آزادسازی این پروتئین‌ها باز داری می‌شود مانند BCL₂ که به‌طور گسترده در سطح غشا خارجی میتوکندری و ER غشا هسته واقع

(LNCaP) سنجیده شود و با رده سلولی نرمال فیبروبلاست (SKM) به‌عنوان گروه کنترل مقایسه شود و همچنین میزان القا آپوپتوزیس در رده‌های سلولی با کمک روش فلوسایتومتری سنجش شود. ترکیب دارو دوکسوروبیسین و عصاره نیز مورد سنجش قرار گرفت و در پایان بیان ژن Bcl₂ با کمک روش Real-Time quantitative RT-PCR برای هر یک از گروه‌های مورد مطالعه مورد سنجش قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

تهیه نمونه گیاهی: این تحقیق یک تحقیق بنیادی، کاربردی است. گیاه خارسنبل از مناطق جنوبی و گرمسیر استان کرمان در فصل بهار در سال ۱۳۹۶ از منطقه کهنوج با طول جغرافیایی ۵۷ و عرض جغرافیایی ۲۷ درجه و ارتفاع از سطح دریا ۵۰۸ متر جمع آوری شد و بعد از تأیید استاد گیاه شناسی، گیاه در سایه و دمای محیط خشک شد و سپس بذرهای گیاه جدا شدند و تا زمان عصاره‌گیری در دمایی اتاق نگه‌داری شدند.

تهیه عصاره گیاهی: برای تهیه عصاره هیدروالکلی از روش خیساندن (Macerate) و اتانول ۷۰ درصد استفاده شد (۲۵). ابتدا ۴۰ گرم از بذر به‌کمک دستگاه آسیاب کاملاً پودر شد. پودر حاصل در ۳۰۰ میلی‌لیتر الکل ۷۰ درصد حل شد و به‌مدت ۷۲ ساعت روی دستگاه شیکر با دور متوسط در دمایی اتاق قرار داده شد. در مرحله بعدی کار با کمک کاغذ صافی واتمن ۱ در مدت ۳۰ دقیقه عصاره‌های صاف شد و جداسازی الکل با کمک دستگاه روتاری در خلا در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد و مدت ۴۵ دقیقه صورت گرفت. در نهایت برای جداسازی کامل حلال از عصاره در داخل

شده‌اند و تمامیت غشا را حفظ می‌کنند (۲۰-۱۸). تحقیقات زیادی در مدت بیش از بیست سال بر روی مرگ برنامه‌ریزی شده سلول یا آپوپتوزیس صورت گرفته است و در نتیجه این تحقیقات ثابت شده است که مرگ برنامه‌ریزی شده سلول به‌عنوان یک مانع طبیعی رشد سرطان می‌باشد، ترکیبات طبیعی موجود در گیاهان با تاثیر بر روی مسیر آپوپتوزیس سلول‌های سرطانی می‌توانند به‌عنوان یک ترکیب ضد توموری شناخته شوند (۲۱).

جنس *Blepharis* دارای ۱۰۰ گونه گیاهی است که در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری رشد می‌کند. گیاه خارسنبل از جنس *Blepharis* با نام علمی *Blepharis persica* شناخته می‌شود (۲۲). گونه مشابه این گیاه، *B. edulis* است که در بیابان‌های خاورمیانه و آفریقا رشد می‌کند (۲۳). خارسنبل گیاهی است چندساله و کم ارتفاع، دارای برگ بیضی و میوه کپسولی است. ریشه آن مدر است و برگ‌های آن دارای خاصیت بند آوردن خون هستند. در حال حاضر تحقیقات زیادی بر روی این گیاه انجام نشده است و اطلاعات کمی از خواص و فواید دارویی این گیاه وجود دارد (۲۴). با توجه به آن که گیاهان دارای اثرات ضد توموری از جمله القای آپوپتوزیس و مرگ سلول‌های سرطانی هستند و عوارض جانبی از استفاده آن‌ها کمتر است و همچنین این گیاه در مناطق بومی جنبه دارویی دارد، در این تحقیق بر آن شدیم که در ابتدا اثرات ضدسرطانی عصاره بذر گیاه خارسنبل با کمک تست MTT (5,2-Dimethylthiazol-2-yl) diphenyltetrazolium bromide بر روی رده‌های سلول‌های سرطانی سینه (MCF-7) و پروستات

غلظت‌های کم عصاره (۰/۶۲۵ و ۰/۳۱۵ میلی گرم بر میلی لیتر) مورد سنجش قرار گرفت .

کشت سلولی: در این پژوهش، سه رده سلول‌های سرطانی سینه (MCF7)، پروستات (LNCaP) و فیبروبلاست (SKM) در داخل فلاسک ۲۵ سانتی‌متر مربع به صورت کشت شده از انستیتو پاستور ایران خریداری شدند. سلول‌های سرطانی در محیط کشت RPMI ۱۶۴۰ و سرم جنینی گاو FBS ۱۰ درصد به همراه ۱ درصد آنتی بیوتیک‌های استرپتومایسین و پنی‌سیلین کشت داده شدند و هر سه رده سلولی را در انکوباتور ۵ درصد CO₂ و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شدند. سلول‌های نرمال فیبروبلاست در محیط کشت DMEM حاوی ۱۰ درصد سرم FBS کشت داده شدند. سلول‌های سرطانی سینه و پروستات بعد از ده مرحله پاساژ منظم و سلول‌های فیبروبلاست بعد از ۵ مرحله پاساژ آماده تیمار با غلظت‌های مختلف عصاره، دارو و ترکیب غلظت کم‌دارو و عصاره شدند.

تست تترازولیوم MTT: رده‌های سلولی در فلاسک ۲۵ سانتی‌متر مربع به صورت مجزا کشت داده شدند و بعد از چند پاساژ به فلاسک ۷۵ سانتی‌متر مربع انتقال داده شدند و در انکوباتور ۵ درصد CO₂ و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شدند. بعد از شمارش سلولی به میزان ۱۰۰ میکرولیتر شامل تقریباً ۷۰۰۰ سلول از سوسپانسیون سلولی در پلیت‌های ۹۶ خانه ریخته شدند و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور حاوی CO₂ و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به منظور چسبیدن و رشد سلول‌ها به کف پلیت قرار داده شدند. سپس محیط کشت رویی سلول‌ها خارج شد و محیط حاوی غلظت‌های عصاره، دارو و ترکیب دارو با عصاره و

آون به مدت ۴۸ ساعت در دمایی ۴۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. عصاره حاصل تا فرایند آزمایشگاهی در فریزر ۲۰- سانتی‌گراد نگهداری شد .

تهیه غلظت‌های مختلف عصاره و دارو: در این تحقیق از ۸ غلظت عصاره هیدروالکلی بذر خارسنبل و ۴ غلظت دارویی دوکسوروبیسین استفاده شد. به منظور تهیه ۱۰ میلی‌لیتر استوک ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره هیدرو الکی، ابتدا میزان ۱۰۰ میلی‌گرم از عصاره نیاز است که این مقدار در ۴۰۰ میکرو لیتر Dimethyl sulfoxide (DMSO) (۴ درصد) حل شد، در ابتدا ۱ میلی‌لیتر محیط کشت فاقد سرم اضافه شد و بعد از آن مابقی محیط کشت اضافه تا کاملاً در عصاره حل شود. غلظت‌های دیگر به ترتیب ۷/۵، ۵، ۲/۵، ۱/۲۵، ۰/۶۲۵، ۰/۳۱۵ و ۰/۱۵۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از استوک اصلی با کمک فرمول $m_1C_1 = m_2C_2$ به دست آمد. در این تحقیق از دارو دوکسوروبیسین ۵۰ میلی‌گرم بر ۲۵ میلی‌لیتر به صورت محلول با نام تجاری Ebedoxo استفاده شد. ابتدا برای تهیه ۷ میلی‌لیتر از استوک نانوگرم بر میلی‌لیتر ۵۰۰ از این دارو ۱/۲۵ میکرولیتر از آن را در ۴۰۰ میکرولیتر DMSO و محیط کشت بدون سرم به صورت کم کم اضافه شد تا حجم محلول ۷ میلی‌لیتر شود و از استوک به دست آمده غلظت‌های ۲۵۰، ۱۲۵ و ۶۲/۵ نانوگرم بر میلی‌لیتر دارو تهیه شد. عصاره موجود و دارو را قبل از رقت سازی با فیلتر سررنگی ۰/۲۲ میکرومتر فیلتر شدند. در این تحقیق همچنین اثر ترکیبی دارو دوکسوروبیسین در غلظت‌های کم (۱۲۵ و ۶۲/۵ نانوگرم بر میلی‌لیتر با

سانتریفیوژ سلول‌ها، به رسوب حاصل بافر بایندینگ اضافه شد. سپس ۵ میکرولیتر از رنگ annexin V اضافه می‌شود و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد و سلول‌ها در مرحله بعدی با محلول بایندینگ شستشو داده شدند و در ۱۰ ماکرولیتر رنگ PI به سلول‌ها اضافه شد و در پایان کار آنالیز توسط دستگاه انجام شد.

بررسی بیان ژن BCL2 فرایند استخراج RNA کل از سلول‌های سرطانی پستان، پروستات و سلول‌های فیبروبلاست بدون تیمار و تحت تیمار عصاره هیدروالکلی ۱/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بذر خارسنبل به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت و همچنین تحت تیمار ترکیب عصاره ۱/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر با دارو ۶۲/۵ نانوگرم بر میلی‌لیتر انجام پذیرفت. ابتدا سلول‌های تحت تیمار و کنترل از کف فلاسک‌های ۲۵ سانتی‌متر مربع با کمک آنزیم تریپسین جدا شدند و برای مراحل استخراج آماده شدند. بعد استخراج RNA با RNA-X PLUS انجام شد. بعد از استخراج کمیت و کیفیت RNA موجود با دستگاه اسپکتوفتومتری و ژل الکتروفورز مورد سنجش قرار گرفت. cDNA با کمک کیت سنتز (Takara Biometra GmbH) PCR با دستگاه ساخت ژاپن (ساخت آلمان) ساخته شد و توالی پرایمر رفت و برگشت ژن BCL2 و ژن کنترل داخلی بتا‌اکتین با استفاده از نرم‌افزار Primer3 طراحی شده و به منظور اطمینان بیشتر از درصد GC، دمای Tm و نداشتن دایمر با همدیگر، پرایمرها با برنامه (Gene Runner نسخه ۳.۵۰ Hasting Software, Inc) بررسی شدند (جدول ۱).

همچنین محیط کشت فاقد سرم به‌عنوان کنترل به سلول‌ها اضافه شدند. بعد از ۲۴ ساعت به هر یک از چاهک‌ها به میزان ۱۰ میکرولیتر MTT (-) MELFORD ساخت انگلستان) اضافه شد و بعد از آن که ۴ ساعت در انکوباتور نگه‌داری شدند به هریک از چاهک‌ها ۱۵۰ میکرولیتر DMSO اضافه شد و بعد از ۳۰ دقیقه جذب سلول‌ها توسط دستگاه الیزا ریدر در طیف جذب ۴۹۰ و ۶۳۰ خوانده شد و بر حسب فرمول مربوطه میزان زنده‌مانی محاسبه شد.

۱۰۰× میانگین جذب سلول‌های تحت اثر ماده

توکسیک-۱ = درصد مهارکنندگی رشد

میانگین جذب کنترل منفی

درصد مهارکنندگی رشد -۱۰۰ = درصد بقا یا زنده‌مانی

بررسی مرگ برنامه‌ریزی شده سلول توسط دستگاه فلوسایتومتری: جهت سنجش میزان آپوپتوزیس در رده سلول‌های سینه، پروستات و سلول‌های فیبروبلاست عصاره هیدروالکلی با غلظت ۱/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر انتخاب شد و سلول‌های تیمار شده و بدون تیمار (کنترل) از روش Annexin/PI با کیت تشخیصی Kit I (BD Pharmingen™, USA) و با کمک دستگاه فلوسایتومتری (CYFlow شرکت partec G mbH ساخت آلمان) انجام گرفت. آزمایش به این صورت انجام شد که سلول‌های سرطانی و فیبروبلاست با عصاره هیدروالکلی ۱/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در مدت ۲۴ ساعت تیمار داده شدند و برای هر کدام از رده‌های سلولی یک کنترل در نظر گرفته شد. سلول‌ها با محلول نمک فسفات با خاصیت بافری (PBS) شستشو داده شدند. بعد از

جدول ۱: توالی و طول محصولات آغازگرهای مورد استفاده

Primer	Tm (C°)	Primer sequence	Product size (bp)
β - actin	64	F:GGACATCCGCAAAGACCTGTA R:ACATCTGCTGGAAGGTGGACA	189
BCL ₂	61	F:GTGGATGACTGAGTACCTGA R:AGCCAGGAGAAATCAAACAGA	119

۲ محاسبه شد. نتایج حاصل از $2^{-\Delta\Delta ct}$ برای سه تکرار به اکسل منتقل شد و با نرم افزار SPSS در سطح ۵ و یک درصد میزان معنی دار شدن بیان ژن هدف مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج

تست MTT

در این تحقیق تاثیر عصاره هیدروالکلی خارسنبل با ۸ غلظت مختلف، ۴ دوز دارو دوکسوروبیسین و ترکیب غلظت پایین عصاره با غلظت پایین دارو دوکسوروبیسین روی رده های سلول های سرطانی سینه، پروستات و سلول فیروبلاست مورد بررسی قرار گرفت. نتایج با کمک روش MTT در سه تکرار به این شکل بود در هر سه رده سلولی تاثیر عصاره بر روی زنده ماندن سلول ها در سطح ۱ درصد و ۵ درصد معنی دار بود. به طوری که عصاره هیدروالکلی بذر گیاه خارسنبل در غلظت های ۱۰ و ۷/۵ میلی گرم بر میلی لیتر به ترتیب بر روی رده های سلولی پروستات و سینه و فیروبلاست بیشترین تاثیر را داشت (شکل ۱)، غلظت ۱۰ و ۷/۵ میلی گرم بر میلی لیتر در پروستات ۸۵/۶۴ و ۸۳/۰۳ درصد سمیت سلولی، در سرطان سینه

پس از طراحی، پرایمرها برای سنتز به شرکت FAZA Biotech سفارش داده شدند. محلول CYBR Green مخصوص فرایند Real time-qPCR از شرکت یکتا تجهیز آزما تهیه شد و بیان ژن های مورد نظر بعد از تیمار با کمک دستگاه rotor-Gene RG-3000 (ساخت استرالیا و شرکت CORBETT Research) مورد سنجش قرار گرفت.

آنالیز آماری

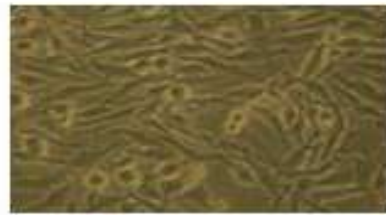
با توجه با آنکه برای هر تیمار و کنترل در تست MTT، ۳ تکرار وجود داشت. ابتدا داده ها وارد اکسل شدند و سپس توسط نرم افزار SPSS 20 در طرح کاملا تصادفی آنالیزها انجام گرفت و از آزمون ANOVA یک طرفه برای مقایسه گروه ها و آزمون دانکن برای آزمون تفاوت بین گروه ها استفاده شد. تست های مربوط به ژن BCL₂ و ژن داخلی بتا اکتین برای هر نمونه سه تکرار در دستگاه rotor-Gene RG-3000 گذاشته شد و نتایج حاصل از بیان ژن برای بررسی اختصاصیت محصول تکثیر شده، منحنی ذوب مورد بررسی قرار گرفت و داده های خام به صورت Ct از دستگاه استخراج شد و با کمک فرمول $\Delta\Delta ct$ نمونه های شاهد و تیمار به دست آورده و نسبت ژن هدف به ژن مرجع بتا اکتین را از طریق $2^{-\Delta\Delta ct}$

رشد ایجاد کرده بود.

و ۷۷/۲۰ در فیبروبلاست ۷۴/۶۸ و ۷۲/۶۲ بازدارندگی



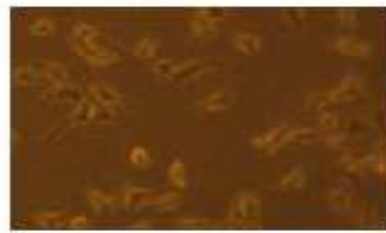
(a)



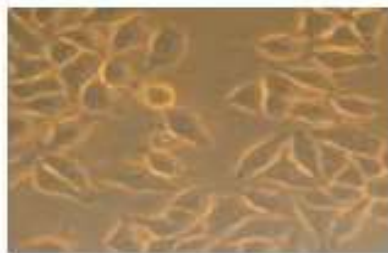
(b)



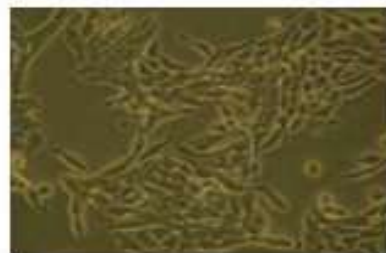
(c)



(d)



(e)

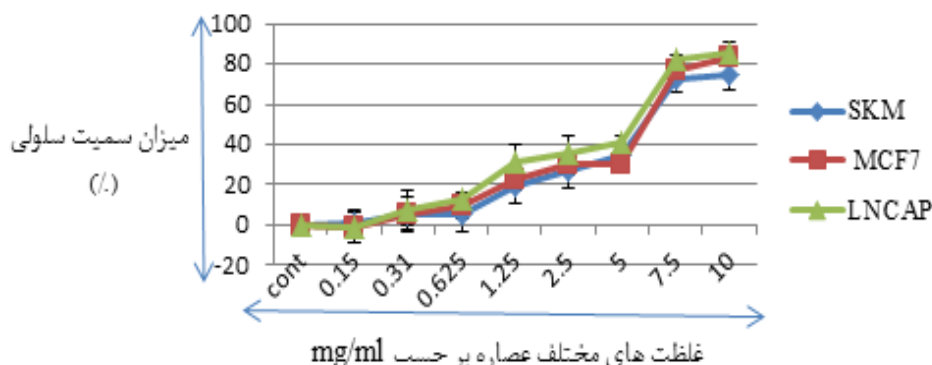


(f)

شکل ۱: (a) سلول کنترل یا بدون تیمار فیبروبلاست، (b) سلول تحت تیمار فیبروبلاست غلظت ۱/۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر، (c) سلول کنترل یا بدون تیمار پستان، (d) سلول پستان تحت تیمار با غلظت ۱/۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر، (e) سلول کنترل یا بدون تیمار پروستات، (f) سلول پروستات تحت تیمار با ۱/۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر در ۲۴ ساعت (بزرگنمایی ۱۰۰ X رده‌های سلولی)

۰/۳۱۵ و ۰/۶۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر بر روی پستان، فیبروبلاست و پروستات با آن که افزایش میزان سمیت سلولی مشاهده می‌شد ولی تفاوت معنی‌داری در سطح ۵ درصد میزان سمیت سلولی تیمارها با کنترل دیده نشد (شکل ۲).

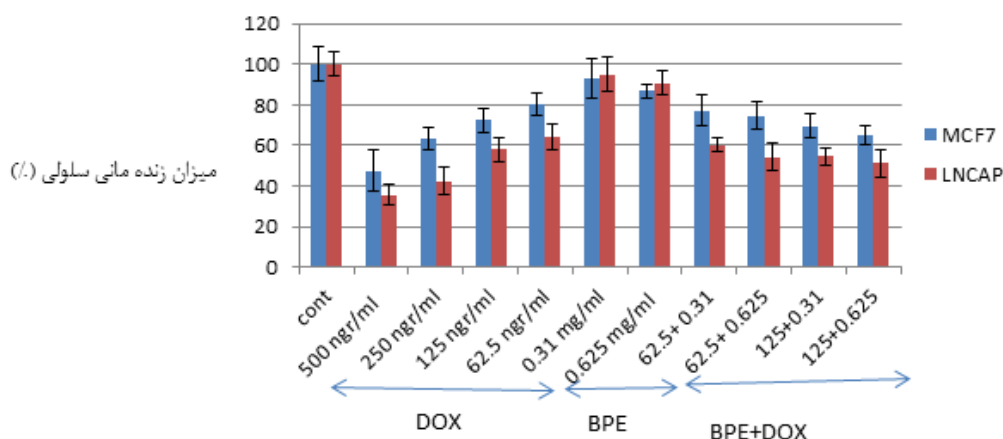
میزان سمیت سلولی در غلظت‌های بالا (۱۰، ۷/۵، ۵، ۲/۵ و ۱/۲۵) تفاوت معنی‌داری در سطح ۱ درصد بر روی رده‌های سلول‌های سرطانی و فیبروبلاست نسبت به کنترل آن‌ها وجود داشت. غلظت ۰/۱۵ میلی گرم بر میلی لیتر هیچ‌گونه سمیت سلولی نداشت ولی غلظت



شکل ۲: میزان سمیت سلولی غلظت‌های مختلف (mg/ml) عصاره هیدروالکلی بذر خارسنبل بر روی رده‌های سلولی سرطان پروستات (رنگ سبز)، فیبروبلاست (رنگ آبی) و سینه (قرمز) و تفاوت معنی‌دار در سطح ۱ درصد در اثر افزایش غلظت عصاره

بر میلی لیتر دارو در سرطان سینه اثرات سمیت قابل توجهی داشتند، به طوری که بیش از ۵۰ درصد سلول‌ها را کشته بودند ولی اثر ترکیبی غلظت ۱۲۵ و ۶۲/۵ نانوگرم بر میلی لیتر دارو دوکسوروبیسین با دو غلظت ۰/۳۱۵ و ۰/۶۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر عصاره بذر گیاه در هر سه رده سلولی با کنترل آن‌ها هیچ گونه تفاوت معنی داری را نشان نداد (شکل ۳).

نتایج نشان می‌دهد که با افزایش غلظت عصاره هیدروالکلی درصد زنده‌مانی هر سه رده سلولی کاهش یافته است. نتایج تست MTT در ۴ غلظت دارویی دوکسوروبیسین بر روی دو رده سلول‌های سرطانی سینه و پروستات دارای اثرات سمیت سلولی بوده و بقای سلولی را کاهش می‌دهد، دوزهای ۵۰۰ و ۲۵۰ نانوگرم بر میلی لیتر دارو در سرطان پروستات و دوز ۵۰۰ نانوگرم

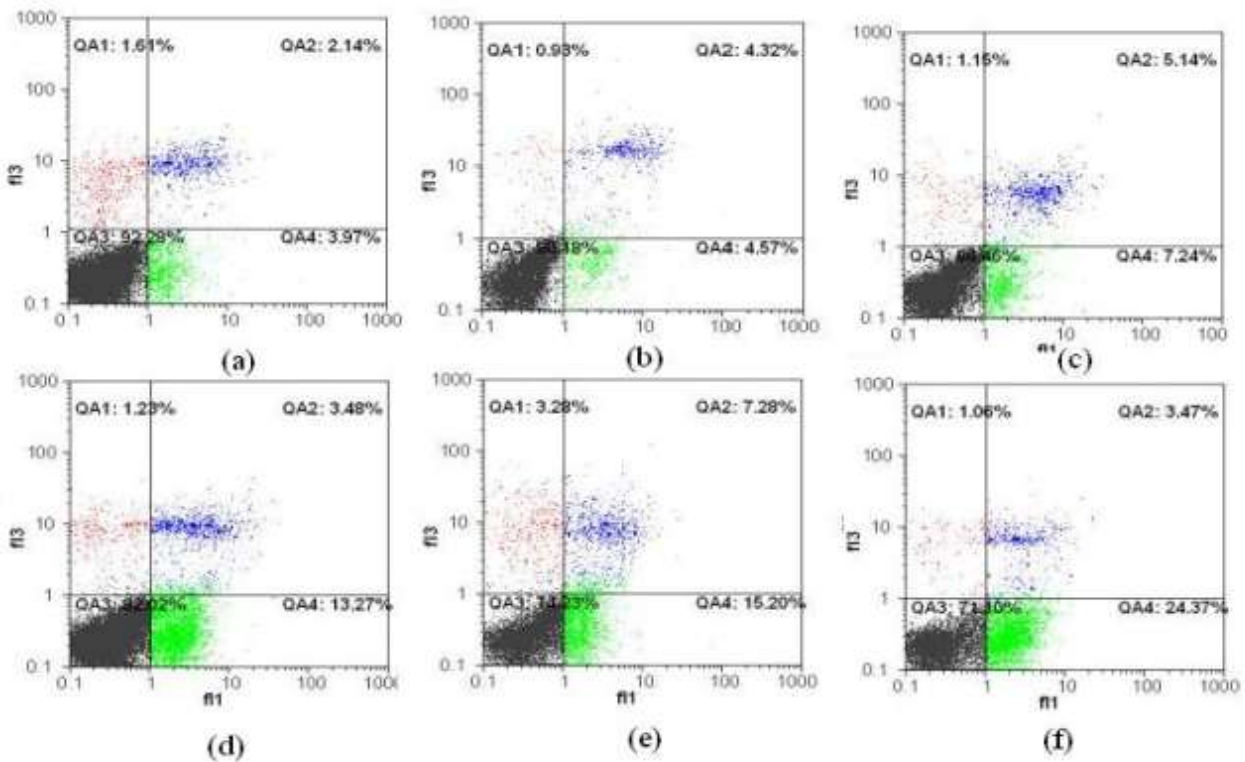


شکل ۳: DOX : تاثیر دوزهای مختلف داروی دوکسوروبیسین ، BPE : تاثیر غلظت کم اثر عصاره خارسنبل بر روی سرطان پستان و پروستات. BPE+DOX: اثر ترکیبی غلظت کم عصاره خارسنبل و دوز پایین دارو بر روی دو رده سلول‌های سرطانی

تست فلوسایتومتری

نتایج حاصل از دستگاه فلوسایتومتری در رده سلول‌های پستان، پروستات و فیروبلاست تیمار شده با عصاره هیدروالکلی با غلظت ۱/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و کنترل (بدون تیمار) بعد از ۲۴ روز مورد سنجش قرار گرفتند. سلول‌های کنترل

پروستات، سینه و فیروبلاست، به ترتیب میزان زنده‌مانی سلول‌ها ۸۴/۴۶، ۹۰/۱۸، ۹۲/۲۸ و مقدار آپوپتوزیس اولیه ۷/۲۴، ۴/۵۷، ۳/۹۷ و درصد آپوپتوزیس تاخیری ۵/۱۴، ۴/۳۲، ۲/۱۴ و درصد نکروزیس در سلول‌های کنترل ۱/۱۵، ۰/۹۳ و ۱/۶۱ نشان داده شد (شکل ۴).



شکل ۴: نتایج حاصل از دستگاه فلوسایتومتری: Q₁= درصد میزان نکروز، Q₂= درصد آپوپتوزیس تاخیری، Q₃= درصد میزان سلول‌های زنده، Q₄= درصد سلول‌های که وارد آپوپتوزیس اولیه شدند. سلول‌های کنترل یا بدون تیمار (a) فیروبلاست، (b) پستان و (c) پروستات، سلول‌های تحت تیمار با غلظت ۱/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در (d) فیروبلاست، (e) پستان و (f) پروستات

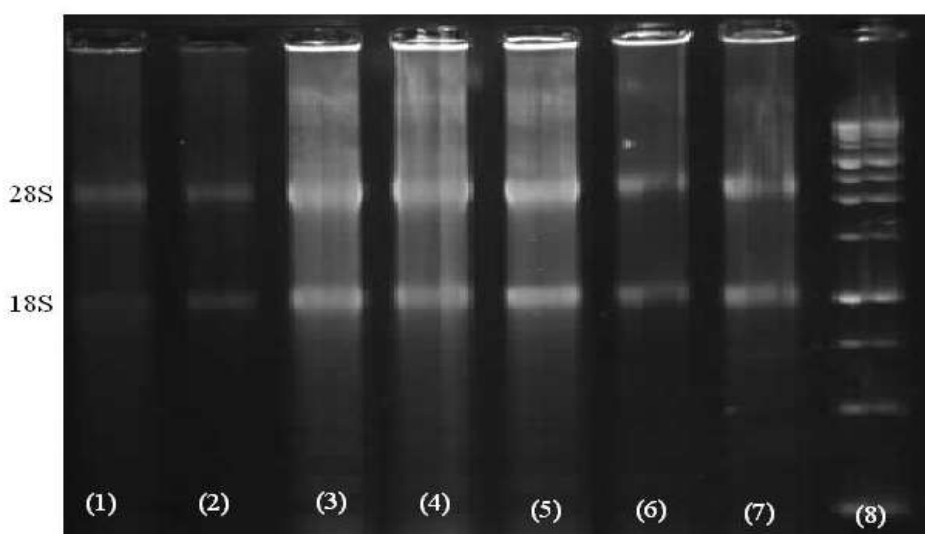
باتوجه به آنکه سلول‌ها تحت تیمار قرار نگرفته بودند میزان آپوپتوزیس و نکروزیس دیده شده در رده‌های سلولی قابل قبول بودند. درصد زنده‌مانی سلول‌های تحت تیمار با غلظت ۱/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره هیدروالکلی خارسنبل در رده‌های سلولی پروستات، پستان، فیروبلاست به ترتیب ۷۱/۱۰، ۷۴/۲۳، ۸۲/۰۲ و میزان آپوپتوزیس اولیه ۲۴/۳۷،

۱۵/۲۰، ۱۳/۲۷، درصد آپوپتوزیس ثانویه به ترتیب ۳/۴۷، ۷/۲۸ و ۳/۴۸ و همچنین درصد نکروز در سلول‌های تحت تیمار به ترتیب ۱/۰۶، ۳/۲۸ و ۱/۲۳ مشخص شد. نتایج نشان داد میزان درصد آپوپتوزیس اولیه، آپوپتوزیس تاخیری، مجموع کل آپوپتوزیس و نکروزیس دیده شده در رده‌های

دارو در مدت ۲۴ ساعت و همچنین استخراج از سلول‌های بدون تیمار یا کنترل انجام گرفت. کیفیت RNAهای نمونه‌ها روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد بررسی شد. دو باند مربوط به ۱۸ S و ۲۸ S به وضوح قابل تشخیص بودند که نشان دهنده کیفیت بالای RNA استخراجی بود (شکل ۵).

سلولی تیمار شده نسبت به رده‌های سلولی بدون تیمار افزایش داشته است.

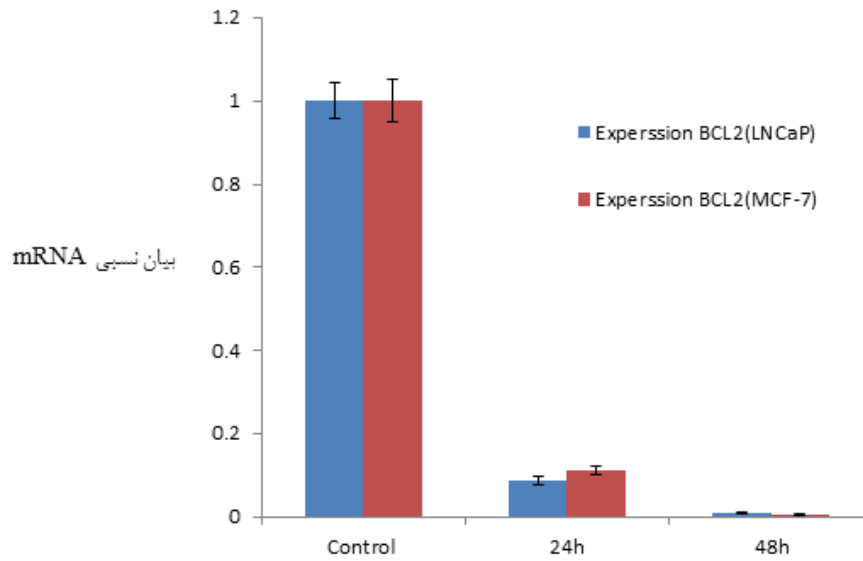
نتایج بیان ژن BCL_2 : استخراج RNA کل از سه رده سلول‌های SKM، LNCaP و MCF-7 تحت تیمار در مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت و ترکیبی عصاره هیدروالکلی ۱/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر با



شکل ۵: RNA کل استخراج شده رده‌های سلولی در مدت ۲۴ ساعت، شماره ۱: تحت تیمار پروستات، ۲: تحت تیمار پستان ۳: مربوط به ترکیبی دارو و عصاره، ۴: کنترل پروستات، ۵: کنترل فیبروبلاست، ۶: کنترل پستان ۷: تحت تیمار فیبروبلاست و ۸: نردبان ملکولی یا Ladder 1kbp روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد

ژن BCL_2 در تمامی رده‌های سلولی کاهش یافته بود و این کاهش بیان در مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت نسبت به ژن کنترل در سطح ۱ درصد معنی‌دار بود. بیشترین کاهش بیان به ترتیب در سلول‌های سرطانی پروستات، سینه نشان داده شد (شکل ۶).

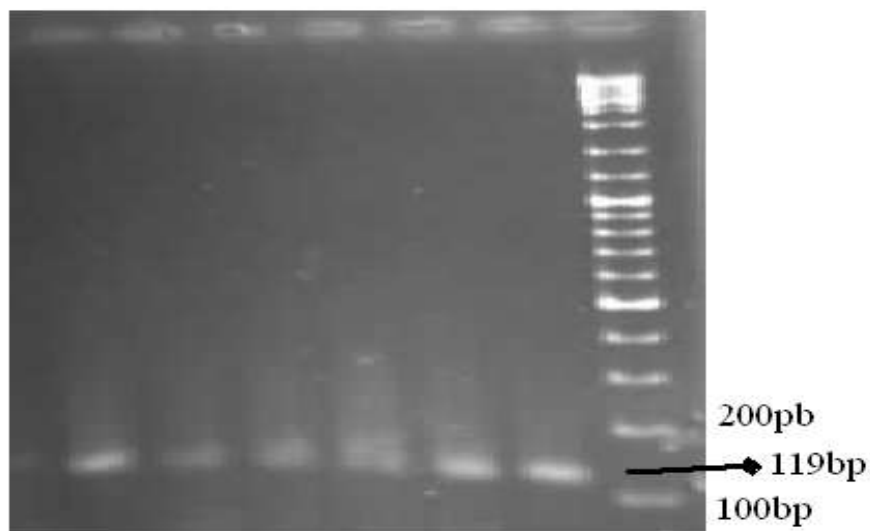
بررسی تغییر بیان ژن آپوپتوزیسی BCL_2 نسبت به ژن کنترل بتا اکتین در رده‌های سلولی MCF7 و LNCaP در غلظت ۱/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره و ترکیب این غلظت با غلظت کم‌دارو با روش Realtime -qPCR در مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت بدین شکل بود که در مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت بیان



شکل ۶: مقایسه بیان ژن *BCL2* نسبت به ژن کنترل داخلی بتاآکتین در مدت زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت در رده سلول‌های سرطانی LNCap و MCF-7

ژن *BCL2* بین این دو تیمار مشاهده نشد. به‌منظور اطمینان از تک باند بودن پرایمرهای موجود، محصولات حاصل از Realtime-qPCR را روی ژل آگاروز ۲ درصد بارگذاری شدند (شکل ۷).

تفاوت معنی‌داری در سطح ۱ درصد بین دو تیمار غلظت ۱/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره و اثر ترکیبی آن با دارو مشاهده نشد و کاهش چشم‌گیری در بیان



شکل ۷: محصول Realtime-PCR - سمت راست چاهک اول نردبان ملکولی (Ladder) 1kbp و بقیه مربوط به ژن *Bcl2* با طول ۱۱۹ bp در رده سلولی روی ژل آگاروز ۲ درصد

بحث

ساپونین است می‌توان گفت این گیاه دارای خواص ضد سرطانی می‌باشد. در این تحقیق با روش خیساندن، عصاره هیدروالکلی این گیاه طی مدت ۷۲ ساعت تهیه شد. نتایج حاصل از تست MTT این عصاره بذر خارسنبل نشان داد که تفاوت معنی‌داری در اثر سمیت سلولی این عصاره در غلظت‌های مختلف با کنترل آن وجود دارد. غلظت‌های ۱۰ و ۷/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر این عصاره با آن‌که در هر سه رده سلولی بالای ۵۰ درصد مهار رشد سلول‌ها را داشت ولی کمترین بازدارندگی رشد را بر روی سلول‌های فیبروبلاست داشته است. در تحقیق Baskar و همکاران (۳۲) اثر عصاره‌های مختلف قسمت هوایی گیاه *Blepharis maderaspatensis* هم‌خانواده- *Blepharis persica* بر روی رده‌های سلول‌های سرطانی MCF7 و AGS مورد مطالعه قرار گرفت و نتایج نشان داد که غلظت‌های مختلف عصاره الکی این گیاه در ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بر روی رده‌های سلولی معده و سینه دارای اثر مهارکنندگی رشد دارد و با افزایش غلظت و زمان، میزان تاثیر‌گذاری عصاره بیشتر شده است. همتا و پروینی (۳۳) به بررسی اثرات سمیت عصاره گیاه رزماری روی رده‌های سلول‌های سرطانی MCF7 القا شده توسط DMBA در رت‌های نژاد SD پرداختند، نتایج نشان داد که عصاره الکی رزماری بر روی سلول‌های MCF7 دارای اثرات سمی قابل توجهی بوده است ولی عصاره آبی خواص ضد سرطانی بسیار ضعیفی داشت. اثر عصاره هیدروالکلی میوه خارخسک بر تکثیر سلول‌های سرطان پروستات و روده بزرگ انسان در شرایط آزمایشگاهی توسط Yaghoobi و همکاران (۳۴) انجام شد. نتایج نشان داد افزایش غلظت عصاره هیدروالکلی میوه خارخسک باعث افزایش اثر بازدارندگی رشد بر روی رده‌های

سرطان به‌عنوان یک بیماری‌کشنده در جهان شناخته می‌شود و هر ساله تعداد زیادی از افراد جدید درگیر این بیماری می‌شوند، در کشورهای در حال توسعه مانند ایران این بیماری عامل اصلی مرگ و میر انسان هاست. سرطان سینه در زنان ایرانی و سرطان پروستات در مردان ایرانی به‌عنوان شایع‌ترین سرطان‌ها مطرح است و در دهه‌های اخیر شیوع آن افزایش یافته است (۲۶ و ۲۷). بیشتر گیاهان و سبزیجاتی مورد استفاده قرار می‌گیرند و در طبیعت وجود دارند دارای خاصیت دارویی هستند. این گیاهان به‌دلیل داشتن ترکیبات دارویی و خاصیت آنتی‌اکسیدانتی می‌توانند به‌عنوان یک عامل ضد سرطانی عمل کنند (۲۸). خاصیت دارویی گیاهان به‌دلیل وجود متابولیت‌های ثانویه است. این ترکیبات برای رشد و نمو گیاهان ضروری نیستند ولی برای حیات و بقا گیاهان ضروری هستند و همچنین دارای پیچیدگی‌های بیشتری نسبت به متابولیت‌های اولیه هستند (۲۹). در این تحقیق از گیاه خارسنبل *Belepharis persica* گیاه بومی مناطق جنوبی ایران استفاده شد تا اثرات ضد سرطانی آن مورد سنجش قرار گیرد. گیاه خارسنبل دارای خواص دارویی است و در مناطق بومی از قسمت‌های مختلف آن استفاده می‌کنند. از ترکیبات شیمیایی موجود در گیاه خارسنبل می‌توان آلانتون، کاتچول، تانن، ساپونین و گلوکز را نام برد (۲۵). ساپونین یک متابولیت ثانویه است که در بسیاری از گیاهان دارویی و حتی جانوران دیده شده است. این ترکیب دارای طیف وسیعی از خواص دارویی از جمله: ضد آسم، ضد التهاب، ضد باکتریایی، مفید برای قلب، تقویت‌کننده سیستم ایمنی، ضد قارچ و ضدسرطان است (۳۰ و ۳۱). با توجه به آنکه این گیاه دارای متابولیت ثانویه متعددی از جمله

نتایج این تحقیق نیز نشان داد که عصاره هیدروالکلی این گیاه کاهش دهنده بیان BCL_2 است که می‌توان به دلیل وجود ساپونین در این گیاه نسبت داد. نتایج حاصل از دستگاه فلوسایتومتری نشان‌دهنده همین مطلب بود که سلول‌های سرطانی رو به آپوپتوزیس آورده‌اند و عصاره حاصل بر روی مسیر آپوپتوزیس سلول‌های سرطانی سینه و پروستات تاثیر داشته است.

نتیجه گیری

نتایج این تحقیق حاکی از اثر بالقوه عصاره هیدروالکلی بذر گیاه خارسنبل بر بیان ژن BCL_2 در سلول‌های سرطانی پستان و پروستات انسان و ارتباط آن با مهار رشد سلول‌های سرطانی است. با توجه به آن در مرحله بعدی کار با جداسازی ماده موثره این گیاه و تحقیقات تکمیلی می‌توان به‌عنوان یک ترکیب موثر در درمان سرطان معرفی شود. نتایج همچنین نشان داد عصاره این گیاه بر روی مسیر آپوپتوزیس تاثیر دارد با تحقیقات تکمیلی از جمله بررسی بیان ژن‌های دیگری که در مسیر آپوپتوزیس درگیر هستند و می‌تواند به‌طور دقیق‌تری پاسخگو این مطلب باشد که عصاره حاصل به‌عنوان ترکیبی موثر برای درمان سرطان سینه و پروستات مورد استفاده قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

این مقاله از پایان نامه دوره دکترای رشته بیوتکنولوژی کشاورزی مصوب در دانشکده کشاورزی دانشگاه گیلان استخراج شده است. از مسئولین آزمایشگاه ژنتیک و بیوتکنولوژی دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته کرمان جهت قرار دادن امکانات و وسایل آزمایشگاهی و آقایان دکتر علی درخشانی، دکتر فیروز جنت علی پور که ما را در انجام و ارتقاء کیفی این پژوهش یاری دادند، صمیمانه تشکر و قدردانی می‌شود.

سلول‌های LNCaP شده است و عصاره موجود بر روی سلول‌های فیروپلاست اثر کمتری داشته است. در تحقیق Ashour (۳۵) در مصر صورت گرفت با کمک تست DPPH radical اثبات شد که قسمت‌های هوایی گیاه *blepharis edulis* خاصیت آنتی‌اکسیدانتی و ضد سرطانی دارند و همچنین نتایج حاصل از تحقیق Mahboubi و همکاران (۳۶) در ایران نشان داد گیاه *blepharis edulis* یا خارسنبل بومی ایران در قسمت های هوایی این گیاه ترکیبات فنولی زیادی وجود دارد که این ترکیبات دارای خواص آنتی‌اکسیدانتی و ضد میکروبی هستند، نتایج این تحقیقات یه‌همراه نتایج حاصل از این تحقیق دال بر این مطلب است که عصاره گیاه خارسنبل دارای خواص آنتی‌اکسیدانتی و ضد سرطانی است. در این مطالعه بیان ژن BCL_2 با کمک Realtime-PCR نیز مورد سنجش قرار گرفت و نتایج نشان داد بیان این پروتئین به‌صورت معنی‌داری تحت تیمار عصاره ۱/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت کاهش یافته است. این نشان دهنده این است که عصاره هیدروالکلی تاثیر بر روی مسیر آپوپتوزیسی گذاشته است. احمدی و همکاران (۳۷) تاثیر عصاره هیدروالکلی برگ گیاه سدر (*Ziziphus spina-christi*) بر زنده‌مانی MCF7 و بیان ژن‌های BAX و BCL_2 مورد بررسی قرار دادند. نتایج به این شکل بود که با افزایش غلظت عصاره زنده‌مانی سلولی نسبت به کنترل کاهش معنی‌داری پیدا کرد و همچنین در غلظت ۰/۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره گیاه، بیان ژن BCL_2 دچار کاهش معنی‌داری ($p < 0/01$) شده است. از عوامل دیگری که می‌تواند در کاهش بیان BCL_2 موثر باشد ساپونین است، ساپونین به‌عنوان یک متابولیت ثانویه می‌تواند یک عامل موثر در آپوپتوزیس سلول‌های سرطانی و کاهش دهنده بیان ژن BCL_2 باشد (۳۸).

منابع

11. Shingo A, Hidewaki N, Toyomasa K. Molecular Features of the Transition from prostatic Intraepithelial Neoplasia (PIN) to prostate cancer: Genome-wide Gene-expression Profiles of Prostate cancers and PINs. *Cancer Res.* 2004; 64(17): 5963-72.
12. Glause A, Muller S. Hemoglobin and fatigue in cancer patients in separable twice. *Sohweiz Med Wochenschr.* 2000; 130(13): 471-477.
13. Hyun lee. Fatigue and hope: Relationships to Psychosocial adjustment in Korean woman with breast cancer. *Appl Nurs Res.* 2001; 14(2): 87-93.
14. Kajstura J, Cheng W, Sarangarajan R, Lim P, et al. Necrotic and apoptotic myocyte cell death in the aging heart of Fischer 344 rats. *Am. J. Physiol.* 1996; 271 (3 Pt 2): 1215-1228.
15. Frias MA, Somers S, Gerber-Wicht C, Opie LH, et al. The PGE2-Stat3 interaction in doxorubicin-induced myocardial apoptosis. *Cardiovasc. Res.* 2008; 80 (1): 69-77.
16. Thorn CF, Oshiro C, Marsh S, et al. Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects. *Pharmacogenetics Genomics.* 2011; 21(7): 440-6.
17. Cruet Hennequart S, Prendergast AM, Shaw G, Barry FP, et al. Doxorubicin induces the DNA damage response in cultured human mesenchymal stem cells. *International journal of hematology.* 2012; 96(5): 649-656.
18. Cory S, Adams, JM, The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch, *Nature Reviews Cancer.* 2002; 2(9): 647-656.
1. Deka SJ, Mamdi N, Manna D, Trivedi V. Alkyl Cinnamates Induce Protein Kinase C Translocation and Anticancer Activity against Breast cancer cells through Induction of the Mitochondrial Pathway of Apoptosis. *J Breast Cancer.* 2016; 19(4): 358-371.
2. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN. *Int J Cancer.* 2015; 136(5): 359-386.
3. Mousavi SM, Gouya MM, Ramazani R, Davanlou M, et al. Cancer incidence and mortality in Iran. *Ann Oncol.* 2009; 20(3): 556-563.
4. Salehi F, Mohsenzadeh F, Aefi M. Prevalence of anxiety of death in patients with breast cancer in Kermanshah, 2015. *Ir Jof Breast Dis.* 2015; 8(4): 36-40.
5. Kruk J, Aboul-Enein Hy. Psychological stress and the Risk of breast cancer: A case-control study. *Cancer Detect Prev.* 2004; 28(6): 399-408.
6. Jamshidinaeni Y, Davoodi H, Esmaeili S. Effects of Vitamin D on risk of breast cancer. *Iran J Nutr Sci Food Technol.* 2013; 7(4)(27): 53-62.
7. Jemal A, Murray T, Ward E, Samuels A, et al. Cancer statistics. *CA cancer J. Clin.* 2005; 55(1): 10-30.
8. Moheghi N, Afshari JT, Brook A. The Cytotoxic Effect of *Zingiber Afficinale* in Breast Cancer (MCF7) Cell line. *J Ofogh Danesh.* 2011; 17(3): 28-34.
9. Chikezie O. Madu and Yi Lu. Novel diagnostic biomarkers for prostate cancer. *J cancer.* 2010; 1(1):150-177.
10. DeMarzo AM, Nelson WG, Isaacs WB, Epstein JI. Pathological and molecular aspects of prostate cancer. *Lancet.* 2003; 361; 955-964.

19. Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer S J. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis, Genes & development. 1999; 13(15): 1899-1911
20. Green DR, Kroemer G. The pathophysiology of mitochondrial cell death. Science Signalling. 2004; 305: (5684): 626.
21. Kaufmann B, Christen P, Veuthey JL. Parameters affecting microwave-assisted extraction of withanolides. Phytochemical Analysis. 2002; 12(5): 327-331.
22. Mozffarian V. A Dictionary of Iranian Plant names. Farhang Moaser. Tehran, Iran. 1996; p. 172.
23. Gutterman Y. Delayed seed dispersal and rapid germination as survival mechanisms of the desert plant *Blepharis persica* (Burm.) Kuntze. Oecologia. 1972; 10(2): 145-149.
24. Mir Heydar H. Plant Education. Office of the Publishing Islamic Culture. Tehran, Vol. 8. 2006. 8 (3): 21-4.
25. Khacha-ananda S, Tragoolpua Kh, Chantawannakul p, Tragoolpua Y. Antioxidant and Anti-cancer Cell Proliferation Activity of Propolis Extracts from Two Extraction Methods. A PJC. 2013; 14: 6991-6995.
26. Hairrchi I, Kolahdoozan S, Karbakhsh M, Chegini N, et al. Twenty years of breast cancer in Iran: downstaging without a formal screening program. Ann Oncol. 2011; 22(1): 93-97.
27. Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, et al. Cancer statistics. CA Cancer J Clin. 2006; 56(2): 106-30.
28. Shukla Y, Singh M. Cancer preventive properties of ginger: a brief review. Food Chem Toxicol. 2007; 45(5): 683-690.
29. Montoro P, Baraca A, Pizza C, De Tommasi N. Structure antioxidant activity relationships of flavonoids isolated from different plants species. Food chemistry. 2005; 92: 249-355.
30. Lacaille-Dubois M.A, Wagner H. Bioactive saponins from plants: an update. In: Studies in natural Products Chemistry. Rahman A.U.(ed). Elsevier, Amsterdam; 2000; 21: 633-687.
31. Hostettmann K, Marston A. Chemistry and pharmacology of natural product: saponins. Cambridge University Press, UK. 1995: 286.
32. Baskar AA, Khalid S. Al, Mohammed A, et al. In vitro antioxidant and antiproliferative potential of medicinal plants used in traditional Indian medicine to treat cancer. Redox Report. 2012; 17(4): 145-156.
33. Hamta A, Parvini P. Study of Cytotoxic Effects of Taxol and Rosemary Extracts on Cancerous Cells Derived From DMBA-induced Breast Cancer in SD Rats. Journal of Cell & Tissue. 2011; 2(2): 117-126.
34. Pourali M, Yaghoobi MM, Salehii MH. Cytotoxic, Anti-Proliferative and Apoptotic Effects of *Tribulus terrestris* L. Fruit Extract on Human Prostate Cancer Lncap and Colon Cancer HT-29 Cell Lines. Jundishapur J Nat Pharm Prod. 2017; 12(2): e33561.
35. Ashour MAG. Isolation, HPLC/UV characterization and antioxidant activity of phenylethanoids from *Blepharis edulis* (Forssk.) Pers. growing in Egypt. Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University. 2012; 50(1): 67-72.

36. Mahboubi M, Haghi GH, Kazempour N, Hatemi AR. Total phenolic content, antioxidant and antimicrobial activities of *Blepharis edulis* extracts. Songklanakarin J. Sci. Technol. 2013; 35(1): 11-16.
37. Ahmadi R, Rahimi S, Ehteshamzad N. The effect of hydroalcoholic *Ziziphus spinachristi* leaf extract on viability of breast cancer cell line (MCF7) and evaluation of Bax and Bcl₂ genes expression level. Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences. 2017; 21(5): 407-413.
38. Dikavsakaya D, Schiffmam D, Lan P. Loss of APC incidence polypoidy as a results of a combination of defects in mitosis and apoptosis. Journal of Cell Biol. 2007; 176(2): 183-195.

Anticancer activity of *Blepharis persica* seed hydroalcoholic extract on (MCF-7) human breast cancer and (LNCaP) prostate cancer cell lines and its synergistic effect with doxorubicin

Aghaabbasi K, Ph.D. Student¹, Hassani Kumleh H, Ph.D.^{2*} Askari N, Ph.D.³ Torkzadeh-Mahani M, Ph.D.³, ramzani-ghara A, Ph.D.⁴

1. PhD student. Department of Biotechnology, University Campus 2 - University of Guilan, Khalij Fars highway (5th kilo meter of Ghazvin road), Rasht, Iran
2. Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Khalij Fars highway (5th kilo meter of Ghazvin road), Rasht, Iran
3. Department of Biotechnology, Institute of Sciences and High Technology and Environmental Sciences, Graduate University of Advanced Technology, End of Haft Bagh-e-Alavi Highway, Kerman, Iran.
4. Faculty of basic sciences, Department of plant biology, University of jiroft. km 8 Bandar Abbas Road, kerman, Iran.

* Email corresponding author: kumleh@yahoo.com_

Received: 24 Jul. 2018

Accepted: 8 Jan.. 2019

Abstract

Aims: This study was aimed to investigate the anti-proliferative effects of hydroalcoholic extract of *Blepharis persica* seed and its synergy effect with doxorubicin on human breast cancer and prostate cancer cell lines.

Materials and Methods: hydroalcoholic extract of seed was prepared using maceration, and ethanol%70. Eight concentrations of extract and four concentrations of combined with doxorubicin (125, 62.5ng/ml) and extract (0.625, 0.315mg/ml) were prepared. MCF7, LNCaP and SKM cell lines were cultured. Cell viability was evaluated by MTT assay after 24h. To show apoptosis induction of breast and prostate cancer cell death by extracts, Annexin/PI test were performed. *BCL₂* gene expression was analyzed using Real-Time RT-qPCR for 24,48h.

Results: The highest effects of growth inhibition were observed in the prostate, breast and fibroblast cell lines with extract, respectively. The combined effect of doxorubicin with extract in three cell lines in comparison with control did not show any significant difference. The results of Annexin / PI indicated that the percentage of initial apoptosis, delayed apoptosis and necrosis in treated cells increased compared to control. *BCL₂* expression in cell lines decreased significantly over 24 and 48 h compares to control(p<0.01).

Conclusion: hydroalcoholic extract of *B.persica* seed has ability to inhibit the proliferation of cancer cell lines as well as the induction of apoptosis in cancer cells, compared with using it with doxorubicin, although the extract did not have any synergy effect with doxorubicin at lower concentrations, it can be a substituted for this kind of drug with fewer side effects.

Keywords: Apoptosis, *Blepharis persica*, *BCL₂*, LNCaP, MCF7