

تأثیر عصاره ریز جلبک اسپرولینا بر روی بیان ژن ضد آپوپتوتیک Bcl-2 در رده سلولی سرطان مغز

نویسندگان:

مهسا کاوسی^{۱*}، دنناز فاطمی مقدم^۲

۱- گروه زیست شناسی، واحد تهران شرق، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
 ۲- کارشناس ارشد ژنتیک، گروه زیست شناسی، واحد تهران شرق، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

Pars Journal of Medical Sciences, Vol.17, No.3, Fall 2019

چکیده:

مقدمه: رده سلولی U87 شامل سلول‌های سرطانی گلیوبلاستوما به عنوان حادث‌ترین نوع تومور مغزی از رده انسانی می‌باشد. افزایش بیان ژن Bcl-2 در سلول‌های سرطانی اثر ضد آپوپتوزی دارد. در مطالعه حاضر اثر عصاره جلبک اسپرولینا بر روی میزان بیان ژن در رده سلول سرطانی بررسی شده است.

روش کار: در این مطالعه آزمایشگاهی، از رده سلولی U87 استفاده گردید. در این مطالعه رده سلولی سرطان مغز از مرکز ذخایر زیستی و ژنتیکی ایران تهیه و کشت داده شد. سلول‌ها به دو گروه تیمار و شاهد تقسیم شدند. تأثیر عصاره جلبک اسپرولینا روی گروه تیمار با استفاده از (compound MTT) (*3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide*) (GAPDH) بود. از سلول‌های گروه تیمار و شاهد RNA استخراج و سپس cDNA ساخته شد. میزان نسبی بیان ژن‌های Bcl-2 و GAPDH، با استفاده از Real-time PCR و $\Delta\Delta Ct$ مورد بررسی قرار گرفت. نتایج با استفاده از نرم‌افزار REST 2009 نسخه 2.0.13 تجزیه و تحلیل گردید.

یافته‌ها: نتیجه MTT نشان داد که IC50 (Median Inhibition Concentration) در 48 ساعت تیمار، 10/01 mg/ml می‌باشد. با انجام Real-time PCR مشخص گردید که در این سلول‌ها، میزان بیان ژن ضد آپوپتوزی Bcl-2 به میزان 3 برابر کاهش معنی‌داری پیدا کرد.

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج می‌توان گفت که در سلول‌های گروه تیمار با عصاره جلبک میزان بیان Bcl-2 سه برابر و به‌طور معنی‌داری کاهش داشته است.

واژه‌گان کلیدی: سرطان مغز، Bcl-2، Real-time PCR، MTT، اسپرولینا

Pars J Med Sci 2019;17(3):17-25

مقدمه:

تومورهای خوش‌خیم مغزی دارای سلول‌های سرطانی نبوده و معمولاً دارای مرز و یا لبه‌ی مشخصی هستند. معمولاً تومورهای خوش‌خیم قابل برداشتن بوده و به ندرت دوباره رشد می‌کنند. سلول‌های تومورهای خوش‌خیم در دیگر قسمت‌های بدن گسترش نیافته و به ندرت بافت‌های اطراف خود را مورد هجوم قرار می‌دهند. به هر حال، تومورهای خوش‌خیم می‌توانند با فشار بر نقاط حساس مغز، باعث بروز مشکلات جدی در سلامتی شوند [۱]. سرطان‌های بدخیم مغز که سرطان مغزی نیز نامیده می‌شود حاوی سلول‌های سرطانی هستند. سرطان‌های مغزی عموماً

جدی‌تر بوده و اغلب تهدیدی برای ادامه زندگی محسوب می‌شوند. احتمال دارد که آن‌ها سریعتر رشد و تجمع پیدا کرده یا به بافت‌های مغزی مجاور حمله کنند. سلول‌های سرطانی ممکن است به دیگر قسمت‌های مغز و یا نخاع گسترش یابند [۲]. انواع مختلفی از سرطان‌های مغزی اولیه وجود دارند، سرطان‌های مغزی اولیه براساس نوع سلول‌ها و یا قسمتی از مغز که در آن شروع به رشد می‌کنند، نام‌گذاری می‌شوند. برای مثال، بیشتر سرطان‌های مغزی اولیه در سلول‌های گلیال شروع می‌شوند، این نوع سرطان گلیوم نامیده می‌شود. گلیوبلاستوما مولتی فرم

* نویسنده مسئول، نشانی: ۱ گروه زیست شناسی، واحد تهران شرق، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

پست الکترونیک: mkavoosi@iaue.ac.ir

تلفن تماس: ۰۹۰۳۱۲۳۹۰۳۷ و ۰۲۱۳۳۵۸۴۹۱۱

پذیرش: ۹۸/۱۰/۱۸

اصلاح: ۹۸/۱۰/۱۷

دریافت: ۹۸/۰۷/۰۹

افزایش قدرت آنتی‌اکسیدان‌های پلاسما و به دلیل داشتن عوارض جانبی کمتر، احتمال ابتلا به بعضی بیماری‌ها مانند سرطان، بیماری‌های قلبی و سکتته مغزی را کاهش می‌دهند [۹]. کاروتنوئیدها گروه مهمی از رنگدانه‌های طبیعی محلول در چربی و ترکیبات هیدروفوب با خواص آنتی‌اکسیدانی هستند [۱۰]. در تحقیقات اخیر، استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های گیاهان دارویی در درمان انواع سرطان‌ها بسیار رواج یافته است. علاوه بر آن، در بسیاری از کشورها بر روی آنتی‌اکسیدان‌های جلبکی مطالعاتی در حال انجام است [۱۱]. سیانوباکترها به عنوان منبع غذایی و مکمل تغذیه به کار برده می‌شوند. سیانوباکترها ارگانیزم‌های تک سلولی پروکاریوت با ویژگی‌های حد واسط بین جلبک و باکتری هستند. سیانوباکترها در مناطق آبی، خشک و حتی در دمای ۷۱ درجه سانتیگراد و در بین درزهای صخره‌های سنگی وجود دارند. رنگ آن‌ها از سبز آبی تا قرمز یا بنفش متغیر است [۱۲]. گونه‌های کلرلا، اسپیرولینا و دونالیلا از جلبک‌های تجاری هستند که به وفور تولید می‌شوند زیرا برای رشد نیاز به محیط خاصی ندارند و می‌توانند در هوای باز بدون حضور آلاینده‌ها یا سایر جلبک‌ها و آغازیان کشت داده‌شوند. کاربرد رنگدانه‌های اسپیرولینا در صنایع دارویی و غذایی، سبب جایگزینی رنگ طبیعی به جای رنگ مصنوعی می‌شود [۱۳]. مطالعات متنوعی جهت اثبات خواص دارویی و فواید مواد مغذی موجود در اسپیرولینا انجام شده است که تعدادی از آن‌ها مربوط به فیکوسیانین موجود در این سیانوباکتر است. فیکوسیانین رنگدانه آبی رنگی است که می‌تواند به عنوان رنگ طبیعی، جایگزین رنگ‌های سنتزی سرطان‌زا در مواد غذایی، دارویی و آرایشی مورد استفاده قرار گیرد. رنگ تیره اسپیرولینا به خاطر وجود غلظت‌های بالایی از رنگدانه‌های طبیعی شامل کلروفیل، کاروتنوئیدها، گزانتوفیل‌ها و فیکوبیلوپروتئین است که این رنگ‌ها متابولیسم حیاتی بدن را تنظیم می‌کنند [۱۴]. در مطالعه‌ای آنتی‌اکسیدان‌های حاصل از ریز جلبک اسپیرولینا را با روش ترکیبی استخراج مایع تحت فشار TLC و HPLC-DAD جداسازی و بررسی نمودند. در این مطالعه کاروتنوئیدها، ترکیبات فنولی و محصولات تجزیه شده کلروفیل را به عنوان مهم‌ترین ترکیبات آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های اسپیرولینا معرفی شد [۱۵]. در پژوهش حاضر اثر عصاره ریز جلبک اسپیرولینا بر روی میزان بیان ژن آنتی‌آپوپتوتیک Bcl-2 در سلول‌های سرطان مغز مورد بررسی قرار گرفته است. با توجه به بررسی‌هایی که در داده پایگاه‌های علمی صورت گرفت مشخص شد که هیچ مطالعه‌ای مبنی بر بررسی اثر جلبک اسپیرولینا بر بیان ژن Bcl-2 که یک ژن مهم در روند سرطانی شدن سلول‌ها می‌باشد، انجام نشده است.

شایع‌ترین، مهاجم‌ترین و در واقع کشنده‌ترین نوع سرطان مغزی اولیه در بزرگسالان است. مدت زنده ماندن بعد از تشخیص اولیه ۱۲-۱۵ ماه است. این سرطان ۵/۲ درصد از مرگ‌های سرطانی را به خود اختصاص داده است و در کشورهای پیشرفته‌تر و نیز در مردها شیوع بیشتری دارد [۳]. یکی از مهم‌ترین ریسک فاکتورها، بعد از جنسیت مذکر، سن بین ۵۰ تا ۷۴ سال است. موارد گزارش شده در ایران در سال ۱۳۹۱ حدود ۱۳۰ نفر آقا و ۲۴۰ نفر خانم بوده است. طبق آخرین مطالعه در ایران سرطان‌های مغزی و سایر سرطان‌های سیستم عصبی مرکزی حدود ۲٪ کل سرطان‌ها را در کشور تشکیل داده و درصد مرگ و میر ناشی از این سرطان‌ها حدود ۲/۷٪ از هر صد هزار نفر تخمین زده شده است. در نتیجه این بیماری، جزء سرطان‌هایی با مرگ و میر بالا می‌باشد. شایع‌ترین انواع سرطان‌های مغزی در بزرگسالان آستروسیتوما است. این سرطان در سلول‌های گلیال ستاره‌ای شکل، که آستروسیت نامیده می‌شوند، شروع می‌شود. این سرطان می‌تواند در هر جایی باشد، در بزرگسالان، یک آستروسیتوما اغلب در مخ به وجود می‌آید [۴]. گروه‌های اصلی بافت سرطانی مغز شامل سرطان‌های بافت نوروای تلیال، اپنایمال، شبکه مشیمیه، پارانشیمی صنوبری، سرطان‌های جنینی، منژولنفوما سیستم عصبی مرکزی اولیه می‌باشد. بر اساس مطالعه‌ای که بر روی ۳۴۳۸ مبتلا به سرطان مغز در ایران بین سال‌های ۲۰۰۴-۱۹۷۸ انجام شده است، پنج نوع از سرطان‌های مغزی از جمله منژئوما ۲۶٪، آستروسیتوما ۲۳٪، آدنوما هیپوفیز ۱۳٪، گلیوبلاستوم ۵٪ و اپنندوما ۴٪ بالاترین میزان شیوع را در هر دو جنس به خود اختصاص دادند. برای تحقیق بر روی گلیومای انسانی، از U87 MS به عنوان معمول‌ترین سلول، استفاده می‌شود [۵]. مطالعات نشان داده که پروتئین‌ها در حالت طبیعی مسئول تنظیم تقسیم و رشد سلول‌ها هستند که وقتی موتاسیون ژنتیکی پیدا کرده و میزان بیان بالایی دارند، آنکوژن نامیده می‌شوند. تا به حال بیش از یک صد نوع آنکوژن شناسایی شده است [۶]. آپوپتوز مرگ برنامه‌ریزی شده و تنظیم شده توسط سلول یا خودکشی برنامه‌ریزی شده سلول می‌باشد [۷]. چندین ژن در تولید آپوپتوز نقش مهمی را ایفا می‌کنند، از جمله Bcl-2، P53، Bcl-XL، Bcl-1، Bax، Bak، Bad، Bim. پروتئین Bcl-2 می‌تواند در ایجاد و ممانعت از آپوپتوز مؤثر باشد. همکاری پروتئین‌های Bcl-2 و Mcl اثر ضد آپوپتوز دارند. در حالی که دیگر پروتئین‌های Bax، Bak، Bad، Bim در ایجاد آپوپتوز نقش موثری را بازی می‌کنند [۸]. نتیجه مطالعه‌ای نشان داده است که گیاهان، سبزی‌ها و ادویه‌ها می‌توانند یک منبع غذایی مفید در پیشگیری از سرطان باشند. گیاهان دارویی از منابع مهم آنتی‌اکسیدان‌ها هستند که سازگاری زیادی با فیزیولوژی بدن انسان دارند و با

روش کار:**آماده‌سازی غلظت‌های مورد نیاز از جلبک اسپیرولینا**

عصاره جلبک از مرکز ذخایر زیستی و ژنتیکی ایران تهیه شد و ۱۰۰۰ میلی‌گرم از وزن خشک عصاره توزین و با رقت‌سازی متوالی توسط آب مقطر غلظت‌های تعیین شده ۱، ۰/۵، ۲، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تهیه شدند.

کشت رده سلول سرطانی U87

این مطالعه بر روی رده سلولی U87 در محیط آزمایشگاه انجام شد. رده سلولی مورد نظر از بانک سلولی مرکز ملی ذخایر زیستی و ژنتیکی ایران تهیه شد. سلول‌های این رده سلولی در محیط کشت DMEM خریداری شده از شرکت Bioidea ایران حاوی ۴/۵ گرم بر لیتر از D-گلوکز، ۱۰٪ FBS، از شرکت Bioidea ایران، پنی‌سیلین خریداری شده از کمپانی Bioidea ایران به میزان ۱۰۰ μg/ml و استرپتومایسین خریداری شده از کمپانی Biosera به میزان ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و فشار ۵٪ از CO₂ کشت داده شد.

انجام MTT Assay

برای بررسی تأثیر عصاره جلبک بر روی بقا رده سلولی U87 از روش MTT Assay استفاده شد. به منظور تیمار سلول‌ها و بررسی بیان ژن مورد نظر، باید IC₅₀ را به دست آورد. برای این کار با استفاده از MTT Assay چندین غلظت مختلف از عصاره جلبک به سلول‌ها تأثیر داده شد. ۱۰۰۰۰ عدد سلول یا ۱۰۰ μl از سلول‌ها در ظرف کشت ۹۶ خانه در محیط کشت، حاوی ۱۰٪ سرم کشت داده شدند. سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ °C و ۵٪ CO₂ انکوبه شدند. از هر کدام از رقت‌های عصاره جلبک به چاهک‌های جداگانه به صورت ۳ تکرار اضافه شدند. انکوباسیون به مدت ۴۸ ساعت ادامه یافت. بیست میکرولیتر از محلول رنگ MTT به هر چاهک اضافه کرده و به مدت ۴ ساعت انکوباسیون ادامه یافت. مایع رویی حذف شده و ۱۰۰ μl DMSO به هر چاهک اضافه شد. بعد از پیتاژ، جذب در طول موج ۵۷۰ nm با استفاده از Elisa Reader, Awareness Technology Stat Fax 2100 از Microplate Reader خوانده شد. سپس با توجه به اینکه برای هر غلظت و همچنین برای کنترل، سه بار تست تکرار شده بود لذا از سه جذب حاصل میانگین گرفته شد و به کمک فرمول زیر درصد تأثیر عصاره جلبک روی مرگ سلولی در هر غلظت تعیین گردید.

$$\left(\frac{\text{OD}_{\text{treated}}}{\text{OD}_{\text{untreated}}} \right) \times 100 = \text{the \% inhibition}$$

در نهایت با رسم منحنی نقطه‌ای در نرم افزار Excel و تعیین بهترین خط ممکن و با کمک فرمول خط میزان غلظتی از عصاره جلبک که در زمان ۴۸ ساعت IC₅₀ به دست آمد. سپس تیمار رده سلولی با عصاره جلبک انجام شد.

استخراج RNA و سنتز cDNA

با استفاده از کیت استخراج RNXTm-Plus و بر اساس پروتکل شرکت Sina. Colon، RNA سلول‌های گروه کنترل و تیمار استخراج شد. خلوص و غلظت RNA استخراج شده توسط Spectrophotometer (Nano Drop Technologies, Wilmington, DE, USA) ۲۰۰۰ Nano Drop بررسی شد که طول موج ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر برای تمام نمونه‌ها بین ۱/۹-۱/۷ بود. کیفیت آن توسط ژل آگارز ۱/۵ درصد بررسی شد. برای سنتز cDNA از کیت Revert Aid First Stand cDNA Synthesis Kit شرکت Thermo Scientific استفاده شد. مواد لازم برای سنتز cDNA، Random Hexamer ۴۰ میکرومولار به حجم ۱ μl، Oligo dt ۱۰۰ میکرومولار به حجم ۱ μl و dNTP ۱۰ میلی‌مولار به حجم ۱ μl می‌باشد که با هم مخلوط شدند. پنجاه نانوگرم/میکرولیتر از RNA به هر لوله افزوده و ۵ دقیقه در ۶۵°C و بعد بلافاصله در یخ قرار داده شد. پس از حدود دو دقیقه مخلوط واکنش با مقادیر Nuclease free water به حجم ۴/۵ μl، M-۱۰X MuLV buffer به حجم ۲ μl، M-MuLV ۲۰۰ واحد در میکرولیتر به حجم ۰/۵ μl تهیه و به هر لوله به مقدار ۷ μl از این مخلوط اضافه گردید به طوری که حجم نهایی واکنش در نهایت ۲۰ μl شد. واکنش به مدت ۶۰ دقیقه در ۴۲ °C قرار داده شد. برای غیر فعال کردن آنزیم MMULV، محلول به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد.

پرایمرهای مورد استفاده و انجام Real Time PCR

توالی mRNA ژن‌های مورد نظر از مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی (NCBI) به دست آمد و اتصال صحیح پرایمرها به توالی مربوطه بررسی شد و سپس توسط برنامه Blast در NCBI اتصال پرایمرها به توالی‌های دیگر مورد بررسی قرار گرفت. لازم به ذکر است که پرایمرها پس از بررسی توسط همین نرم‌افزار جهت ساخت به شرکت ماکروژن سفارش گردید. توالی پرایمرهای مورد بررسی در جدول ۱ آمده است.

تست PCR برای هر تکرار در نمونه‌های تیمار و کنترل به طور جداگانه برای بررسی ژن‌های GAPDH و Bcl-2 انجام شد (شکل ۱). با استفاده از شیب خط منحنی به دست آمده و رابطه زیر بازده واکنش برای هر پرایمر محاسبه شد.

$$\text{Slope} = 10(-1/\text{slope}) - 1 = E = \text{بازده واکنش} = E = \text{شیب خط منحنی}$$

شد. سپس با استفاده از $\Delta\Delta Ct$ میزان نسبی ژن توسط نرم افزار REST 2009 V2.0.13 محاسبه شد.

تکثیر ژن‌ها صورت گرفته و تعیین کمیت نسبی در آن به وسیله اندازه‌گیری میزان افزایش نور فلوروسانس در اثر اتصال سایر گرین توسط دستگاه ABI 7500 Real-time PCR system (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, USA) انجام

جدول ۱: توالی پرایمرهای مورد استفاده

Gene	Accession N	CG%	Tm(°c)	Amplicon length	Primer pair sequences
Bcl-2 Forward	XM_017025917/2	۶۲/۵۰	۵۸/۹۷	۶۵	۵'-TTGGCCCCCGTTGCTT-۳'
Bcl-2 Reverse	XM_017025917/2	۵۷/۱۴	۶۰/۲۷	۶۵	۵'-CGGTTATCGTACCCCGTTTCTC-۳''
GAPDH Forward	NM_001357943/2	۵۷/۸۲	۵۷/۱۸	۲۲۶	۵'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-۳'
GAPDH Reverse	NM_001357943/2	۴۵	۵۳/۷۲	۲۲۶	۵'-GAAGATGGTGATGGGATTTC-۳''

یافته‌ها:

نتیجه مربوط به تعیین دز مهاری ترکیبات IC50 بر روی سلول سرطانی U87

تیمار سلول‌های U87 با غلظت‌های مختلف عصاره جلبک در غلظت‌های متوالی طی مدت ۴۸ ساعت انجام شد. بر اساس نتایج MTT غلظتی از عصاره جلبکی که ۵۰ درصد سلول‌های U87 را می‌کشد (IC50) برابر ۱۰/۰۱ mg/ml محاسبه گردید (نمودار ۱).

پس از ترسیم نمودار و به کمک فرمول بهترین خط، میزان IC50 عصاره جلبک در دوره زمانی ۴۸ ساعت بدست آمد.

نتیجه تست MTT

نتیجه بررسی بعد از ۴۸ ساعت تیمار با عصاره و انجام تست MTT در نمودار ۲ ارائه شده است.

نتیجه محاسبه غلظت RNA جداسازی شده

در این مرحله غلظت RNA در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر با روش تعیین دانسیته نوری (OD) توسط دستگاه Scientific اندازه‌گیری شد که میزان ۱/۱ μg/ml گزارش شد. محاسبه نسبت جذب ۲۶۰ به ۲۸۰ تعیین کننده خلوص اسیدهای نوکلئیک استخراجی می‌باشد. برای نمونه‌های RNA نسبت ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر برابر ۲±۱ و برای نمونه‌های DNA نسبت ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر برابر ۱±۱/۸ قابل قبول است.

نتیجه انجام Real-Time PCR

تیمار رده سلولی U87 با غلظت‌های مختلف از عصاره جلبک در غلظت‌های متوالی طی مدت ۴۸ ساعت انجام و سپس میزان

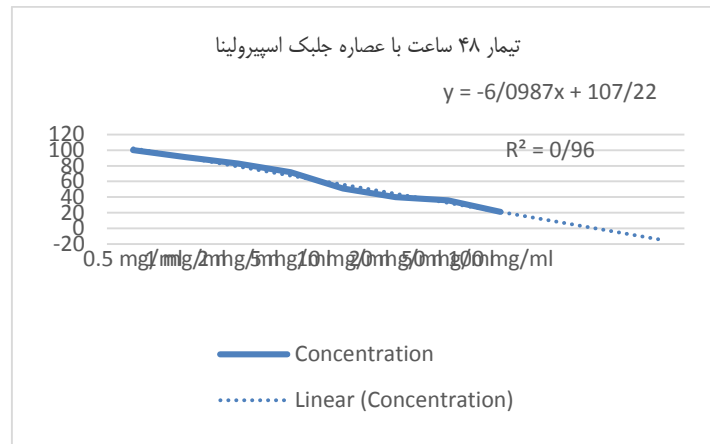
زنده‌مانی آن‌ها در مقایسه با گروه کنترل که تحت تأثیر عصاره قرار نگرفته بودند، با تست MTT انجام شد. از سلول‌های هر دو گروه کنترل و تیمار RNA استخراج شد. به منظور کسب اطمینان از عدم تجزیه RNA استخراج شده، کیفیت نمونه‌های RNA به کمک الکتروفورز ژل آگارز و کمیت آن‌ها با اسپکتروفتومتری بررسی شد. در بررسی ژل دو باند ۱۸S و ۲۸S RNA ریبوزومی به وضوح مشاهده شد که بیانگر عدم تجزیه RNA می‌باشد. در بررسی با اسپکتروفتومتری نیز نسبت جذب در ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر نتیجه قابل قبولی به دست آمد. بنابراین RNA استخراجی می‌تواند با اطمینان در مراحل بعدی تحقیق استفاده شود. قبل از انجام Real time PCR ضروری است که پرایمرهای طراحی شده با استفاده از روش Conventional PCR مورد ارزیابی قرار گیرند تا عملکرد آن‌ها بررسی گردد. این کار با استفاده از سایت NCBI و نرم‌افزار Primer-BLAST انجام شد. سپس واکنش PCR با پرایمرهای مذکور انجام شد (نمودار ۳).

پس از کسب اطمینان از کارایی پرایمرها Real time PCR انجام شد. با بررسی منحنی ذوب ژن‌ها می‌توان گفت که هیچ گونه آلودگی در نمونه‌های تکثیر یافته وجود نداشته است. برای اطمینان از عملکرد صحیح پرایمرها و محصول PCR، از آنالیز منحنی ذوب استفاده شد. منحنی‌های مربوط به ژن‌های GAPDH و Bcl-2 به صورت جداگانه و تک بودند که نشان می‌دهد باند غیراختصاصی ایجاد نشده است و دمای نشان داده شده در این منحنی معادل دمای محاسبه شده در نرم‌افزار است. در نهایت، نتایج با استفاده از نرم‌افزار REST آنالیز گردید (جدول ۲).

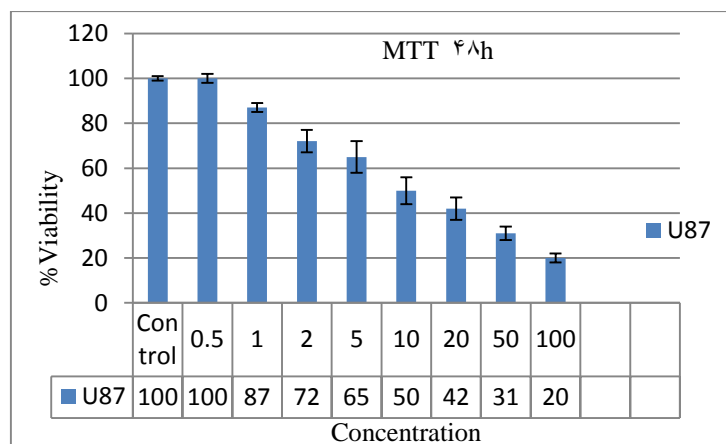
روش اندازه‌گیری میزان بیان ژن‌های مورد نظر به صورت Relative (نسبی) بوده است. به عبارت دیگر میزان بیان ژن هدف

نمودار ۴ مشخص است میزان بیان ژن Bcl-2 گروه نمونه در اثر تیمار با عصاره جلبک به نسبت ۳- کاهش داشته است که با توجه به این که مقدار p-value کمتر از ۰/۰۵ است نتیجه به دست آمده معنی دار است.

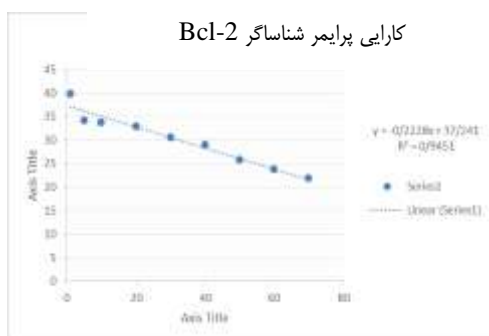
به نسبت میزان بیان ژن رفرنس محاسبه شده است. با توجه به این که مقدار p-value کمتر از ۰/۰۵ است نتیجه به دست آمده معنی دار است و بنابراین می توان با اطمینان گفت که بیان ژن Bcl-2 به مقدار ۳ کاهش یافته است. همانطور که در



نمودار ۱: نمودار IC_{50} در تیمار ۴۸ ساعت با عصاره جلبک $IC_{50} = 10.01$ mg/ml



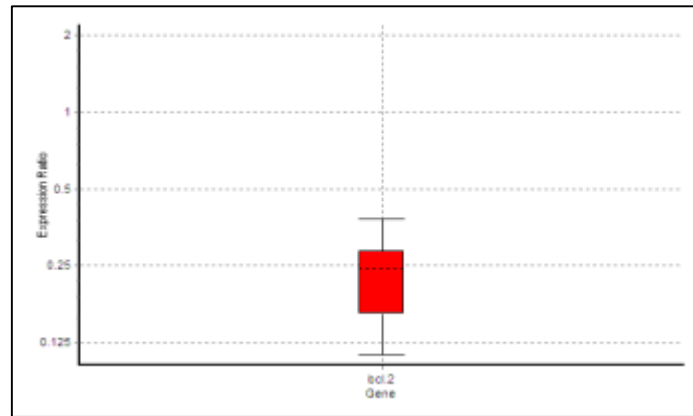
نمودار ۲: نمودار تست MTT بر روی سلول های سرطانی U87 در مدت ۴۸ ساعت



نمودار ۳: بررسی کارایی پرایمرهای GAPDH (راست) و Bcl-2 (چپ)

جدول ۲: نتیجه مربوط به تغییرات بیان ژن Bcl-2 در مواجهه با عصاره جلبک اسپیرولینا

Gene	Type	Reaction Efficiency	Expression	Std. Error	95% C.I.	P(H1)	Result
GAPDH	REF	۱	۰/۶۶۶	۰/۵۵۶ -- ۰/۷۷۱	۰/۵۳۴ -- ۰/۸۹۰	۰/۰۵۸	
Bcl-2	TRG	۱	۰/۱۴۵	۰/۱۰۵ -- ۰/۱۸۱	۰/۰۹۷ -- ۰/۱۹۹	۰/۰۰۰	DOWN



نمودار ۴: BOXPLOT مربوط به ژن Bcl-2

بحث:

سرطانی مؤثر بوده است. هم چنین در مطالعه دیگری، برخی محققین اثر اسپیرولینا بر سیستم ایمنی انسان را بررسی کرده و نشان دادند که تعداد سلول‌های رده میلوپیدی و سلول‌های NK تحت تأثیر این جلبک قرار می‌گیرند. هم‌چنین محققین آنتی‌اکسیدان‌های حاصل از ریز جلبک اسپیرولینا را با روش ترکیبی استخراج مایع تحت فشار، TLC و HPLC-DAD جداسازی و بررسی نمودند. آن‌ها کاروتنوئیدها، ترکیبات فنولی و محصولات تجزیه‌شده کلروفیل را به عنوان مهمترین ترکیبات آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های اسپیرولینا معرفی نمودند [۱۵]. در راستای این مطالعه، در مطالعه‌ای به بررسی اثر فتوتوکسیک اسپیرولینا بر سلول‌های سرطانی پرداختند. روش درمانی Photodynamic therapy (PDT) یکی از روش‌های جدید برای مبارزه با سلول‌های سرطانی است که در آن با استخراج کلروفیل و تبدیل آن به یک ترکیب جدید به نام Ppa به بررسی اثر فتوتوکسیک این ماده بر سلول‌های سرطانی پرداختند و نشان دادند که این ماده می‌تواند به عنوان ترکیبی در روش PDT مورد استفاده قرار گیرد [۲۰]. نتیجه این پژوهش نشان داد که بیان ژن Bcl-2 در اثر تیمار لاین سلولی با عصاره جلبک اسپیرولینا کاهش یافته است. با توجه به این که مقدار p-value کمتر از ۰/۰۵ است نتیجه به دست آمده معنی‌دار است.

نتیجه مطالعه‌ای نشان داد که بتا کاروتن می‌تواند خطر ابتلا به سرطان معده را کاهش دهد [۱۶] که مطابق با نتیجه به دست آمده از این پژوهش است. نتیجه تحقیق دیگری نیز به صورت همسویه نشان داد که بتا کاروتن با از بین بردن رادیکال‌های آزاد مانع سرطان پوست گردیده است [۱۷]. نتیجه مطالعه‌ای نشان داد که بتا کاروتن می‌تواند مورفولوژی سلول‌های سرطان شش ۶۹H- را تغییر داده و باعث کاهش رشد و تقسیم سلولی در آن‌ها گردد. محققان در آمریکا ثابت کردند که عصاره جلبک‌های دونالیلا و اسپیرولینا، بتا کاروتن، آلفاتوکوفرول و کانتازانتین می‌تواند باعث القای فاکتور نکروز تومور (α -TNF) گردد که منجر به کاهش خطر سرطان اپیدرموئید کیسه دهانی در موش می‌گردد [۱۸]. با توجه به نتایج به دست آمده از این پژوهش، مشاهده شد که بیان ژن Bcl-2 در اثر تیمار لاین سلولی با عصاره جلبک اسپیرولینا کاهش یافته است. با توجه به این که مقدار p-value کمتر از ۰/۰۵ است نتیجه به دست آمده معنی‌دار است. اسپیرولینا خاصیت آنتی‌اکسیدانی دارد و منجر به مهار رشد سلول‌های نوروبلاستوما و کاهش خطر سرطان کبد، شش، پوست، معده، پروستات در بدن موش شده است، هم‌چنین باعث تغییر و کاهش در تعداد و سائز سرطان‌ها و کاهش تخریب ماکولار و کوری در فرد، باعث افزایش سلول‌های کمکی T4 و افزایش ایمنی در بدن می‌شوند [۱۹]. نتیجه این پژوهش نیز نشان داد که تیمار با عصاره جلبک اسپیرولینا بر روی آپوپتوز سلول‌های

نتیجه‌گیری:

با توجه به تعداد کم مطالعاتی که در زمینه‌ی تأثیر آنتی‌اکسیدانی جلبک اسپیرولینا در دنیا انجام شده، این مطالعه برای بررسی تأثیر آنتی‌اکسیدانی اسپیرولینا، که از جمله سیانوباکترهای مطرح می‌باشد، بر روی سلول‌های سرطانی انجام شد. در این مطالعه از روش SYBER green و ژن GAPDH به عنوان ژن مرجع جهت بررسی بیان ژن Bcl-2 در رده سلولی U87 تیمار شده با عصاره جلبک اسپیرولینا استفاده شد. با توجه به نتایج به دست آمده از این پژوهش، مشاهده شد که بیان ژن Bcl-2 در اثر تیمار لاین سلولی با عصاره جلبک اسپیرولینا کاهش یافته است. با توجه به این که مقدار p-value که کمتر از ۰/۰۵ است نتیجه به دست آمده معنی‌دار است. پیشنهاد می‌شود که میزان بیان ژن تحت تأثیر

عصاره‌های جلبکی دیگر به منظور شناسایی مؤثرترین عصاره انجام شود.

تشکر و قدردانی:

به این وسیله نگارندگان مقاله از کسانی که پژوهش حاضر را یاری کردند سپاس‌گزاری می‌کنند. این مقاله از پایان‌نامه کارشناسی ارشد ژنتیک به شماره ثبت ۲۸۳۳۰۵۵۳۹۵۲۰۰۲ استخراج شده و هیچ‌گونه حامی مالی نداشته است.

تعارض منافع:

نویسندگان مقاله تصریح می‌کنند که بین نویسندگان هیچ‌گونه تعارض منافع وجود ندارد.

References:

- Laplante M, Sabatini DM. MTOR signaling in growth control and disease. *Cell*. 2013; 149: 274–293. DOI: 10.1016/j.cell.2012.03.017.
- Zacharaki EI, Wang S, Chawla S, Yoo DS, Wolf R, Melhem ER, et al. MRI-based classification of brain tumor type and grade using SVM-RFE. In: Proceedings of IEEE international symposium on biomedical imaging: from nano to macro. 2009; p. 1035–8. <https://doi.org/10.1109/isbi.2009.5193232>
- Cabone M, Bocchetta M, Cristaudo A, Gazdar A, Jasani B. SV40 and human brain tumors. *Int J cancer*. 2003; 106(1): 140–142. <https://doi.org/10.1002/ijc.11189>.
- Lawrence YR, Mishra MV, Werner-Wasik M, Andrews DW, Showalter TN, Glass J, Shen X, Symon Z, Dicker AP. Improving prognosis of glioblastoma in the 21st century: Who has benefited most cancer. 2012; 118: 4228–4234. <https://doi.org/10.1002/cncr.26685>.
- Gladson CL, Prayson RA, Liu WM. The pathobiology of glioma tumors. *Annu Rev Pathol*. 2010; 5: 33-50. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-121808-102109>.
- Qingyi W, Li L, Chen D. DNA Repair, Genomic Instability, and Cancer. *World Scientific*. ISBN. 2007; 981: 270-014- 5. doi: 10.4172/2157-2518.1000165.
- Supriya V. Novel Bcl2 inhibitor, disarray induces apoptosis by disruption of Bcl2-Bak interaction. *Biochemical Pharmacology*. 2017; 52: 45-53. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2017.02.015>
- Delamin Z; Mbita Z; Zungu M. Genealogy, expression and molecular mechanism in apoptosis. *Pharmacol*. 2004; 2: 1-15. PMID: 14729389.
- Ebrahimi E, Parsania M, Hosseini dost H. Effect of Different Concentrations of Alcoholic Extract of Aloe Vera Leaves on Coleopteran Cells Reproduction (Hela). *Journal of Physiology and Animal Husbandry*. 2015; 29 (8): 51- 58. [Persian]
- Toolabi- dezfouli Z, Mesbah M, Peyman R, Fazlara A, Zareei M. The Effect of Oral Use of Alcoholic Extract on Growth, Resistance and Pigmentation of Macro Fish Skin. *Iranian Journal of Veterinary Medicine*. 2016; 12 (1): 43- 52. [Persian]
- Toolabi- dezfouli Z, Mesbah M, Peyman R, Fazlara A, Zareei M. The Effect of Oral Use of Alcoholic Extract on Growth, Resistance and Pigmentation of Macro Fish Skin. *Iranian Journal of Veterinary Medicine*. 2016; 12 (1): 43- 52. [Persian]
- Munne-Bosch S, Penuelas J. Photo- and antioxidant protection during summer leaf senescence in *Pistiscia lentiscus* L. grown under Mediterranean field conditions. *Annals of Botany*. 2003; 92: 385-391. <https://doi.org/10.1093/aob/mcg152>.
- Becker EW, Venkataraman LV. *Biotechnology & Utilization of Algae: The Indian Experience*. New Delhi, India : Dept. of Science & Technology and Central Food Technological Research Institute, Mysore, India, 1985., Mangalore, India. 1985.
- Choonawala B, Swalaha FM. *Spirulina* sp. Production in brine effluent from cooling tower water, Durban Institute of Technology. A dissertation submitted in compliance with the requirements biotechnology, Durban University of technology, Durban. 2004.
- Al-Ameeri A, Cruz EM, Al-Sharrah T. Growth and performance of *Penaeus semisulcatus* fed with two commercial shrimp feeds. *Aquaculture Research*. 2006; 37: 1507-1515. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2006.01565.x>
- Jaime L, Mendiola JA, Herrero M, Soler-Rivas C, Santoyo S, Señorans FJ, et al. Separation and characterization of antioxidants from *Spirulina platensis* microalga combining pressurized liquid extraction, TLC, and HPLC-DAD. *J Sep Sci*. 2005; 28(16): 2111-9. <https://doi.org/10.1002/jssc.200500185>.
- Blot Wj, Li JY, Taylor PR, Guo W, Dawsey S, Wang GQ, Yang CS, Zheng, SF, Gaie M, Li GY, Yu Y, Liu B Q, Tangrea I, Sun YH, Liu F, Fraumeni JF, Zhang YH, Li B. Nutrition intervention trials in Linxian, China: Supplementation with specific vitamin/mineral

- combinations. Cancer incidence and disease-specific. 1993. <https://doi.org/10.1093/jnci/85.18.1483>.
17. Challem J. Beta-carotene and other carotenoids: promises failures and a new vision. *Journal of Orthomolecular Medicine*. 1997; 12(1): 11-19.
18. Schwartz JL, Shklar G. Prevention and regression of hamster oral squamous cell carcinoma following administration of carotenoids, in: "Antioxidant Nutrients and Immune Functions," A. Bendich, M. Phillips, R. Tengerdy, eds., Plenum Press, New York. 1989. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1990.tb00144.x>.
19. Talero E, Avila-Roman J, Motilva V. Chemoprevention with phytonutrients and microalgae products in chronic inflammation and colon cancer. *Current pharmaceutical design*. 2012; 18(26): 3939-65. <https://doi.org/10.2174/138161212802083725>.
20. Chaturvedi PK, Kim YW, Kim SS, Ahn WS. Phototoxic effects of pyropheophorbide-a from chlorophyll-a on cervical cancer cells. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*. 2014; 18(3): 182-7. <https://doi.org/10.1142/s1088424613501034>.

The effect of Spirulina Microalgae extract on Bcl-2 Anti-Apoptotic Gene Expression in Brain Cancer Cell Line

Mahsa Kavousi*¹, Delnaz Fatemimoghadam²

Received: 2019.10.1

Revised: 2020.01.07

Accepted: 2020.10.8

1. Department of Biology, East Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2. MS of Genetic, Department of Biology, East Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Pars Journal of Medical Sciences, Vol.17, No.3, Fall 2019

Pars J Med Sci 2019;17(3):17-25

Abstract:

Introduction:

U87 cell line contains glioblastoma cancer cells as the most acute type of human brain tumor. Increased expression of Bcl-2 gene in cancer cells has anti-apoptotic effect. In the present study the effect of Spirulina extract on gene expression in cancer cell line was investigated.

Materials and Methods:

In this in laboratory study, the U87 cell line was used. The brain cancer cell line was procured and cultivated from the Iranian Biological Resource Center. Cells were divided into two treatment and control groups. Spirulina alga extract was affected on the treatment group and its toxicity was measured using MTT assay (compound 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide for). The reference gene in this study was GAPDH. RNA was extracted from control and control cells and cDNA was made. The expression of genes was evaluated using $\Delta\Delta C_t$ in Real-time PCR.

Results:

The result of MTT assay showed that the IC₅₀ (Median Inhibition Concentration) value was 10.01 mg/ml for the 48 hour treatment. The result of Real-time PCR showed that the expression of Bcl-2 and the anti-apoptotic gene significantly decreased 3 folds in treatment group.

Conclusion:

According to the results of MTT assay and Real-time PCR, the expression of Bcl-2 significantly decreased 3 times in treatment group.

Keywords: Brain Cancer, Bcl-2, Real-time PCR, MTT, Spirulina

* Corresponding author Email: mkavoosi@iauet.ac.ir