فیزیولوژی و بیوتکنولوژی آبزیان
سال سوم، شماره چهارم، زمستان ۱۳۹۴

اثر عصاره سیانوباکتری *Oscillatoria* sp. روی رده سلولی MCF-7 سرطان پستان و بیان ژن کاسپاز ۳

فاطمه اکبری[۱]، علی صالح‌زاده[۲]*، محمد مهدی فرقانی فرد[۳]

تاریخ دریافت: بهمن ۹۴ تاریخ پذیرش: اسفند ۹۴

چکیده

سرطان پستان شایع‌ترین سرطان و دومین دلیل مرگ ناشی از سرطان بعد از سرطان ریه در زنان جهان است. تلاش‌های زیادی به منظور درمان این سرطان صورت گرفته که می‌توان به جراحی، رادیوتراپی و شیمی‌درمانی اشاره کرد. شیمی‌درمانی به دلیل اثرات جانبی، سمیت و مقاومت دارویی دارای محدودیت‌هایی است. بنابراین استفاده از روش‌ها و منابع جدید از جمله منابع دریایی به عنوان یک کاندیدای امیدوار کننده جهت درمان مطرح شده است. سیانوباکتری‌ها به دلیل داشتن ترکیبات موثر بر روند مرگ سلولی در سلول‌های سرطانی، ممکن است بتوانند به عنوان منبع جدیدی در درمان سرطان پستان مورد استفاده قرار بگیرند. در پژوهش حاضر، اثر عصاره هیدروالکلی سیانوباکتری *Oscillatoria* بر زیستایی سلول‌های سرطانی و بیان ژن کاسپاز ۳ (CASP3) در سلول‌های رده MCF-7 سرطان پستان بررسی شد. سلول‌های سرطانی پستان توسط عصاره هیدروالکلی *Oscillatoria* با غلظت‌های ۰/۰۷۵، ۰/۱۵، ۰/۳، ۰/۶، ۱/۲، ۲/۵، ۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تیمار شدند. تاثیر عصاره بر زیستایی سلول‌ها توسط تست MTT assay و تغییرات بیان ژن کاسپاز ۳ توسط Real Time PCR بررسی شد. نتایج این پژوهش نشان داد که با افزایش غلظت، زیستایی سلول‌ها کاهش پیدا کرد و اختلاف معنی‌داری را نسبت به نمونه شاهد نشان داد. همچنین نتایج Real Time PCR نشان داد که بیان ژن کاسپاز ۳ در زمان ۲۴ ساعت به طور معنی‌داری نسبت به نمونه شاهد افزایش یافت.

واژگان کلیدی: *سرطان پستان، کاسپاز ۳*، Oscillatoria.

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی میکروبی، گروه زیست‌شناسی، واحد دامغان، دانشگاه آزاد اسلامی، دامغان، ایران.
۲- استادیار گروه زیست‌شناسی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران.
۳- استادیار گروه زیست‌شناسی، واحد دامغان، دانشگاه آزاد اسلامی، دامغان، ایران.
* نویسنده مسئول: salehzadehmb@yahoo.com

مقدمه

افزایش بروز سرطان در دهه‌های اخیر در سطح جهان رابطه مستقیم با تغییرات عمده‌ای دارد که در نوع تغذیه و شیوه زندگی مردم در جوامع مدرن و صنعتی و نیمه صنعتی به وجود آمده است. طبق آمار سازمان بهداشت جهانی، پس از بیماری قلبی و عروقی دومین عامل مرگ و میر در جهان سرطان است (Siegel et al., 2016). سازمان بهداشت جهانی از سال ۲۰۰۹ تا ۲۰۱۳، ۱۲ میلیون و ۶۰۰ هزار مورد ابتلا به سرطان و ۷ میلیون و ۷۰۰ هزار مرگ و میر را اعلام کرده است (Steven et al., 2013). شایع‌ترین سرطان‌هایی که در جهان تشخیص داده شده‌اند سرطان ریه (یک میلیون و ۶۰۰ هزار مورد مرگ و میر)، سرطان پستان (یک میلیون و ۷۰۰ هزار نفر مرگ و میر) و سرطان روده بزرگ (یک میلیون و ۴۰۰ هزار نفر مرگ و میر) است (Zhu et al., 2012).

در ایالات متحده از هر هشت زن یک نفر در زندگی خود مبتلا به سرطان پستان می‌شود. این رقم در ایران ۲۵ تا ۳۰ در ۱۰ هزار نفر در جمعیت است (Mousavi et al., 2007). هر ساله در ایالات متحده بیش از یک میلیون و ششصد زن در جهان به این سرطان مبتلا می‌شوند که از این تعداد حدود ششصد هزار نفر می‌میرند (Siegel et al., 2015). اگرچه سرطان پستان دارای کم‌ترین نرخ ابتلا در ایران در مقایسه با سایر کشورهای آسیایی است (حریرچی و همکاران، ۱۳۸۰) ولی در طی چهار دهه گذشته افزایش میزان ابتلا به این بیماری باعث شد که سرطان پستان به عنوان یکی از بیماری‌های بدخیم با فراوانی بسیار بالا در بین زنان ایرانی شناخته شود (نوروزی‌نیا و ایزدی، ۱۳۸۸).

بیش‌ترین میزان مرگ و میر مربوط به این بیماری در سن ۴۴-۴۰ سالکی رخ می‌دهد. سرطان پستان یک بیماری وابسته به هورمون است و از عوامل خطر دیگر می‌توان به تنوع جغرافیایی، سن، تاریخچه فامیلی، تاریخچه حاملگی، بارداری، داروی ضدبارداری خوراکی، چاقی، رژیم غذایی پرچرب و مصرف الکل، نیز اشاره کرد (Yassaee et al., 2002; Deep and Agarwal, 2010). اختلال در عملکرد طبیعی حداقل ۴ الی ۶ ژن به وسیله سازوکارهای ژنتیک و اپی‌ژنتیک منجر به بروز سرطان پستان می‌شود. این ژن‌ها در حفظ تعادل میان تکثیر، مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی و تمایز سلول‌ها، تنظیم بروز گیرنده‌های استروئیدی، اتصال سلول‌ها و رگ‌زایی نقش

دارند (Fisch et al., 2005). با توجه به اثرات جانبی برخی داروهای شیمیایی، استفاده از منابع طبیعی با حداقل اثرات جانبی و تداخل دارویی مورد توجه قرار گرفته است.

یکی از مکانیسم‌های ضدسرطانی، مرگ برنامه‌ریزی شده سلول است. در صورتی که مکانیسم مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی به درستی عمل نکند، بیماری‌های مختلفی از جمله بیمارهای خودایمنی، تحلیل دهنده عصبی و انواع سرطان ایجاد خواهد شد. مکانیسم مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی پیچیده، دقیق و شامل آبشاری از رویدادهای مولکولی است. دو مسیر مختلف در مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی وجود دارد. یکی وابسته به رسپتورهای مرگ روی سطح سلول است که به عوامل خارج سلولی پاسخ می‌دهد و دیگری که مسیر ذاتی نامیده می‌شود وابسته به میتوکندری است. البته پژوهش‌های اخیر نشان داده است که این دو مسیر با هم در ارتباط هستند و این ارتباط به کاسپاز ۳ ختم می‌شود. کاسپاز ۳ یکی از کاسپازهای اجرایی است که می‌تواند در اثر پروتئولیز فعال شود و سایر پروکاسپازها را فعال کند. در نهایت مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی منجر به قطعه قطعه شدن DNA، تجزیه اسکلت سلولی و پروتئین‌های هسته‌ای و سرانجام جذب توسط فاگوسیت‌ها می‌شود (Elmore et al., 2007). سیانوباکتری *Oscillatoria* از جمله سیانوباکتری‌هایی است که دارای ترکیبات آنتی‌توموری و آنتی‌اکسیدانی است (Dixit and Suseela, 2013). همچنین به ترکیبات دیگری همانند کارتنوییدها، لیکوپن، بتاکاروتن، لوتین، فیکوبیلی‌پروتئین، فیکوسیانین، مشتقات تریپن، پلی‌ساکاریدها، گلوکان، لکتین، فنل، بتائیین، پلی‌پپتید می‌توان اشاره کرد. همچنین در خانواده سیانوباکتری‌ها خواص ضدباکتریایی، ضدقارچی و انگلی نیز گزارش شده است (Andreoli et al., 1986; Freile et al., 2004). در این پژوهش تاثیر عصاره هیدروالکلی سیانوباکتری *Oscillatoria* بر روند رشد رده سلولی MCF-7 سرطان پستان، نقش بازدارندگی آن بر روی سلول‌های سرطانی و تغییرات بیان ژن کاسپاز ۳ مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

تهیه سیانوباکتری و کشت آن

استوک سیانوباکتری *Oscillatoria* sp. از شرکت ریزجلبکی پارسیان (شهرستان رشت) تهیه شد و در محیط کشت زاندر منفی

(Sigma-Aldrich، آلمان) کشت داده شد. سیانوباکتری در دمای ۲۸درجه سانتی‌گراد با شدت نور ۳۵۰±۳۵۰۰ لوکوس و تحت شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی نگهداری داده شد. سپس محیط کشت از کاغذ صافی واتمن با قطر منفذ ۰/۴۵ میکرومتر عبور داده شد و مخلوط صاف شده لیوفیلیزه شد. برای تهیه عصاره، ۳ گرم پودر خشک شده سیانوباکتری *Oscillatoria* با ۱۰۰ میلی‌لیتر اتانول ٪۵۰ (Sigma-Aldrich، آلمان) مخلوط و روی شیکر انکوباتور مدل BTI8 (Memmert، آلمان) قرار گرفت. پس از ۲۴ ساعت مخلوط از کاغذ صافی عبور داده شد. محلول صاف شده در دستگاه روتاری (مدل RE301A-W، Memmert، آلمان) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت تا تغلیظ شود. سپس در آون (مدل ۵۰ لیتری، Memmert، آلمان) با دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد خشک شد. برای تهیه استوک به ۲۰ میلی‌گرم پودر خشک عصاره ۱۰ میکرولیتر محیط کشت فاقد سرم اضافی و به آرامی حل شد.

کشت سلول‌های سرطانی

رده سلولی MCF-7 از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه شد. مقدار یک میلی‌لیتر از سلول‌ها به فلاسک ۲۵ سانتی‌متر مربع منتقل شد و ۵ میلی‌لیتر محیط کشت RPMI1640 (Sigma-Aldrich، آلمان) به همراه ۵ میلی‌لیتر سرم جنین گاوی (FBS) ٪۱۰، ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر پنی‌سیلین و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر استرپتومایسین (Sigma-Aldrich، آلمان) اضافه شد. سپس به انکوباتور (مدل ۱۵۰ لیتری، Memmert، آلمان) کشت انتقال یافت و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد حاوی ٪۵ CO_2 و رطوبت ٪۹۵، کشت داده شد.

تست MTT

میزان حیات سلولی توسط تست MTT Assay بررسی شد. برای انجام این تست، بعد از دوبار پاساژ دادن، سلول‌ها به پلیت ۹۶ خانه (۱۰،۰۰۰ سلول در هر خانه) منتقل شدند. بعد از اتمام زمان تیمار سلول‌ها با عصاره *Oscillatoria* به مدت ۲۴ ساعت، محلول MTT (Sigma-Aldrich، آلمان) به چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه اضافه شد و پلیت به مدت ۳ ساعت در انکوباتور (مدل BTI8، Memmert، آلمان) ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس محلول رویی چاهک‌ها خالی شد. به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر محلول DMSO

(Dimethyl Sulfoxide) اضافه شد و برای حل کردن رسوب بنفش MTT، پلیت کشت به مدت ۱۰ دقیقه تکان داده شد. سپس توسط الایزا ریدر (مدل Elx800، Biotek، آمریکا) جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۵۹۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. همچنین شکل سلول‌ها به وسیله میکروسکوپ اینورت (مدل IX51، Olympus، ژاپن) بررسی شد.

برای محاسبه میزان اثر عصاره سیانوباکتری *Oscillatoria* بر روی سلول‌های سرطانی MCF-7 و بررسی میزان مرگ سلول‌های تیمار شده از رابطه ۱ استفاده شد (Poff et al., 2014):

رابطه ۱:

میزان مرگ سلول‌ها (٪) = 1-[(OD_E/OD_C)×100]

OD_E: جذب نوری سلول‌های تیمار شده با عصاره؛

OD_C: جذب نوری سلول‌های تیمار شاهد.

طراحی پرایمرها

توالی ژن کاسپاز ۳ از پایگاه اینترنتی NCBI (National Center for Biotechnology Information) گرفته شد و با توجه به آن، توالی پرایمر مورد نظر طراحی شد. پرایمرها توسط نرم افزار Becon Desingner طراحی شد و توسط NCBI BLAST از اختصاصی بودن محل اتصال پرایمرها اطمینان حاصل شد. مشخصات پرایمر در جدول ۱ آماده است.

جدول ۱: مشخصات پرایمرهای مورد استفاده

نام پرایمر	′5-′3	اندازه محصول (جفت باز)	دمای ذوب
CASPASE3- F	5′TGGTTCATCCAGTCGCTTG3′	۱۰۰	۵۶
CASPASE3- R	5′ATTCTGTTGCCTTTCG3′	۱۰۰	۵۰
B-ACTIN- F	5′TCCTCCTGAGCCAAGTA3′	۱۵۰	۵۰
B-ACTIN- R	5′CCTGCTTGCTGATCCACATCT3′	۱۵۰	۶۰

استخراج RNA و تهیه cDNA

برای استخراج RNA از کیت RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen، آلمان) استفاده شد. ابتدا سلول‌های رده MCF-7 با غلظت‌های ۰/۰۷۵، ۰/۱۵، ۰/۳، ۰/۶، ۱/۲، ۲/۵، ۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره به مدت ۲۴

ساعت انکوبه شدند و سپس سلول‌های شاهد (سلول‌های تیمار نشده با عصاره) و سلول‌های تیمار شده با عصاره جدا شدند و توسط بافر فسفات سالین شستشو داده شدند. سپس ۲ میلی‌لیتر RNX Plus (Qiagen، آلمان) به سلول‌ها اضافه شد و نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. سپس به میزان ۴۰۰ میکرولیتر کلروفرم (Sigma-Aldrich، آلمان) به نمونه‌ها اضافه شد. پس از ورتکس شدید، به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق نگه داشته شد. سپس با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ (مدل EB21، Hettich، آلمان) شد. بخش بالایی با سمپلر به یک تیوپ استریل منتقل و با ۵۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول (Sigma-Aldrich، آلمان) مخلوط شد و دوباره به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. پس از خارج کردن فاز بالایی، به فاز پایینی ۱ میلی‌لیتر اتانول ٪۷۵ اضافه شد. در ادامه، نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۷۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند و فاز رویی آن‌ها خارج شد. در مرحله آخر RNA در ۳۰ میکرولیتر آب مقطر استریل حل شد. کیفیت و کمیت مولکول‌های RNA به ترتیب با الکتروفورز روی ژل آگارز ٪۱ و با دستگاه نانودراپ (Scandrop، آلمان) مورد بررسی قرار گرفت. سپس cDNA با استفاده از کیت RevertAid (Thermo Scientific، آمریکا) از روی RNA استخراج شده، ساخته شد.

Real Time PCR

برای بررسی بیان ژن مورد مطالعه از روش کمیت سنجی با استفاده از دستگاه Real Time PCR (Bioneer، کره جنوبی) استفاده شد. محلول واکنش با حجم ۲۵ میکرولیتر در تیوب‌های مخصوص تهیه شد. این محلول شامل ۱ میکرولیتر cDNA، ۱ میکرولیتر از هر یک از پرایمرهای پیشین و پسین، ۱۲/۵ میکرولیتر آنزیم Taq پلیمراز (شرکت سیناژن، ایران) و ۹/۵ میکرولیتر آب مقطر بود.

آنالیز داده‌های Real Time PCR بر اساس مقایسه چرخه آستانه انجام شد. در این مطالعه، اختلاف چرخه‌های آستانه به دست آمده از نمونه‌های مورد آزمایش (سلول‌های تیمار شده با عصاره) و نمونه‌های شاهد محاسبه و با استفاده از فرمول ΔΔCt، نسبت ژن هدف به ژن مرجع (B-actin) از طریق $2^{-\Delta\Delta Ct}$ محاسبه شد، که محاسبه آن به شرح زیر است:

رابطه ۲:

$$\Delta Ct = Ct_{Target} - Ct_{Reference}$$
$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{Test\ Sample} - \Delta Ct_{Control\ Sample}$$
$$\text{Relative Expression: } 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Ct: چرخه آستانه؛ ΔCt: تفاوت بین چرخه آستانه سلول‌های شاهد و تیمار شده؛ ΔΔCt: تفاوت بین ΔCtهای سلول‌های شاهد و تیمار شده.

آنالیز آماری

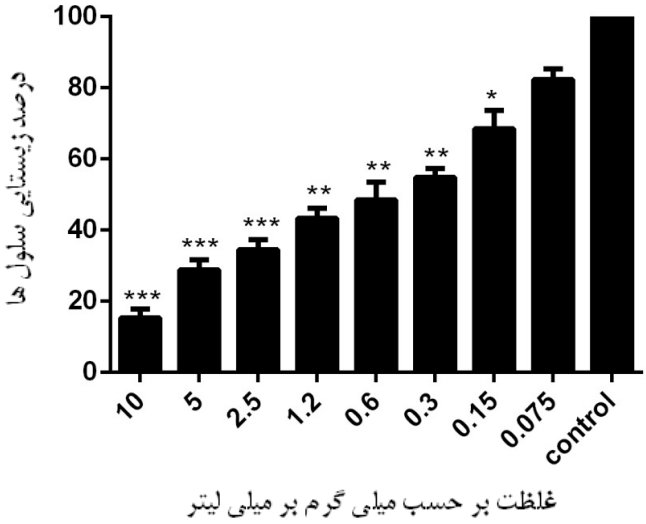
محاسبات آماری این مطالعه با استفاده از نرم افزار SPSS 16 انجام شد و داده‌ها با آنالیز واریانس یک‌طرفه (One Way ANOVA) مورد بررسی قرار گرفت و تفاوت بیان ژن‌های هدف و بین نمونه‌های شاهد و تیمار شده با آزمون Tukey's HSD محاسبه شد. نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار نمایش داده شده‌اند و P<۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج

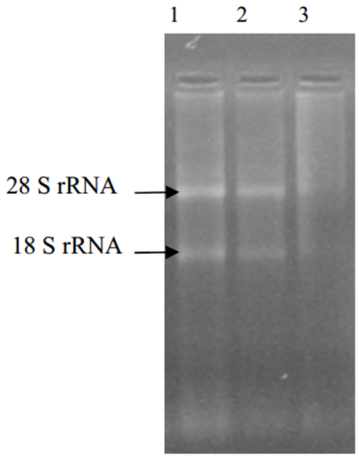
نتایج ریخت‌شناسی رده سلولی MCF-7 نشان داد که عصاره سیانوباکتری *Oscillatoria* تغییرات قابل توجهی در مقایسه با سلول‌های شاهد (فاقد عصاره) در ویژگی‌های ریخت‌شناسی سلول‌ها ایجاد کرده است.

نتایج بررسی زیستایی سلول‌ها نشان داد که بعد از ۲۴ ساعت، تحت تاثیر عصاره هیدروالکلی سیانوباکتری *Oscillatoria*، میزان بقای سلول‌ها تا حد زیادی کاهش یافت. در واقع در غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر پس از ۲۴ ساعت، اختلاف معنی‌داری مشاهده شد. غلظت ۰/۰۷۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره کم‌ترین اثر را روی میزان بقای سلول‌ها نشان داد که اختلاف معنی‌داری را نسبت به نمونه شاهد نداشت (شکل ۱).

پس از گذشت ۲۴ ساعت، در حضور غلظت ۰/۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره *Oscillatoria*، مهار ۵۰ درصدی زیستایی سلول‌ها مشاهده شد (P<۰/۰۰۱).



شکل ۱: زیستایی سلول‌های MCF-7 سرطان پستان تحت تاثیر عصاره سیانوباکتری *Oscillatoria* با غلظت‌های ۰/۰۷۵، ۰/۱۵، ۰/۳، ۰/۶، ۱/۲، ۲/۵، ۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر پس از ۲۴ ساعت.

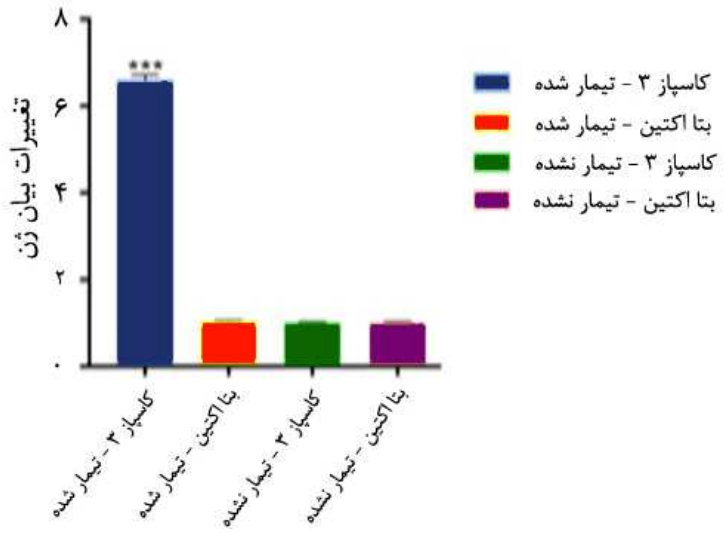


شکل ۲: نتایج استخراج RNA روی ژل ۱٪ آگارز

پس از استخراج RNA از سلول، کیفیت RNAهای استخراج شده روی ژل بررسی شد. در شکل ۲ باندهای ۱۸ S و ۲۸ S به طور واضح قابل تشخیص هستند که حضور این باندها نشان دهنده سالم بودن RNA استخراجی است.

نتایج به دست آمده از تجزیه و تحلیل آماری بیانگر تغییر در بیان ژن کاسپاز ۳ در رده سلولی MCF-7 تیمار شده با غلظت ۰/۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره بعد از ۲۴ ساعت بود.

ارزیابی آماری نشان داد که نسبت بیان ژن کاسپاز ۳ به ژن مرجع در رده سلولی MCF-7 تیمار شده با عصاره در غلظت IC_{50} نسبت به شاهد (Fold Change)، در طی ۲۴ ساعت، به میزان ٪۶/۵۹±۰/۸۳ تغییر یافت (P<۰/۰۰۱، شکل ۳).



شکل ۳: تغییرات بیان ژن کاسپاز ۳ تحت تاثیر عصاره هیدرو الکلی *Oscillatoria*

بحث

از مزیت‌های شناخته شده عصاره‌های ارگانیسم‌های دریایی، عدم وجود عوارض جانبی و گستردگی طیف اثر آن‌ها است (Chiheb et al., 2009). سرطان پستان شایع‌ترین سرطان‌های زنان در کل دنیا بوده، شیوع و ابتلا به این بیماری در اکثر کشورها از جمله ایران در حال افزایش است. از جمله علل مرتبط با شیب صعودی ابتلا به سرطان می‌توان به عوامل محیطی از جمله آلودگی هوا، استرس، الگوی زندگی و رژیم غذایی افراد اشاره کرد (Komarek, 1973; Miller et al., 1978). از طرفی دیگر، با وجود استفاده از راهکارهای درمانی از جمله جراحی، شیمی درمانی و رادیوتراپی، همچنان میزان مرگ و میر در بیماران مبتلا به سرطان بالا است که بیانگر ناکارآمدی این راهکارهای درمانی است. به علاوه، تاثیر مخرب شیمی درمانی و پرتونگاری بر سلول‌های طبیعی در حال تقسیم

نیز از جمله معایب دیگر مرتبط با این پروسه درمانی است. بنابراین استفاده از فرآورده‌های طبیعی به ویژه منابع دریایی که دارای خاصیت ضدسرطانی هستند در دو دهه اخیر افزایش یافته است (Piri and Ordog, 1997). از جمله این منابع دریایی می‌توان به سیانوباکتری *Oscillatoria* اشاره کرد که مطالعاتی راجع به اثرات ضدسرطانی این باکتری آبزی انجام شده است.

Mukund و Sivasubramanian در سال ۲۰۱۴ طی بررسی که درباره اثر سمیت سلولی سیانوباکتری *Oscillatoria* در رده سلولی A595 سرطان ریه انجام دادند، نشان دادند که غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر آن در طی ۲۴ ساعت توانست باعث مهار تکثیر سلول‌های سرطانی شد و شکل سلول‌های سرطانی را تغییر داد. بنابراین به این نتیجه رسیدند که سیانوباکتری *Oscillatoria* دارای خاصیت ضد سرطانی است (Mukund and Sivasubramanian, 2014) که با نتایج پژوهش حاضر همخوانی دارد. Kyadari و همکاران در سال ۲۰۱۴ اثر عصاره سیانوباکتری *Oscillatoria* را بر روی سلول های سرطانی دهانه رحم انسان بررسی کردند. نتایج تست MTT در مطالعه آن‌ها نشان داد که عصاره این سیانوباکتری در کاهش تکثیر سلول‌های سرطانی دهانه رحم نقش داشت و غلظت ۲۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر باعث مهار تکثیر سلول‌های سرطانی شد که از لحاظ مهار تکثیر با این پژوهش مطابقت دارد (Kyadari et al., 2014).

Jinhui و Wang در سال ۲۰۱۴ مشخص کردند که ترکیب Microcystin در سیانوباکتری *Oscillatoria* در غلظت ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بعد از ۴۸ ساعت دارای اثر کشندگی ۵۰ درصدی بر سلول‌ها بود. آن‌ها همچنین نشان دادند که بیان ژن‌های P53، bax و bcl-2 تغییر کرد. این امر بیانگر این مطلب بوده که این ترکیب توانسته بر روی مراحل مرگ برنامه‌ریزی شده سلول تاثیرگذار باشد (Jinhui and Wang, 2014). از آنجا که ژن کاسپاز ۳ هم از ژن‌های آپوپتوزی است، نتایج پژوهش حاضر با مطالعه آن‌ها (Jinhui and Wang, 2014) مطابقت دارد. Bing و همکارانش در سال ۲۰۱۰ تاثیر ضدسرطانی ترکیب فیکوسیانین خانواده Nostocaceae را بر روی رده سرطان پستان MCF-7 بررسی کردند. نتایج حاصل حاکی از آن بود که این ترکیب باعث مهار تکثیر سلولی این رده سلول‌های سرطانی شده، همچنین منجر به

تغییرات فراساختاری از جمله از دست دادن میکروویلی، تراکم کروماتین و تغییرات غشایی شد (Bing et al., 2010). Wolf و همکاران در سال ۲۰۰۸ طی بررسی که درباره اثر مهاری سیانوباکتری *Lyngbya majuscula* بر روی بیان ژن کاسپاز ۸ انجام دادند دریافتند که این سیانوباکتری به علت داشتن ترکیبات ضدسرطانی منجر به مهار تکثیر سلول‌های سرطان پستان شد (Wolf et al., 2008).

با توجه به پژوهش‌های یاد شده در بالا، می‌توان دریافت که عصاره سیانوباکتری، اثرات ضدسرطانی متفاوتی را در سرطان‌های مختلف و حتی روی یک رده سلولی یکسان از خود نشان می‌دهند. سیانوباکتری‌ها به دلیل داشتن ترکیبات ثانویه قادر هستند اثرات زیستی متفاوتی از خود نشان دهند. نتایج به دست آمده نشانگر این است که در مدت زمان ۲۴ ساعت، با افزایش غلظت عصاره، میزان زنده ماندن سلول‌های سرطانی کاهش می‌یابد که احتمالا به دلیل تاثیر عصاره بر مسیر مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی است. اثرات سیتوتوکسیک عصاره هیدروالکلی *Oscillatoria* می‌تواند از طریق افزایش بیان ژن کاسپاز ۳ اعمال شود. خاصیت القای مرگ سلولی و افزایش بیان ژن کاسپاز ۳ را می‌توان به وجود ترکیبات ویژه در *Oscillatoria* نسبت داد. سیانوباکتری‌ها دارای رنگیزه‌های فیکوسیانینی هستند که به عنوان یک ماده ضدسرطانی شناخته شده‌اند و فعالیت آنتی‌اکسیدانی قوی دارند که مقاومت بدن را به داروهای پرتودرمانی بالا می‌برند. همچنین ترکیبات پلی‌ساکاریدی در عصاره به دست آمده از سیانوباکتری در کمک به سیستم دفاعی بدن نقش به سزایی دارد (Andreoli et al., 1986).

بررسی منابع نشان داد که مطالعات کمی در زمینه اثر عصاره سیانوباکتری *Oscillatoria* بر بیان ژن‌های مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی صورت گرفته است. با توجه به این که این سیانوباکتری در موارد اندکی از سرطان‌ها مورد بررسی قرار گرفته است، انجام مطالعات گسترده بر روی ویژگی‌های ضدسرطانی و مکانیسم اثر این سیانوباکتری در مهار تکثیر سلولی و بررسی‌های بالینی و آزمایشگاهی، ضروری است.

منابع

حریرچی آ.، ابراهیمی م.، زمانی ن. و منتظری آ. ۱۳۸۰. سرطان سینه در ایران. مجله سلامتی،۲(۵): ۱۴۳-۱۴۱.

نوروزی‌نیا م. و ایزدی پ. ۱۳۸۸. مروری مختصر بر کاربرد اپی‌ژنتیکی در سرطان پستان. مجله ژنتیک در هزاره سوم، ۷(۴): ۱۸۸۷-۱۸۸۴.

Andreoli S.P., Mallet S. and Bergstein M.P. 1986. Role of glutathione in protecting endothelial cells against hydrogen peroxide oxidant injury. Journal of Laboratory and Clinical Medicine, 108: 190–195.

Bing L., Xianming C.H., Meihua G. and Wuxiu L. 2010. Apoptotic mechanism of MCF-7 breast cells *in vivo* and *in vitro* induced by photodynamic therapy with C-phycocyanin. Acta Biochimica et Biophysica Sinica, 42(1): 80–89.

Chiheb I., Riadi H., Martinez L.J. and Dominguez S. 2009. Screening of antibacterial activity in marine green and brown macroalgae from the coast of Morocco. African Journal of Biotechnology, 8: 1258–1264.

Deep G. and Agarwal R. 2010. Antimetastatic efficacy of silibinin: Molecular mechanisms and therapeutic potential against cancer. Cancer and Metastasis Reviews, 29(3): 447–463.

Dixit R.B. and Suseela M.R. 2013. Cyanobacteria: Potential candidates for drug discovery. Antonie van Leeuwenhoek, 103: 947–961.

Elmore S. 2007. Apoptosis: A review of programmed cell death. Journal of Toxicologic Pathology, 35(4): 495–516.

Fisch T., Pury P., Probst N., Bordoni A., Bouchardy C. and Frick H. 2005. Variation in survival after diagnosis of breast cancer in Switzerland. Annals of Oncology, 16(12): 1882–1888.

Freile P.N. and Morales J.L. 2004. Antibacterial activity in marine algae from the coast of Yucatan, Mexico. Botanica Marina, 47: 140–146.

Jinhui L.I. and Wang Q. 2014. Effect of Microcystin-LR on cell viability and apoptosis-related proteins in primary cultured Sertoli cells for 48h. Life Science Journal, 11(12): 704–710.

Komarek J. 1973. Culture collections. P: 519–524. In: Carr N.G. and Whitton B.A. (Eds.). The biology of blue-green algae. Blackwell Scientific Publ.

Kyadari M., Fatma T., Velpandian T., Malliga P., Bharat N. and Bano F. 2014. Antiangiogenic and antiproliferative assessment of cyanobacteria. Indian Jornal of Experimental Biology, 52(8): 835–842.

Miller D.E., Green J.C. and Shiroyama T. 1978. The *Selenastrum capricornatum* Printz algal assay bottle test: Experimental design, application and interoperation protocol. Corvallis Environmental Research Laboratory, Office of Research and Development, U.S. Environmental Protection Agency. 126P.

Mousavi S.M., Montazeri A., Mohagheghi M.A., Jarrahi A., Harirchi I., Najafi M. and Ebrahimi M. 2007. Breast Cancer in Iran: An Epidemiological Review. The Breast Journal, 13(4): 383–391.

Mukund S. and Sivasubramanian V. 2014. Anticancer activity of *Oscillatoria terebriformis*, cyanobacteria in human lung cancer cell line A549. International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology, 5(2): 34–45.

Piri Z.M. and Ordog V. 1997. Effect of some herbicides commonly used in Iranian agriculture on aquatic food chain. Ph.D. Thesis, Hungarian Academy of Science, 130P.

Poff A.M., Ari C., Arnold P., Seyfried T.N. and Agostino D.P. 2014. Ketone supplementation decreases tumor cell viability and prolongs survival of mice with metastatic cancer. The International Journal of Cancer, 135: 1711–1720.

Siegel L., Miller D. and Ahmedin J. 2015. Cancer Statistics, 2015. A Cancer Journal for Clinicians, 65: 5–29.

Siegel L., Miller D. and Ahmedin J. 2016. Cancer Statistics, 2016. A Cancer Journal for Clinicians, 66: 7–30.

Steven S., Coughlin S.S. and Cypel Y. 2013. Epidemiology of Breast Cancer in Women. Springer Science Business Media, New York. 399P.

Wolf W., Ainhoa M., Vicente A., Simone S. and Takashi L. 2008. The marine lipopeptide somocystinamide A triggers apoptosis via caspase 8. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 105(7): 2313–2318.

Yassaee V.R., Zeinali S., Harirchi I., Jarvandi S., Mohagheghi M.A. and Hornby D.P. 2002. Novel mutation in the BRCA1 and BRCA2 genes in Iranian women with early-onset breast cancer. Breast Cancer Research, 4(4): 71–79.

Zhu L., Pickle L.W. and Ghosh K. 2012. Predicting US- and state-level cancer counts for the current calendar year: Part II: evaluation of spatiotemporal projection methods for incidence. Cancer, 118: 1100–1109.

Aquatic Physiology and Biotechnology
Vol. 3, No. 4, Winter 2016

The effect of *Oscillatoria* sp. cyanobacterium extract on MCF-7 breast cancer cell line and CASP3 gene expression

Fatemeh Akbari[1], Ali Salehzadeh[2]*, Mohammad Mahdi Forghani Fard[3]

Received: February 2016 Accepted: March 2016

Abstract

Breast cancer is the most common cancer and the second leading cause of cancer death in women after lung cancer. Many efforts, including surgery, radiation and chemotherapy, have been made to treat breast cancer. Due to some drawbacks of chemotherapy such as toxicity and drug resistance, some other strategies, including use of marine resources, have recently been developed. Cyanobacteria have some effective compounds that can induce the process of cell death in cancer cells and might be promising candidate for cancer therapy. In the present study, the effect of hydro-alcoholic extract of *Oscillatoria* cyanobacterium on the viability and gene expression of caspase 3 (CASP3) in MCF-7 breast cancer cell line was examined. Breast cancer cell lines were treated with concentrations of 0.075, 0.15, 0.3, 0.6, 1.2, 2.5, 5 and 10 mg/mL of *Oscillatoria* extract. The effect of extracts on the viability of cells was evaluated by MTT assay and alteration of caspase 3 gene expression was checked out by Real Time PCR. The results showed that the MCF7 cell viability was reduced in the presence of increasing concentration of the extract with significant differences compared to the control samples. The results of Real Time PCR showed that the expression of caspase 3 significantly increased after 24 h in comparison with the control group.

Key words: *Breast Cancer*, *Caspase 3*, Oscillatoria.

1- M.Sc. Student in Microbial Biotechnology, Department of Biology, Damghan Branch, Islamic Azad University, Damghan, Iran.
2- Assistant Professor in Department of Biology, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran.
3- Assistant Professor in Department of Biology, Damghan Branch, Islamic Azad University, Damghan, Iran.
*Corresponding Author: salehzadehmb@yahoo.com