مقاله پژوهشی

اثرات سمیت عصاره سیانوباکتری *Phormidium animale* بر رده سلولی سرطان سینه (MCF-7) و آنالیز بیان ژن سرکوبگر تومور p53

علی اصغر عزیزی جیرآبادی[۱]، سید عطا اله سادات شاندیز[۱،*] و مریم عباسی[۱]

۱- گروه زیست شناسی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

*نویسنده مسئول: سید عطا اله سادات شاندیز، دکتری تخصصی زیست‌شناسی، ata.sadatshandiz@iauctb.ac.ir

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۹/۲/۴ تاریخ بازنگری: ۱۳۹۹/۵/۲۶ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۹/۸/۲۸

چکیده

پیشینه مطالعه و هدف: سرطان سینه، یکی شایع¬ترین سرطان‌ها و دومین عامل مرگ و میر در زنان به شمار می‌رود. هدف از این مطالعه، بررسی اثرات ضد سرطانی عصاره سیانوباکتری *Phormidiumm animale* با کمک آزمون MTT و ارزیابی بیان ژنی p53 در رده سلولی سرطان سینه می باشد.

روش مطالعه: در این مطالعه رده های سلولی سرطانی سینه (MCF-7) و نرمال (HEK293) تحت تیمار عصاره *Phormidiumm animale* با غلظت‌های مختلف ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی گرم در میلی‌لیتر طی زمان ۲۴ ساعت قرار گرفتند. درصد زنده مانی سلول‌ها برروی رده‌های سلولی با کمک روش رنگ سنجی MTT ارزیابی شد. بیان کمی ژن P53 نسبت به ژن کنترل GAPDH با کمک تکنیک Real-time PCR بررسی شد.

نتایج: نتایج تست MTT نشان داد که عصاره *P. animale*، میزان زنده مانی سلول‌های سرطانی را نسبت به سلول‌های نرمال به طور معنی داری کاهش می دهد. همچنین، بیان ژن p53 بعد از تیمار با غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر عصاره *P. animale* به ترتیب ۳/۳۴ ، ۵/۱۵ و ۹/۱۱ برابر نسبت به ژن کنترل افزایش یافت.

نتیجه گیری: نتایج این پژوهش نشان داد که عصاره سیانوباکتری *P. animale* توانایی کشتن سلول‌های سرطانی را دارد و این امر می‌تواند با کمک مرگ برنامه ریزی شده آپوپتوز با افزایش بیان ژن p53 در رده ی سلولی سرطانی سینه MCF-7 انجام گیرد.

واژه‌های کلیدی: *Phormidiumm animale*، سلول‌های سرطان سینه، بیان ژن، p53

مقدمه

سرطان سینه یکی از فراوان‌ترین سرطان‌های بدخیم غیر پوستی در میان زنان تشخیص داده شده است، که در این میان ۱۲ ٪ از کل سرطان‌ها و ۲۵٪ از سرطان‌های زنان را در سال ۲۰۱۲ به خود اختصاص داده است. کمترین نرخ شیوع این بیماری در کشورهای در حال توسعه و بیشترین نرخ در کشورهای توسعه یافته دیده می‌شود (Albeshan *et al.*, 2018). تخمین زده شده که تقریبا با افزایش ۱۸/۴ ٪ از سال ۲۰۱۲ تا سال ۲۰۲۰، ۱/۹ میلیون زن مبتلا به این بیماری شوند (Torre *et al*,, 2015). تقریبا ۲۵٪ از وراثت سرطان سینه در ارتباط با جهش‌هایی در ژن‌های بسیار با نفوذی از جمله BRCA1، BRCA2، TP53، PTEN، STK11 و CDK1 می‌باشند (Shiovitz and Korde, 2015). این جهش‌ها در ارتباط با خطر توسعه سرطان سینه می‌باشد که از ۵۰٪ نیز تجاوز می‌کنند (Ghoussaini *et al.*, 2013; Venkitaraman, 2014).

سرکوبگر تومور p53 یک پروتئین سرکوب کننده تومور است که توسط ژن TP53 کد گذاری می‌شود. این پروتئین نقشی کلیدی در کنترل سیستم سلولی ایفا می‌کند. همچنین رشد، تکثیر و ازدیاد سلولی و آپوپتوز را تنظیم می‌کند و ثبات کروموزومی را گسترش می‌دهد (Kern *et al.*, 1991). جهش در ژن تولید کننده p53 منجر به

سرطان‌زایی می‌شود. جهش‌های p53 در ۲۵- ۱۸٪ ازکارسینوم‌های اولیه سینه دیده می‌شود. همچنین، p53 نقش مهمی در پیش‌بینی سرطان سینه دارد. از طرف دیگر، بیان بالای p53 منجر به پاسخ ضعیفی به شیمی درمانی می‌شود (Alsner *et al.*, 2000).

امروزه، اثرات ضدسرطانی ترکیبات طبیعی برگرفته از ارگانیسم‌هایی مانند سیانوباکتری‌ها مشخص شده است. سیانوباکتریای دریایی منبع غنی از متابولیت‌های متابولیک ثانویه زیستی است که از مسیرهای بیوسنتز ترکیبی حاصل می شود. سیانوباکتری‌ها به دلیل داشتن ترکیبات موثر بر روند مرگ سلولی در سلول‌های سرطانی، می‌توانند به عنوان منبع جدیدی در درمان سرطان مورد استفاده قرار بگیرند. علاوه بر این، متابولیت‌های سیانوباکتریایی دارای عملکردهای ویژه زیستی هستند. از جمله فعالیت‌های ضد میکروبی، سرکوب‌کننده سیستم ایمنی، ضد سرطان، ضد HIV (ویروس نقص ایمنی بدن انسان)، ضد باکتری، ضد انعقاد، ضد قارچی، ضد التهابی، ضد ویروس، ضد پروتئینی، ضدتروکولوژیک، ضد ویروسی و ضد تومور می‌باشد (Gademann and Portmann, 2008; Wase and Wright, 2008).

در این میان، جنس *Phormidium* شامل تعداد زیادی از گونه‌ها از محیط‌های آب شیرین و دریایی، با اندازه و نسبت سلول‌های مختلف وجود دارند. گونه‌های متعلق به جنس *Phormidium* می‌توانند طیف وسیعی از سیانوتوکسین‌ها را تولید کنند. شایع‌ترین سموم تولید شده آناتوکسین A (ATX) و هوموآناتوکسین A (HTX) و مشتقات ساختاری آنها می‌باشد (Catherine *et al.*, 2013; Borges *et al.*, 2015).

با توجه به شیب صعودی شیوع سرطان سینه در ایران طی دو دهه گذشته، در این پژوهش بر آن شدیم تا اثرات عصاره‌ی سیانوباکتری *Phormidium animale* بر دو رده‌ی سلولی سرطان سینه MCF-7 و رده ی سلولی نرمال HEK293 مورد بررسی قرار گیرد. همچنین میزان بیان ژن در سطح mRNA ژن p53 را به عنوان سرکوبگر تومور که نقشی کلیدی در کنترل سیستم سلولی ایفا می‌کند، مورد ارزیابی قرار گیرد.

روش مطالعه

تهیه عصاره *Phormidium animale*: در این تحقیق سیانوباکتری *Phormidium animale* از کلکسیون ریزجلبک‌ها در پژوهشکده علوم پایه کاربردی جهاد دانشگاهی، دانشگاه شهید بهشتی (شهر تهران) تهیه شد. جهت اطمینان از خالص بودن نمونه، خالص سازی سیانوباکتری *Phormidium animale* به روش پلیت آگار بر روی محیط کشت جامد BG11 انجام شد (Andersen, 2005). جهت تهیه عصاره، ۳ گرم پودر خشک شده سیانوباکتری با ۱۰۰ میلی لیتر اتانول ۵۰ درصد مخلوط گردید و روی انکوباتور شیکردار در مدت یک شبانه روز قرار گرفت. پس از گذشت این مدت، مخلوط مورد نظر از کاغذ صافی عبور داده شد. سپس، عصاره توسط دستگاه تقطیر در خلاء تا حد خشکی تغلیظ و غلظت آن مشخص شد. در نهایت رقت‌های مختلف از عصاره در شرایط استریل تهیه شد.

کشت سلولی: رده‌های سلولی سرطان سینه MCF-7 و رده ی سلولی نرمال HEK293 از انستیتو پاستور ایران تهیه شد. محیط کشت $RPMI_{1640}$ مکمل شده با ۱۰٪ سرم FBS برای کشت سلولی مورد استفاده قرار گرفت. درصد سلول‌های زنده با رنگ آمیزی سلول توسط تریپان بلو تعیین گردید. هنگامی که تعداد سلول‌ها در داخل فلاسک به تراکم در حدود ۸۰٪ رسید، پاساژ داده شدند چرا که رشد آنها نیازمند مواد مغذی و فضای کافی و خروج مواد زائد از آنها بود.

تیمار سلول‌ها با استفاده از آزمون MTT: روش رنگ سنجی MTT یکی از تست‌هایی است که بر اساس احیا شدن و شکسته شدن کریستال‌های زرد رنگ تترازولیوم بوسیله آنزیم سوکسینات دهیدروژناز و تشکیل کریستال‌های آبی رنگ نامحلول انجام می‌شود (Hekmat *et al.*, 2020). بنابراین میزان زنده‌مانی سلول‌ها مورد بررسی قرار گرفت. بعد از رسیدن سلول‌ها به سطح پوشش مناسب، سوسپانسیون سلولی (۲×۱۰^{۴} سلول در هر میلی لیتر) در میکروپلیت‌های ۹۶ خانه کشت داده شد و به مدت ۲۴ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد، ۵٪ دی‌اکسید کربن و ۹۵٪ رطوبت انکوباتور تیمار گردید. سپس غلظت‌های مختلف تهیه شده از عصاره‌های سیانوباکتری *Phormidium animale* به میزان ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم در میلی لیتر به چاهک‌های حاوی سلول ها افزوده شد. از محیط کشت حاوی یک درصد DMSO (دی متیل سولفوکساید) به عنوان کنترل منفی استفاده گردید. میکروپلیت‌های حاوی سلول و عصاره به مدت ۴۸ ساعت در شرایط یکسان انکوبه شدند. سپس ۲۰ میکرولیتر محلول MTT (سیگما آلدریچ، آلمان) به هر چاهک اضافه گردید و به مدت ۳ ساعت دیگر انکوبه شد. به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر محلول DMSO اضافه شد و برای حل کردن رسوب بنفش MTT، پلیت کشت به مدت ۱۰ دقیقه تکان داده شد. سپس توسط قرائت‌گر الایزا جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۵۷۰ نانومتر اندازه گیری شد. درصد میزان مرگ سلول‌ها نیز از فرمول ۱ محاسبه شد:

$$\text{میزان مرگ هاسلول}(\%) = 1 - [\left(\frac{OD_E}{OD_C}\right) \times 100] \qquad (۱)$$

در فرمول ۱، OD_E و OD_C به ترتیب جذب نوری سلول‌های تیمار شده با عصاره و جذب نوری سلول‌های تیمار شاهد می‌باشند. درصد

بقاء سلولی در گروه کنترل منفی ۱۰۰ منظور و درصد بقاء سلول‌هایی که تحت تاثیر غلظتی خاص از عصاره قرار گرفته‌اند با تقسیم جذب چاهک‌های تیمار شده به جذب کنترل منفی ضربدر ۱۰۰ محاسبه گردید. غلظتی از ترکیبات مورد آزمایش که درصد حیات سلولی را به نصف تقلیل دهد، به عنوان IC_{50} در نظر گرفته شد.

ارزیابی بیان ژن p53 با کمک تکنیک Real-time PCR:

به منظور ارزیابی بیان ژن، استخراج RNA کل سلولی با کشت تعداد $۱×۱۰^{۶}$ سلول در هر ویال پلیت ۶ خانه‌ای انجام گرفت. پس از تیمار با غلظت های عصاره سیانوباکتری انکوباسیون در انکوباتور CO_2 دار با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انجام گرفت. استخراج RNA با کیفیت و کمیت مناسب از سلول‌های MCF-7 و HEK293 با استفاده از کیت استخراج RNA شرکت سیناکلون، طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام گرفت. تمامی نمونه‌های RNA استخراج شده از سلول‌ها، با استفاده از دستگاه بایوفتومتر کمپانی شرکت اپندورف براساس میزان نانوگرم بر میکرولیتر و با توجه به طول موج ۲۶۰ تعیین کمیت شد (Dejakam *et al.*, 2020). به منظور سنتز cDNA، ۰/۲g/µl (Random Hexamer)، ۰/۵ g/µl (پرایمر Oligi dT)، ۱۰۰ U آنزیم MMULV و ۱۰ میکرولیتر RNA به هر لوله افزوده شد به طوری که حجم نهایی واکنش در نهایت ۲۰ ماکرولیتر بدست آمد. نمونه ها به مدت ۵ دقیقه در ۶۵ درجه سانتی گراد قرارداده شد. سپس بلافاصله در یخ گذاشته شد. لوله ها به مدت ۱ ساعت در ۴۲ درجه سانتی گراد قرار داده شدند. در این مطالعه از گلیسر آلدهید فسفات دهیدروژناز (GAPDH) به عنوان کنترل داخلی استفاده گردید. توالی رونوشت ژنهای مورد نظر از پایگاه اینترنتی www.ncbi.nlm.nih.gov دریافت گردید (جدول ۱). توالی پرایمرهای طراحی شده با استفاده از نرم افزار BLAST در توالی ژنوم انسان جستجو شد تا از ویژگی توالی و یکتا بودن محل اتصال آن‌ها اطمینان حاصل شود. به منظور تجزیه و تحلیل صحت سنتز cDNA، واکنش PCR انجام شد. در واکنش پلی مرازی از پرایمرهای یاد شده از ژن‌های p53 و GAPDH استفاده شد. واکنش PCR در حجم نهایی ۲۰ میکرو لیتری محتوی ۱ میکرولیتر از cDNA سنتز شده، ۱۰µl میکرولیتر مستر میکس (یکتا تجهیز)، ۵µl آب فاقد نوکلئاز، ۲µl پرایمر جلوبر، ۲µl پرایمر برگشتی انجام شد.

روش کمیت سنجی Real-time PCR به منظور آنالیز بیان ژن‌های p53 و GAPDH با کمک دستگاه Real-time PCR مدل ABI 7300 (Applied Biosystems ,Foster City,CA,USA) انجام گرفت.

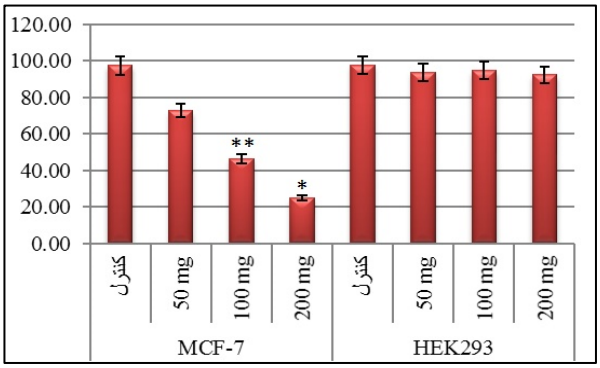
تجزیه و تحلیل آماری: داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS ویرایش ۲۲ مورد آنالیز آماری قرار گرفتند و برای آنالیز آماری داده‌ها از آزمون t استفاده شد و $P<0.05$ به عنوان سطح معنی‌داری مورد استفاده قرار گرفت. برای رسم نمودارها از نرم افزار Excel استفاده شد.

جدول ۱. آغازگرهای استفاده شده برای این پژوهش (Lagunas-Cruz *et al.*, 2019)

ژن	GC%	bp	پرایمر (5' to 3')
Forward Primer p53	٪۵۵	۶۰۰	GCTGCCCTGGTA GGTTTTCT
Reverse Primer p53	٪۵۵		TGCTGGATCCCCA CTTTTCC
Forward primer GAPDH	٪۵۰	۲۴۴	AAGGGCCCTGAC AACTCTTT
Reverse primer GAPDH	٪۶۰		CTCCCCTCTTCAA GGGGTCT

نتایج

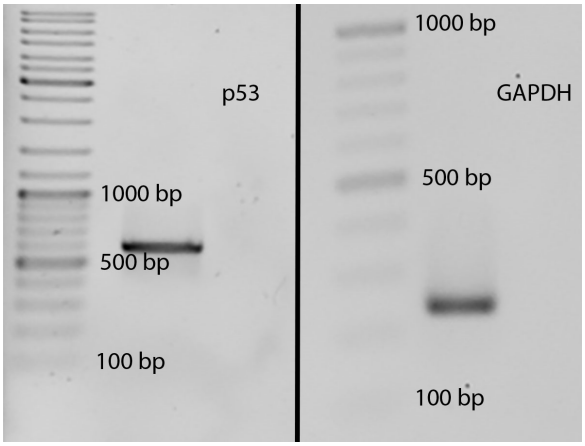
بررسی میزان بقاء سلولی با استفاده از روش MTT نشان داد که عصاره سلولی *P. animale* رشد سلول‌های MCF-7 و HEK293 را به صورت وابسته به دوز کاهش می‌دهد (نمودار ۱). بیشترین مهار تکثیر رده سلولی سرطانی در ۲۴ ساعت مربوط به غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بوده که از لحاظ آماری معنی دار بود ($P<۰/۰۰۱$) این درحالی بود که در تمامی غلظت‌های عصاره بر روی رده ی سلولی نرمال نسبت به گروه کنترل اختلاف معنی داری نشان نداد.



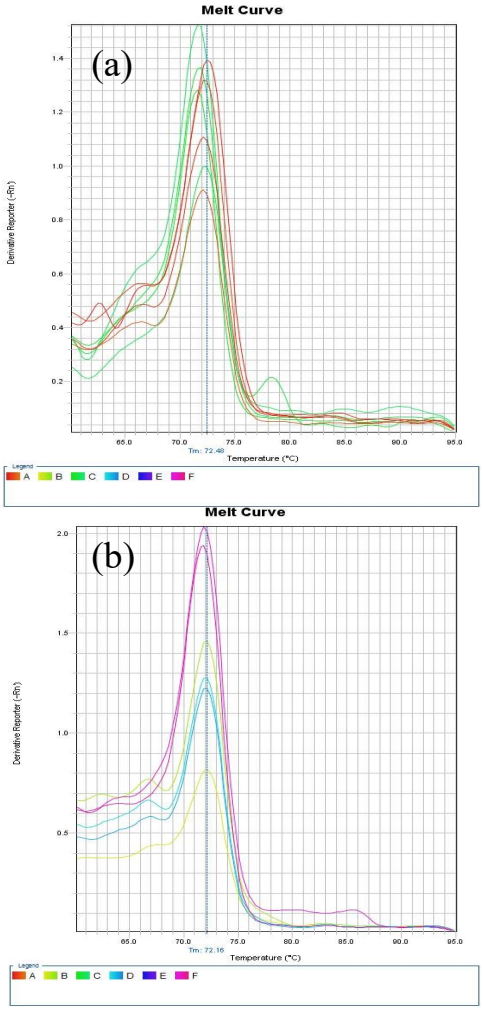
نمودار ۱- درصد زنده‌مانی سلول‌ها در دو رده سلولی سرطانی MCF-7 و نرمال HEK293. مقادیر به‌دست آمده به صورت درصد زنده مانی در مقایسه با نمونه‌های کنترل و به صورت میانگین ± انحراف معیار گزارش شد و تفاوت میانگین ها در سطح $P<۰/۰۵$ در نظر گرفته شده است (*:$P<۰/۰۵$، **:$P<۰/۰۱$).

برای اطمینان از نمونه‌های cDNA سنتز شده از سلول‌ها، با استفاده از روش PCR، نمونه‌ها تکثیر یافته و با استفاده از ژل آگارز

الکتروفورز شدند (شکل ۱). نتایج حاصل از آنالیز منحنی ذوب ژن‌های p53 و GAPDH در زیر نشان داده شده است. منحنی ذوب واحد بیانگر عدم وجود محصول غیر اختصاصی می باشد (شکل ۲).

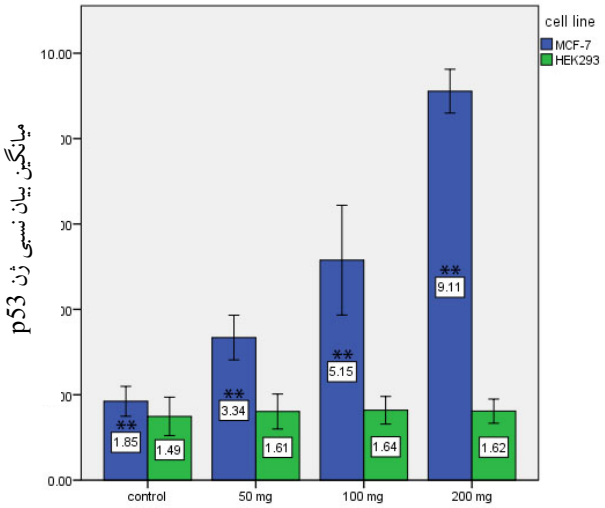


شکل ۱- نتایج حاصل از تکثیر ژن‌های p53 و GAPDH در سلول MCF-7



شکل ۲- منحنی‌های ذوب ژن‌های p53 (a) و GAPDH (b)

همچنین این نتایج در رده سلولی HEK293 معنی‌دار نبود. این نتایج بدین معنی است که استفاده از عصاره سیانوباکتری، بیان این ژن را به طور معنی‌داری در رده سلولی MCF-7 بالا برد و تاثیری بر رده سلولی HEK293 نداشت (نمودار ۲).



نمودار ۲- میانگین بیان نسبی ژن p53 در سطوح مختلف عصاره سیانوباکتری

بحث

شیمی درمانی یکی از بیشترین درمان‌هایی است که امروزه برای سرطان‌ها مورد استفاده قرار گرفته است، که دارای اثرات جانبی تهدید کننده برای بیمار بوده و از طرفی منجر به مقاومت دارویی، شکست درمان و اثر بخشی کم بر گسترش سلولهای سرطانی مقاوم به دارو می‌شود. از اینرو، کشف ترکیبات جدید یک فرآیند هزینه بردار و طولانی مدت است. بنابراین جامعه جهانی، رویکردی در جهت کاهش هزینه ها، تولید داروهایی موثر، در جهت کاهش اثرات جانبی و افزایش کارایی آنها است (Bajpai *et al.*, 2009). از طرفی، اثرات ضدسرطانی ترکیبات طبیعی برگرفته از ارگانیسم‌هایی مانند سیانوباکتری‌ها مشخص شده است. اخیرا تولید ترکیبات بیواکتیو با کاربردهای تجاری و پزشکی علاقه به مطالعه در مورد سیانوباکتری ها را افزایش داده است (Tan, 2007).

پژوهش‌های گذشته تاثیر مهارکنندگی عصاره سیانوباکترها بر رشد و تکثیر سلول‌های سرطانی گزارش شده است. پائول و همکاران در سال ۲۰۱۲ دو گروه از سیانو باکتری‌های جنس *Phormidium* را با استفاده از عصاره‌های خام خالصی بر روی سلول‌های سرطانی گردن رحم (HeLa) مورد ارزیابی قرار دادند. سمیت سلولی با استفاده از

آزمون‌های پایداری سلولی مانند آزمون کاهش دهنده و آزمون حذف رنگی تریپان آبی مورد ارزیابی قرار گرفت. با استفاده از تست MTT با افزایش میزان درمان، کاهش تدریجی میزان زنده ماندن سلول را نشان دادند. آنها همچنین ارائه کردند که گونه *valderianum Phormidium* موثرتر از سایرین بود. تغییرات متفاوتی در مورفولوژی سلولی و هسته مشاهده کردند. القای مرگ سلولی یکی از شایع‌ترین روش‌ها در جهت کنترل رشد کلی سلول‌های سرطانی است، زیرا بیشتر سلول‌های سرطانی از پیشرفت طبیعی به مرگ سلول‌ها جلوگیری می‌کنند. مطالعه آنها اولین گزارش از فعالیت ضد تکثیر عصاره آبی این دو گونه *Phormidium* بر روی سلول‌های HeLa انجام شده است (Paul *et al.*, 2012).

علاوه بر این، متابولیت‌های سیانوباکتریایی عملکردهای جالب بیولوژیکی فراوانی از جمله فعالیت‌های ضد میکروبی، سرکوب‌کننده سیستم ایمنی، ضد سرطان، ضد ویروس نقص ایمنی بدن انسان، ضد قارچی، ضد التهابی، ضد ویروس، ضد پروتئینی، ضد ویروسی و ضد تومور دارا می باشند (Gademann and Portmann, 2008; Wase and Wright, 2008). ویجیاکومار و همکاران در سال ۲۰۱۵ عنوان کردند که زیرگونه‌های *Phormidium* دارای ترکیبات بیواکتیو شامل Caylobolide B می‌باشند که می‌تواند در زمینه تومورهای بدخیم روده بزرگ و واژن مورد استفاده قرار گرفته شود. *Caylobolide B* به عنوان یک جامد بی رنگ و بی شکل با فرمول مولکولی $C_{42}H_{80}O_{11}$ می‌باشد (Vijayakumar and Menakha, 2015). همچنین اثرات ضد سرطانی سایر گونه‌های سیانوباکتری مورد مطالعه دیگر پژوهشگران قرار گرفت. صیاد دلشادپور و همکاران با بررسی فعالیت ضد سرطانی عصاره سیانوباکتری اسیلاتوریا علیه رده سلولی سرطان پستان MCF-7 نشان دادند طی مدت ۲۴ ساعت با IC50 با مقدار ۰/۳۲۴±۰/۴۳۲ محاسبه شد. در نتایج آنها بیان کاسپاز ۹ افزایش یافته گزارش شد (Salehzadeh *et al.*, 2018). در دیگر مطالعه، رحمت االهی و همکاران به بررسی اثرات سمیت و آپوپتوزی عصاره اسیلاتوریا با غلظت‌های مختلف طی زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت با استفاده از روش MTT پرداختند، نتایج آنها نشان داد عصاره مورد بررسی سمیت وابسته به دوز داشته و میزان زنده مانی سلول‌ها را به طور معنی‌داری کاهش می‌دهد (Salehzadeh *et al.*, 2018).

در پژوهش حاضر، اثرات سمیت غلظت های مختلف عصاره سیانوباکتری *Phormidiumm animale* بر روی رده سلولی سرطان سینه MCF-7 و سلول نرمال HEK293 مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج بررسی زنده ماندن رده سلولی نشان داد که عصاره سیانوباکتری پس از ۲۴ ساعت از زمان واکنش باعث کاهش معنی‌دار زنده مانی سلول‌های سرطانی تحت تاثیر عصاره می‌شود. در حالی که در سلول‌های نرمال تیمار شده با غلظت‌های مختلف عصاره، اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد.

طبق بیشتر مطالعات، عصاره سیانوباکتری‌ها در درمان سرطان مورد استفاده قرار گرفته شده است. نتایج این پژوهش هم توانست همین عمل را نشان دهد. اما مکانیسم عمل این عصاره همچنان ناشناخته باقی مانده است. در این پژوهش علاوه بر سمیت عصاره سیانوباکتری، ارزیابی بیان ژنی p53 را در رده‌های سلولی MCF-7 انجام گرفت که بطور معنی‌داری افزایش نشان داد. همانطور که قبلا ذکر شده بود، ژن p53 به عنوان سرکوبگر تومور عنوان شده است. این بدین معنی است که این عصاره توانسته در تمامی سطوح بیان این ژن را بالا ببرد. اما همچنان نمی‌توان گفت که این عصاره را به عنوان سرکوب تومور عنوان کرد. چون در چرخه سرطان، تعداد بسیار بالایی از ژن‌ها وجود دارد که در توسعه سرطان نقش ایفا می‌کنند. ولی در هر صورت این ژن به عنوان یک آنکوژن، یکی از مهمترین ژن‌های در ارتباط با سرطان می‌باشد. اما طبق نتایج، عصاره این سیانوباکتری در تمامی سطوح مورد استفاده هیچ تاثیری بر بیان ژن p53 در رده سلولی HEK293 نداشت.

نتیجه‌گیری

در این پژوهش برای اولین بار اثرات ضد توموری عصاره سیانوباکتری *Phormidiumm animale* در افزایش بیان ژن سرکوب‌گر توموری p53 در رده سلولی سرطانی سینه MCF-7 نشان داده شد. همچنین نتایج نشان داد اثر کشندگی این سیانوباکتری برروی سلول‌های سرطانی بستگی به غلظت و زمان دارد. بنابراین، رویکرد بالقوه دارویی سیانوباکتری‌ها نیازمند توجه بیشتر در تحقیقات مدل‌های حیوانی و داروسازی می‌باشد که می‌تواند جهت کمک درمانی در زمینه‌های مختلف درمانی از جمله سرطان باشد.

تقدیر و تشکر

این مقاله حاصل پایان نامهٔ نویسندهٔ اول است. بدین وسیله از دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی و تمامی افرادی که در انجام این پروژه همکاری داشته اند، قدردانی می گردد.

مراجع

Albeshan, S.M., Mackey, M.G., Hossain, S.Z., Alfuraih, A.A. and Brennan, P.C. 2018. Breast cancer epidemiology in gulf cooperation council countries: A regional and international comparison. Clinical breast cancer, 18(3): e381-e392.

Andersen, R.A. 2005. Algal culturing techniques. Elsevier.

Bajpai, R., Sharma, N.K. and Rai, A.K. 2009. Hepatosplenomegaly and phytotoxicity of a planktonic cyanobacterium nostoc sp. Bhu001 isolated from agricultural pond. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 25(11 :(.۲۰۰۳-۱۹۹۵

Borges, H., Branco, L., Martins, M., Lima, C., Barbosa, P., Lira, G., Bittencourt-Oliveira, M. and Molica, R. 2015. Cyanotoxin production and phylogeny of benthic cyanobacterial strains isolated from the northeast of brazil. Harmful Algae, 4.۵۷-٤٦ :۳

Catherine, Q., Susanna, W., Isidora, E.-S., Mark, H., Aurelie, V. and Jean-François, H. 2013. A review of current knowledge on toxic benthic freshwater cyanobacteria–ecology, toxin production and risk management. Water research, 47(15): 5464-547.۹

Dejakam, A., Dejakam, A. and Hekmat, A. 2020. Evaluating of bdnf expression in blood cells of opium recovering patients with a new treatment method: A molecular marker. Research in Karyotic Cell &Tissue, 1(1): 16-25.

Gademann, K. and Portmann, C. 2008. Secondary metabolites from cyanobacteria: Complex structures and powerful bioactivities. Current Organic Chemistry, 12(4): 326-341.

Ghoussaini, M., Pharoah, P.D .and Easton, D.F. 2013. Inherited genetic susceptibility to breast cancer: The beginning of the end or the end of the beginning? The American journal of pathology, 183(4): 1038-1051.

Hekmat, A., Afrough, M., Hesami Tackallou, S. and Ahmad, F. 2020. Synergistic effects of titanium dioxide nanoparticles and paclitaxel combination on the DNA structure and their antiproliferative role on mda-mb-231cells. Journal of Nanoanalysis, 7(2): 152-165.

Kern, S.E., Kinzler, K.W., Bruskin, A., Jarosz, D., Friedman, P ,.Prives, C. and Vogelstein, B. 1991. Identification of p53 as a sequence-specific DNA-binding protein. Science, 252(5013): 1708-1711.

Lagunas-Cruz, M.d.C., Valle-Mendiola, A., Trejo-Huerta, J., Rocha-Zavaleta, L., Mora-García, M.d.L., Gutiérrez-Hoya, A ,.Weiss-Steider, B. and Soto-Cruz, I. 2019. Il-2 induces transient arrest in the g1 phase to protect cervical cancer cells from entering apoptosis. Journal of oncology, 2019.

Paul, S., Pal, R. and Kundu, R. 2012. Antiproliferative activity of phormidium valderianum and phormidium tenue (cyanobacteria) on human cervical cancer cells (hela) in vitro. Algal Biomass Utln, 3(4): 30-37.

Salehzadeh, A., Sayyad Delshadpour, F. and Sadat Shandiz, A. 2018. Cytotoxicity effect and changes in the expression of caspase ۹-gene in breast cancer cell line (mcf-7) treated with the extract of oscillatoria cyanobacteria. Qom University of Medical Sciences Journal, 12(1): 26-34.

Shiovitz, S. and Korde, L.A. 2015. Genetics of breast cancer: A topic in evolution. Annals of Oncology, 26(7): 1291-1299.

Tan, L.T. 2007. Bioactive natural products from marine cyanobacteria for drug discovery. Phytochemistry, 68(7): 954-979.

Venkitaraman, A.R. 2014. Cancer suppression by the chromosome custodians, brca1 and brca2. Science, 343.۱٤۷٥-۱٤۷۰ :(٦۱۷۸)

Vijayakumar, S. and Menakha, M. 2015. Pharmaceutical applications of cyanobacteria—a review. Journal of Acute Medicine, 5(1): 15-23.

Wase, N.V. and Wright, P.C. 2008. Systems biology of cyanobacterial secondary metabolite production and its role in drug discovery. Expert opinion on drug discovery, 3(8): 903-929.

Research in Karyotic Cell &Tissue, Volume 1, Issue 2, 2020 Pages 15-20

Research Article

Cytotoxicity effects of *Phormidium animale* cyanobacterium extract on breast cancer cell line (MCF-7) and analysis of the expression of tumor suppressor p53 genes

Ali Asghar Azizi Jirabadi[1], Seyed Ataollah Sadat Shandiz[1,*] and Maryam Abbasi[1]

[1] Department of Biology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

*Correspondence to Seyed Ataollah Sadat Shandiz, Ph.D., ata.sadatshandiz@iauctb.ac.ir

Received 23rd April 2020 Revised 16th August 2020 Accepted 18th Desember 2020

Abstract

Introduction and Aim: Breast Cancer is the most prevalent type of tumor and is also have second major death among women. The aim of the current study was to investigate the anticancer properties of *Phormidiumm Animale* cyanobacterium extract using MTT assay and through modulation of *p53* gene expression in breast cancer cells.

Methods: In the current study, the breast cancer MCF-7 and normal HEK293 cell lines were treated with various concentrations of *P. animale* extract ranging 50, 100, 200 mg/mL for 24 hours. Cell viability was measured using MTT (3-(4, 5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) assay against cell lines. The gene expressions of p53 compared with GAPDH were measured using the real-time PCR method.

Results: The MTT results showed that *P. animale* significantly decreased the viability of cancer cells compared to normal cells in dose-dependent mode. Moreover, the mRNA levels of *p53* were significantly increased from 3.34 in MCF-7 cells to 5.15 and 9.11 fold, respectively, following treatment with 50, 100, and 200 mg/mL *P. animale* extract.

Conclusion: The data suggest that *P. animale* extract can induce cytotoxicity and might modulate apoptosis by up-regulating *p53* gene expression in human breast cancer MCF-7 cell line.

***Keywords*:** *Phormidiumm animale*, Breast cancer cells, Gene expression, P53.