

بررسی اثر سایتوکسیستی عصاره غضروف کوسه بر رده سلولی آدنوکارسینومای پستان (MCF7)

سمیه شاهرخی^۱، دکتر طوبی غضنفری^۲، دکتر محمد علی محققی^۳، دکتر زهیر محمد حسن^۴، دکتر غلامرضا بابایی^۵

تاریخ دریافت: ۸۳/۱۱/۲۰ تاریخ پذیرش: ۸۴/۹/۷

چکیده

مقدمه: غضروف کوسه ماهی منبع ترکیبات ضدگزایی و ضد توموری است که خاصیت ضد رگزایی آن به اثبات رسیده است. با توجه به اینکه مدارک معتبر بسیار کمی در مورد مکانیسم احتمالی این ماده در مهار مستقیم رشد سلولهای تومور وجود دارد. لذا در این مطالعه اثر آن به طور مستقیم بر رده سلولی آدنوکارسینومای پستان مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روشها: در این مطالعه آزمایشگاهی پس از کشت و تکثیر سلولهای L929 و MCF7 به منظور تعیین اثر سایتوکسیک عصاره غضروف کوسه ماهی، این سلولها در مجاورت دوزهای مختلف عصاره غضروف کوسه (۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ mg) قرار گرفتند و به مدت ۲۴، ۴۸، ۷۲ ساعت آنکوبه شدند. پس از پایان آنکوباسیون تست MTT انجام شد.

بافته‌های پژوهش: نتایج حاصل از تست MTT نشان داد که این عصاره، اثر سایتوکسیستی وابسته به دوز بر MCF7 دارد که این ویژگی با گذشت زمان افزایش می‌یابد به طوریکه با افزایش دوز عصاره ، رشد سلولهای توموری بیشتر می‌شود، مثلا در دوز ۱۰۰ mg و آنکوباسیون ۷۲ ساعته، بیشترین درصد مرگ سلولی مشاهده شد در حالی که در سلولهای طبیعی این سایتوکسیستی مشاهده نشد که بیانگر اثر سایتوکسیستی انتخابی عصاره غضروف کوسه بر سلولهای توموری می‌باشد.

نتیجه گیری‌نهایی: عصاره غضروف کوسه با اثر سایتوکسیک مستقیم بر سلولهای توموری MCF7، می‌تواند باعث مهار رشد این سلولها شود.

واژه‌های کلیدی: سرطان پستان، غضروف کوسه ماهی، سایتوکسیستی

- ۱- کارشناس ارشد ایمونولوژی دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، نویسنده مسؤول
E-mail: Shahrokh_so@yahoo.com
- ۲- دانشیار گروه ایمولوژی دانشکده پزشکی، دانشگاه شاهد
- ۳- دانشیار مرکز تحقیقات سرطان انسیتو کانسیر، دانشگاه علوم پزشکی تهران
- ۴- دانشیار ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس
- ۵- دانشیار گروه آماری زیستی دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس

عصاره را بر تومور 2-VX در قرنیه خرگوش تأثیر دادند و بیشترین اثر ضد رگزایی را در دو نوع از این فراکشنها یافتند (۱۴، ۸).

شروع و همکاران در سال ۱۹۹۸ فراکشنی حاوی دو پروتئین با وزن مولکولی ۱۰ و ۱۴ کیلو دالتون با اثر ضد رگزایی و ضد تومور از غضروف کوسه ماهی جدا کردند، این فراکشن (U-995-U) دارای اثر مهاری بر مهاجرت و تکثیر سلولهای آندوتیال عروقی بوده و می‌تواند کلائزولیز را مهار نماید (۱۶).

اما مکانیسم احتمالی دیگر این ماده مهار مستقیم رشد سلولهای توموری در اثر خاصیت سایوتوكسیسیتی آن می‌باشد، که مدرک علمی معتبری در تأیید این نظر وجود ندارد. در این مطالعه تصمیم گرفته شد که اثر غضروف کوسه را به طور مستقیم بر رده سلولی آدنوکارسینومای پستان (MCF7) بررسی کنیم.

مواد و روشها

الف) عصاره گیری از غضروف کوسه ماهی: پس از خردباری غضروف کوسه ماهی از بنادر بوشهر و پاک کردن و شستن آن با آب مقطر، غضروفها چرخ شده و به مدت یک شب در فریزر نگهداری شدند. سپس با استفاده از دستگاه لیوفلیزانور، نمونه لیوفلیزه شده و سپس پودر شد. ده گرم از پودر غضروف در ۱۰۰ سی سی بافر حاوی گوانیدیوم هیدروکلراید ۴ مولار، pH= ۰/۸ با حل استات سدیم ۱/۰ حل شد، به این بافر ۶ آنتی پروتئاز با غلظتهاي زير اضافه شد (۵):

1mM PMSF و 6.25mM EDTA
10 mM N-Ethyl maleimide,
12.5mM 6-Aminohexanoic acid,
2mM Idoacetic acid, HClو .25 mM
0.25 mM Benzamidine HCL

مقدمه

مطالعات متعددی در تأیید این نکته که غضروف منبع ترکیبات ضد رگزایی و ضد توموری است وجود دارد (۹، ۶، ۱).

عدد ای از محققین معتقدند که اسکلت غضروفی کوسه ماهی سبب محافظت آن در برابر تومور می‌شود (۸، ۱۷)، چرا که تفاوت اصلی کوسه با سایر حیوانات، اسکلت کاملاً غضروفی و بدون استخوان آنهاست (۱۰). با انتشار این نظریه، عدد زیادی از محققین تحقیقات خود را بر غضروف کوسه ماهی متمرکز کردند (۱۶، ۱۴). غضروف کوسه علاوه بر این که یک ماده مغذی است خصوصیات زیر را نیز دارا می‌باشد:

- حاوی مواد ضد رگزایی است که سبب مهار رشد تومورها می‌شود (۱۶، ۱۴).
- سبب بهبود پاسخهای سیستم ایمنی و افزایش تولید آنتی بادی می‌گردد (۱۷، ۹).

۳- خاصیت ضد التهابی در بهبودی رخمهای داشته و در بیماریهای ایمنی مثل آرتیت مؤثر است (۹، ۱۷).

۴- غضروف کوسه همچنین می‌تواند نقش مهمی در محافظت از جهش زایی DNA در برابر رادیکالهای آزاد داشته باشد (۷). از نظر تئوریک مکانیسمهای مذکور در درمان سرطانها مؤثر می‌باشد.

همچنین بیشترین مطالعات پیرامون اثر عصاره غضروف کوسه ماهی برمهار رشد سلولهای آندوتیال رگی انجام شده است و خاصیت ضد رگزایی آن اثبات شده است (۱۱، ۱۴). اویکاو^۱ و همکارانش در سال ۱۹۹۰ از عصاره غضروف کوسه، چهار فراکشن جدا کردند و فراکشن های حاوی وزن مولکولی یک تا ده کیلو دالتون این

-
1. Oikaw
 2. Sheu

سانتیگراد حاوی CO_2 %۵ انکوبه شدند. پس از پایان زمان انکوباسیون سلولها $1/10$ ، حجم هر چاهک (۰-۲ میکرولیتر) MTT به چاهکها اضافه شد. سپس مجدداً پلیت در انکوباتور ۳۷ درجه ساعت انکوبه شد، مایع رویی چاهکها به طور کامل خارج گردید و به جای آن ۱۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول اسیدی ۴٪. مولار اضافه شد. پس از حل شدن کریستالها، مایع بنفسن رنگی حاصل شد که در طول موج ۵۴۰ نانومتر بوسیله دستگاه ELISA Reader خوانده شد(۱۱،۱۰). با استفاده از فرمول زیرمیزان مهار شدن سلولها محاسبه شد. (لازم به ذکر است آزمایشات به صورت سه تایی و هر تست ۳ بار تکرار شد).

$$\frac{1}{100} \times \text{حدب تست} = \text{درصد مرگ سلولی}$$

جذب کنترل

نتایج حاصل از تست MTT که با دستگاه ELISA Reader ثبت شد و با استفاده از فرمول فوق به درصد مرگ سلولی تبدیل و از نظر آماری آنالیز شد. آنالیز آماری نتایج تجربی با نرمآفزار T student و ANOVA و SPSS تحلیل انجام شد.

یافته های پژوهش

آنالیز آماری نتایج نشان داد که در زمان انکوباسیون ۲۴ ساعته، درصد مرگ سلولی با افزایش دوز عصاره غضروف کوسه در MCF7 افزایش یافته بود. همچنان که در نمودار ۱ مشاهده می شود افزایش درصد مرگ سلولی وابسته به دوز در انکوباسیون ۴۸ ساعته سلولهای MCF7 دیده شد و این میزان در مقایسه با زمان ۲۴ ساعت انکوباسیون این سلولها افزایش داشت، ولی این افزایش از نظر آماری معنی دار نبود($p=0.057$). در سلولهای L929 این روند افزایش بسیار

سپس به ازای هر ۱۰ میلی لیتر از بافر، مقدار یک گرم پودر غضروف اضافه شد. محلول حاصله به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شد. سپس با نیروی ۹۰۰۰ و به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید(۹،۶،۴).

میزان پروتئین مایع رویی حاوی عصاره پروتئین های غضروف کوسه ماهی، به روش برادفورد سنجیده شد. سپس عصاره به دست آمده، از فیلتر با قطر ۲۲/۰ میکرون عبور داده شد و در حجم های کوچک تقسیم و تا زمان مصرف در فریزر با دمای -۲۰ درجه سانتیگراد نگهداری شد.

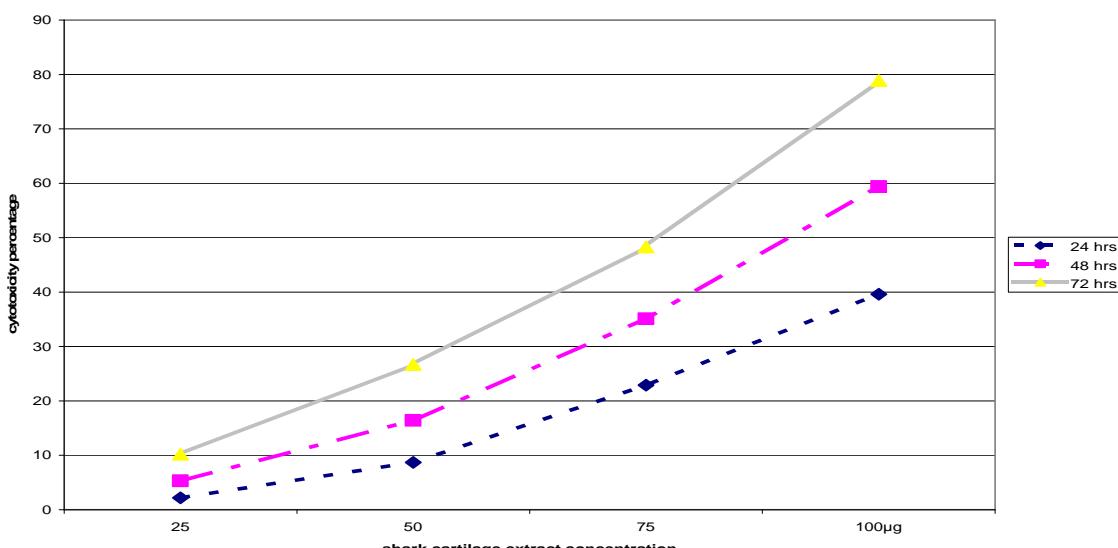
ب) شرایط کشت رده سلولی: MCF7 که یک رده سلولی آدنوکارسینومای پستان و L929 که یک رده سلولی نرمال است از انسیتو پاستور تهران خریداری شد. جهت بررسی اثر سایوتوتوكسیسیتی انتخابی عصاره از سلولهای نرمال L929 استفاده شد. سلولها در محیط کشت کامل (RPMI حاوی ۱۰% FBS) رشد و تکثیر یافتهند تا پس از رسیدن به میزان کافی، در تست سایوتوتوكسیسیتی از آنها کشت داده شود.

ج) تست سایوتوتوكسیسیتی: حفظ تست MTT به میزان ۲۰۰۰۰ عدد از سلول L929 و MCF7 در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه با کف صاف به مدت یک شب کشت داده شد، پس از چسبیدن سلولها به کف پلیت، محیط کشت رویی چاهکها خالی شد و دوزهای مختلف از عصاره غضروف کوسه ماهی ($100\ \mu\text{g}$, $75\ \mu\text{g}$, $50\ \mu\text{g}$, $25\ \mu\text{g}$, $200\ \mu\text{g}$) به میزان ۲۰۰ میکرولیتر به چاهک های تست اضافه شد. به چاهکهای کنترل منفی تنها محیط کشت RPMI حاوی ۱۰% FBS اضافه شد. ردیف بلانک تنها

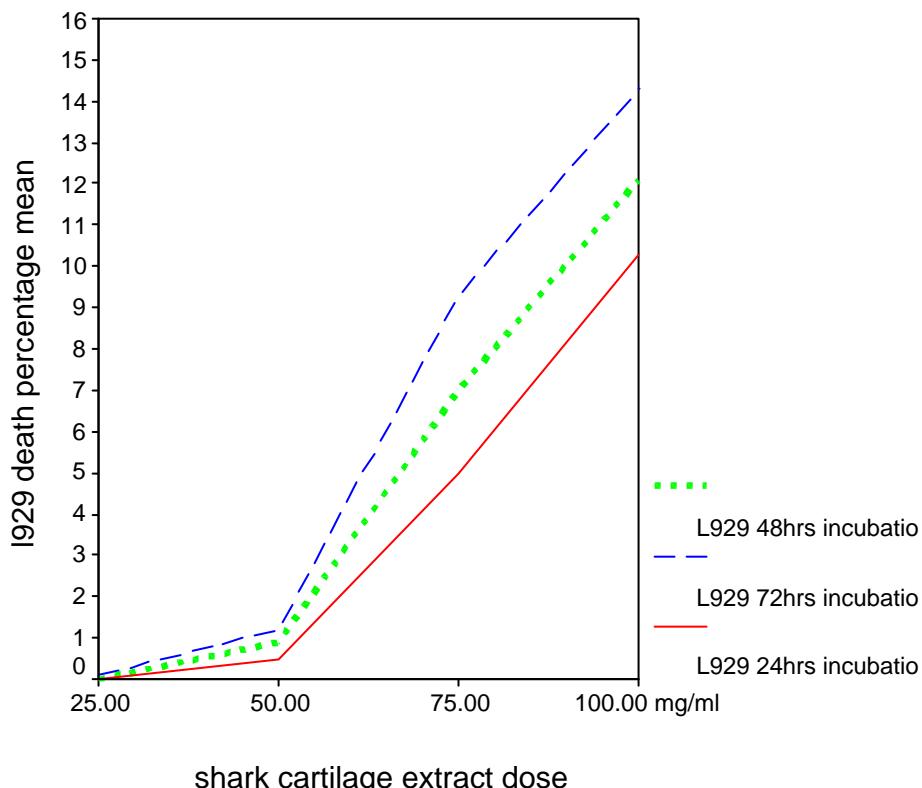
حاوی ۲۰۰ میکرولیتر محیط RPMI حاوی ۱۰% FBS بود(بدون سلول). پلیت های کشت به مدت ۴۸، ۳۶ و ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه

تغییر معنی‌داری دیده نشد ($p = 0.142$). همچنانکه در نمودار ۳ مشاهده می‌شود میزان درصد مرگ سلولی در این دو سلول روند افزایشی وابسته به دوز دارد که با گذشت زمان بیشتر می‌شود و آنالیز نتایج با استفاده از تی‌ تست ANOVA اختلاف معنی‌داری در تمام غلظتها و در هر سه زمان بین این دو نوع سلول را نشان داد ($P = 0.27$)

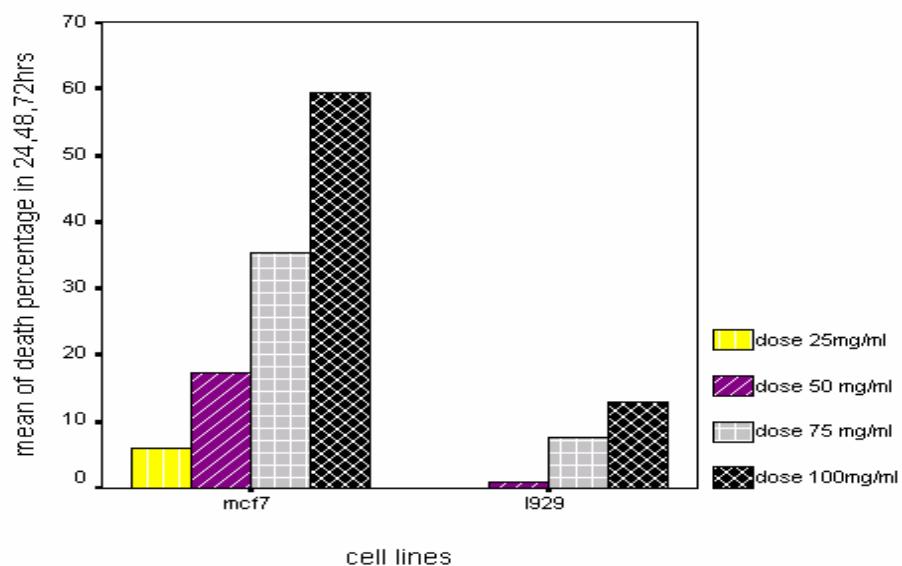
کندی داشت و در مقایسه با انکوباسیون ۲۴ ساعته تغییر معنی‌داری نداشت ($p = 0.126$) (نمودار ۲). در انکوباسیون ۷۲ ساعته مربوط به سلولهای MCF7 (نمودار ۱)، افزایش درصد مرگ سلولی مشاهده شد که این اختلاف نسبت به انکوباسیون ۲۴ ساعته سلولها، از نظر آماری معنی‌دار بود ($P = 0.29$), ($P = 0.41$). در سلولهای L929 نسبت به انکوباسیون ۴۸ و ۲۴ ساعته اش



نمودار ۱- میانگین درصد مرگ سلولهای MCF7 در انکوباسیون ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعته با دوزهای مختلف عصاره غضروف کوسه



نمودار ۲- میانگین درصد مرگ سلولهای L929 در انکوباسیون ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعته با دوزهای مختلف عصاره غضروف کوسه



نمودار ۳- مقایسه میانگین درصد مرگ سلولهای MCF7 و L929 در زمانهای مختلف انکوباسیون (ساعت ۲۴، ۴۸ و ۷۲) با دوزهای مختلف عصاره غضروف کوسه

بحث و نتیجه‌گیری

عصاره غضروف کوسه ماهی بر سلولهای توموری می‌باشد. در مطالعات مشابه دیگری که بر عصاره استاندارد شده Neovastat (غضروف کوسه) انجام شد اثر ضد تکثیری آن بر رده سلولهای سرطانی پستان، تخدمان، پروستات و ریه گزارش شد (۲،۳).

اما برخی دیگر از محققین معتقدند که اثر ضد سرطانی غضروف کوسه ناشی از ویژگی ضد رگزایی آن است و این دارو اثر سایوتوكسیک مستقیمی بر سلولهای توموری ندارد (۱۴).

البته تحقیقات در این زمینه بسیار اندک است ولی به نظر می‌رسد روش تهیه عصاره و نوع کوسه مورد استفاده عامل مهمی در تنوع پاسخها باشد که این مساله یکی از دلایل تفاوت نتایج گروههای تحقیق با یکدیگر است، مثلاً ممکن است فراکشنی جدا شود که این اثر سایوتوكسیک را نداشته باشد.

با توجه به این مطالعه و تحقیقات مشابه، علاوه بر ویژه گی ضد رگزایی این ماده، مهار رشد سلولهای توموری توسط عصاره غضروف کوسه می‌تواند مکانیسم دیگری از اثر این داروی ضد سرطان در مقابله با تومورها باشد که انجام تحقیقات بیشتری در این زمینه بسیار ضروری به نظر می‌رسد.

فوايد کلینيكي متعددی برای غضروف کوسه مطرح شده است اما ابتدا به عنوان اثر ضد سرطانی اش در درمان تومورها شناخته شد (۱۵،۹). غضروف کوسه ماهی به طور گسترده‌ای در درمان بسیاری از تومورهای مختلف استفاده می‌شود (۱). اما مکانیسم اثر آنرا بیشتر به علت ویژگی ضد رگزایی اش می‌دانند.

در این تحقیق با تهیه عصاره ای از این ماده و تأثیر آن بر سلولهای MCF7 به عنوان رده سلول توموری و سلولهای 929 به عنوان سلولهای نرمal (جهت بررسی سایوتوكسیسیتی انتخابی عصاره) ویژگی اثر مهاری عصاره غضروف کوسه ماهی بر رشد سلولهای توموری بررسی شد. نتایج حاصله نشان داد که این عصاره با اثرات سایوتوكسیسیتی (وابسته به دوز) بر سلولها می‌گردد، به سبب مرگ این سلولها می‌گردد، به طوری که با افزایش دوز عصاره، رشد سلولهای توموری بیشتر مهار می‌شود مثلًا در غلظت μg ۱۰۰ نسبت به سایر غلظت‌ها، درصد مرگ سلولی افزایش داشت به طوری که در دوز μg ۱۰۰ این عصاره، درصد مرگ سلولی از $\frac{۳}{۴} ۵۹$ درصد در ۴۸ ساعت انکوباسیون به $\frac{۷۸}{۹}$ درصد رسید که این اختلاف از نظر آماری معنی دار بود. در حالیکه در سلولهای طبیعی این سایوتوكسیسیتی مشاهده نشد که بیانگر اثر انتخابی

References

- 1- Anonymous; So far, shark cartilage is a fishy treatment for cancer; Env Nutrition,1997,20(9);7.
- 2-Dredge K, AE-941 (AEterna). Curr Opin Investig Drugs. 2004 Jun;5(6):668-77.
- 3-Dupont, E. Alaoui-jamali, W.T. Angiostatic and antitumoral activity of AE941 (Neovastat), A molecular fraction derived from Shark Cartilage.88th annual meeting of the American association for cancer research, (1997), 227,12.
- 4-Dupont E, Brazeau P, Juneau C , Maes DH; Methods of using extract of shark cartilage, United States Patents:No,6,028,118.
- 5- Feyzi R, Hassan ZM, Mostafaie A ; Modulation of CD4+ and CD8+ tumor infiltrating lymphocytes by a fraction from shark cartilage: Shark cartilage modulates anti tumor immunity; Int Immuno pharmacology:2002,406:1-6.

- 6-Gingras D, Renaud A, Mousseau N, Beliveau R;Shark cartilage extract as anti angiogenic agents :Smart drinks or bitter pills?;Cancer Metastasis Rev,2000,19(1-2):83-6.
- 7- Gomes EM, Souto RF, Felzeszwalb I ; Shark cartilage containing preparation protects cells against hydrogen peroxide induced damage and mutagenesis ;Mutation Res :1996,367:203-208.
- 8-Gonzalez RP, Leyva A , Moraes MO; Shark cartilage as source of antiangiogenic compounds: from basic to clinical research; Biol. Pharm Bull, 2001,24(10):1097-1101.
- 9-Kralovec JA , Guan Y , Metera K, Carr RI.; Immunomodulating principles from shark cartilage part1.Isolation and biological assessment in vitro; Int Immunopharmacology , 2003,3 :657-669.
- 10- Lane IW, Comac L; Shark don't get cancer. Avery publishing group Inc.1992
- 11-Lee A, Langer R;Shark cartilage contains inhibitors of tumor angiogenesis. ; Science,1983, 221(4626):85-7.
- 12- Lian Z, Niwa K, Gao Jingchun, Tagami K , Mori H , Tamaya T;Association of cellular apoptosis with anti-tumor effects of the chinese herbal complex in endocrine-resistant cancer cell line; Cancer Detection and Prevention,2003,27:147-154.
- 13-Mori H, Niwa K,Zheng Q, Yamada Y, Sakata K, Yoshimi N; Cell proliferation in cancer prevention; effects of prevention agents on estrogen-related endometrial carcinogenesis model and on in vitro human colorectal cells; Mutation Res , 2001,480(1):201-207.
- 14-Oikawa T, Ashino-fuse H, Shimamura M, Koide U, Iwaguchi T; A novel angiogenic inhibitor derived from Japanese shark cartilage(I), Extraction and estimation of inhibitory activities toward tumor and embryonic angiogenesis;Cancer Letters.1990,51 ,181-6.
- 15-Saul G; Shark cartilage therapy against cancer; Nutrition & Health forum,1997,14,1:1-5.
- 16-Sheu JR, Fu CC, Tsai ML, Chung WJ; Effect of U-995, a potent shark cartilage-derived inhibitor, on antiangiogenesis and antitumor activities ; Anticancer Res. 1998,18:4435-42.
- 17-Vae BW ;shark cartilage; total health.1993,15(4): 42.

Evaluation of Cytotoxicity Effect of Shark Cartilage Extract on Breast Adenocarcinoma Cell Line(MCF7)

Shahrokhi S.¹, Dr. Ghazanfari T.², Dr. Mohagheghi MA.³, Dr. Mohammad Hassan Z.⁴, Dr. Babaei Gh.R.⁵

Abstract

Introduction: Several studies have supported have supported the shark cartilage contains antiangiogenic andante tumor comounds, it's antiangiogenic properties has been confirmed, which is an important mechanism in inhibiting tumor cell growth, but it's cytotoxic effect on tumor cell could be another mechanism and there is little dcientific evidence approving this. So, we evaluated this effect on human adenocarcinoma cell line(MCF7.)

Materials & methods: To assess the cytotoxicity effect of shark cartilage extract on MCF7 and L929 cell lines, they were cultured and propagated, then incubated with different doses of shark cartialige (25 μ g,50 μ g, 75 μ g, 100 μ g) for 24, 48 and 72 hrs. After the incubation period, MTT test was done.

Results: The results of MTT showed that this extract has dose dependent cytotoxicity on tumor cells. For example, the highest cytotoxicity was seen in incubating cell with 100 μ g of extract for 72 hrs, while there was no cytotoxicity in normal cells which shows the differential cytotoxicity effect of shark cartilage extract on tumor cells.

Discussion: Considering the finds, shark cartilage extract can inhibit the tumor cell growth through a cytotoxicity as well as it's anti-angiogenicity.

* * *

Key words: Breast adenocarcinoma, Shark cartilage, Cytotoxicity.

-
1. MSc., auth in chief, immunology Dep., medical faculty, Tarbiat Modares university
 2. Associated Prof., immunology Dep., medical faculty, Shahed university
 3. Associated Prof., cancer research center, Tehran medical university
 4. Associated Prof., immunology Dep., medical faculty, Tarbiat Modares university
 5. Associated Prof., bio-statistics Dep., medical faculty, Tarbiat Modares university

This document was created with Win2PDF available at <http://www.daneprairie.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.