

بررسی اثر سایتوتوکسیسیته عصاره غصروف کوسه بر رده سلولي آدنوکارسینوماي پستان (MCF7)

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

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

چکیده

مقدمه: غصروف کوسه ماهی منبع ترکیبات ضدگرزایی 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 سلولي آدنوکارسینوماي 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 سایتوتوکسیک عصاره غصروف کوسه ماهی، این سلولها در مجاورت دوزهای مختلف عصاره غصروف کوسه (۲۵mg، ۵۰mg، ۷۵ mg و ۱۰۰ mg) قرار گرفتند و به مدت ۲۴، ۴۸، ۷۲ ساعت آنکوبه شدند. پس از پایان آنکوباسیون تست MTT انجام شد.

یافته‌های پژوهش: نتایج حاصل از تست MTT نشان داد که این عصاره، اثر سایتوتوکسیسیته 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، مثلاً در دوز ۱۰۰ mg و آنکوباسیون ۷۲ ساعته، بیشترین درصد مرگ سلولی مشاهده شد در حالی که در سلولهای طبیعی این سایتوتوکسیسیته مشاهده نشد که بیانگر اثر سایتوتوکسیسیته انتخابی عصاره غصروف کوسه بر سلولهای توموری می باشد.

نتیجه گیری نهایی: عصاره غصروف کوسه با اثر سایتوتوکسیک مستقیم بر سلولهای توموری MCF7، می تواند باعث مهار رشد این سلولها شود.

واژه‌های کلیدی: سرطان پستان، غصروف کوسه ماهی، سایتوتوکسیسیته

۱- کارشناس ارشد ایمونولوژی دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، نویسنده مسؤول
E-mail: Shahrokhi_so@yahoo.com

۲- دانشیار گروه ایمولوژی دانشکده پزشکی، دانشگاه شاهد

۳- دانشیار مرکز تحقیقات سرطان انستیتو کانسر، دانشگاه علوم پزشکی تهران

۴- دانشیار ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس

۵- دانشیار گروه آماری زیستی دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس

مقدمه

مطالعات متعددي در تأييد اين نکته که غضروف منبع ترکيبات ضد رگزا يي و ضد توموري است وجود دارد (۹،۶،۴،۱). عده اي از محققين معتقدند که اسکلت غضروفي کوسه ماهی سبب محافظت آن در برابر تومور مي شود (۱۷،۸)، چرا که تفاوت اصلي کوسه با ساير حيوانات، اسکلت کاملاً غضروفي و بدون استخوان آنهاست (۱۰). با انتشار اين نظريه، عده زيادي از محققين تحقيقات خود را بر غضروف کوسه ماهي متمرکز کردند (۱۶،۱۴). غضروف کوسه علاوه بر اين که يک ماده مغذي است خصوصيات زير را نيز دارا مي باشد:

۱- حاوي مواد ضد رگزا يي است که سبب مهار رشد تومورها مي شود (۱۶،۱۴).

۲- سبب بهبود پاسخهاي سيستم ايمني و افزايش توليد آنتي بادي مي گردد (۱۷،۹).

۳- خاصيت ضد التهابي در بهبودي زخمها داشته و در بيماريهاي ايمني مثل آرتریت مؤثر است (۹،۱۷).

۴- غضروف کوسه همچنين مي تواند نقش مهمي در محافظت از جبهش زايي DNA در برابر رادیکالهاي آزاد داشته باشد (۷). از نظر تيوريک مکانيسمهاي مذکور در درمان سرطانها مؤثر مي باشند.

همچنين بيشترين مطالعات پيرامون اثر عصاره غضروف کوسه ماهي بر مهار رشد سلولهاي آندوتليال رگي انجام شده است و خاصيت ضد رگزا يي آن اثبات شده است (۱۴،۱۱). اویکاو^۱ و همکارانش در سال ۱۹۹۰ از عصاره غضروف کوسه، چهار فراکشن جدا کردند و فراکشن هاي حاوي وزن مولکولي يک تا ده کيلو دالتون اين

عصاره را بر تومور VX-2 در قرنیه خرگوش تأثير دادند و بيشترين اثر ضد رگزا يي را در دو نوع از اين فراکشنها يافتند (۱۴،۸).

شو^۲ و همکاران در سال ۱۹۹۸ فراکشن هاي حاوي دو پروتئين با وزن مولکولي ۱۰ و ۱۴ کيلو دالتون با اثر ضد رگزا يي و ضد تومور از غضروف کوسه ماهي جدا کردند، اين فراکشن (U-995) داراي اثر مهاري بر مهاجرت و تکثير سلولهاي آندوتليال عروقي بوده و مي تواند کلاژنوليز را مهار نمايد (۱۶).

اما مکانيسم احتمالي ديگر اين ماده مهار مستقيم رشد سلولهاي توموري در اثر خاصيت سايتوتوکسیسيته آن مي باشد، که مدرک علمي معتبري در تأييد اين نظر وجود ندارد. در اين مطالعه تصميم گرفته شد که اثر سايتوتوکسیسيته عصاره غضروف کوسه را به طور مستقيم بر رده سلولي آدنوکارسينوماي پستان (MCF7) بررسی کنيم.

مواد و روشها

الف) عصاره گيري از غضروف کوسه ماهي: پس از خريداري غضروف کوسه ماهي از بنادر بوشهر و پاک کردن و شستن آن با آب مقطر، غضروفها چرخ شده و به مدت يک شب در فریزر نگه داري شدند. سپس با استفاده از دستگاه ليوفليزاتور، نمونه ليوفليزه شده وسپس پودر شد. ده گرم از پودر غضروف در ۱۰۰ سي سي بافر حاوي گوانيديوم هيدروکلرايد ۴ مولار، محلول استات سدیم ۰/۱ با pH= ۵/۸ حل شد. به اين بافر ۶ آنتي پروتئاز با غلظت هاي زير اضافه شد (۵):

1mM PMSF و 6.25mM EDTA
10 mM N-Ethyl maleimide,
12.5mM 6-Aminohexanoic acid,
2mM Idoacetic acid, HClO₄ 25 mM
0.25 mM Benzamidin HCL

1. Oikaw
2. Sheu

سانتی‌گراد حاوی CO₂ ۵٪ انکوبه شدند.

پس از پایان زمان انکوباسیون سلولها ۱/۱۰، حجم هر چاهک (۲۰ میکرولیتر) MTT به چاهکها اضافه شد. سپس مجدداً پلیت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد و در حضور CO₂ ۵٪ به مدت ۴ ساعت انکوبه شد، مایع رویی چاهکها به طور کامل خارج گردید و به جای آن ۱۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانل اسیدی ۰.۴٪، مولار اضافه شد. پس از حل شدن کریستالها، مایع بنفش رنگی حاصل شد که در طول موج ۵۴۰ نانومتر بوسیله دستگاه ELISA Reader خوانده شد (۱۱،۱۰). با استفاده از فرمول زیرمیزان مهار رشد سلولها محاسبه شد. (لازم به ذکر است آزمایشات به صورت سه تایی و هر تست ۳ بار تکرار شد).

$100 \times \frac{1 - \text{حذب تست}}{\text{حذب کنترل}} = \text{درصد مرگ سلولی}$

حذب 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 نرم‌آزار SPSS و تست ANOVA و T student تحلیل انجام شد.

یافته های پژوهش

آنالیز آماری نتایج نشان داد که در زمان انکوباسیون ۲۴ ساعته، درصد مرگ سلولی با افزایش دوز عصاره غصروف 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 معنی‌دار نبود (p=۰/۰۵۷). در سلولهای L929 این روند افزایش بسیار

سپس به ازای هر ۱۰ میلی لیتر از بافر، مقدار یک گرم پودر غصروف اضافه شد. محلول حاصله به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد. سپس با نیروی ۸۰۰۰۰g به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفوژ گردید (۹،۶،۴). میزان پروتئین مایع رویی حاوی عصاره پروتئین‌های غصروف کوسه ماهی، به روش برادفورد سنجیده شد. سپس عصاره به دست آمده، از فیلتر با قطر ۰/۲۲ میکرون عبور داده شد و در حجمهای کوچک تقسیم و تا زمان مصرف در فریزر با دمای -۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

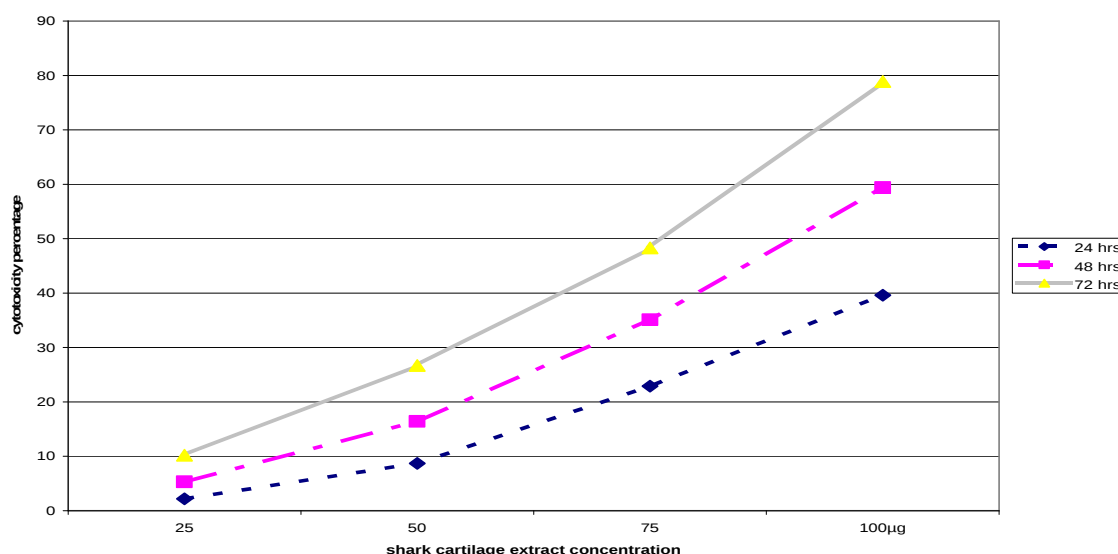
ب) شرایط کشت رده سلولی: MCF7 که یک رده سلولی آدنوکارسینومای پستان و L929 که یک رده سلولی نرمال است از انستیتو پاستور تهران خریداری شد. جهت بررسی اثر سایتوتوکسیسیته انتخابی عصاره از سلولهای نرمال L929 استفاده شد. سلولها در محیط کشت کامل (RPMI حاوی ۱۰٪ FBS) رشد و تکثیر یافتند تا پس از رسیدن به میزان کافی،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

ج) تست سایتوتوکسیسیته: جهت

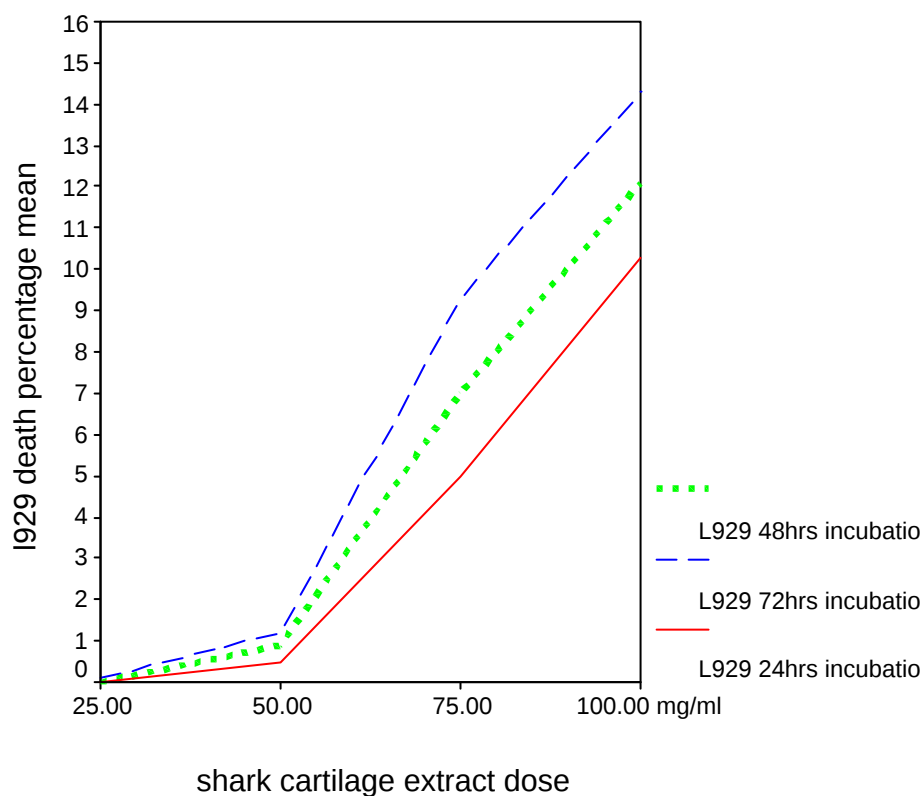
تست MTT به میزان ۲۰۰۰۰ عدد از سلول L929 و MCF7 در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه پاکف صاف به مدت یک شب کشت داده شد، پس از چسبیدن سلولها به کف پلیت، محیط کشت رویی چاهکها خالی شد و دوزهای مختلف از عصاره غصروف کوسه ماهی (۲۵ μg، ۵۰ μg، ۷۵ μg، ۱۰۰ μg) به میزان ۲۰۰ میکرولیتر به چاهک های تست اضافه شد. به چاهکهای کنترل منفی تنها محیط کشت RPMI حاوی ۱۰٪ FBS اضافه شد. ردیف بلانک تنها حاوی ۲۰۰ میکرولیتر محیط RPMI حاوی ۱۰٪ FBS بود (بدون سلول). پلیتهای کشت به مدت ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه

تغییر معنی‌داری دیده نشد ($p = 0/153$) و ($p = 0/142$). همچنین 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 تست ANOVA اختلاف معنی‌داری در تمام غلظتها و در هر سه زمان بین این دو نوع سلول را نشان داد ($P = 0/027$)

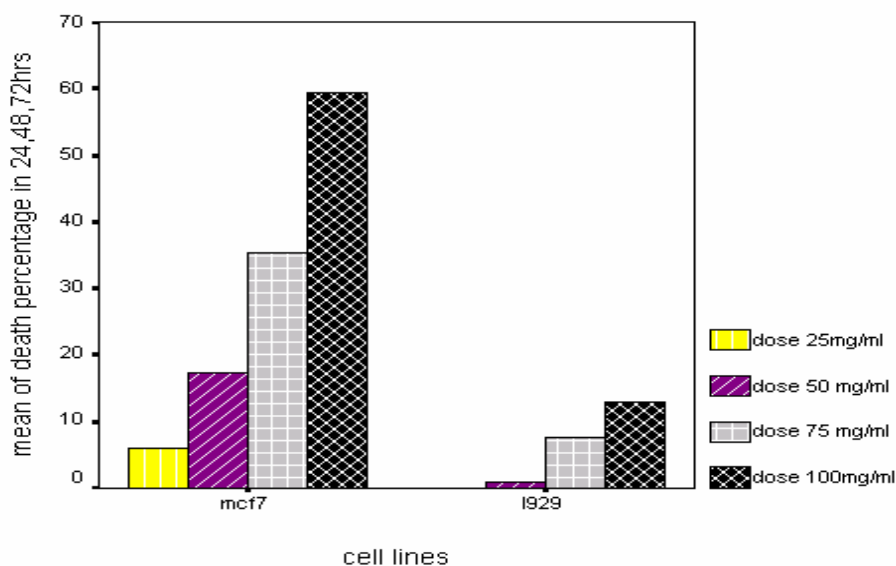
کندی داشت و در مقایسه با انکوباسیون ۲۴ ساعته تغییر معنی‌داری نداشت ($p = 0/126$) (نمودار ۲). در انکوباسیون ۷۲ ساعته مربوط به سلولهای MCF7 (نمودار ۱)، افزایش درصد مرگ سلولی مشاهده شد که این اختلاف نسبت به انکوباسیون ۲۴ و ۴۸ ساعته سلولها، از نظر آماری معنی‌دار بود ($P = 0/029$)، ($P = 0/041$). در سلولهای 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 (۲۴، ۴۸ و ۷۲) با دوزهای مختلف عصاره غضروف کوسه

بحث و نتیجه‌گیری

فواید کلینیکی متعددی برای غضروف کوسه مطرح شده است اما ابتدا به عنوان اثر ضد سرطانی اش در درمان تومورها شناخته شد (۹، ۱۵). 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 L929 به عنوان سلولهای نرمال (جهت بررسی سایتوتوکسیسیته انتخابی عصاره) ویژگی اثر مهار عصاره غضروف کوسه ماهی بر رشد سلولهای توموری بررسی شد. نتایج حاصله نشان داد که این عصاره با اثرات سایتوتوکسیسیته (وابسته به دوز) بر سلولهای توموری، سبب مرگ این سلولها می‌گردد، به طوری که با افزایش دوز عصاره، رشد سلولهای توموری بیشتر مهار می‌شد مثلاً در غلظت $100 \mu\text{g}$ نسبت به سایر غلظت‌ها، درصد مرگ سلولی افزایش داشت به طوری که در دوز $100 \mu\text{g}$ این عصاره، درصد مرگ سلولی از $59/4$ درصد در 48 ساعت انکوباسیون به $78/9$ درصد رسید که این اختلاف از نظر آماری معنی دار بود. در حالیکه در سلولهای طبیعی این سایتوتوکسیسیته مشاهده نشد که بیانگر اثر انتخابی

عصاره غضروف کوسه ماهی بر سلولهای توموری می‌باشد. در مطالعات مشابه دیگری که بر Neovastat (عصاره استاندارد شده غضروف کوسه) انجام شد اثر ضد تکثیری آن بر رده سلولهای سرطانی پستان، تخمدان، 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 سایتوتوکسیک 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 سایتوتوکسیک 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 دارو ضد سرطان در مقابله با تومورها باشد که انجام تحقیقات بیشتری در این زمینه بسیار ضروری به نظر می‌رسد.

References

- 1- Anonymouse; 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. Mahammad Hassan Z.⁴, Dr. Babaei Gh.R.⁵

Abstract

Introduction: Several studies have supported the shark cartilage contains antiangiogenic and antitumor compounds, its antiangiogenic properties has been confirmed, which is an important mechanism in inhibiting tumor cell growth, but its cytotoxic effect on tumor cell could be another mechanism and there is little scientific 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 cartilage (25µg, 50µg, 75 µg, 100 µg) 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 µg 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 its 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.