مجله علمي دانشگاه علوم پزشكي ايلام، دوره سيزدهم، شماره دوم، تابستان ۸۴

بررسي اثر سايتوتوكسيسيتي عصارة غضروف كوسه بر رده سلولي آدنوكارسينوماي پستان (MCF7)

سميه شاهرخي[۱] ، دكتر طوبي غضنفري[۲]، دكتر محمد علي محققي[۳] ، دكتر زهير محمد حسن [٤]، دكتر غلامرضا بابايي[۵]

تاريخ دريافت: ۸۳/۱۱/۲۰ تاريخ پذيرش: ۸٤/۹/۷

چكيده

مقدمه: غضروف كوسه ماهي منبع تركيبات ضدرگزايي و ضد توموري است كه خاصيت ضد رگزايي آن به اثبات رسيده است. با توجه به اينكه مدارك معتبر بسيار كمی در مورد مكانيسم احتمالي اين ماده در مهار مستقيم رشد سلولهاي تومور وجود دارد. لذا در اين مطالعه اثر آن به طور مستقيم بر رده سلولي آدنوكارسينوماي پستان مورد بررسي قرار گرفت.

مواد و روشها: در اين مطالعه آزمايشگاهی پس از كشت و تكثير سلولهاي L929 و MCF7 به منظور تعيين اثر سايتوتوكسيک عصاره غضروف كوسه ماهی، اين سلولها در مجاورت دوزهای مختلف عصاره غضروف كوسه (۲۵mg، ۵۰mg، ۷۵ mgو ۱۰۰ mg) قرار گرفتند و به مدت ۲۴، ۴۸، ۷۲ ساعت آنكوبه شدند. پس از پايان آنكوباسيون تست MTT انجام شد.

يافته‌هاي پژوهش: نتايج حاصل از تست MTT نشان داد كه اين عصاره، اثر سايتوتوكسيسيتي وابسته به دوز بر MCF7 دارد كه اين ويژگي با گذشت زمان افزايش مي‌يابد به طوريكه با افزايش دوز عصاره ، رشد سلولهای توموری بيشتر ميشود، مثلا در دوز ۱۰۰ mgو آنكوباسيون ۷۲ ساعته، بيشترين درصد مرگ سلولی مشاهده شد در حالی كه در سلولهای طبيعی اين سايتوتوكسيسيتی مشاهده نشد كه بيانگر اثر سايتوتوكسيسيتی انتخابی عصاره غضروف كوسه بر سلولهای توموری می باشد.

نتيجه گيری‌نهائي: عصاره غضروف كوسه با اثر سايتوتوكسيک مستقيم بر سلولهاي توموريMCF7، مي تواند باعث مهار رشد اين سلولها شود.

واژه‌هاي كليدي: سرطان پستان، غضروف كوسه ماهي، سايتوتوكسيسيتي

۱- كارشناس ارشد ايمونولوژي دانشكده پزشكي، دانشگاه تربيت مدرس، نويسنده مسوول
E-mail: Shahrokhi_so@yahoo.com
۲- دانشيار گروه ايمولوژي دانشكده پزشكي، دانشگاه شاهد
۳- دانشيار مركز تحقيقات سرطان انستيتو كانسر، دانشگاه علوم پزشكي تهران
۴-دانشيار ايمونولوژي، دانشكده پزشكي، دانشگاه تربيت مدرس
۵- دانشيار گروه آماري زيستي دانشكده پزشكي، دانشگاه تربيت مدرس

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-12]

مقدمه

مطالعات متعددي در تأييد اين نكته كه غضروف منبع تركيبات ضد رگزايي و ضد توموري است وجود دارد (١،٤،٦،٩).

عده اي از محققين معتقدند كه اسكلت غضروفي كوسه ماهی سبب محافظت آن در برابر تومور مي‌شود(٨،١٧)، چرا كه تفاوت اصلي كوسه با ساير حيوانات ،اسكلت كاملاً غضروفي و بدون استخوان آنهاست(١٠). با انتشار اين نظريه، عده زيادي از محققين تحقيقات خود را بر غضروف كوسه ماهي متمركز كردند (١٤،١٦). غضروف كوسه علاوه بر اين كه يک ماده مغذي است خصوصيات زير را نيز دارا مي‌باشد:

١- حاوي مواد ضد رگزايي است كه سبب مهار رشد تومورها مي شود(١٤،١٦).

٢- سبب بهبود پاسخهاي سيستم ايمني و افزايش توليد آنتي بادي مي‌گردد(٩،١٧).

٣- خاصيت ضد التهابي در بهبودي زخمها داشته و در بيماريهاي ايمني مثل آرتريت مؤثر است(٩،١٧).

٤- غضروف كوسه همچنين مي‌تواند نقش مهمي در محافظت از جهش زايي DNA در برابر راديكالهاي آزاد داشته باشد(٧). از نظر تئوريك مكانيسمهاي مذكور در درمان سرطانها مؤثر مي‌باشند.

همچنين بيشترين مطالعات پيرامون اثر عصاره غضروف كوسه ماهي برمهار رشد سلولهاي آندوتليال رگي انجام شده است و خاصيت ضد رگزايي آن اثبات شده است(١١،١٤) . اويكاو[1] و همكارانش در سال ١٩٩٠از عصاره غضروف كوسه، چهار فراكشن جدا كردند و فراكشن هاي حاوي وزن مولكولي يك تا ده كيلو دالتون اين عصاره را بر تومور VX-2 در قرنيه خرگوش تأثير دادند و بيشترين اثر ضد رگزايي را در دو نوع از اين فراكشنها يافتند(٨،١٤).

شو[2] و همكاران در سال ١٩٩٨ فراكشني حاوي دو پروتئين با وزن مولكولي ١٠ و ١٤ كيلو دالتون با اثر ضد رگزايي و ضد تومور از غضروف كوسه ماهي جدا كردند، اين فراكشن (U-995) داراي اثر مهاري بر مهاجرت و تكثير سلولهاي آندوتليال عروقي بوده و مي تواند كلاژنوليز را مهار نمايد(١٦).

اما مكانيسم احتمالي ديگر اين ماده مهار مستقيم رشد سلولهاي توموري در اثر خاصيت سايتوتوكسيسيتي آن مي باشد، كه مدرك علمي معتبري در تأييد اين نظر وجود ندارد. در اين مطالعه تصميم گرفته شد كه اثر سايتوتوكسيسيتي عصاره غضروف كوسه ر ا به طور مستقيم بر رده سلولي آدنوكارسيناماي پستان(MCF7) بررسي كنيم.

مواد و روشها

الف) عصاره گيري از غضروف كوسه ماهي: پس از خريداري غضروف كوسه ماهي از بنادر بوشهر و پاک كردن و شستن آن با آب مقطر ، غضروفها چرخ شده و به مدت يک شب در فريزر نگه‌داري شدند. سپس با استفاده از دستگاه ليوفليزاتور، نمونه ليوفليزه شده وسپس پودر شد. ده گرم از پودر غضروف در ١٠٠ سي سي بافر حاوي گوانيديوم هيدروكلرايد ٤ مولار، محلول استات سديم ٠/١ با pH= ٥/٨ حل شد. به اين بافر ٦ آنتي پروتئاز با غلظتهاي زير اضافه شد(٥):

1mM PMSF و 6.25mM EDTA
10 mM N-Ethyl malemide,
12.5mM 6-Aminohexanoic acid,
2mM Idoacetc acid,Hclo ./25 mM
0.25 mM Benzamidine HCL

1. Oikaw
2. Sheu

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-12]

سپس به ازاي هر ۱۰ ميلي ليتر از بافر، مقدار يک گرم پودر غضروف اضافه شد .محلول حاصله به مدت ٤٨ ساعت در دماي ٤ درجه سانتي‌گراد نگه‌داري شد. سپس با نيروي ۸۰۰۰۰g به مدت ۳۰ دقيقه سانتريفوژ گرديد(۹،۶،۴).
ميزان پروتئين مايع رويي حاوي عصاره پروتئين‌هاي غضروف کوسه ماهي ، به روش برادفورد سنجيده شد. سپس عصاره به دست آمده، از فيلتر با قطر ۰/۲۲ميکرون عبور داده شد و در حجمهاي کوچک تقسيم و تا زمان مصرف در فريزر با دماي۲۰-درجه سانتي‌گراد نگهداري شد.

ب) شرايط کشت رده سلولي:
MCF7 که يک رده سلولي آدنوکارسينوماي پستان و L929 که يک رده سلولي نرمال است از انستيتو پاستور تهران خريداري شد. جهت بررسي اثر سايتوتوکسيسيتي انتخابي عصاره از سلولهاي نرمال L929 استفاده شد . سلولها در محيط کشت کامل(RPMI حاوی ۱۰% FBS) رشد و تکثير يافتند تا پس از رسيدن به ميزان کافي، در تست سايتوتوکسيسيتي از آنها کشت داده شود.

ج) تست سايتوتوکسيسيتي: جهت تست MTT به ميزان۲۰۰۰۰ عدد از سلولL929 وMCF7 در هر چاهک پليت ۹۶ خانه باکف صاف به مدت يك شب کشت داده شد، پس از چسبيدن سلولها به کف پليت، محيط کشت رويي چاهکها خالي شد و دوزهاي مختلف از عصاره غضروف کوسه ماهي (۲۵ µg، ۵۰ µg،۷۵ µg، ۱۰۰ µg) به ميزان۲۰۰ ميکروليتر به چاهک هاي تست اضافه شد . به چاهکهاي کنترل منفي تنها محيط کشت RPMI حاوی ۱۰% FBS اضافه شد. رديف بلانک تنها حاوي ۲۰۰ ميکروليتر محيط RPMI حاوی ۱۰% FBS بود(بدون سلول). پليت‌هاي کشت به مدت ۴۸،۲۴و۷۲ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتي‌گراد حاوي CO2 ۵% انکوبه شدند.
پس از پايان زمان انکوباسيون سلولها ۱/۱۰، حجم هر چاهک (۲۰ميکروليتر) MTT به چاهکها اضافه شد. سپس مجدداً پليت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتي‌گراد و در حضور CO2 ۵% به مدت ٤ ساعت انکوبه شد، مايع رويي چاهکها به طور کامل خارج گرديد و به جاي آن ۱۰۰ ميکروليتر ايزوپروپانل اسيدي ٤./. مولار اضافه شد. پس از حل شدن کريستالها ، مايع بنفش رنگي حاصل شد که درطول موج ٥٤٠ نانومتر بوسيله دستگاه ELISA Reader خوانده شد(۱۱،۱۰). با استفاده از فرمول زيرميزان مهار رشد سلولها محاسبه شد. (لازم به ذکر است آزمايشات به صورت سه تايي و هر تست ۳ بار تکرار شد).

درصد مرگ سلولي = (۱- جذب تست / جذب کنترل) × ۱۰۰

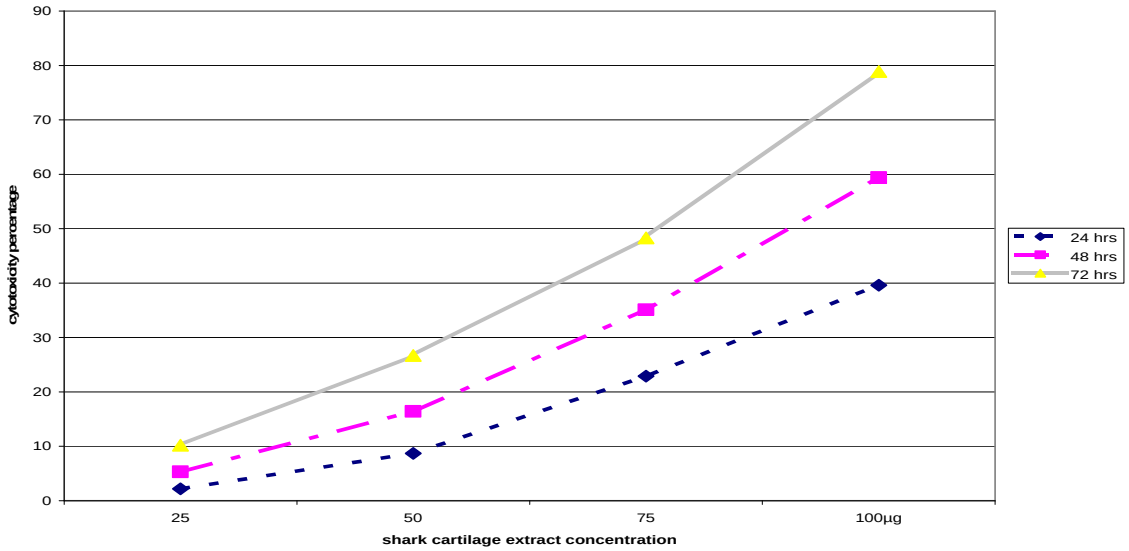
نتايج حاصل از تست MTT که با دستگاه ELISA Reader ثبت شد و با استفاده ازفرمول فوق به درصد مرگ سلولي تبديل و از نظر آماري آناليز شد. آناليز آماري نتايج تجربي با نرم‌افزار SPSS و تستANOVA و T student تحليل انجام شد.

يافته هاي پژوهش

آناليز آماری نتايج نشان داد که در زمان انکوباسيون ۲۴ ساعته، درصد مرگ سلولي با افزايش دوز عصاره غضروف کوسه در MCF7 افزايش يافته بود.
همچنان که در نمودار ۱ مشاهده مي شود افزايش درصد مرگ سلولي وابسته به دوز، در انکوباسيون ۴۸ ساعته سلولهايMCF7 ديده شد و اين ميزان در مقايسه با زمان۲۴ ساعت انکوباسيون اين سلولها افزايش داشت ، ولي اين افزايش از نظر آماري معني‌دار نبود(p= ۰/۰۵۷). در سلولهاي L929 اين روند افزايش بسيار

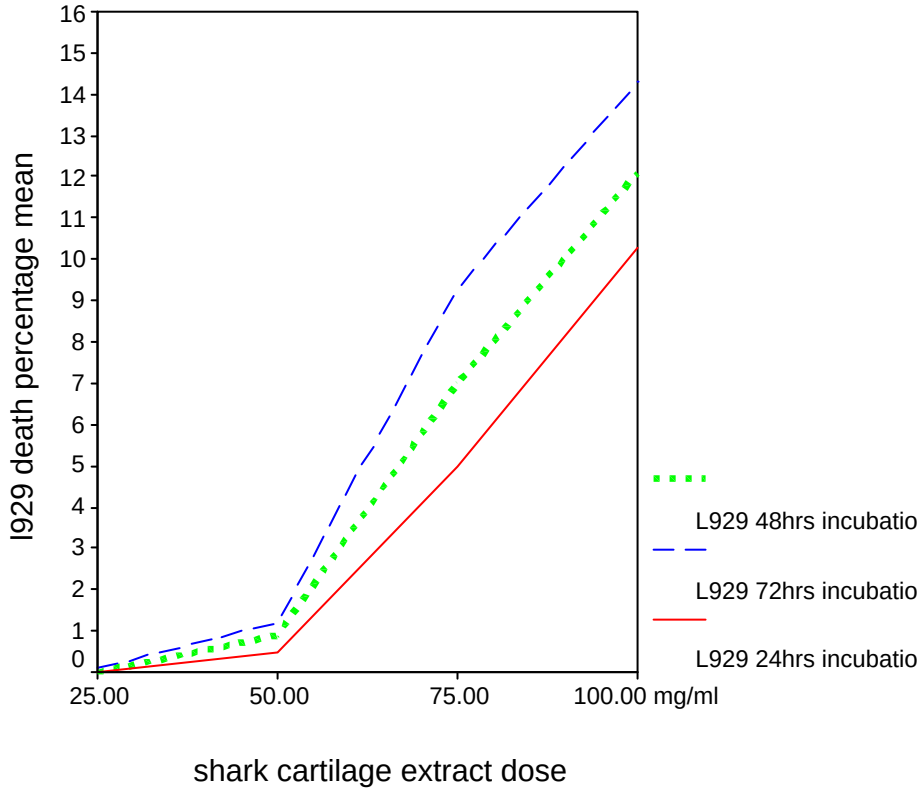
[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-12]

كندي داشت و در مقايسه با انكوباسيون۲۴ ساعته تغيير معني‌داري نداشت (p=۰/۱۲۶) (نمودار ۲).
در انكوباسيون ۷۲ ساعته مربوط به سلولهايMCF7 (نمودار۱)، افزايش درصد مرگ سلولي مشاهده شد كه اين اختلاف نسبت به انكوباسيون۲۴و ۴۸ساعته سلولها ، از نظر آماري معني دار بود (P=/۰۲۹)، (P=۰/۰۴۱).
در سلولهاي L929 نسبت به انكوباسيون ۴۸ و ۲۴ ساعته اش تغيير معني‌داري ديده نشد (p =۰/۱۵۳) و (p =۰/۱۴۲).
همچنانكه در نمودار۳ مشاهده مي شود ميزان درصد مرگ سلولي در اين دو سلول روند افزايشي وابسته به دوز دارد كه با گذشت زمان بيشتر مي‌شود و آناليز نتايج با استفاده ازتست ANOVA اختلاف معني داري در تمام غلظتها و در هر سه زمان بين اين دو نوع سلول را نشان داد (P= ۰/ ۰۲۷)

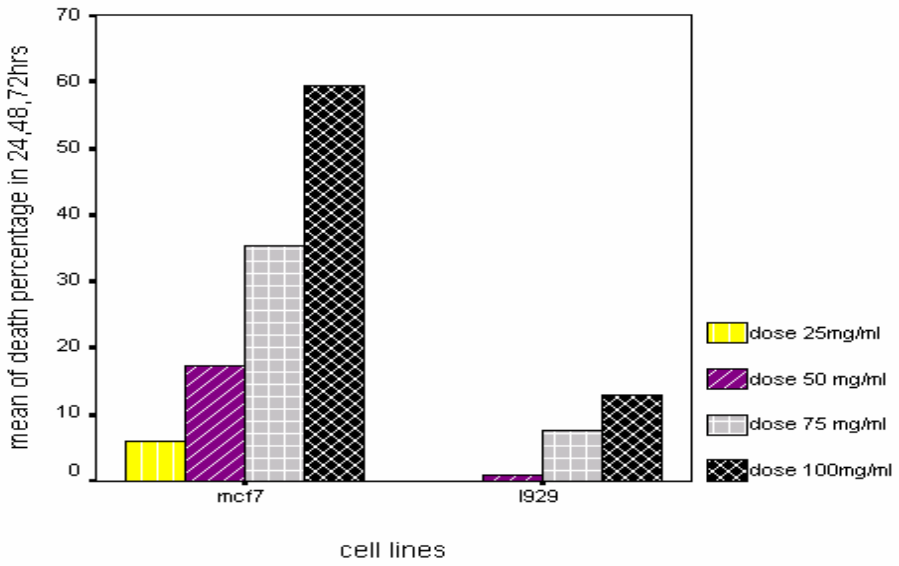


نمودار۱- ميانگين درصد مرگ سلولهايMCF7 در انكوباسيون ٢٤،٤٨و٧٢ ساعته با دوزهاي مختلف عصاره غضروف كوسه

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-12]



نمودار۲- میانگین درصد مرگ سلولهايL929 در انکوباسیون۲۴، ۴۸و۷۲ ساعته با دوزهاي مختلف عصاره غضروف کوسه



نمودار۳- مقایسه میانگین درصد مرگ سلولهاي MCF7وL929 در زمانهاي مختلف انکوباسیون(ساعت۲۴،۴۸و۷۲) با دوزهاي مختلف عصاره غضروف کوسه

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-12]

بحث و نتيجه‌گيري

فواید کلینیکي متعددي براي غضروف کوسه مطرح شده است اما ابتدا به عنوان اثر ضد سرطاني اش در درمان تومورها شناخته شد(۱۵،۹). غضروف کوسه‌ماهي به طور گسترده‌اي در درمان بسياري از تومورهاي مختلف استفاده مي شود (۱). اما مکانیسم اثر آنرا بیشتر به علت ویژگي ضد رگزايي‌اش مي دانند .

در این تحقیق با تهیه عصاره اي از این ماده و تأثیر آن بر سلولهايMCF7 به عنوان ردة سلول توموري و سلولهاي L929 به عنوان سلولهاي نرمال (جهت بررسي سايتوتوكسيسيتي انتخابي عصاره) ویژگي اثر مهاري عصاره غضروف کوسه ماهي بر رشد سلولهاي توموري بررسي شد. نتایج حاصله نشان داد که این عصاره با اثرات سایتوتوکسیسیتي (وابسته به دوز) بر سلولهاي توموري ، سبب مرگ این سلولها می گردد، به طوري که با افزایش دوز عصاره، رشد سلولهاي توموري بیشتر مهار مي شد مثلاً در غلظت µg ۱۰۰ نسبت به سایر غلظت ها، درصد مرگ سلولي افزایش داشت به طوري که در دوز µg ۱۰۰ این عصاره، درصد مرگ سلولي از ۵۹/۴ درصد در ۴۸ ساعت انکوباسیون به ۷۸/۹ درصد رسید که این اختلاف از نظر آماري معني دار بود. در حالیکه در سلولهای طبیعی این سایتوتوکسسیتی مشاهده نشد که بیانگر اثر انتخابي عصاره غضروف کوسه ماهي بر سلولهاي توموري مي باشد.

در مطالعات مشابه دیگري که بر Neovastat (عصارة استاندارد شدة غضروف کوسه) انجام شد اثر ضد تکثیري آن بر رده سلولهای سرطاني پستان، تخمدان، پروستات و ریه گزارش شد (۳،۲).

اما برخي دیگر از محققین معتقدند که اثر ضد سرطاني غضروف کوسه ناشي از ویژگي ضد رگزايي آن است و این دارو اثر سایتوتوکسیك مستقیمي بر سلولهاي توموري ندارد (۱۴).

البته تحقیقات در این زمینه بسیار اندك است ولي به نظر مي رسد روش تهیة عصاره و نوع کوسة مورد استفاده عامل مهمي در تنوع پاسخها باشد که این مساله یکی از دلایل تفاوت نتایج گروههاي تحقیق با یکدیگر است ، مثلاً ممکن است فراکشني جدا شود که این اثر سایتوتوکسیك را نداشته باشد.

با توجه به این مطالعه و تحقیقات مشابه، علاوه بر ویژه گي ضد رگزايي این ماده، مهار رشد سلولهاي توموري توسط عصارة غضروف کوسه مي‌تواند مکانیسم دیگري از اثر این داروي ضد سرطان در مقابله با تومورها باشد که انجام تحقیقات بیشتري در این زمینه بسیار ضروري به نظر مي رسد.

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.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-12]

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 Immunoppharmacology , 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 preventtion; 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.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-12]

Journal Of Ilam University Of Medical Sciences Vol 13 , No , 2 , Summer 2005

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 have supported the shark cartigle contains antiagiogenic 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 (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 it's anti-angiogenicity.

* * *

Key words: Breast adenocarcioma, 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

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-12]

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.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-12]