



Investigating the Cytotoxic Effect of Pinoresinol and Lariciresinol on Breast Cancer Cell Line SKBr3

ARTICLE INFO

Article Type

Original Research

Authors

Soltani M.¹ MSc,
Ahmadian Chashmi N.² PhD,
Sharifi M.³ PhD,
Fotovat R.^{*1} PhD,
Behmanesh M.⁴ PhD

How to cite this article

Soltani M, Ahmadian Chashmi N, Sharifi M, Fotovat R, Behmanesh M. Investigating the Cytotoxic Effect of Pinoresinol and Lariciresinol on Breast Cancer Cell Line SKBr3. Modares Journal of Biotechnology. 2020;11(1):13-20.

¹Plant Production & Genetics Department, Agriculture Faculty, University of Zanjan, Zanjan, Iran

²Biology Department, Basic Sciences Faculty, University of Mazandaran, Babolsar, Iran

³Plant Biology Department, Biological Sciences Faculty, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

⁴Genetics Department, Biological Sciences Faculty, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

*Correspondence

Address: Plant Production & Genetics Department, Agriculture Faculty, University of Zanjan, Zanjan, Iran.
Postal Code: 4537138791
Phone: +98 (24) 33054513
Fax: +98 (24) 33054554
r_fotovat@znu.ac.ir

Article History

Received: June 24, 2019

Accepted: September 18, 2019

ePublished: March 14, 2020

ABSTRACT

Aims Breast cancer is the most common malignancy in women throughout the world. Among the various methods for preventing and treating cancer, plant natural compounds have more benefits than chemical drugs and have less side effects. Recently, many studies have been carried out on the antioxidant, anticancer, antiproliferation, and antiinflammatory properties of plant lignans, indicating the importance of these compounds in the prevention and treatment of various diseases. In the present study, the cytotoxic effects and inducing apoptosis of pinoresinol and lariciresinol lignans were investigated on SKBr3 breast cancer cell line.

Materials & Methods SKBr3 cells were treated with different concentrations of both pinoresinol and lariciresinol, separately for 72 hours. Then, cell viability and cells morphological changes were determined using MTT assay and inverted light microscope, respectively. Also, apoptosis induction was analyzed by flow cytometry using an Annexin V-FITC apoptosis detection kit.

Findings Both pinoresinol and lariciresinol treatments induced morphological changes, decreased cell growth, survival, proliferation and a significant increase in apoptosis induction in SKBr3 cell line compared to control cells in a concentration-dependent manner.

Conclusion Inducing apoptosis and preventing the growth and proliferation of cancer cells are important mechanisms in the treatment of cancer. Pinoresinol and lariciresinol can be used to reduce cell proliferation and increase apoptosis induction in prevention and treatment of breast cancer.

Keywords Breast Cancer; Pinoresinol; Lariciresinol; Cytotoxicity; Apoptosis

CITATION LINKS

[1] Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and ... [2] Role of apoptosis-related miRNAs in resveratrol-induced breast cancer ... [3] Cytotoxic effect of emodin on growth of SKBR3 breast ... [4] Incidence pattern and spatial analysis of breast cancer in Iranian ... [5] Epidemiology and histopathology of breast cancer in Iran versus other ... [6] Cell death mechanisms of plant-derived anticancer drugs: beyond ... [7] Podophyllotoxin: A novel potential natural anticancer ... [8] In vitro and in vivo antitumoral effects of combinations of ... [9] Lignans and stilbenes from African medicinal ... [10] Cytotoxicity of the methanol extract of datura innoxia petals on MCF-7 and ... [11] 6-Methoxy podophyllotoxin induces apoptosis via inhibition of TUBB3 and TOP2A ... [12] Antitumorogenic effect of a mammalian lignan precursor from ... [13] Among plant lignans, pinoresinol has the ... [14] Antioxidant efficacy and the upregulation of Nrf2-mediated ... [15] Lariciresinol induces apoptosis in HepG2 cells via ... [16] Dietary phytochemicals and cancer prevention: Nrf2 signaling, epigenetics, and ... [17] Herbal medicine as inducers of apoptosis in cancer ... [18] Apoptosis of human gastric cancer SGC-7901 cells induced by ... [19] The biological effects and the chemical ... [20] Synthesis and anticancer activity of dimeric podophyllotoxin ... [21] Breast cancer risk ... [22] Recent advances in the metabolic engineering of lignan biosynthesis ... [23] Down-regulation of inhibitor of apoptosis proteins by deguelin ... [24] Bioconversion of pinoresinol into matairesinol by use of recombinant Escherichia ... [25] Essences in metabolic engineering of lignan ... [26] In vitro proliferation assays do not fully predict the ... [27] Phytoestrogen (+)-pinoresinol exerts antitumor activity in ... [28] Pinoresinol inhibits proliferation and induces differentiation ... [29] Apoptosis: A target for anticancer ... [30] The apoptotic effects of Brucea javanica fruit extract against ... [31] Terrein induces apoptosis in HeLa human cervical carcinoma ... [32] Programmed cell death pathways in cancer: A review of ... [33] Activity guided fractionation of Arum italicum ... [34] Chemopreventive properties of pinoresinol-rich olive oil ... [35] Umbelliprenin and lariciresinol isolated from a long-term-used herb medicine ...

بررسی اثرات سمیت سلولی پینورسینول و لاریسی‌رسینول در سلول‌های سرطان سینه رده SKBr3

مونا سلطانی MSc

گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران

نجمه احمدیان‌چاشمی PhD

گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران، مازندران، ایران

محسن شریفی PhD

گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

رضا فتوت* PhD

گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران

مهرداد بهمنش PhD

گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

چکیده

اهداف: سرطان سینه شایع‌ترین نوع بدخیمی زنان در سراسر جهان است. از میان روش‌های مختلف در پیشگیری و درمان سرطان، ترکیبات طبیعی گیاهی دارای مزایای بیشتری نسبت به داروهای شیمیایی هستند و عوارض جانبی کمتری دارند. اخیراً مطالعات بسیاری در ارتباط با خواص آنتی‌اکسیدانی، ضدسرطانی، ضدتکثیری و ضدالتهابی لیگنان‌های گیاهی انجام شده است که نشان‌دهنده اهمیت این ترکیبات در پیشگیری و درمان انواع بیماری‌ها است. در مطالعه حاضر اثرات سمیت سلولی و القای آپوپتوز توسط ترکیبات لیگنانی پینورسینول و لاریسی‌رسینول بر رده سلولی سرطان سینه SKBr3 بررسی شد.

مواد و روش‌ها: سلول‌های SKBr3 با غلظت‌های مختلفی از پینورسینول و لاریسی‌رسینول به مدت ۷۲ ساعت تیمار شدند. سپس قابلیت حیات سلولی و تغییرات مورفولوژیکی سلول‌ها به ترتیب با ارزیابی MTT و میکروسکوپ نوری معکوس تعیین شدند. همچنین القای آپوپتوز به وسیله آنالیز فلوسایتومتری و با استفاده از کیت تشخیص آپوپتوز آنکسین V-FITC بررسی شد.

یافته‌ها: تیمارهای پینورسینول و لاریسی‌رسینول هر دو در حالت وابسته به غلظت موجب القای تغییرات مورفولوژیکی، کاهش قابلیت رشد، حیات، تکثیر سلولی و افزایش معنی‌دار میزان القای آپوپتوز در رده سلولی SKBr3 نسبت به سلول‌ها شدند.

نتیجه‌گیری: القای آپوپتوز و جلوگیری از رشد و تکثیر سلول‌های سرطانی از مکانیزم‌های مهم در درمان سرطان است. پینورسینول و لاریسی‌رسینول می‌توانند از طریق کاهش تکثیر سلولی و افزایش القای آپوپتوز در پیشگیری و درمان سرطان سینه مفید باشند.

کلیدواژه‌ها: سرطان سینه، پینورسینول، لاریسی‌رسینول، سمیت سلولی، آپوپتوز

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۴/۳

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۶/۲۷

*نویسنده مسئول: r_fotovat@znu.ac.ir

مقدمه

امروزه بروز سرطان و مرگ و میرهای ناشی از آن در سراسر جهان به سرعت در حال رشد است و پیش‌بینی می‌شود که تنها مائع اصلی افزایش امید به زندگی در قرن ۲۱ باشد [1]. با وجود پیشرفت قابل توجه در کشف و توسعه روش‌های جدید درمان سرطان، این بیماری پس از بیماری‌های قلبی-عروقی، همچنان دومین عامل مرگ و میر

در جهان است. سرطان سینه فراوان‌ترین نوع سرطان در زنان و دلیل بیشترین میزان مرگ و میر مرتبط با سرطان در سراسر جهان است [2]. در ایران نیز ابتلا به سرطان سینه در زنان رو به افزایش و شایع‌ترین بدخیمی در زنان است که ۲۴/۶٪ از سرطان‌ها را با میانگین سنی ۴۹/۶ سال تشکیل می‌دهد [3]. طبق گزارش آژانس بین‌المللی تحقیقات سرطان (Globocan) در سال ۲۰۱۲ میزان ابتلا و مرگ و میر ناشی از سرطان سینه در ایران به ترتیب ۲۸/۱ و ۹/۹ مورد در هر صد هزار نفر در سال است [4]. در حالی که مشخص شده است این میزان در سال ۲۰۱۸ به ترتیب به ۳۳/۲۱ و ۱۴/۲ مورد در هر صد هزار نفر افزایش یافته است [5].

از میان روش‌های مختلف در درمان سرطان، توسعه و استفاده از روش‌هایی که دارای حداقل عوارض جانبی روی سلول‌های نرمال بدن باشند، حایز اهمیت است. ترکیبات گیاهی برای سال‌های متمادی از مهم‌ترین منابع دارویی ضدسرطان به شمار می‌روند و به علت سهولت در دسترسی، عوارض جانبی و سمیت نسبتاً کمتر در مقایسه با روش‌های جراحی، شیمی درمانی، هورمون درمانی و پرتو درمانی نقش مهمی در پیشگیری و درمان سرطان ایفا می‌کنند. تاکنون بیش از ۳۰۰۰ گونه گیاهی برای درمان سرطان گزارش شده است و حدود ۳۰۰ ترکیب گیاهی در آزمایش‌های بالینی سرطان مورد بررسی قرار گرفته‌اند [6].

لیگنان‌ها گروه بزرگی از متابولیت‌های ثانویه گیاهی هستند که از دایمرهای فنیل‌پروپانئیدی و به شکل آزاد در طبیعت تشکیل می‌شوند. گیاهان حاوی ترکیبات لیگنانی دارای فعالیت‌های بیولوژیکی متنوع از جمله خواص ضدسرطانی هستند [7]. برخی از لیگنان‌ها شامل پودوفیلوتوکسین، پینورسینول و لاریسی‌رسینول به علت شباهت ساختاری با استروژن‌ها به عنوان فیتواستروژن‌ها نیز شناخته می‌شوند. این ترکیبات توسط باکتری‌های روده به اینترولیگنان‌های اینترولاکتون و اینترودیول تبدیل می‌شوند و ممکن است همانند استروژن‌ها در بدن عمل کنند و یا از طریق جابه‌جایی استروژن از سلول‌ها، اثر آن را کاهش دهند و منجر به پیشگیری از برخی سرطان‌های وابسته به استروژن مثل سرطان سینه شوند [8-10].

لیگنان‌ها در برخی از گیاهان از جمله سرده کتان با غلظت بالا و در جلبک‌ها، حبوبات، غلات، سبزیجات و میوه‌ها به میزان کمتری یافت می‌شوند [8]. *Linum album* گیاه بومی ایران و غنی از ترکیبات لیگنانی شامل پودوفیلوتوکسین، ۶- متوکسی پودوفیلوتوکسین، لاریسی‌رسینول، پینورسینول و غیره با خواص ضدسرطانی [11، 12]، ضدالتهابی [13] و اثرات آنتی‌اکسیدانی [14] است که می‌توان از آن به عنوان منبع جایگزینی برای استخراج لیگنان‌ها استفاده کرد.

داروهای ضدسرطان گیاهی دارای مکانیزم‌های عملکرد متعددی هستند و اغلب آنها باعث مرگ سلولی آپوپتوز می‌شوند که مکانیزم تنظیمی مهمی برای ارگانیزم‌های چندسلولی برای حفظ هوموستاز سلولی است. کنترل بقا و مرگ سلولی از مهم‌ترین استراتژی‌ها در

محلول MTT به هر چاهک اضافه شد و مجدداً پلیت‌ها برای ۴ ساعت در انکوباتور 37°C قرار داده شدند. سپس به هر چاهک، حلال MTT برای حل شدن محصولات کریستالی فورمازان اضافه شد و پس از ۲۰ دقیقه انکوباسیون، مقدار سلول‌های زنده در طول موج ۵۷۰ نانومتر توسط دستگاه خوانشگر میکروپلیت الایزا (ELISA microplate reader) خوانده شدند. آزمایش در سه تکرار انجام و درصد سلول‌های زنده مطابق با فرمول زیر محاسبه شد:

$$100 \times \frac{O.D \text{ سلول‌های گروه تیمار}}{O.D \text{ سلول‌های گروه کنترل}} = \text{قابلیت حیات سلولی (بر حسب درصد)}$$

در نهایت غلظتی از ترکیبات مورد آزمون که موجب کاهش قابلیت حیات سلولی به میزان ۵۰٪ در مقایسه با گروه کنترل شده بودند، به عنوان غلظت مهارکنندگی (IC_{50}) آن ترکیبات در نظر گرفته شد.

مشاهده مورفولوژی سلول‌ها

به منظور بررسی تغییرات مورفولوژی سلول‌های سرطان سینه انسانی رده SKBr3، تیمار سلول‌ها بر مبنای IC_{50} مشخص شده از پینورسینول (۴۰۰ میکرومولار)، لاریسی‌رسینول (۳۰۰ میکرومولار)، پودوفیلوتوکسین (۷۵٪ میکرومولار) به عنوان کنترل مثبت و الکل متانول (با غلظت نهایی ۱٪ حجم به حجم) به عنوان کنترل منفی انجام شد. ۷۲ ساعت پس از تیمار با ترکیبات مورد نظر، سلول‌های گروه کنترل و گروه‌های تیماری مختلف به دقت با میکروسکوپ نوری معکوس و بزرگ‌نمایی ۴۰ برابر مشاهده و بررسی شدند.

ارزیابی آپوپتوز با فلوسایتومتري

آپوپتوز به وسیله فلوسایتومتري و با استفاده از کیت تشخیص آپوپتوز آنکسین V-FITC/PI (BioLegend؛ ایالات متحده) بررسی شد. به طور مختصر سلول‌های SKBr3 در پلیت‌های ۱۲ خانه کشت داده شدند و به مدت یک شب انکوبه شدند. سپس رده سلولی SKBr3 با غلظتی برابر IC_{50} مشخص شده از هر ترکیب (پودوفیلوتوکسین با غلظت ۷۵٪ میکرومولار، پینورسینول با غلظت ۴۰۰ میکرومولار و لاریسی‌رسینول با غلظت ۳۰۰ میکرومولار) برای رده سلولی سرطان سینه SKBr3 که پس از تیمار ۷۲ ساعته به دست آمده بودند، تیمار و انکوبه شدند. پس از ۷۲ ساعت سلول‌ها با محلول تریپسین-EDTA جداسازی و بلافاصله جمع‌آوری شدند. سلول‌ها پس از شست‌وشو با بافر PBS در ۵۰۰ میکرولیتر از بافر اتصال ۱X (1X binding buffer) شامل ۵ میکرولیتر آنکسین-V-FITC و ۱۰ میکرولیتر پروپیدایومیداید (PI) حل و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی انکوبه شدند. در پایان میزان اتصال آنکسین و رنگ‌آمیزی پروپیدایومیداید از طریق فلوسایتومتري ارزیابی شد.

آنالیزهای آماری

نتایج هر آزمایش، به صورت میانگین آماری بیان شد. داده‌ها با نرم‌افزار GraphPad Prism 7 پردازش شدند. برای ارزیابی تفاوت معنی‌دار بین گروه‌ها از آنالیز واریانس یک‌طرفه استفاده شد.

مدیریت و درمان سرطان است و فعال کردن آپوپتوز موفق‌ترین درمان غیرجراحی محسوب می‌شود که برای انواع سرطان‌ها موثر است، زیرا فرار از آپوپتوز یکی از نشانه‌های سرطان است و مختص نوع خاصی از سرطان نیست [15-17]. در مطالعات پیشین مشخص شده است که ترکیبات لیگنانی مانند پودوفیلوتوکسین می‌توانند به صورت طبیعی به عنوان ضدتومور عمل کنند و موجب القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی شوند [18, 19]. با این حال مطالعات محدودی در ارتباط با خواص ضدسرطانی لاریسی‌رسینول و پینورسینول که پیش‌سازهای پودوفیلوتوکسین در مسیر سنتز لیگنان‌ها هستند، در دسترس است. به این ترتیب، مطالعه حاضر با هدف بررسی اثرات سمیت سلولی و القای آپوپتوز در رده سلولی سرطان سینه SKBr3 تحت تاثیر تیمار با لاریسی‌رسینول و پینورسینول انجام شد.

مواد و روش‌ها

ترکیبات شیمیایی

ترکیبات (+)پینورسینول، (+)لاریسی‌رسینول و پودوفیلوتوکسین از آزمایشگاه علوم گیاهی دانشگاه تربیت مدرس تهیه شدند. به منظور تهیه محلول مادری اولیه با غلظت ۱۰۰ میلی‌مولار، هر یک از ترکیبات اولیه در متانول خالص (گرید HPLC؛ مرک، کره جنوبی) حل و در 20°C نگهداری شدند.

کشت سلولی و نگهداری

رده سلولی سرطان سینه SKBr3 از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه شد. سلول‌های SKBr3 در محیط DMEM supplemented حاوی ۱۰٪ سرم جنین گاوی (FBS)، ۱۰۰ واحد پنی‌سیلین و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر استرپتومایسین و در شرایط انکوباتور با دمای 37°C و ۵٪ دی‌اکسیدکربن کشت و نگهداری شدند تا از لحاظ تعداد و مورفولوژی به حد مطلوب برسند.

ارزیابی سمیت سلولی

به منظور بررسی غلظت بازدارندگی (IC_{50}) ترکیبات پینورسینول و لاریسی‌رسینول از ارزیابی کلرومتریک MTT استفاده شد. سلول‌های SKBr3 با غلظت تقریبی 6×10^3 سلول در هر چاهک در پلیت ۹۶ خانه کشت داده شدند. به منظور کشت تعداد مناسب از سلول‌های SKBr3 در هر چاهک، پس از رقیق‌سازی محیط حاوی سلول‌های SKBr3، شمارش سلول‌ها روی لام نئوبار و با استفاده از میکروسکوپ نوری معکوس انجام شد. محلول‌های مادری مربوط به پودوفیلوتوکسین، پینورسینول و لاریسی‌رسینول در متانول گرید HPLC و با غلظت نهایی الکل ۱٪ (حجم به حجم) تهیه شدند. سپس سلول‌ها با غلظت‌های مختلف شامل پودوفیلوتوکسین از صفر تا ۶۰۰ میکرومولار به عنوان کنترل مثبت، پینورسینول از صفر تا ۸۰۰ میکرومولار و لاریسی‌رسینول نیز از صفر تا ۸۰۰ میکرومولار تیمار و به مدت ۷۲ ساعت در انکوباتور 37°C با ۵٪ دی‌اکسیدکربن نگهداری شدند. همچنین یک گروه از رده سلولی SKBr3 با ۱٪ حجم به حجم الکل متانول تیمار و به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد. بعد از ۷۲ ساعت به میزان ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر

همچنین حداقل سطح معنی‌داری به صورت $p < 0.01$ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

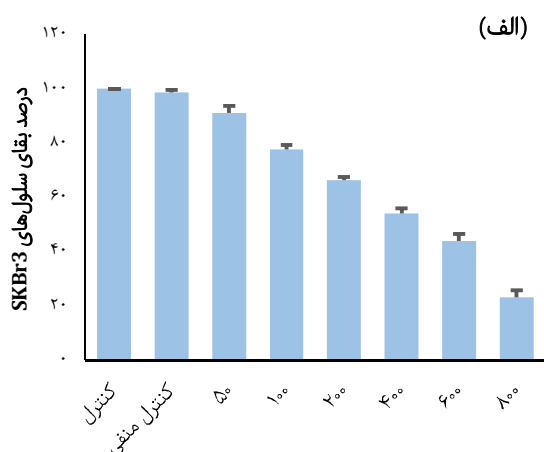
تأثیر تیمار پینورسینول و لاریسی‌رسینول بر رشد و تکثیر سلولی

برای ارزیابی اثرات سمیت سلولی پینورسینول و لاریسی‌رسینول در غلظت‌های مختلف (صفر تا ۸۰۰ میکرومولار) بر رده سلولی SKBr3 و تعیین درصد سلول‌های زنده از روش MTT استفاده شد. روش MTT، ارزیابی کلرومتریک مبتنی بر تغییر رنگ زرد تترازولیوم‌بروماید به رنگ صورتی فورمازان نامحلول توسط آنزیم سوکسینات‌دهیدروژناز میتوکندریایی در سلول‌های زنده است [20]. نتایج حاصل از MTT نشان می‌دهد که افزایش غلظت هر دو تیمار، موجب کاهش معنی‌دار بقای سلولی نسبت به سلول‌های کنترل می‌شود، به طوری که غلظت‌های بالاتر هر یک از این تیمارها دارای اثرات سمیت سلولی بیشتری نسبت به غلظت‌های پایین‌تر در رده سلولی SKBr3 هستند. هیچ اثر بازدارندگی قابل توجهی در سلول‌های تیمار شده با الکل متانول (حلال نمونه‌های لیگناتی) به عنوان کنترل منفی مشاهده نشد. تیمار سلول‌ها با پودوفیلوتوکسین به عنوان کنترل مثبت که از مشتقات آن به عنوان داروی ضدسرطان استفاده می‌شود، موجب کاهش معنی‌دار بقای سلولی شد. به این ترتیب مشخص شد که اثرات سمیت سلولی پینورسینول و لاریسی‌رسینول پس از ۷۲ ساعت موجب کاهش قابلیت رشد، حیات و تکثیر سلولی در حالت وابسته به غلظت در سلول‌های تیمار نسبت به کنترل می‌شوند.

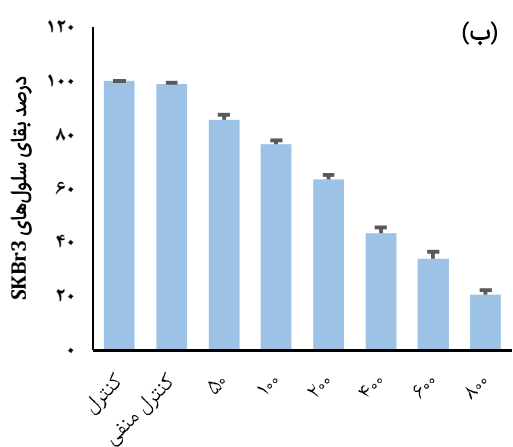
هر دو ترکیب پینورسینول و لاریسی‌رسینول در غلظت ۵۰ میکرومولار کمترین اثر سمیت سلولی و در غلظت ۸۰۰ میکرومولار بیشترین اثر سمیت سلولی را نشان دادند. همچنین میزان IC_{50} که برابر است با غلظتی از ترکیب سمیت سلولی که ۵۰٪ رشد سلول‌ها را کاهش می‌دهد، برای پینورسینول و لاریسی‌رسینول در رده سلولی SKBr3 پس از ۷۲ ساعت به ترتیب برابر با ۴۰۰ و ۳۰۰ میکرومولار بود (نمودار ۱).

تأثیر تیمار پینورسینول و لاریسی‌رسینول بر مورفولوژی سلولی

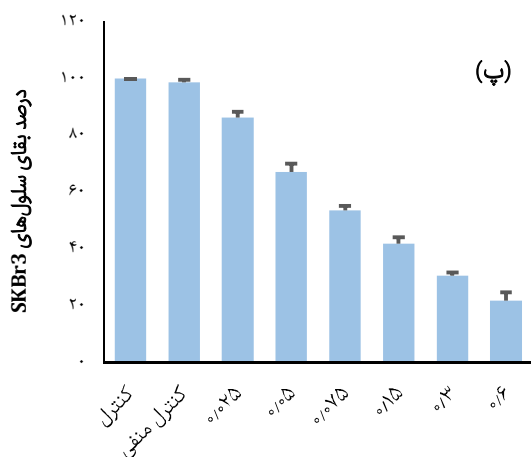
برای بررسی مورفولوژی سلولی، سلول‌ها قبل و بعد از تیمار با پینورسینول، لاریسی‌رسینول و پودوفیلوتوکسین در غلظتی برابر با IC_{50} به دست‌آمده از این ترکیبات، به دقت توسط میکروسکوپ مورد بررسی قرار گرفتند و اثرات بازدارندگی این ترکیبات با مشاهده تغییرات مورفولوژیکی سلول‌ها نیز تایید شد. تیمار با این ترکیبات مانع از رشد سلول‌های سرطانی SKBr3 شد و اختلاف قابل توجهی در قدرت زنده ماندن سلول‌های کنترل و سلول‌های تیمار شده وجود داشت. علاوه بر این تیمار با ترکیبات لیگناتی پینورسینول، لاریسی‌رسینول و همچنین پودوفیلوتوکسین به عنوان کنترل مثبت، در سلول‌های SKBr3 موجب القای تغییرات مورفولوژیکی از جمله چروکیدگی و انقباض سلولی، برآمدگی غشایی، گردشدگی سلولی و کاهش حجم سلول‌ها در سلول‌های SKBr3 شده بود (شکل ۱).



غلظت تیمار پینورسینول (میکرومولار)



غلظت تیمار لاریسی‌رسینول (میکرومولار)

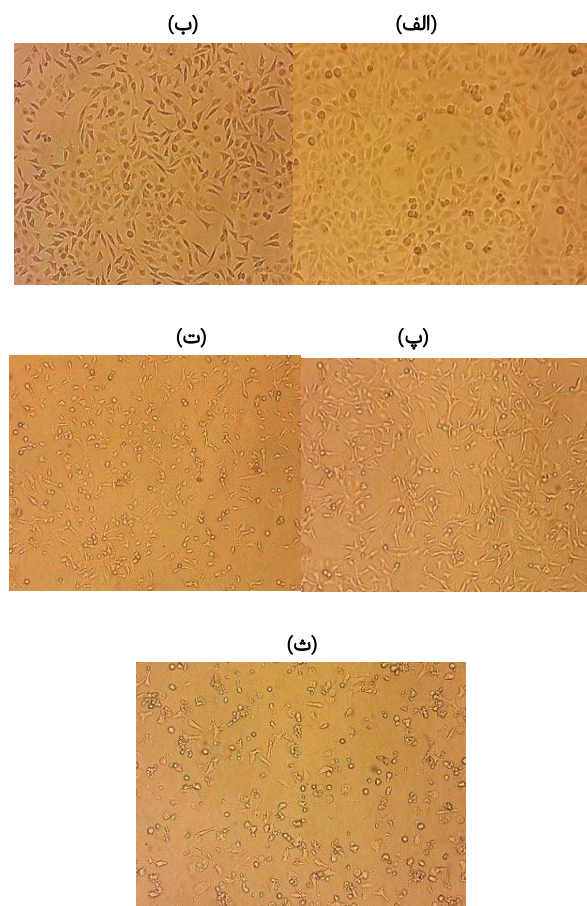


غلظت تیمار پودوفیلوتوکسین (میکرومولار)

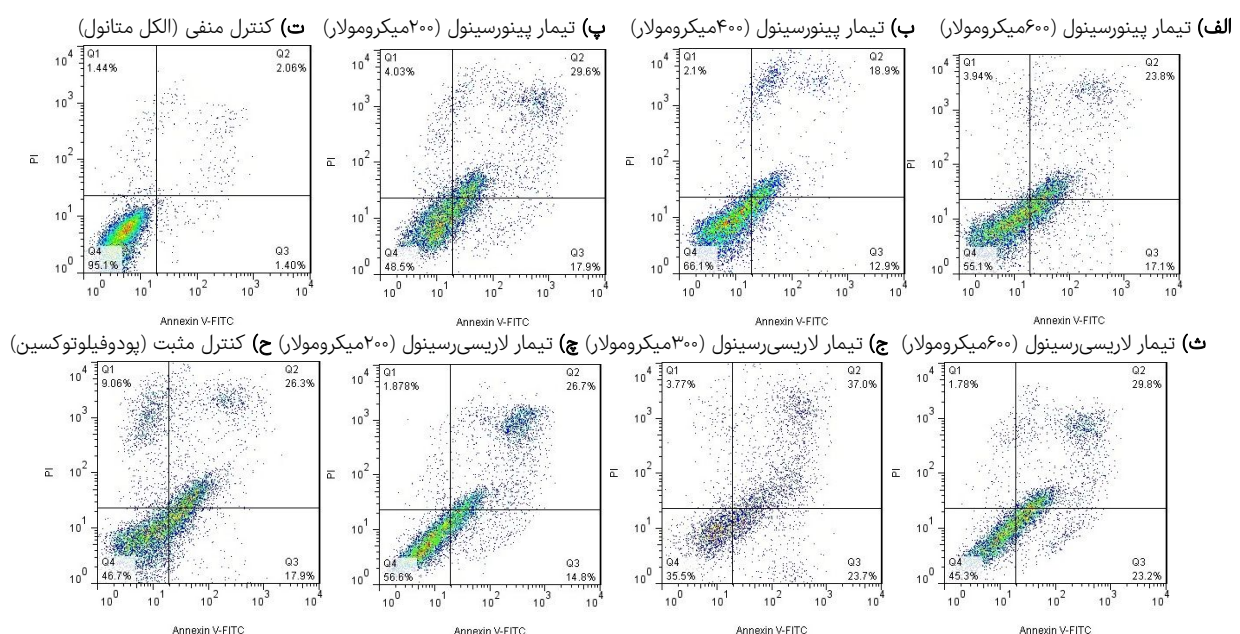
نمودار ۱ تأثیر تیمار پینورسینول و لاریسی‌رسینول بر قابلیت حیات رده سلولی سرطان سینه SKBr3 در روش وابسته به غلظت با استفاده از ارزیابی MTT: تیمار سلول‌های SKBr3 با غلظت‌های مختلفی از (الف) پینورسینول، (ب) لاریسی‌رسینول و (پ) پودوفیلوتوکسین به عنوان کنترل مثبت، به مدت ۷۲ ساعت (کنترل منفی، گروه سلول‌های تیمار شده با الکل متانول (حلال ترکیبات لیگناتی) است و اختلاف معنی‌دار بین گروه‌های تیماری با گروه کنترل منفی به صورت $p < 0.01$ در نمودار مشخص شده است).

تاثیر تیمار پینورسینول و لاریسی‌رسینول بر القای مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی

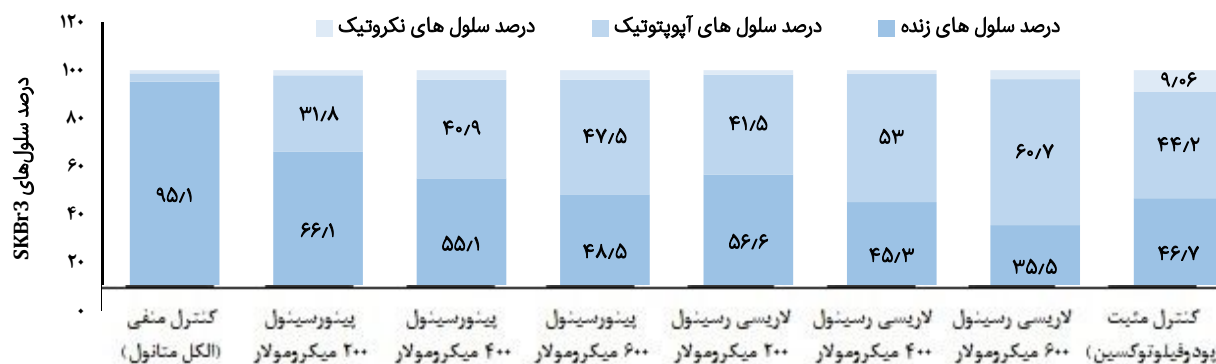
به‌منظور بررسی القای آپوپتوز سلولی تحت تاثیر تیمارهای پودوفیلوتوکسین، پینورسینول و لاریسی‌رسینول در رده‌های سلولی نرمال و سرطان سینه از کیت تشخیص آپوپتوز آنکسین V-FITC/PI و فلوسایتومتری استفاده شد. رده سلولی SKBr3، در غلظتی برابر با IC_{50} ترکیبات لیگناتی پینورسینول ($400 \mu\text{M}$)، لاریسی‌رسینول ($300 \mu\text{M}$) و پودوفیلوتوکسین ($0.75 \mu\text{M}$) به‌عنوان کنترل مثبت، به مدت ۷۲ ساعت تیمار و پس از آن آنالیز فلوسایتومتری انجام شد. از آنجایی که در تیمار سلول‌ها با الکل متانول به‌عنوان کنترل منفی، هیچ اثر بازدارندگی قابل توجهی مشاهده نشد، از این گروه برای انجام آنالیزهای بعدی استفاده شد. تیمار ترکیبات لیگناتی باعث افزایش قابل توجهی در میزان القای آپوپتوز در حالت وابسته به غلظت در مقایسه با سلول‌های کنترل شد ($p < 0.01$)، به‌طوری که میزان سلول‌های آپوپتوتیک تحت تاثیر تیمار پینورسینول و لاریسی‌رسینول به ترتیب از 31.8% و 41.5% در غلظت $200 \mu\text{M}$ به 47.5% و 60.7% در غلظت $400 \mu\text{M}$ افزایش یافت (شکل ۲). تیمار سلول‌ها با پودوفیلوتوکسین به‌عنوان کنترل مثبت نیز موجب افزایش معنی‌دار در میزان آپوپتوز و نکروز نسبت به سلول‌های کنترل شد. همچنین تیمار لاریسی‌رسینول نسبت به پینورسینول در غلظتی برابر با IC_{50} مشخص شده از هر ترکیب ($300 \mu\text{M}$ لاریسی‌رسینول و $400 \mu\text{M}$ پینورسینول) و همچنین در غلظت‌های برابر از این ترکیبات ($200 \mu\text{M}$ و $400 \mu\text{M}$ لاریسی‌رسینول) منجر به القای آپوپتوز به میزان بیشتری در سلول‌های SKBr3 شد و لاریسی‌رسینول اثرات سمیت سلولی شدیدتری بر سلول‌ها نشان داد (نمودار ۲).



شکل ۱) مورفولوژی سلول‌های سرطان سینه رده SKBr3 در (الف) نمونه کنترل، (ب) نمونه تیمار شده با پینورسینول، (ت) نمونه تیمار شده با لاریسی‌رسینول و (ث) نمونه تیمار شده با پودوفیلوتوکسین به‌عنوان کنترل مثبت پس از ۷۲ ساعت (بزرگ‌نمایی $40\times$)



شکل ۲) بررسی القای آپوپتوز و نکروز در سلول‌های سرطان سینه رده SKBr3 تحت تاثیر تیمارهای پینورسینول و لاریسی‌رسینول با غلظت کمتر از IC_{50} ($200 \mu\text{M}$ لاریسی‌رسینول و $400 \mu\text{M}$ پینورسینول) و غلظتی برابر با IC_{50} به‌دست آمده برای هر ترکیب ($400 \mu\text{M}$ پینورسینول و $300 \mu\text{M}$ لاریسی‌رسینول) و غلظت بیشتر از IC_{50} ($600 \mu\text{M}$ لاریسی‌رسینول) پس از ۷۲ ساعت با استفاده از ارزیابی فلوسایتومتری و روش آنکسین V-FITC/PI: Q1: درصد سلول‌های نکروتیک؛ Q2: درصد آپوپتوز ثانویه؛ Q3: درصد آپوپتوز اولیه و Q4: درصد سلول‌های زنده؛ (سلول‌های تیمار شده با الکل متانول به‌عنوان کنترل منفی و تیمار پودوفیلوتوکسین ($0.75 \mu\text{M}$) به‌عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شدند).



نمودار ۲) درصد سلول های زنده، آپوپتوتیک و نکروتیک در سلول های SKBr3 تحت تاثیر تیمارهای پینورسینول و لاریسینول پس از ۷۲ ساعت؛ (سلول های تیمار شده با الکل متانول به عنوان کنترل منفی و تیمار پودوفیلوتوکسین به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شدند).

بحث

هر چند در ایران شیوع سرطان سینه نسبت به کشورهای غربی کمتر است، اما شایع ترین بدخیمی در زنان است [21]. کشف و توسعه داروهای جدید و موثر بر سرطان سینه که دارای حداقل عوارض جانبی بر سلول های نرمال باشند، از اهمیت بالایی برخوردار است. در این میان شناسایی محصولات جدید طبیعی که دارای اثربخشی بهتر در برابر سرطان هستند و اثرات زیان بار کمتری بر سلول های نرمال دارند، مطلوب است و این محصولات برای توسعه انواع داروهای سمیت سلولی در سراسر جهان مورد بررسی قرار می گیرند [15].

لیگنان ها ترکیبات طبیعی هستند که در اکثر گونه های گیاهی به صورت طبیعی ساخته می شوند. از بین گیاهان حاوی ترکیبات لیگنانی، دانه های کنجد و کتان دارای بیشترین میزان لیگنان ها هستند که تاکنون گزارش شده اند [22]. لیگنان های گیاهی و به ویژه متابولیت های آنها شامل اینترولیگنان ها دارای فعالیت های بیولوژیکی متنوعی از جمله اثرات ضد تکثیر، ضد التهابی و آپوپتوزی است [23].

بیشترین توجه محققان در ارتباط با مصرف لیگنان های غذایی و کاهش خطر ابتلا به سرطان است. به طور خاص، طیف گسترده ای از تجزیه و تحلیل اپیدمیولوژیک نشان می دهد که مصرف منظم غذاهای غنی از اینترولیگنان ها با کاهش خطر ابتلا به سرطان سینه و بهبود احتمال بیماری در زنان دارای سرطان سینه مبتلا شده پس از یائسگی مرتبط است [22].

تبدیل ترکیبات لیگنانی فورفورانی از جمله پینورسینول و لاریسینول توسط میکروفلورهای موجود در ابتدای روده پستانداران به اینترولیگنان های اینترودیول و اینترولاکتون موجب جذب این ترکیبات از طریق روده بزرگ می شود و حضور لیگنان های روده ای در سرم خون، خطر ابتلا به سرطان سینه، سرطان پروستات و سرطان روده بزرگ را کاهش می دهد [24]. پینورسینول و لاریسینول از پیش سازهای پودوفیلوتوکسین در مسیر سنتز ترکیبات لیگنانی در برخی از گیاهان سرده کتان و از لحاظ خواص ضد سرطانی و آنتی اکسیدانی حایز اهمیت هستند [25].

تنش اکسیداتیو نقش مهمی در پاتوژنز بیماری های مزمن مختلف مانند دیابت، سرطان و اختلالات قلبی- عروقی دارد. بنابراین اخیراً توجه به استفاده از آنتی اکسیدان های طبیعی برای حفظ سلامت انسان و پیشگیری و درمان انواع مختلف بیماری های مزمن افزایش یافته است. خواص آنتی اکسیدانی (+) لاریسینول در پراکسیداسیون لیپیدها، رادیکال های پراکسی و رادیکال های سوپراکساید موجب کاهش استرس اکسیداتیو می شود و این ترکیب خواص آنتی اکسیدانی شدیدتری نسبت به دیگر لیگنان ها دارد [14]. علاوه بر این در برخی مطالعات مصرف (+) لاریسینول از طریق غذا باعث کاهش رشد تومور و رگ زایی در سرطان سینه MCF-7 در موش های آزمایشگاهی شد [22, 26].

(+) پینورسینول نیز با خواص مشابه دارای اثرات آنتی اکسیدانی در هر دو رده سلولی سرطان سینه رده MDA-MB-231 و MCF7 است [27]. همچنین تیمار پینورسینول منجر به کاهش رشد و تکثیر سلول های سرطان روده رده HCT116، سرطان پروستات رده LNCaP، سرطان خون رده K562 و HL60 و انواع مقاوم به دارو HLR60 می شود [28].

با توجه به اینکه هیچ پژوهشی در ارتباط با اثرات سمیت سلولی و بررسی القای مرگ سلولی ایجاد شده توسط پینورسینول و لاریسینول بر گسترش سلول های سرطان سینه انسانی رده SKBr3 یافت نشد، در مطالعه حاضر، اثرات بیولوژیکی پینورسینول و لاریسینول بر رده سلولی SKBr3 مورد بررسی قرار گرفت. مطابق با دیگر یافته ها، نتایج نشان داد که تیمار پینورسینول و لاریسینول دارای اثرات سمیت سلولی معنی داری بر سلول های سرطان سینه رده SKBr3 است و موجب کاهش رشد و تکثیر سلول ها در حالت وابسته به غلظت می شود، به طوری که افزایش غلظت ترکیبات مورد آزمون موجب تشدید اثرات سمیت سلولی بر سلول های SKBr3 می شود. در ضمن تیمار لاریسینول دارای اثرات سمیت سلولی شدیدتری نسبت به پینورسینول بر رده سلولی SKBr3 است. همچنین تغییرات مورفولوژی سلول های SKBr3 تحت تاثیر تیمارهای پینورسینول و لاریسینول، نتایج به دست آمده از آزمون حیات سلولی را تایید می کند.

تشکر و قدردانی: از تمامی اساتید، دانشجویان و کارکنان دانشگاه تربیت مدرس و دانشگاه زنجان که در انجام این مطالعه کمال همکاری را انجام دادند، تشکر و قدردانی می‌شود.

تأییدیه اخلاقی: مطالعه حاضر توسط همه نویسندگان تأیید شده و در نشریه دیگری به زبان فارسی، انگلیسی یا زبان دیگری چاپ نشده یا به‌طور همزمان برای نشریه دیگری ارسال نشده است.

تعارض منافع: هیچ‌گونه تعارض منافعی وجود ندارد.

سهم نویسندگان: مونا سلطانی (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/ پژوهشگر اصلی/ نگارنده بحث (۶۰٪)؛ نجمه احمدیان‌چاشمی (نویسنده دوم)، روش‌شناس (۱۵٪)؛ محسن شریفی (نویسنده سوم)، پژوهشگر کمکی (۱۰٪)؛ رضا فتوت (نویسنده چهارم)، تحلیلگر آماری (۱۰٪)؛ مهرداد بهمنش (نویسنده پنجم)، روش‌شناس/ تحلیلگر آماری (۵٪).

منابع مالی: مطالعه حاضر با حمایت مالی دانشگاه‌های زنجان و تربیت مدرس انجام شد.

منابع

- 1- Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018;68(6):394-424.
- 2- Venkatadri R, Muni T, Iyer AK, Yakisich JS, Azad N. Role of apoptosis-related miRNAs in resveratrol-induced breast cancer cell death. *Cell Death Dis*. 2016;7(2):e2104.
- 3- Rezapour Kalkhoran M, Kazerouni F, Omrani MD, Rahimipour A, Shanaki M, Dehghan Nayeri N, et al. Cytotoxic effect of emodin on growth of SKBR3 breast cancer cells. *Int J Cancer Manag*. 2017;10(4):e8094.
- 4- Ahmadi A, Ramazani R, Rezagholi T, Yavari P. Incidence pattern and spatial analysis of breast cancer in Iranian women: Geographical information system applications. *East Mediterr Health J*. 2018;24(4):360-7.
- 5- Nafissi N, Khayamzadeh M, Zeinali Z, Pazooki D, Hosseini M, Akbari ME. Epidemiology and histopathology of breast cancer in Iran versus other Middle Eastern countries. *Middle East J Cancer*. 2018;9(3):243-51.
- 6- Gali-Muhtasib H, Hmadi R, Kareh M, Tohme R, Darwiche N. Cell death mechanisms of plant-derived anticancer drugs: beyond apoptosis. *Apoptosis*. 2015;20(12):1531-62.
- 7- Ardalani H, Avan A, Ghayour Mobarhan M. Podophyllotoxin: A novel potential natural anticancer agent. *Avicenna J Phytomed*. 2017;7(4):285-94.
- 8- Fantini M, Benvenuto M, Masuelli L, Frajese GV, Tresoldi I, Modesti A, et al. In vitro and in vivo antitumoral effects of combinations of polyphenols, or polyphenols and anticancer drugs: Perspectives on cancer treatment. *Int J Mol Sci*. 2015;16(5):9236-82.
- 9- Tsopmo A, Awah FM, Kuete V. Lignans and stilbenes from African medicinal plants. In: Kuete V, editor. *Medicinal plant research in Africa: Pharmacology and chemistry*. 1st Edition. Amsterdam: Elsevier;2013. pp. 435-78.
- 10- Cheshomi H, Aldaghi LS, Rezaei Seresht H. Cytotoxicity of the methanol extract of datura innoxia

در تمام سلول‌های سرطانی بدون در نظر گرفتن علت یا نوع سرطان، نشانه‌های مشابهی مانند رشد غیر قابل کنترل سلول‌ها، رگ‌زایی و فرار از آپوپتوز مشاهده می‌شود^[29]. شایع‌ترین مکانیزم‌های مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلول، آپوپتوز و نکروز هستند. برای توسعه یک عامل ضدسرطانی، آپوپتوز مکانیزم ترجیحی است، چون این فرآیند در سلول‌های منفرد رخ می‌دهد و برخلاف نکروز فاقد هر نوع اثر التهابی بر سلول‌های مجاور است^[30,31]. در حالی که در فرآیند نکروز یکپارچگی غشای سلولی مختل و انتشار مواد داخل سلولی به محیط خارج سلولی منجر به ایجاد پاسخ التهابی توسط سلول‌های ایمنی می‌شود که گاهی این التهاب موضعی ممکن است منجر به رشد تومور شود^[32].

در مطالعه حاضر براساس نتایج حاصل از فلوسایتومتری، تیمارهای پینورسینول و لاریسی‌رسینول بر مبنای IC₅₀ مشخص شده از هر ترکیب بر رده سلولی SKBr3 منجر به القای مرگ سلولی آپوپتوز در حالت وابسته به غلظت شد. همچنین تحت تأثیر تیمار لاریسی‌رسینول میزان القای آپوپتوز و نکروز در رده سلولی SKBr3 پس از ۷۲ ساعت بسیار بیشتر از تیمار پینورسینول بود. با این حال هر دو تیمارهای پینورسینول و لاریسی‌رسینول موجب القای کمتر نکروز نسبت به آپوپتوز در رده سلولی SKBr3 شدند و می‌توان نتیجه گرفت که تحت تأثیر تیمار با این ترکیبات لیگناتی مرگ سلولی عمدتاً به دلیل آپوپتوز رخ می‌دهد.

این نتایج مطابق با مطالعات متعدد دیگری است که نشان می‌دهند پینورسینول و لاریسی‌رسینول دارای فعالیت‌های ضدسرطانی هستند و منجر به القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی می‌شوند. روغن زیتون حاوی مقادیر بالایی از پینورسینول (۶۲٪) است و اثرات آپوپتوزی را در سلول‌های سرطانی روده بزرگ نشان می‌دهد^[33, 34]. همچنین تیمار پینورسینول موجب توقف سیکل سلولی در فاز G₀ و القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی HL60 می‌شود^[28]. تیمار لاریسی‌رسینول نیز موجب القای آپوپتوز در سلول‌های سرطان معده رده BGC-823 و سرطان کبد رده HepG2 می‌شود^[15, 35]. به‌طور کلی این یافته‌ها نشان می‌دهند که لیگنان‌ها ترکیبات رژیمی امیدوارکننده برای جلوگیری از انواع سرطان و به‌خصوص سرطان سینه هستند و بنابراین می‌توان از این ترکیبات برای بررسی‌های بیشتر و احتمالاً توسعه داروهای ضدسرطان جدید استفاده کرد.

در حال حاضر خواص ضدسرطانی ترکیبات گیاهی در شرایط آزمایشگاهی بررسی شده، اما هنوز در انسان مورد ارزیابی قرار نگرفته است. بنابراین پژوهش و مطالعات در جهت نشان دادن تأثیرات مفید این گیاهان برای درمان سرطان در انسان ضروری است.

نتیجه‌گیری

تیمارهای پینورسینول و لاریسی‌رسینول موجب القای آپوپتوز و مهار رشد و تکثیر در رده سلولی SKBr3 می‌شوند و می‌توانند در پیشگیری و درمان سرطان سینه مفید باشند.

- apoptosis in breast cancer cells. *Mol Pharmacol*. 2007;71(1):101-11.
- 24- Kuo HJ, Wei ZY, Lu PC, Huang PL, Lee KT. Bioconversion of pinoresinol into matairesinol by use of recombinant *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*. 2014;80(9):2687-92.
- 25- Satake H, Koyama T, Esmaeilzadeh Bahabadi S, Matsumoto E, Ono E, Murata J. Essences in metabolic engineering of lignan biosynthesis. *Metabolites*. 2015;5(2):270-90.
- 26- Airio M, Wärrä A, Mäkelä S, Saarinen NM. In vitro proliferation assays do not fully predict the MCF-7 tumor growth response to lignan lariciresinol in vivo. *Proc Am Assoc Cancer Res*. 2005;46:1223-1224.
- 27- López-Biedma A, Sánchez-Quesada C, Beltrán G, Delgado-Rodríguez M, Gaforio JJ. Phytoestrogen (+)-pinoresinol exerts antitumor activity in breast cancer cells with different oestrogen receptor statuses. *BMC Complement Altern Med*. 2016;16(1):350.
- 28- Sepporta MV, Mazza T, Morozzi G, Fabiani R. Pinoresinol inhibits proliferation and induces differentiation on human HL60 leukemia cells. *Nutr Cancer*. 2013;65(8):1208-18.
- 29- Pfeffer CM, Singh AT. Apoptosis: A target for anticancer therapy. *Int J Mol Sci*. 2018;19(2):448.
- 30- Bagheri E, Hajiaghaalipour F, Nyamathulla Sh, Salehen NA. The apoptotic effects of *Brucea javanica* fruit extract against HT29 cells associated with p53 upregulation and inhibition of NF- κ B translocation. *Drug Des Dev Ther*. 2018;12:657-71.
- 31- Porameesanaporn Y, Uthaisang-Tanechpongamb W, Jarintanan F, Jongrungruangchok S, Thanomsub Wongsatayanon B. Terrein induces apoptosis in HeLa human cervical carcinoma cells through p53 and ERK regulation. *Oncol Rep*. 2013;29(4):1600-8.
- 32- Ouyang L, Shi Z, Zhao S, Wang FT, Zhou TT, Liu B, et al. Programmed cell death pathways in cancer: A review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. *Cell Prolif*. 2012;45(6):487-98.
- 33- Ağalar HG, Çiftçi GA, Göger F, Kırimer N. Activity guided fractionation of *Arum italicum* miller tubers and the LC/MS-MS profiles. *Rec Nat Prod*. 2018;12(1):64-75.
- 34- Fini L, Hotchkiss E, Fogliano V, Graziani G, Romano M, De Vol EB, et al. Chemopreventive properties of pinoresinol-rich olive oil involve a selective activation of the ATM-p53 cascade in colon cancer cell lines. *Carcinogenesis*. 2008;29(1):139-46.
- 35- Zhang L, Si J, Li G, Li X, Zhang L, Gao L, et al. Umbelliprenin and lariciresinol isolated from a long-term-used herb medicine *Ferula sinkiangensis* induce apoptosis and G0/G1 arresting in gastric cancer cells. *RSC Adv*. 2015;5(110):91006-17.
- petals on MCF-7 and HEK-293 cell lines. *J Biomed*. 2016;1(2):e6623.
- 11- Sadeghi I, Behmanesh M, Ahmadian Chashmi N, Sharifi M, Soltani BM. 6-Methoxy podophyllotoxin induces apoptosis via inhibition of TUBB3 and TOP1A gene expressions in 5637 and K562 cancer cell lines. *Cell J*. 2015;17(3):502-9.
- 12- Thompson LU, Seidl MM, Rickard SE, Orcheson LJ, Fong HH. Antitumorigenic effect of a mammalian lignan precursor from flaxseed. *Nutr Cancer*. 1996;26(2):159-65.
- 13- During A, Debouche C, Raas T, Larondelle Y. Among plant lignans, pinoresinol has the strongest antiinflammatory properties in human intestinal Caco-2 cells. *J Nutr*. 2012;142(10):1798-805.
- 14- Bajpai VK, Alam MB, Quan KT, Kwon KR, Ju MK, Choi HJ, et al. Antioxidant efficacy and the upregulation of Nrf2-mediated HO-1 expression by (+)-lariciresinol, a lignan isolated from *Rubia philippinensis*, through the activation of p38. *Sci Rep*. 2017;7:46035.
- 15- Ma ZJ, Lu L, Yang JJ, Wang XX, Su G, Wang ZL, et al. Lariciresinol induces apoptosis in HepG2 cells via mitochondrial-mediated apoptosis pathway. *Eur J Pharmacol*. 2018;821:1-0.
- 16- Lee JH, Khor TO, Shu L, Su ZY, Fuentes F, Kong AN. Dietary phytochemicals and cancer prevention: Nrf2 signaling, epigenetics, and cell death mechanisms in blocking cancer initiation and progression. *Pharmacol Ther*. 2013;137(2):153-71.
- 17- Safarzadeh E, Sandoghchian Shotorbani S, Baradaran B. Herbal medicine as inducers of apoptosis in cancer treatment. *Adv Pharm Bull*. 2014;4(Suppl 1):421-7.
- 18- Ji CF, Ji YB. Apoptosis of human gastric cancer SGC-7901 cells induced by podophyllotoxin. *Exp Ther Med*. 2014;7(5):1317-22.
- 19- Kelly MG, Hartwell JL. The biological effects and the chemical composition of podophyllin. A review. *J Natl Cancer Inst*. 1954;14(4):967-1010.
- 20- Zi CT, Yang L, Xu FQ, Dong FW, Yang D, Li Y, et al. Synthesis and anticancer activity of dimeric podophyllotoxin derivatives. *Drug Des Dev Ther*. 2018;12:3393-406.
- 21- Kamińska M, Ciszewski T, Łopacka-Szatan K, Miotła P, Starosławska E. Breast cancer risk factors. *Prz Menopauzalny*. 2015;14(3):196-202.
- 22- Satake H, Ono E, Murata J. Recent advances in the metabolic engineering of lignan biosynthesis pathways for the production of transgenic plant-based foods and supplements. *J Agric Food Chem*. 2013;61(48):11721-9.
- 23- Peng XH, Karna P, O'Regan RM, Liu X, Naithani R, Moriarty RM, et al. Down-regulation of inhibitor of apoptosis proteins by deguelin selectively induces