مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی - مولکولی
دوره هشتم، شماره سی و دوم- پائیز۱۳۹۷

NCMBJ
Research Article
مقاله تحقیقی

بررسی اثر عصاره اسپیرولینا بر لاین سلولی DU145 و بیان ژن *OCT4* در سلول‌های تیمار شده با عصاره

لیلا زمانی، سعید ذاکر بستان آباد*، مسعود صالحی پور

گروه زیست شناسی،دانشکده علوم زیستی، واحد پرند، دانشگاه آزاد اسلامی، پرند، ایران

چکیده

سابقه و هدف: سرطان پروستات دومین بدخیمی رایج در مردان است. در مطالعه حاضر به بررسی اثر عصاره جلبک اسپیرولینا بر لاین سلولی DU145 سرطان پروستات و تغییر بیان ژن *OCT4* در سلول‌های سرطانی پرداخته شده است.

مواد و روش‌ها: عصاره جلبک اسپیرولینا بر لاین سلولی مذکور اثر داده شد و میزان میرایی سلول با روش MTT و تغییر بیان ژن OCT4 نیز با استفاده از Real Time PCR ارزیابی گردید.

یافته‌ها: در بررسی MTT پس از ۴۸ ساعت تعداد سلول‌های زنده نسبت به گروه کنترل کاهش معنادار داشت و بیان ژن OCT4 نیز کاهش یافته بود. با افزایش غلظت و زمان تغییرها معنادار شد. بیش‌ترین کاهش بیان در غلظت ۸۰۰ میکرومولار از عصاره در ۷۲ ساعت پس از تیمار مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: در نهایت می‌توان چنین نتیجه گرفت که عصاره اسپیرولینا با تأثیر بر ژن‌ها اصلی مسیر نامیرایی و کاهش بیان آن‌ها کمک به کاهش میزان تقسیم سلولی می‌کنند و این کاهش باعث عدم توسعه بافت سرطانی می‌شود.

واژه‌های کلیدی : *oct4*، اسپیرولینا، سرطان پروستات

مقدمه

سرطان یک اختلال ژنتیکی است که در آن کنترل نرمال رشد سلول از بین رفته است. ژنتیک سرطان هم‌اکنون یکی از تخصص‌های در حال گسترش است. در سطح مولکولی، سرطان به‌دلیل وقوع جهش یا جهش‌هایی در DNA اتفاق می‌افتد که باعث تکثیر بیش از حد سلول می‌شوند و بیش‌تر این جهش‌ها در سلول‌های سوماتیک رخ می‌دهند. با این وجود، برخی افراد جهش‌ها را به ارث می‌برند (۶).

سرطان شامل همه انواع تومورهای بدخیم می‌شود (۱۴) که در پزشکی آن‌ها را بیش‌تر با نام نئوپلاسم می‌شناسند. بروز سرطان در سنین مختلف وجود دارد ولی با افزایش سن احتمال ابتلا به سرطان زیادتر می‌شود (۴). سرطان باعث ۱۳٪ عوامل مرگ و میر انسان‌هاست (۲۶).

سرطان پروستات شایع‌ترین سرطان بدخیم در مردان است، که براساس آمار سال ۲۰۱۰ از بین سرطان‌های مردان، سرطان پروستات شایع‌ترین سرطان تشخیص داده شده و بیش‌ترین موارد بروز (۲۲درصد) و دومین علت مرگ و میر (۱۱درصد) پس از سرطان ریه (۲۹٪) را به خود اختصاص می‌دهد (۷).

علیرغم کاهش میزان بروز و مرگ از سرطان پروستات در ایالات متحده و برخی از دیگر کشورهای دیگر غربی، میزان بروز و مرگ از این سرطان در کشورهای کم‌تر توسعه یافته و در حال توسعه در حال افزایش است (۲).

مطالعه‌های مختلف نشان داده‌اند که در ایران نیز بروز این بیماری بیش از پیش شده است و در نهایت می‌توان نتیجه-

* نویسنده مسئول:
دانشگاه آزاد اسلامی، واحد پرند، پرند، ایران
پست الکترونیکی: saeedzaker20@yahoo.com
تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۰/۱۴
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۶/۲۱

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2021-12-08]
[DOR: 20.1001.1.22285458.1397.8.32.1.0]

گیری کرد که سرطان پروستات در کشور دارای یک روند افزایشی است و سهم این سرطان نسبت به کل سرطان‌ها در کشور رو به افزایش است، هم‌چنین روند بیماری در تمام استان‌ها از یک روند افزایش پیروی می‌کند ولی در برخی از استان‌ها مانند تهران و اصفهان این روند از سرعت بسیار بالاتری نسبت به استان‌های دیگر مانند سیستان و بلوچستان و قم برخوردار است. این روند متفاوت در استان‌های کشور نیز به نوبه خود می‌تواند به‌دلیل تفاوت در سبک زندگی، تغذیه، ژنتیک و تفاوت در تشخیص و درمان بیماری باشد. لذا با توجه به روند افزایشی این سرطان مطالعه در زمینه تشخیص زود هنگام بیماری، استفاده از روش‌های درمانی مؤثر بسیار حائز اهمیت است (۸).

راه‌کارهای مرسوم درمانی سرطان پروستات عبارتند از جراحی (برداشتن کامل غده پروستات یا پروستاتکتومی)، جراحی سرد یا سرما درمانی، شیمی درمانی، پرتو درمانی و آندروژن درمانی. عوارض درمانی راه‌کارهای موجود بسیار زیاد بوده و از طرفی روش‌هایی نظیر آندروژن درمانی نیز باعث ابقای سلول-های سرطانی غیروابسته به آندروژن می‌شود و این سلول‌ها در شرایط فقدان آندروژن به فعالیت خود ادامه می‌دهند و منجر به تشدید بیماری و در نهایت مرگ می‌شوند. این شکل از بیماری «شکل غیروابسته به آندروژن» نام دارد. در کل سرطان پروستات غیروابسته به آندروژن، نسبت به اپوپتوز القا شده در نتیجهٔ دست‌کاری هورمونی مقاوم است و بحث دیگری که باعث عدم موفقیت روش‌های درمانی مرسوم می‌شود ابقای سلول‌های بنیادی سرطانی است که با ویژگی نامیرایی و خود تجدیدپذیری احتمال عود بیماری را افزایش می‌دهند (۱۶). لذا یافتن روش‌های درمانی که با عوارض جانبی کم‌تر همراه باشد و سلول‌های بنیادی سرطان و ژن‌های مسئول تکثیر و ایجاد این سلول‌ها نظیر oct4، Nanog و Stat 3 را نیز هدف قرار دهد از اهمیت به‌سزایی برخوردار است.

OCT4 هم یک فاکتور پرتوانی است که در بسیاری از مطالعه‌ها به‌عنوان مارکر سلول‌های بنیادی سرطانی مورد استفاده قرار می‌گیرد. OCT4 دارای سه ایزوفرم است OCT4A، OCT4B و OCT4B1 که فقط OCT4A در پرتوانی نقش دارد و دو ایزوفرم دیگر OCT4B و OCT4B1 در مواقع استرس سلولی افزایش بیان دارند.

نام دیگر این ژن POU5F1[1] است که دارای ۸ ژن کاذب است که ژن کاذب ۱ به نام *OCT4P1* دارای ۹۸٪ همولوژی با *OCT4A*است(۶).

بیان ژن*Oct4* در سرطان‌های سوماتیک در چند سال اخیر بیش‌تر مورد توجه قرار گرفته است. دودمان‌های سلولی توموری پانکراس، کبد و پستان، همین‌طور دودمان‌های سلولی کلاسیک، نظیر Hela و Mcf7، همه بیان *Oct4* را آشکار کردند (۱).

محققان روی گیاهان زیادی مطالعه و تأثیر آن‌ها را روی بهبود سرطان بررسی کرده‌اند. یکی از گیاهانی که امروزه بسیار مورد توجه قرار گرفته است جلبک اسپیرولینا پلانتیس است. جلبک‌های دریائی از منابع عظیم میکروارگانیسم‌های دریائی هستند که مورد توجه بسیاری از صنایع داروئی و درمانی جهت تولید محصول‌های آینده قرارگرفته‌اند. اسپیرولینا یک نوع جلبک سبز تیره رنگ است. دارای میزان زیادی ویتامین و مواد معدنی است برای همین به آن معدن طلای غذایی می-گویند. این جلبک غنی از ترکیب‌های مفید نظیر اسید چرب-های ضروری، ویتامین‌های گروه B، ویتامین E و مواد معدنی نظیر آهن، منیزیوم ، سلنیوم و روی است. این جلبک‌ها علاوه بر این که منبع غنی از مواد غذایی با ارزش است یک ترکیب آنتی‌اکسیدان قوی نیز است که علت آن وجود ترکیب‌های فنولی و فیکوبیلی پروتئینی است و بسیاری از مطالعه‌ها نشان داده‌اند که این ترکیب می‌تواند در درمان سرطان مؤثر واقع شود (۲۸). هدف مطالعه حاضر بررسی اثر عصاره این جلبک بر میرایی سلول‌های سرطانی پروستات در لاین سلولی DU145 و بررسی میزان بیان ژن oct4 در این سلول‌ها در حضور عصاره این جلبک است.

مواد و روش‌ها:

این مطالعه در محیط آزمایشگاه و با استفاده از رده سلولی DU145 انجام شد. رده سلولی از بانک سلولی انیستیتو پاستور (تهران، ایران) تهیه شد .سلول‌های این رده سلولی در محیط کشت RPMI ۱۶۴۰ حاوی 2 Mm از L-گلوتامین، FBS 10% ،پنی‌سیلین به میزان 100 mL/unit و استریتوماسیون به میزان 100 mL/µg در دمای ۳۷ ° C و فشار ۵ ٪از CO_2 کشت داده شدند. برای تیمار سلول‌ها از عصاره اتانولی اسپیرولینا استفاده شد.

جلبلک به شکل پودر سبزرنگ به‌صورت تجاری خریداری شد. ۵ گرم پودر اسپیرولینا درون فالکون ریخته شد و ۲۵

[1] POU domain, class 5, transcription factor

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2021-12-08]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1397.8.32.1.0]

سی‌سی متانول به آن اضافه و با ورتکس به مدت ۲ دقیقه هم‌زده شد. در سانتریفوژ به‌مدت ۵ دقیقه با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه و دمای ۱۵ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژگردید به رسوب موجود در فالکون ۲۵ سی‌سی متانول تازه اضافه گردید. سپس همان شرایط ذکر شده دوباره سانتریفوژ شد. لایه رویی جدید به عصاره استخراج شده مرحله قبلی افزوده شد. این عصاره‌ها با کاغذ صافی فیلترشده و با شرایط ذکر شده دوباره سانتریفوژ شد. سپس محلول به‌دست آمده با متانول به حجم ۵۰ میلی‌لیتر رسانده شد. عصاره متانولی عصاره حاصل تا زمان آنالیز در فریزر با دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

به منظور تعیین اثرهای بهینه دارو، ۳ متغیر دوز و زمان در این تحقیق در نظر گرفته شد. سلول‌های سرطانی، با غلظت-های ۲۰۰، ۴۰۰ و ۸۰۰ میکرومولار از عصاره تیمار شدند و به‌ترتیب پس از زمان‌های ۱۲، ۲۴ و ۴۸ و ۷۲ ساعت مورد مطالعه قرار گرفتند. هم‌چنین سلول-های DU145که با دارو تیمار نشدند، به‌عنوان سلول‌های گروه کنترل استفاده شد. در ضمن به‌منظور افزایش بهره‌وری کار و بررسی مقایسه‌ای، آزمایش‌ها به‌صورت تریپلیکیت انجام شد. میزان حیات سلولی توسط تست MTT بررسی شد. جهت انجام تست سلول‌ها به پلیت ۹۶ خانه (۱۰۰۰۰ سلول در هر خانه) منتقل شدند. بعد از اتمام زمان تیمار سلول‌ها، محلول MTT (PBS 5 ml/mg) به چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه اضافه شد و به‌مدت ۲ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه قرار گرفتند. پس از طی زمان انکوباسیون، پلیت حاوی سلول‌ها با دور g ۱۰۰۰ به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس محلول رویی در چاهک‌ها خالی گردید و ۱۰۰ میکرولیتر محلول DMSO (Dimethyl sulfoxide) به هر کدام اضافه شد و به‌مدت ۱۰ دقیقه جهت حل کردن رسوب‌های بنفش MTT، تکان داده شد. سپس توسط الایزاریدر جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۵۷۰ نانومتر اندازه-گیری شد. علاوه‌بر این روش میزان بیان ژن OCT4 در دوزهای ۲۰۰ و ۸۰۰ میکرومولار در زمان‌های ذکر شده با میزان بیان این ژن در نمونه کنترل با استفاده از Real Time PCR ارزیابی شد. در این بررسی ژن GAPDH به‌عنوان ژن کنترل داخلی استفاده شد. از سلول‌های تیماری در زمان‌های مشخص با استفاده از کیت استخراج RNA شرکت تاکارا و بر اساس پروتوکل شرکت RNA استخراج شد و کیفیت و کمیت RNA با استفاده از نانودراپ ارزیابی گردید و سپس سنتز cDNA انجام شد و محصول به‌دست آمده پس از یکسان سازی غلظت در واکنش Real Time PCR به کار گرفت. مواد مورد استفاده در انجام Real Time PCR و توالی پرایمرها در جدول ۱ و ۲ نشان داده شده‌اند. نتایج حاصل از MTT با استفاده آنالیز واریانس و نرم‌افزار SPSS ورژن ۲۳ آنالیز گردید و نتایج حاصل از Real Time PCR را با استفاده از $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ارزیابی گردید.

نتایج:

میانگین میزان جذب سلولی در هر غلظتی در زمان‌های مختلف تیمار در جدول۳ و شکل ۱ نشان داده شده است که بر این اساس مشخص است که در هر بازه زمانی با افزایش غلظت عصاره اسپیرولینا میزان جذب که معرف سلول‌های زنده است کاهش یافته است اما این کاهش در ۱۲ ساعت اول بسیار ناچیز است. به‌منظور یافتن معناداری این کاهش از ازمون‌های آماری ANOVA استفاده شد. نتایج حاصل از آزمون ANOVA نشان داد که تعداد سلول‌ها پس از ۱۲ ساعت با هم اختلاف معنادار ندارد و $P\text{-Value} > 0.05$ است و در واقع می‌توان نتایج چنین برداشت کرد که عصاره اسپیرولینا در زمان ۱۲ ساعت اثر گذاری مناسب را نداشته است. نتایج در جدول ۴ نشان داده شده است. پس از ۲۴ و ۴۸ و ۷۲ ساعت میزان جذب کاهش یافته است که این کاهش جذب معنی‌دارنیز بود و مقدار $P\text{-Value} < 0.05$ شد (جدول۴). در بررسی بیان ژن OCT4 نیز استخراج RNA و سنتز cDNA انجام شد پس از بررسی کمیت و کیفیت نمونه‌ها سپس Real Time PCR انجام شد. نمودار تکثیری در شکل ۲ نشان داده شده است نتایج حاصل از بررسی CTهای تکثیری نشان داد بیان ژن در نمونه‌های تیماری نسبت به نمونه کنترل کاهش داشته است که تغییر زمان و غلظت نیز باعث تغییر بیان ژن می‌شود. کاهش بیان بین ۲۴ ساعت و ۴۸ ساعت تفاوت چندانی باهم ندارد اما بعد از ۷۲ ساعت تغییر بیان چشم‌گیر است و بیش‌ترین کاهش بیان در ۷۲ ساعت پس از تیمار در غلظت ۸۰۰ میلی‌گرم در لیتر از عصاره اسپیرولینا مشاهده شد (جدول ۵).

بحث:

یکی از سرطان‌های رایج در بین مردان سرطان پروستات است که این سرطان بیش‌ترین بروز و دومین علت مرگ مردان را به خود اختصاص می‌دهد (۲). با توجه به شیوع بالای این سرطان در مطالعه حاضر، این سرطان مورد توجه قرار گرفته است و به

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2021-12-08]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1397.8.32.1.0]

بررسی امکان درمان سرطان یا پیش‌گیری از پیشرفت آن توسط یک گیاه دریایی به نام اسپیرولینا پرداخته شد.
با توجه به هزینه‌های بالای درمانی یافتن داروهای گیاهی که هزینه درمان و عوارض جانبی کم‌تری باشند و بتوانند فعالیت آنتی اکسیدانی داشته باشند، از اهمیت بسیاری برخوردار است. مطالعه‌های مختلف نشان داده‌اند که رادیکال‌های آزاد می‌توانند منجر به بیماری‌های مخربی چون سرطان، دجنراسیون استخوان، پیری سلول و ... شوند. ترکیب‌های آنتی‌اکسیدان شامل کارتنوئیدها، فلاونوئیدها و ترکیب‌های حاوی گلوتاتیون و...می شود (۳).
جلبک اسپیرولینا یکی از گیاهانی است که غنی از ترکیب‌های آنتی‌اکسیدانی است. این جلبک در گذشته بر اساس ویژگی-های ژنتیکی، بیوشیمیایی و بیوفیزیکی جز باکتری‌ها طبقه-بندی شده بود، اما در حال حاضر در خانواده گیاهان قرار دارد. مطالعه‌های مختلف به نقش ضدسرطانی اسپیرولینا اشاره کرده‌اند و طی مطالعه‌های متفاوت مشخص شده است که نقش ضدسرطانی اسپیرولینا مربوط به اثر آن بر میتوکندری سلول‌های سرطانی، اثر بر مسیرهای پیام‌رسانی می‌شود (۱۲).
در مطالعه حاضر نیز به بررسی اثر عصاره اسپیرولینا بر لاین DU145 سرطان پروستات پرداخته شد. مطالعه‌های مختلف نشان داده‌اند که مصرف این جلبک می‌تواند باعث کاهش ابتلا به سرطان های کولون و ریه شود.
در سال ۲۰۰۱ Pinero Estrada و همکارانش نیز به بررسی اثر آنتی‌توموری اسپیرولینا پلانتیس پرداختند و نشان دادند که ترکیب‌های فیکوبیلوپروتئین و فیکوسیانین موجود در عصاره این جلبک دارای ویژگی انتی اکسیدانی بسیار قوی است (۱۷).
Pant و همکارانش در سال ۲۰۱۱ به بررسی اثر آنتی-اکسیدانی عصاره جلبک‌های آبی با استفاده از روش DPPH پرداختند. نتیجه حاصله نشان داد که عصاره متانولی این گروه از جلبک‌ها خاصیت آنتی‌اکسیدانی بسیار قوی دارد (۲۰).
در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۵ توسط khan و همکارانش انجام شد به نقش ضدسرطانی جلبک اسپیرولینا اشاره شده است این گروه نیز اذعان داشتند که این ویژگی مربوط به خاصیت آنتی‌اکسیدانی این جلبک است (۱۰).
در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۹ توسط Yuusuke Akao و همکارانش انجام شد به نقش اسپیرولینا در جلوگیری از پیشرفت تومورهای سرطانی پرداخته شد. مطالعه‌های این گروه به‌صورت in vivo و بر روی موش‌های آزمایشگاهی مبتلا به ملانوما بود. این گروه مشاهده کردند که در موش‌های تیمار شده با اسپیرولینا حجم توده توموری پس از مدتی نسبت به موش‌های کنترل کاهش معنادار داشت. آن‌ها یکی از دلایل ویژگی‌های آنتی‌توموری اسپیرولینا را به القا افزایش سلول‌های کشنده طبیعی NK cell در بدن موش‌ها عنوان کرده‌اند (۱).
در مطالعه حاضر نیز نتایج نشان داد که این عصاره می‌تواند باعث القا مرگ سلولی در لاین سرطان پروستات شود چراکه تعداد سلول‌های تیمار شده با این عصاره در بررسی MTT نسبت به گروه کنترل کاهش معنادار داشت البته این کاهش پس از ۴۸ ساعت به‌صورت بارزتر خود را نشان داد. از طرفی نتایج نشان داد که افزایش غلظت و زمان تأثیر نیز می‌تواند باعث افزایش اثرگذاری این عصاره بر تکثیر سلولی شود.
در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۴ توسط JaguSubhashini و همکارانش انجام شد نیز اثر عصاره اسپیرولینا بر القای مرگ سلولی در لاین سلولی لوکمیا K562 مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این گروه نشان داد که سلول‌هایی که با ۵۰ میکرومولار از فیکوسیانین تیمار شده بودند پس از ۴۸ ساعت کاهش ۴۹٪ در تعداد سلول‌ها را نسبت به گروه کنترل داشتند که این نتایج با نتایج حاصل از این مطالعه به‌طور کامل هم‌خوانی داشت. بررسی‌های میکروسکوپی این گروه بر روی سلول‌های تیماری نشان از القای آپپتوز در سلول‌ها داشت. لذا می‌توان کاهش تعداد سلول‌ها را در مطالعه حاضر نیز به دلیل القای آپپتوز در نظر گرفت (۲۷).
Karnati و همکارانش نیز به بررسی اثر فیکوسیانین موجود در عصاره جلبک بر لاین سلولی سرطان کبد HepG2 پرداختند و نشان دادند که این ماده باعث ایجاد تغییر در ساختار غشای میتوکندری و القا آپپتوز در سلول‌های تیمار شده می‌شود لذا می توان نتیجه گرفت که کاهش تعداد سلول مشاهده شده در این مطالعه در اثر وجود ترکیب فیکوسیانین موجود در عصاره و تغییر در غشای میتوکندری‌های سلول‌های تیماری بوده است (۲۱). در مطالعه دیگری که توسط Schwartz و همکارانش در سال ۲۰۰۹ انجام گرفت نیز، نشان داده شد که عصاره اسپیرولینا از رشد سرطان دهان در همستر ممانعت می‌کند (۲۲). Mathew و همکارانش در سال ۲۰۰۹ اثر جلبک اسپیرولینا بر سرطان دهان را بررسی کردند و مشاهده کردند که این جلبک باعث از بین رفتن زخم‌های دهانی در سرطان دهان می‌شود (۱۵). Konickova و همکارانش در سال ۲۰۱۴ اثر اسپیرولینا بر سرطان پانکراس را بررسی کردند و مشاهده کردند که ترکیب‌های موجود در این جلبک باعث کاهش تکثیر سلول‌های سرطانی پانکراس می‌شود (۱۱). Pan و همکارانش در سال ۲۰۱۵ نشان دادند

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2021-12-08]
[DOR: 20.1001.1.22285458.1397.8.32.1.0]

که عصاره اسپیرولینا باعث کاهش پرولیفراسیون سلولی در لاین سلولی تخمدان می‌شود و این کاهش پرولیفراسیون مربوط به فعال کردن کاسپازهای ۳،۸ و ۹ است و این گروه نشان دادند که با افزایش غلظت مؤثره این عصاره می‌توان القا آپوپتوز را از ۱/۹٪ به ۱۹/۸٪ رساند (۱۹).

مورد بعدی که در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفت اثر این جلبک بر بیان ژن oct4 بود.

این ژن یکی از ژن‌های مسئول تمایززدایی در سلول‌های سرطانی است که افزایش بیان آن در سلول‌های سرطانی به آن ویژگی سلول‌های بنیادی را القا می‌کند و باعث تکثیر نامحدود این سلول‌ها می‌شود لذا استفاده از موادی بر بیان این ژن اثر کاهنده داشته باشند نیز می‌تواند استراتژی مناسبی در درمان سرطان باشد (5). سوتومایور و همکاران بیان ژن *Oct-4* را در سرطان پروستات نشان دادند. هم‌چنین در این بررسی‌ها مشخص شد که میزان بیان ژن مذکور با درجه بدخیمی تومور نیز در ارتباط است؛ به این معنی که با افزایش بیان ژن *Oct-4* در نمونه‌های توموری پروستات، درجه بدخیمی آن نیز افزایش می‌یابد (۲۵). هم‌چنین در سال ۲۰۰۷کریستل و همکاران نشان دادند که درسلول‌های سرطانی جنینی، سه ژن *Nanog*، *Oct-4* و *Sox2* به‌طور هم‌زمان بیان می‌شوند (۲۳) و در سال۲۰۰۹ متیو و همکاران نشان دادند که در انواعی از سرطان‌های بدخیم نظیر پروستات، مثانه، مغز و ریه *Sox2* و *Oct-4* به‌طور هم‌زمان بیان می‌شوند (۲۴).

با بررسی‌های انجام گرفته مشخص شد که عصاره اسپیرولینا می‌تواند بر بیان این ژن اثر کاهنده داشته باشد. که این اثر با افزایش غلظت و زمان تغییرهای معنادار پیدا کرد. بیش‌ترین کاهش بیان در غلظت ۸۰۰ میکرومولار از عصاره در ۷۲ ساعت پس از تیمار مشاهده شد. ترکیب‌های مختلف جهت اثرگذاری بر بیان ژن *oct4* در سرطان‌ها مورد بررسی قرار گرفته اند. به‌عنوان مثال در مطالعه میرزایی و همکارانش اثر زردچوبه بر کاهش بیان ژن *oct4* مورد بررسی قرار گرفت و نشان داده شد که ترکیب‌های مؤثره آن در کاهش بیان oct4 مؤثر است (۱۸) و لذا در نتیجه‌گیری نهایی عنوان شده است که این ترکیب به‌دلیل توانایی کاهش بیان ژن‌های خود تجدید پذیر می‌تواند در مهار سلول‌های سرطانی مفید باشد، چنان‌چه که در مطالعه حاضر نیز نشان داده شد ترکیب‌های موجود در عصاره اسپیرولینا می‌توانند بیان ژن *oct4* را کاهش دهند.

نتیجه‌گیری:

با توجه به تأکید استفاده از داروها گیاهی در درمان سرطان، در این پژوهش تأثیر غلظت‌های مختلف اسپیرولینا بر بیان oct4 بر رده سلولی سرطان پروستات مورد بررسی قرار گرفت و نتایج نشان داد که عصاره اسپیرولینا با تأثیر بر ژن اصلی مسیر نامیرایی و کاهش بیان آن‌ها کمک به کاهش ویژگی نامیرایی سلول می‌کنند و این کاهش باعث عدم توسعه بافت سرطانی می‌شود. لذا می‌توان عنوان کرد مصرف اسپیرولینا به‌عنوان یک مکمل گیاهی می‌تواند باعث افزایش مرگ سلولی و از بین بردن سلول‌های بنیادی سرطان پروستات شود و احتمال ریشه‌کنی سرطان را افزایش دهد.

سپاسگزاری:

از معاونت پژوهش و فن‌آوری دانشگاه آزاد اسلامی واحد پرند برای تأمین منابع مالی این پروژه تشکر و قدردانی می‌شود.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2021-12-08]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1397.8.32.1.0]

جدول۱: توالی پرایمر ها

پرایمر	توالی پرایمر ها	طول
Forward-oct4	5'-ATTCAGCCAAACGACCATC-3´	۱۹۶
Reverse-oct4	5'- TTGCCTCTCACTCGGTTC -3´	
Forward-GAPDH	5'-GGTCATCATCTCTGCCCCCT-3´	۲۷۶
Reverse-GAPDH	5'-AGGCAGGGATGATGTTCTGG-3´	

جدول۲: برنامه زمانی انجام Real Time PCR

مرحله انجام	زمان انکوباسیون/ دمای انکوباسیون	تعداد سیکل
دناتورسیون اولیه	۹۵ درجه/۳۰ ثانیه	۱ سیکل
دناتوراسیون	۹۵ درجه/ ۵ ثانیه	۴۰ سیکل
اتصال پرایمر و طویل سازی رشته	۵۶ درجه/۳۵ ثانیه	

جدول۳: میانگین جذب در زمان های مختلف و دوز های مختلف تیمار با عصاره اسپیرولینا

	con	200	400	800
12h	0.528333	0.534333	0.509	0.522333
24h	0.6	0.57	0.48	0.4
48h	0.88	0.86	0.67	0.65
72h	0.79	0.71	0.61	0.51

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2021-12-08]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1397.8.32.1.0]

جدول۴: نتایج حاصل ازآنالیز آماری تست ANOVA

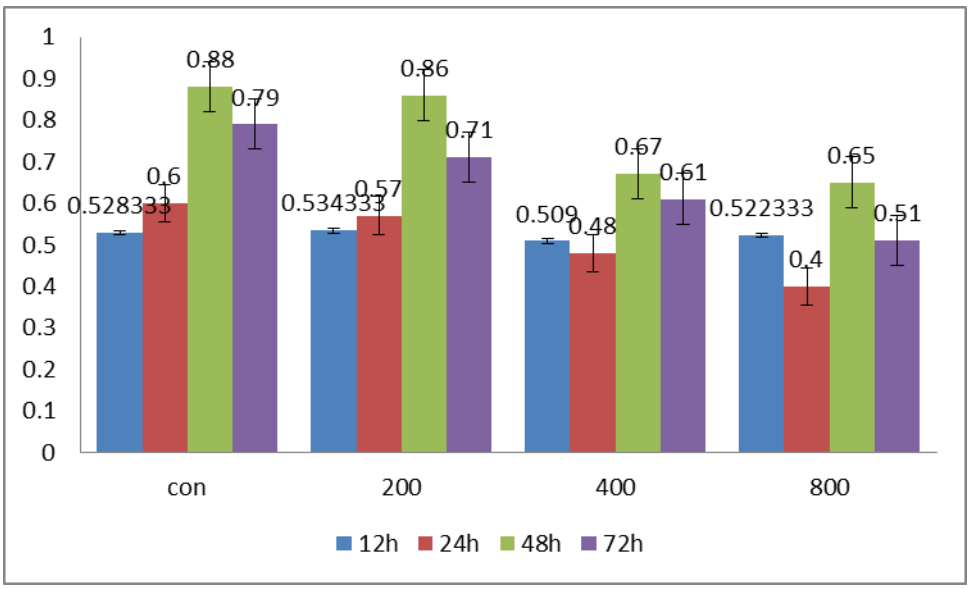
		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
-ساعت 12در جذب	Between Groups	.001	3	.000	.182	.906
	Within Groups	.015	8	.002		
	Total	.017	11			
ساعت 24 در جذب	Between Groups	.110	3	.037	27.934	.000
	Within Groups	.011	8	.001		
	Total	.121	11			
ساعت 48 در جذب	Between Groups	.138	3	.046	6.792	.014
	Within Groups	.054	8	.007		
	Total	.192	11			
ساعت 72 در جذب	Between Groups	.135	3	.045	14.445	.001
	Within Groups	.025	8	.003		
	Total	.159	11			

جدول۵: نتایج حاصل از Real Time PCR

	ΔCT_{Target}	$2^{-\Delta ct}$	$2^{-\Delta cttarget}/2^{-\Delta ctccontrol}$	Fold change
200mg/l in 24h	-۱/۶	۳/۰۳	۰/۲	کاهش ۵ برابر
200mg/l in 48h	-۱/۴	۲/۶۳	۰/۱۸	کاهش ۵,۵ برابر
200mg/l 72h	-۰/۵	۱/۴۱	۰/۱	کاهش۱۰ برابر
800mg/l 24h	-۰/۵	۱/۴۱	۰/۱	کاهش ۱۰ برابر
800mg/l in 48h	-۰/۴	۱/۳۱	۰/۰۹	کاهش ۱۱برابر
800mg/l In 72h	۱/۳	۰/۴	۰/۰۲	کاهش ۵۰ برابر
Control	-۳/۸	۱۳/۹۲	۱	۱

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2021-12-08]

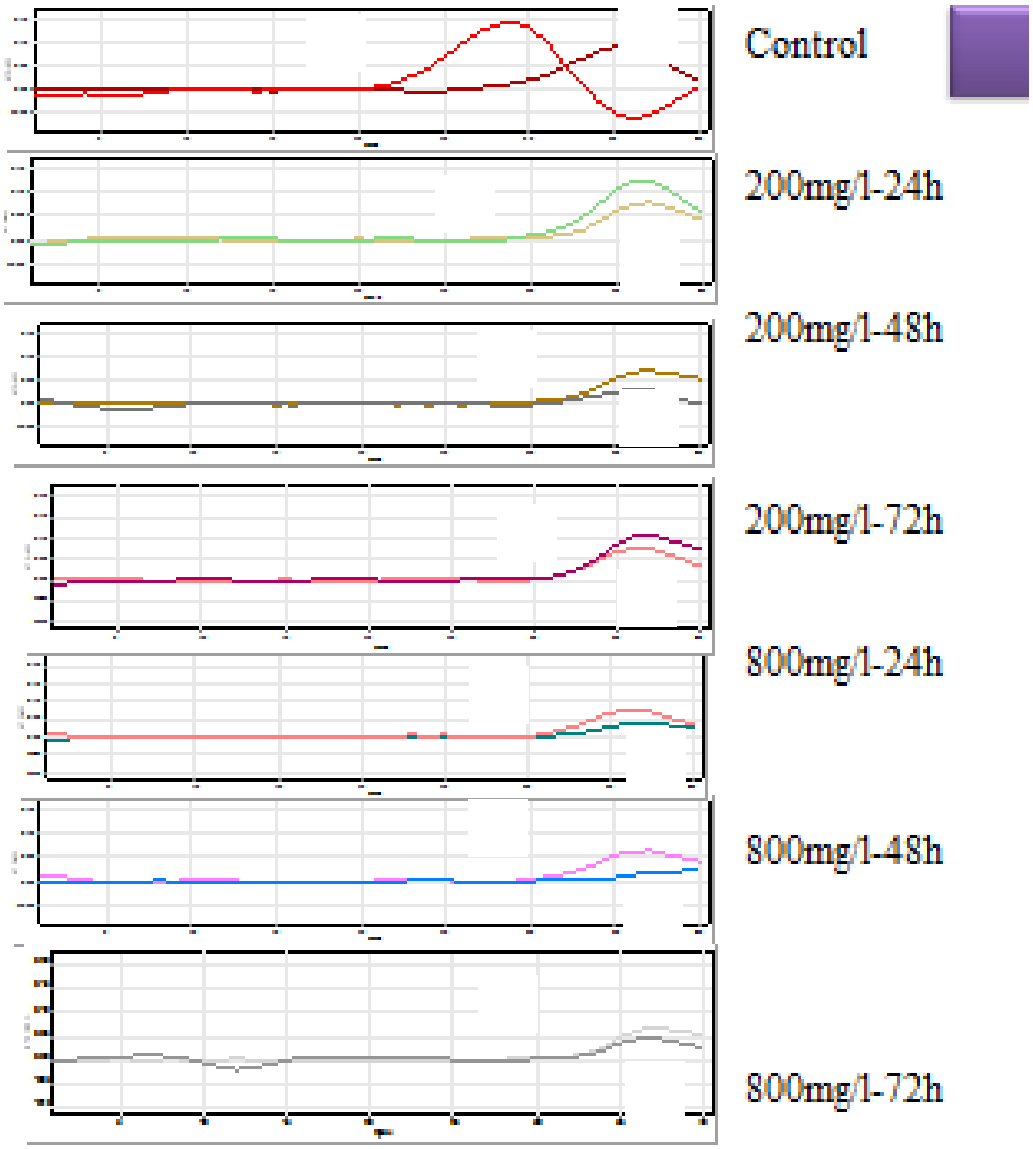
[DOR: 20.1001.1.22285458.1397.8.32.1.0]



شکل۱: نمودار میزان میانگین جذب در زمان‌ها و دوزهای مختلف تیمار با اسپیرولینا

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2021-12-08]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1397.8.32.1.0]



شکل۲: منحنی تکثیر Real Time PCR برای ژن *OCT4* و *GAPDH*

۱. بیان ژن *OCT4* در لاین سلولی DU-145

۲. منحنی تکثیر ژن کنترل داخلی *GAPDH*

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2021-12-08]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1397.8.32.1.0]

منابع

1- Akao Y, Ebihara T, Masuda H, Saeki Y, Akazawa T, Hazeki K, et al. Enhancement of antitumor natural killer cell activation by orally administered Spirulina extract in mice. Cancer science. 2009 Aug;100(8):1494-501.

2- American Cancer Society. Cancer Facts & Figures 2014. Atlanta: American Cancer Society.

3- Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1993 Sep 1;90(17):7915-22.

4- Crawford ED. Epidemiology of prostate cancer. Urology. 2003 Dec 22;62(6):3-12.

5- Ezeh UI, Turek PJ, Reijo RA, Clark AT. Human embryonic stem cell genes OCT4, NANOG, STELLAR, and GDF3 are expressed in both seminoma and breast carcinoma. Cancer. 2005 Nov 15;104(10):2255-65.

6- Gershwin ME, Belay A, editors. Spirulina in human nutrition and health. CRC press; 2007 Oct 8.

7- Hosseini M, Jahani Y, MAHMOUDI M, Eshraghian MR, Yahyapour Y, KESHTKAR AA. The assessment of risk factors for prostate cancer in Mazandaran province, Iran. J Gorgan Uni Med Sci2009;10(3):58-64. [Persian].

8- Hsing AW, Tsao L, Devesa SS. International trends and patterns of prostate cancer incidence and mortality. International journal of cancer. 2000 Jan 1;85(1):60-7.

9- Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics, 2010. CA: a cancer journal for clinicians. 2010 Sep 1;60(5):277-300.

10- Khan M, Shobha JC, Mohan IK, Naidu MU, Sundaram C, Singh S, et al. Protective effect of Spirulina against doxorubicin-induced cardiotoxicity. Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives. 2005 Dec;19(12):1030-7.

11- Konícková R, Vanková K, Vaníková J, Vánová K, Muchová L, Subhanová I, et al. Anti-cancer effects of blue-green alga Spirulina platensis, a natural source of bilirubin-like tetrapyrrolic compounds. Annals of hepatology. 2014 Apr 21;13(2):273-83.

12- Li XL, Wong YS, Xu G, Chan JC. Selenium-enriched Spirulina protects INS-1E pancreatic beta cells from human islet amyloid polypeptide-induced apoptosis through suppression of ROS-mediated mitochondrial dysfunction and PI3/AKT pathway. European journal of nutrition. 2015 Jun 1;54(4):509-22.

13- Nasrin Sadat Nabavizadeh, Zohreh Hojjati Najafabadi. Evaluation of expression of OCT4 and SOX2 autologous genes in breast cancer tissue using Real Time PCR. Government - Ministry of Science, Research, Technology - Isfahan University - Faculty of Science. 1392 Master's Thesis.

14- Nouri Dolloi Mohammad Reza, Ebrahimzadeh Vesal Reza. Molecular Genetics, Diagnosis, Prevention and Gene Therapy in Prostate Cancer. Review Article.

15- Mathew B, Sankaranarayanan R, Nair PP, Varghese C, Somanathan T, Amma BP, et al. Evaluation of chemoprevention of oral cancer with Spirulina fusiformis. " (1995): 197-202.

16- Miller GJ. Prostate cancer among the Chinese: pathologic, epidemiologic, and nutritional considerations. Advanced therapy of prostate disease. London, BC Decker. 2000:18-27.

17- Miranda MS, Cintra RG, Barros SB, Mancini-Filho J. Antioxidant activity of the microalga Spirulina maxima. Brazilian Journal of Medical and biological research. 1998 Aug;31(8):1075-9.

18-Mirzaei ,mohadreza mahmodi, mehdi hajizade ,mohamdreza begrezaei ,fahmide akbarpor ,vajihe bahramabadi. Investigating the effect of curcumin on the expression of OCT4, Nano and Nucleostemin genes in the AGS cell line (gastric adenocarcinoma). Community health 1396; (2)8: 27-19.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2021-12-08]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1397.8.32.1.0]

19- Pan R, Lu R, Zhang Y, Zhu M, Zhu W, Yang R, et al. Spirulina phycocyanin induces differential protein expression and apoptosis in SKOV-3 cells. International journal of biological macromolecules. 2015 Nov 1;81:951-9.

20- Pant GA, Kumar GA, Karthik LO, PRASUNA RG, VANKATA K, RAO B. Effect of electric treatment on total phenolic content and antioxidant activity of Anabaena variabilis. Int. J. Pharm. Pharm. Sci.. 2012;4:128-31.

21- Roy KR, Arunasree KM, Reddy NP, Dheeraj B, Reddy GV, Reddanna P. Alteration of mitochondrial membrane potential by Spirulina platensis C-phycocyanin induces apoptosis in the doxorubicinresistant human hepatocellular-carcinoma cell line HepG2. Biotechnology and applied biochemistry. 2007 Jul;47(3):159-67.

22- Schwartz J, Shklar G, Reid S, Trickier D. Prevention of experimental oral cancer by extracts of Spirulina-Dunaliella algae.2009.

23- Schwartz J, Shklar G, Reid S, Trickier D. Prevention of experimental oral cancer by extracts of Spirulina-Dunaliella algae.2009.

24- Schoenhals M, Kassambara A, De Vos J, Hose D, Moreaux J, Klein B. Embryonic stem cell markers expression in cancers. Biochemical and biophysical research communications. 2009 May 29;383(2):157-62.

25- Sotomayor P, Godoy A, Smith GJ, Huss WJ. Oct4A is expressed by a subpopulation of prostate neuroendocrine cells. The Prostate. 2009 Mar 1;69(4):401-10.

26- Stewart BW, Wild CP. World cancer report 2014. Self. 2018 Oct 18.

27- Subhashini J, Mahipal SV, Reddy MC, Reddy MM, Rachamallu A, Reddanna P. Molecular mechanisms in C-Phycocyanin induced apoptosis in human chronic myeloid leukemia cell line-K562. Biochemical pharmacology. 2004 Aug 1;68(3):453-62.

28- Tai MH, Chang CC, Olson LK, Trosko JE. Oct4 expression in adult human stem cells: evidence in support of the stem cell theory of carcinogenesis. Carcinogenesis. 2005 Feb 1;26(2):495-502.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2021-12-08]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1397.8.32.1.0]

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2021-12-08]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1397.8.32.1.0]