



مطالعه اثر درون تن و برون تن آلكالوئید كلشی سین بر رده سلول‌های سرطان پستان موشی (T1۴)

الهام ادهم فومنی: دانشجوی دکتری تخصصی زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، گروه زیست‌شناسی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
شیرا ایرانی: دانشیار، گروه زیست‌شناسی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
یلدا شکوهی نیا: دانشیار، گروه فارماکولوژی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران
علی مصطفایی: استاد ایمونولوژی، مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران (* نویسنده مسئول) amostafaie@kums.ac.ir

چکیده

کلیدواژه‌ها

كلشی سین،
سلول سرطان پستان موش،
آپوپتوز،
مطالعات درون و برون تن

زمینه و هدف: كلشی سین یک آلكالوئید تروپولانی است که به طور معمول برای درمان نقرس استفاده می‌شود. همچنین تأثیر درمانی بر سرطان از طریق القای آپوپتوز دارد، اما مسیرهای درگیر در این فرایند مبهم باقی مانده اند. آلكالوئیدها ترکیبات مهمی هستند که پتانسیل بالایی در درمان بیماریها از جمله انواع تومور دارند. آلكالوئیدهای مختلف، اثرات ضدتکثیر و ضدمتاستازی بر روی انواع مختلف سرطان در شرایط درون تن و برون تن (*in vivo* و *in vitro*) دارند. ترکیباتی مانند کامپتوسین، وین بلاستین و كلشی سین در حال حاضر با موفقیت به داروهای ضد سرطان توسعه یافته اند. تحقیقات گسترده نشان داده است که كلشی سین دارای خواص ضد تکثیر و ضد سرطان در طیف گسترده ای از رده های سلولی و حیوانات است. علاوه بر این، مطالعات اخیر نشان داده است که كلشی سین به عنوان عوامل ضد سرطان، می تواند به طور موثری باعث ایجاد آپوپتوز شود. این امر با تأثیرات بازدارنده آن بر رشد تعدادی از رده های سلولی تومور در شرایط درون تن و برون تن (*in vivo* و *in vitro*)، از جمله سلول معده، کارسینوم سلول های کبدی، سلول کبدی و کلانژیو کارسینوم نشان داده می شود. كلشی سین در دوزهای بالا بسیار سمی است که استفاده از آن را در درمان های درمانی سلول های انسان محدود می کند. فعال سازی خاص آپوپتوز در سلول های توموری یک رویکرد امیدوار کننده برای درمان سرطان می باشد. مطالعه حاضر به منظور بررسی برون تن و درون تن اثر این دارو بر رده سلول های سرطان پستانی موش انجام پذیرفت.

روش کار: این پژوهش از نوع بنیادی بوده که به روش تجربی انجام شد. ابتدا کشت سلول های سرطان پستان موش (4T1) خریداری شده از انستیتو پاستور ایران انجام گرفت. سپس اثر كلشی سین بر آپوپتوز و مسیرهای سیگنالینگ مرتبط، با استفاده از آزمایش های مختلف شامل سنجش زنده ماندن سلول، ریل تایم پی سی آر، رنگ آمیزی آنکسین V و پروپیدیوم یوآید، و تجزیه و تحلیل وسترن بلات تعیین شد. مطالعات درون تن نیز پس از القاء تومور در موش ها و سپس درمان آن ها انجام گرفت.

یافته ها: نتایج نشان داد که كلشی سین در غلظت ۳۰۰ میکروگرم در میلی لیتر ۵۰٪ سلول های سرطانی 4T1 را از بین برد. كلشی سین به مقدار قابل توجهی بیان mRNA بax و P53 را افزایش و مقدار بیان بcl-2 را کاهش داد. در مطالعه درون تنی نشان داده شد که در بافت توموری موش های تیمار شده با كلشی سین شواهد آپوپتوز و ناحیه تخریب و نکروز، به طور معنی داری وسیع تر از گروه تیمار نشده است.

نتیجه گیری: كلشی سین نقش موثری در مهار تکثیر سلول های سرطانی پستان داشت و مصرف آن به صورت خوراکی باعث کاهش اندازه تومور در موش ها، جلوگیری از تکثیر بیشتر و متاستاز و القای آپوپتوز شد.

تعارض منافع: گزارش نشده است.

منبع حمایت کننده: حامی مالی ندارد.

شبهه استناد به این مقاله:

Adham Foumani E, Irani S, Shokoohinia Y, Mostafaie A. *In Vivo* and *In Vitro* Effect of Colchicine on Mouse Breast Cancer Cell Line (4T1). *Razi J Med Sci.* 2024(31 Jan);30.179.

Copyright: ©2024 The Author(s); Published by Iran University of Medical Sciences. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

*انتشار این مقاله به صورت دسترسی آزاد مطابق با CC BY-NC-SA 4.0 صورت گرفته است.



In Vivo and In Vitro Effect of Colchicine on Mouse Breast Cancer Cell Line (4T1)

Elham Adham Foumani: PhD Student of cell and Molecular biology, Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Shiva Irani: Associate Professor, Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Yalda Shokoohinia: Associate Professor, Department of Pharmacognosy and Biotechnology, School of Pharmacy, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran

Ali Mostafaie: Professor, Medical Biology Research Center, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran (* Corresponding Author) amostafaie@kums.ac.ir

Abstract

Background & Aims: Alkaloids are important compounds that have a high potential in the treatment of diseases, including types of tumors. Different alkaloids have antiproliferative and antimetastatic effects on different types of cancer *in vitro* and *in vivo*. Compounds such as camptothecin, vinblastine, and colchicine have already been successfully developed into anticancer drugs. Colchicine binds to tubulin and interferes with tubulin polymerization, thereby disrupting microtubule formation. This issue leads to inhibiting the migration of leukocytes and other inflammatory cells and inhibiting the mitosis of dividing cells. Colchicine can also increase free cellular tubulin to limit mitochondrial metabolism in cancer cells through the inhibition of mitochondrial membrane voltage-gated anion channels. In addition, extensive research has shown that colchicine has anti-proliferative and anti-cancer properties in a wide variety of cell lines and animals. In addition, recent studies have shown that colchicine, as an anticancer agent, can effectively induce apoptosis. This is shown by its inhibitory effects on the growth of several tumor cell lines *in vitro* and *in vivo*, including gastric cell, hepatocellular carcinoma, hepatocellular carcinoma, and cholangiocarcinoma. Colchicine is highly toxic at high doses, which limits its use in human cell therapy. Apoptosis is a regulated and programmed cell death process that involves the activation of various molecules to initiate cell death. Specific activation of apoptosis in tumor cells is a promising approach for cancer treatment. Considering the role of colchicine in inducing apoptosis, it can be considered a suitable candidate for investigating anticancer effects in the form of *in vitro* studies on breast cancer cell models and *in vivo* studies on mouse models with mammary tumors. However, the specific mechanisms of colchicine-induced cytotoxicity are controversial due to the variability of signaling pathways in different cell types. In addition, colchicine is highly toxic at high doses and the exact mechanism of its apoptotic effects in breast cancer cells is still unclear. Colchicine is an alkaloid widely used to treat gout. It also has a therapeutic effect on cancer through the induction of apoptosis, but the pathways involved in this process remain unclear. The present study was conducted to investigate the effect of this drug on mouse Breast cancer cell line *in vitro* and *in vivo*.

Methods: This research is of a fundamental type that was carried out experimentally. First, mouse mammary cancer cells (4T1) purchased from Pasteur Institute of Iran were cultured. Then, the effect of colchicine on apoptosis and related signaling pathways was determined using various tests including cell viability assay, real-time PCR, annexin V and propidium iodide staining, and western blot analysis. *In vivo* studies were also performed after tumor induction in mice and then their treatment. Effect of colchicine and related signaling pathways were determined using different tests

Keywords

Colchicine,
Mouse Breast Cancer cell
line,
Apoptosis,
in vivo and *in vitro* study

Received: 05/08/2023

Published: 31/01/2024

including cell viability assay, real-time PCR, annexin V and propidium iodide staining and western blot analysis. *In vivo* studies were investigated through tumor induction with 4T1 cells in mice and then their treatment. After tumor formation, the antitumor activity of colchicine was compared in cancer mice. Tumor tissues after isolation, fixation and staining with hematoxylin and eosin were examined with a microscope for the presence of cancer symptoms.

Results: The results showed that colchicine at a concentration of about 300 µg/ml killed 50% of 4T1 cancer cells. Colchicine significantly increased *Bax* and *P53* mRNA expression and decreased *Bcl-2* gene expression. In the *in vivo* study, it was shown that in the tumor tissue of mice treated with colchicine, the evidence of apoptosis and the area of destruction and necrosis was much wider than that of the untreated group. The *in vivo* study showed that in the group treated with colchicine, the tumor tissue showed more evidence of apoptosis than the control group, and in the treated group, the area of destruction and necrosis was much wider than in the untreated group. In the tumor tissues of mice in the control group (without treatment), the signs of malignancy were more severe than in the group that had been treated, and abnormal mitotic forms were abundantly seen. Also, no metastases to the liver and spleen were observed in the treated group as well as in the control group. Finally, it can be concluded that the oral intake of pure colchicine reduces the size of induced tumors in mice, prevents further proliferation and metastasis, and induces Apoptotic. Studies have shown that tumors that grow faster, such as tumors from 4T1 cancer cells, are more invasive and metastasize to the surrounding tissues, but the cells of these tumors (with a high proportion of dividing cells) are the most sensitive to toxic compounds of the cell cycle, such as colchicine. They have sin. Continuous use of these compounds causes a high percentage of exposed cells to be destroyed. Reduction in the size of tumors and metastasis of cells to other places in mice treated with colchicine was observed in the present study.

Conclusion: Studies have shown that tumors that grow faster, such as tumors from 4T1 cancer cells, are more invasive and metastasize to the surrounding tissues, but the cells of these tumors (with a high proportion of dividing cells) are the most sensitive to They have cell cycle toxic compounds such as colchicine. Continuous use of these compounds causes a high percentage of exposed cells to be destroyed. Reduction in the size of tumors and metastasis of cells to other places in mice treated with colchicine was clearly observed in the present study. Colchicine had an effective role in inhibiting the proliferation of breast cancer cells, and its oral use reduced the size of induced tumors in mice, prevented further proliferation and metastasis, and induced apoptosis. The mechanism of toxicity of colchicine for cancer treatment is still not clear enough. In the present research, the results of all the tests showed that colchicine has an effective role in inhibiting the proliferation of mouse breast cancer cells and apoptosis through increasing the expression of pro-apoptotic genes and proteins *Bax* and *p53*, decreasing the expression of anti-apoptotic *Bcl2* genes and proteins, and ultimately induces the activation of caspases.

Conflicts of interest: None

Funding: None

Cite this article as:

Adham Foumani E, Irani S, Shokoohinia Y, Mostafaie A. *In Vivo* and *In Vitro* Effect of Colchicine on Mouse Breast Cancer Cell Line (4T1). *Razi J Med Sci.* 2024(31 Jan);30:179.

Copyright: ©2024 The Author(s); Published by Iran University of Medical Sciences. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

***This work is published under CC BY-NC-SA 4.0 licence.**

مقدمه

سرطان پستان شایع‌ترین سرطان در بین زنان در کشورهای توسعه یافته و در حال توسعه است (۱). در سال ۲۰۱۵ در ایالات متحده آمریکا حدود ۳٫۱ میلیون نفر به سرطان پستان مبتلا شدند. میزان مرگ و میر هر زن بر اثر سرطان پستان حدود ۱ در ۳۷ نفر، یا ۲٫۷ درصد است. در ایران سرطان پستان به عنوان شایع‌ترین سرطان شناخته شده است و همچنین پنجمین عامل اصلی مرگ و میر در میان زنان ایرانی است و مرگ و میر ناشی از آن به طور چشمگیری افزایش یافته است (۲-۴). تا به امروز، شیمی درمانی متداول‌ترین درمان برای سرطان سینه و سایر سرطان‌ها بوده است. با این حال، برخی از سلول‌های طبیعی نیز با این روش درمان از بین می‌روند. با توجه به طیف گسترده‌ای از فعالیت‌های بیولوژیکی و سمیت کم در مدل‌های حیوانی، برخی از محصولات طبیعی به عنوان درمان‌های جایگزین برای سرطان‌ها از جمله سرطان پستان استفاده شده است (۵ و ۶). بنابراین، یافتن ترکیبات طبیعی جدید با سمیت کم و گزینش پذیری بالا برای کشتن سلول‌های سرطانی یکی از مهم‌ترین زمینه‌های تحقیق است (۷).

آلکالوئیدها ترکیبات مهمی هستند که پتانسیل بالایی در درمان بیماری‌ها از جمله انواع تومور دارند. آلکالوئیدهای مختلف، اثرات ضد تکثیر و ضد متاستازی بر روی انواع مختلف سرطان در شرایط درون تن و برون تن (in vivo و in vitro) دارند. ترکیباتی مانند کامپتوسین، وین بلاستین و کلشی‌سین در حال حاضر با موفقیت به داروهای ضد سرطان توسعه یافته‌اند (۸). کلشی‌سین به توبولین متصل می‌شود و در پلیمریزاسیون توبولین تداخل ایجاد می‌کند و در نتیجه، شکل ریز لوله‌ها را مختل می‌کند. این موضوع منجر به مهار مهاجرت لکوسیت‌ها و دیگر سلول‌های التهابی و مهار میتوز سلول‌های در حال تقسیم می‌شود (۹ و ۱۰). کلشی‌سین همچنین می‌تواند توبولین سلولی آزاد را افزایش دهد تا متابولیسم میتوکندری را در سلول‌های سرطانی از طریق مهار کانال‌های آنیونی وابسته به ولتاژ غشای میتوکندریایی محدود کند (۱۱). علاوه بر این، تحقیقات گسترده نشان داده است که کلشی‌سین دارای خواص ضد تکثیر و ضد سرطان در

طیف گسترده‌ای از رده‌های سلولی و حیوانات است. علاوه بر این، مطالعات اخیر نشان داده است که کلشی‌سین به عنوان عوامل ضد سرطان، می‌تواند به طور موثری باعث ایجاد آپوپتوز شود. این امر با تأثیرات بازدارنده آن بر رشد تعدادی از رده‌های سلولی تومور در شرایط in vivo و in vitro، از جمله سلول معده (۱۲)، کارسینوم سلول‌های کبدی (۱۳)، سلول کبدی (۱۴) و کلانژیوکارسینوم (۱۵) نشان داده می‌شود. کلشی‌سین در دوزهای بالا بسیار سمی است که استفاده از آن را در درمان‌های درمانی سلول‌های انسان محدود می‌کند (۱۲). آپوپتوز یک فرآیند تنظیم شده و برنامه ریزی شده مرگ سلولی است که شامل فعال شدن مولکول‌های مختلف برای شروع مرگ سلولی می‌شود. فعال سازی خاص آپوپتوز در سلول‌های توموری یک رویکرد امیدوار کننده برای درمان سرطان می‌باشد. بسیاری از مطالعات نشان دادند که اثر آن بر مرگ سلولی با فعال شدن مسیر کاسپاز ۳ است، اما مسیرهای درگیر در این فرآیند مبهم باقی‌مانده است (۱۴). براین اساس در این طرح اثر کلشی‌سین خالص بر ژن‌های دخیل در مسیر مرگ سلولی در سرطان پستان از جمله P53، Bcl-2 و Bax مورد بررسی قرار داده شد.

با توجه به نقش کلشی‌سین در القاء آپوپتوز، می‌توان آن را به عنوان یک کاندید مناسب به منظور بررسی اثرات ضد سرطانی در قالب مطالعات برون تنی بر روی مدل سلولی سرطان پستان و مطالعات درون تنی بر روی مدل موشی مبتلا به تومور پستانی در نظر گرفت.

با این حال، مکانیسم‌های خاص سمیت سلولی ناشی از کلشی‌سین به دلیل متغیر بودن مسیرهای سیگنالینگ در انواع مختلف سلول‌ها بحث برانگیز است. علاوه بر این، کلشی‌سین در دوزهای بالا بسیار سمی است (۱۶) و مکانیسم دقیق اثرات آپوپتوز آن در سلول‌های سرطانی پستان هنوز نامشخص است.

در مطالعه حاضر اثر کلشی‌سین خالص بر رده سلولی 4T1 (سلول‌های آدنوکارسینومای پستانی موشی) در شرایط برون تن و درون تن (ایجاد تومور در مدل موشی) مطالعه شد.

روش کار

تهیه کلشی سین: کلشی سین مورد نیاز در این مطالعه از شرکت Alexis خریداری شد. جهت تایید خصوصیات و درصد خلوص پودر خریداری شده با استفاده از طیف ف FTIR، NMR و اسکن با اسپکتوفتومتر مورد آنالیز قرار گرفت.

کشت سلول: رده سلولی سرطان سینه موشی (4T1) از موسسه پاستور ایران خریداری شد (کلیه روش های آزمایشی مطابق با اصول اخلاقی و اخذ کد اخلاق انجام گرفت). کشت سلول های سرطانی موشی (4T1) در محیط کشت Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) با ۱۰٪ سرم جنینی گاوی (FCS) همراه ۱۰۰ واحد در میلی لیتر پنی سیلین، و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر استرپتومایسین در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد با ۵٪ CO₂ انجام شد.

آزمون مرگ سلولی و مهار تکثیر در غلظت های مختلف کلشی سین: به منظور ارزیابی اثرات سایتوتوکسیسیته از آزمون تریپان بلو استفاده شد و اثر سایتوتوکسیک کلشی سین خالص پس از ۲۴ ساعت از زمان تیمار، در رده سلولی سرطان سینه موشی (4T1) بررسی گردید.

برای بررسی تاثیر کلشی سین بر روی تکثیر رده های سلولی سرطانی (4T1)، بعد از گذشت ۴۸ ساعت از زمان اثر دهی داروها از آزمون MTT استفاده شد.

استخراج RNA: ابتدا به حدود 1×10^6 سلول 4T1 یک میلی لیتر از محلول RNX-plus اضافه گردید و به خوبی هم زده شد. مخلوط ۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. در تمام مراحل استخراج RNA حفظ زنجیره سرمایی لازم رعایت شد. در مرحله بعد به مخلوط ۲۰۰

میکرولیتر کلروفرم اضافه گردید و به مدت ۱۵ ثانیه لوله به شدت تکان داده شد و به مدت پنج دقیقه در دمای چهار درجه سانتی گراد یا روی یخ نگه داشته شد. نمونه ها در 15000 g به مدت ۱۵ دقیقه در دمای چهار درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شد. فاز آبی بالایی (حاوی RNA) به آرامی و توسط سمپلر، جدا و به یک لوله جدید منتقل شد. به منظور رسوب دادن RNA هم حجم مایع جدا شده، ایزوپروپانول سرد اضافه شد و به مدت ۱۵ دقیقه در چهار درجه سانتی گراد نگهداری شد. پس از اتمام این مدت میکروتیوب در میکرو سانتریفیوژ در دمای چهار درجه سانتی گراد قرار داده شد. مایع رویی دور ریخته شد و به رسوب اتانول ۷۵ درصد سرد اضافه گردید و ورتکس شد تا رسوب در انتهای میکروتیوب جدا شود. مایع رویی به طور کامل دور ریخته شد و رسوب خشک گردید. رسوب RNA جهت انجام مراحل بعدی در ۷۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد. به منظور تعیین غلظت، یک میکرولیتر از محلول RNA را برداشته و با دستگاه (Thermo Nano 2000c drop) میزان RNA سنجیده شد. ارزیابی کمی RNA با روش تعیین دانسیته نوری (Optical density) انجام و میزان جذب در طول موج ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر اندازه گیری شد.

طراحی پرایمر: برای طراحی پرایمرها ابتدا توالی کل ژن ها و توالی اگزون های ژن مورد نظر از سایت NCBI پیدا شدند. سپس این توالی ها در نرم افزار Pre Primer وارد شدند و این نرم افزار تعدادی پرایمر برای هر ژن در اختیار ما قرار داد که ساختار هر کدام از آنها به طور مجزا مورد بررسی قرار گرفت و سپس با مقایسه این توالی ها با توالی های پرایمری که در مقالات برای این

جدول ۱- توالی پرایمرهای ژن ها در رده سلولی 4T1

Primer	Nucleotide Sequence	mRNA length
<i>β-actin-F</i>	5'-CAGGTCATCACTATTGGCAACGAG-3'	82
<i>β-actin-R</i>	5'-CACAGGATTCATACCCCAAGAAGG-3'	
<i>Bcl2-F</i>	5'-GGAGTGTGAGGACCCAATCTG-3'	151
<i>Bcl2-R</i>	5'-CCCAAACAAATACATAAGGCAACC-3'	
<i>P53-F</i>	5'-CCGACCTATCCTTACCATCATCAC-3'	84
<i>P53-R</i>	5'-GCACAAACACGAACCTCAAAGC-3'	
<i>Bax-F</i>	5'-TTTGCTACAGGGTTTCATCCAG-3'	140
<i>Bax-R</i>	5'-TGTCAGTTCATCTCCAATTCG-3'	

PBS (بافر فسفات نمکی) استریل شسته شد. سپس حدود ۲۰۰ میکرولیتر بافر لیز که شامل اوره ۸ مولار، تیوره ۲ مولار، تریس ۵۰ میلی مولار PMSF (فنیل متیل سولفونکساید) ۰/۱ میلی مولار بود به هر چاهک اضافه گردید و ۱۰-۵ دقیقه زمان داده شد تا سلول ها از کف پلیت جدا و لیز شوند. لیزات سلولی هر چاهک به یک میکروتیوب، منتقل و سپس سانتریفیوژ شد تا ذرات درشت رسوب نماید. مایع رویی جهت تعیین غلظت پروتئین و الکتروفورز جمع آوری و تقسیم بندی شد و در فریزر ۲۰- سانتی گراد نگهداری گردید.

تعیین غلظت پروتئین با روش برادفورد انجام شد. عنوان پروتئین نمونه با استفاده از آلومین گاوی به عنوان پروتئین استاندارد سنجیده شد. پس از تعیین غلظت پروتئین هر بار ۴۰ میکروگرم پروتئین برای الکتروفورز در ژل آکریلامید وسترن بلات مورد استفاده قرار گرفت. برای انجام بلاتینگ بعد از الکتروفورز، بخش متراکم کننده ژل جدا شد و ژل ۱۰ دقیقه در بافر انتقال قرار گرفت. سپس ژل پلی اکریل آمید و غشای PVDF به صورت ساندویچ بین ۳ لایه کاغذ واتمن و یک لایه اسفنج در هر طرف قرار گرفتند. مجموعه بلات در قالب پلاستیکی مربوط محکم شد و در تانک بلات حاوی بافر انتقال قرار گرفت. الکتروفورز در دمای ۸-۴ درجه سانتی گراد داخل یخچال به مدت یک ساعت در شدت جریان ثابت ۱۰۰ میلی آمپر و سپس به مدت یک ساعت در شدت جریان ثابت ۲۰۰ میلی آمپر و سپس دو ساعت در شدت جریان ثابت ۳۰۰ میلی آمپر انجام گرفت. تشخیص باندهای پروتئینی با رنگ آمیزی اختصاصی در غشاء بر پایه واکنش آن ها با لیگاندهای اختصاصی (آنتی بادی ها) صورت گرفت (۱۸). در مطالعه حاضر هدف سنجش پروتئین های دخیل در آپوپتوز شامل Caspase-3, Caspase-9, P53, BAX, BCL2 β -ACTIN بود. بنابراین آنتی بادی های علیه این پروتئین ها از شرکت SANTA CRUZ خریداری شد. آنتی بادی های اولیه برای اتصال به پروتئین های باند شده به غشاء در محلول کازئین ۱٪ در PBS حاوی توپین بیست تهیه شدند. آنتی بادی های ضد پروتئین های P53, BAX و BCL-2 با رقت ۱ به ۳۰۰، آنتی بادی ضد پروتئین β -ACTIN با رقت ۱ به ۱۰۰۰ و

ژن ها طراحی شده بود بهترین و کارآمد ترین از بین آن ها انتخاب گردید. به منظور اطمینان از صحت توالی، توالی تمام پرایمرها BLAST شدند و جهت تأیید اندازه قطعه مورد نظر و ارزیابی اینکه اگر توالی های پرایمر به DNA های احتمالی موجود در نمونه استخراج شده متصل شدند قطعه حاصل چه اندازه خواهد بود، جفت پرایمرها BLAST-Primer گردیدند. سعی شد پرایمرهای انتخاب شده دارای اندازه محصول کوچک (زیر ۲۵۰ جفت باز) باشند. پرایمرها همچنین در سایت MFE primer بررسی و توسط شرکت سینا ژن (کرج، ایران) ساخته شدند. ویژگی پرایمرهای که مورد استفاده قرار گرفت در جداول ۱ آمده است. ژن بتا اکتین به عنوان ژن مرجع در نظر گرفته شد.

مراحل انجام Quantitative Real-time PCR

جهت بررسی کمی بیان رونوشت های P53, Bax, Bcl2 بررسی بیان ژنهای P53, Bax, Bcl2 و ژن مرجع β -Actin در مطالعه حاضر، با استفاده از تکنیک quantitative Real-time PCR و رنگ فلوروسانس SYBR-Green I در دستگاه Corbett Rotor-GeneTM 6000 طبق دستورالعمل کیت SYBER GreenER Fluorescent ساخت شرکت Takara (ژاپن) انجام گرفت. آزمایش برای هر نمونه به صورت دوتایی (Duplicate) انجام شد.

آنالیز نتایج Real-time PCR و تجزیه و تحلیل آماری: در این تحقیق از روش تعیین مقدار نسبی، که سیگنال PCR رونوشت هدف را در یک گروه تیمار به نمونه دیگر به عنوان کنترل تیمار نشده ارتباط می دهد، استفاده و از فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$ که اولین بار توسط Livak پیشنهاد شد برای آنالیز تغییرات نسبی در بیان ژن های حاصل از آزمایش ها استفاده گردید (۱۷).

سنجش پروتئین های دخیل در آپوپتوز با استفاده از ایمنوبلاتینگ: به منظور دستیابی به پروتئین های سلول های 4T1، کشت این سلول ها در پلیت های ۶ خانه ای انجام شد. بعد از گذشت ۲۴ ساعت از کشت اولیه محیط رویی تخلیه و داروی کلشی سین در غلظت های ۲۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم در میلی لیتر روی رده سلولی 4T1 اثر داده شد. بعد از گذشت ۲۴ ساعت از زمان اثر دارو و فراکسیون کلشی سین، محیط رویی دور ریخته شد و سلول ها ۲ بار با

کلشی سین در این گروه از موش‌های سرطانی نسبت به موش‌های گروه کنترل مورد مقایسه قرار گرفت. توده توموری باقی مانده یا محل قبلی وجود تومور از طریق جراحی برداشته و به آزمایشگاه پاتولوژی ارسال گردید. تومورهای جدا شده از موش یک شب در FineFix فیکس، شستشو و سپس دوباره در پارافین قرار داده شدند. برای رنگ آمیزی HES برش‌هایی از تومور چسبیده به پارافین تهیه شد. در این نوع رنگ آمیزی ابتدا هماتوکسیلین باعث بنفش یا آبی شدن هسته سلول‌ها شده، سپس ائوزین باعث قرمز یا صورتی شدن سیتوپلاسم، کلاژن و کراتینوسیت‌ها می‌شود.

یافته‌ها

بررسی اثرات سایتوتوکسیک کلشی سین خالص بر روی رده سلولی سرطانی موشی (4T1):

اثر سایتوتوکسیک کلشی سین پس از ۲۴ ساعت از زمان تیمار در رده سلولی 4T1 بررسی گردید. همان‌طور که در نمودار ۱ دیده می‌شود، کلشی سین تا غلظت ۴۰ میکروگرم در میلی‌لیتر دارای اثر سایتوتوکسیک کمتر از ۳۰٪ بود، اما در غلظت ۲۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر تقریباً ۵۰٪ سلول‌های تیمار شده دچار مرگ شدند و این نسبت در غلظت ۸۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به حدود ۹۰٪ رسید. بنابراین CC_{50} برای سلول‌های 4T1 حدود ۳۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر محاسبه شد.

تاثیر کلشی سین خالص بر روی تکثیر رده سلولی 4T1

برای بررسی تاثیر کلشی سین خالص بر روی تکثیر رده‌های سلولی سرطانی 4T1 بعد از گذشت ۴۸ ساعت از زمان اثر دهی داروها از آزمون MTT استفاده شد. تعداد سلول‌های زنده 4T1 در غلظت ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر کلشی سین خالص به میزان ۷۵٪ گروه کنترل رسید. اما با افزایش غلظت کلشی سین (در غلظت ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) تکثیر سلولی به زیر ۳۰ درصد با $p < 0.001$ کاهش یافت، به طوری که در غلظت حدود ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر دارو میزان تکثیر سلول‌ها نسبت به گروه کنترل ۵۰٪ شد (نمودار ۲).

آنتی بادی‌های ضد Caspase-3 و Caspase-9 با غلظت ۱ به ۵۰۰ تهیه شد و به این محلول‌ها بعد از تهیه سدیم آزاید (به عنوان محافظ) در غلظت نهایی ۰/۰۱ درصد اضافه شده و مورد استفاده قرار گرفت.

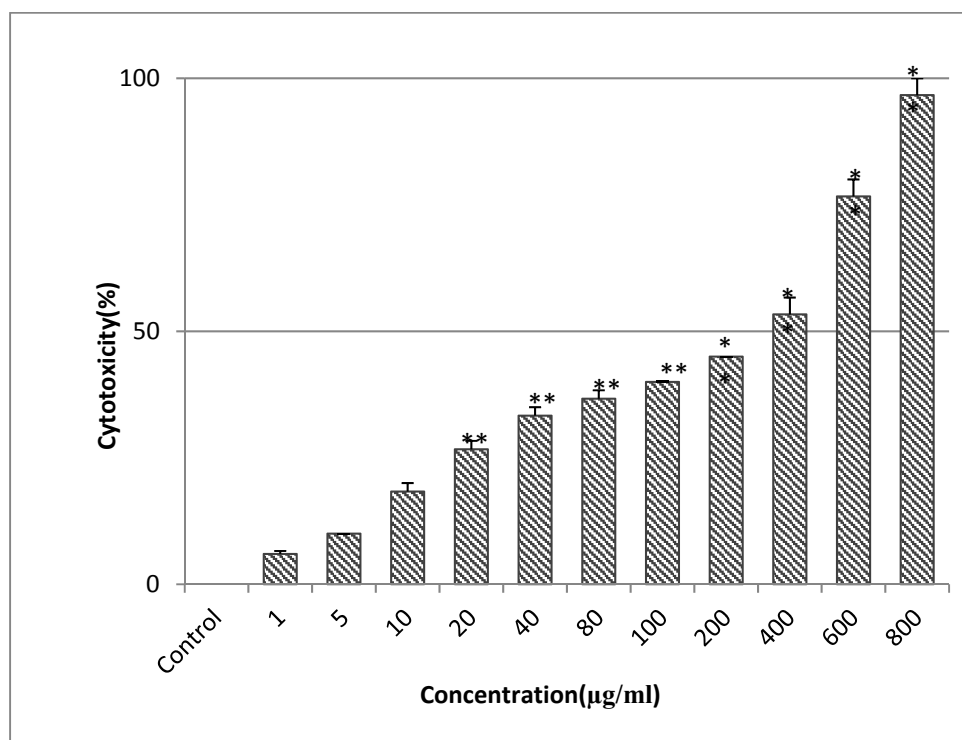
آنتی بادی‌های ثانویه مورد استفاده در این تحقیق با آنزیم پراکسیداز ترب کوهی (Horseradish -HRP peroxidase) کنژوگه شده و برای اتصال به هر نوع آنتی بادی‌های اولیه بز، خرگوشی و موش مناسب بود (برحسب نوع آنتی بادی اولیه خریداری شده و اینکه از چه موجودی به دست آمده است، آنتی بادی ثانویه مناسب کنژوگه شده با HRP مورد استفاده قرار گرفت) (۱۸).

تهیه مدل درون تن با تزریق سلول‌های سرطانی

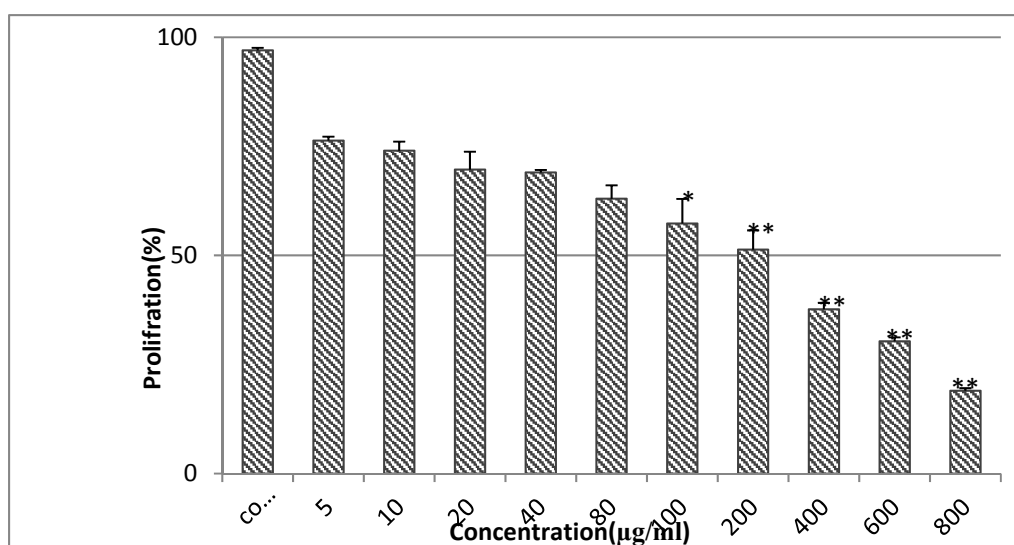
به موش: برای القای سرطان با استفاده از روش کاشت سلول‌های سرطانی، سلول‌های 4T1 در محیط DMEM حاوی ۱٪ آل-گلوتامین، ۱۰٪ سرم جنین گاوی (Fetal bovine serum-FBS)، ۶۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر پنی‌سیلین و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر استرپتومایسین کشت داده شدند و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و CO_2 ۵٪ انکوبه شدند. برای ایجاد تومور در موش‌های BALB/c، سلول‌های 4T1 که دارای منشأ سلولی از همین موش‌ها هستند، در بافر PBS به تعلیق درآمده و به هر کدام از موش‌ها تعداد نیم میلیون سلول (5×10^5 سلول در ۰/۱ میلی‌لیتر PBS) به صورت زیر پوستی از ناحیه پایین پشت (lower back) تزریق شد. هر سه روز یک بار موش‌ها از نظر ایجاد تومور در ناحیه پایین پشت بررسی و لمس شدند. وقتی حجم تومور به اندازه قابل قبول رسید و قابلیت اندازه‌گیری داشت (تقریباً بعد از گذشت ۱۰ روز) مراحل بعدی یعنی تجویز کلشی سین خالص آغاز گردید. ۱۰ سر موشی که تومور در آن‌ها ایجاد شده و به ابعاد مناسب و قابل اندازه‌گیری رسیده بود وزن و به دو گروه (هر گروه شامل ۵ سر موش) تقسیم شدند. یک گروه به عنوان کنترل، یک گروه تحت درمان با داروی کلشی سین قرار گرفتند. داروی کلشی سین در آب مقطر استریل حل شد. موش‌های گروه تیمار به مدت ۱۰ روز متوالی و هر روز یک دوز (۵/۸ میلی‌گرم بر کیلوگرم، ۰/۱۲ mg/mouse/day) از طریق خوراکی تحت درمان قرار گرفتند و فعالیت ضد توموری داروی

ساخته شد. نتایج آزمون Real-Time PCR در نمودار ۳ نشان داده شده است. در غلظت ۲۰۰ میکرو گرم در میلی لیتر کلشی سین خالص، ژن *p53* نسبت به کنترل ۱/۰۷ فولد افزایش بیان داشته است. در غلظت ۴۰۰ میکرو گرم در میلی لیتر دارو ژن *p53* افزایش بیان ۲/۷۳ برابری را نسبت به حالت کنترل نشان

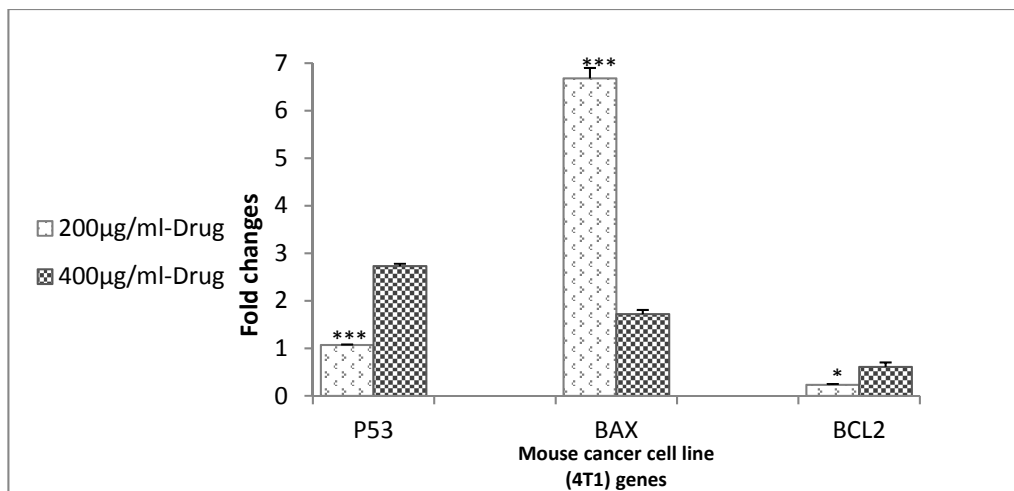
نتایج آزمون Real-Time PCR کلشی بر بیان ژن های *Bcl-2*, *p53* و *Bax* در رده سلولی 4T1 بعد از کشت سلول های رده 4T1 و تیمار آن ها با غلظت های ۲۰۰ و ۴۰۰ میکرو گرم در میلی لیتر (غلظت برابر و نزدیک به CC_{50}) کلشی سین خالص بعد از گذشت ۲۴ ساعت، RNA از آن ها استخراج و cDNA



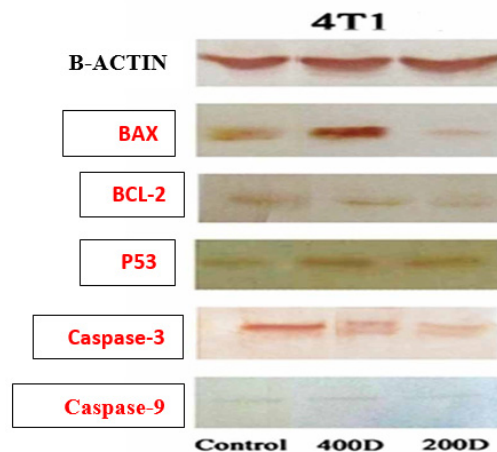
نمودار ۱- تاثیر غلظت های مختلف کلشی سین خالص بر مرگ سلول های 4T1. هر ستون نمایشگر میانگین \pm SE از سه تکرار مستقل است. $p < 0.05$ و $p < 0.001$ در مقایسه با گروه کنترل است. اثر کلشی سین خالص از غلظت ۱۰ میکرو گرم در میلی لیتر به بالا از نظر آماری معنا دار می باشد.



نمودار ۲- تاثیر غلظت های مختلف کلشی سین خالص بر تکثیر سلول های 4T1. هر ستون نمایشگر میانگین \pm SE از سه تکرار مستقل است. $p < 0.05$ و $p < 0.001$ در مقایسه با گروه کنترل است. اثر کلشی سین خالص از غلظت ۱۰۰ میکرو گرم در میلی لیتر به بالا از نظر آماری معنادار می باشد.



نمودار ۳- میزان بیان mRNA های ژن های *Bax* و *Bcl-2*, *p53* در رده سلولی 4T1 که تحت تاثیر تیمارهای مختلف داروی کلشی سین قرار گرفته اند. هر ستون نمایشگر میانگین \pm SE از سه تکرار مستقل است. از لحاظ آماری سطوح معناداری بین دو غلظت متفاوت دارو به صورت $p < 0.05$ و $p < 0.01$ و $p < 0.001$ نشان داده شده است.



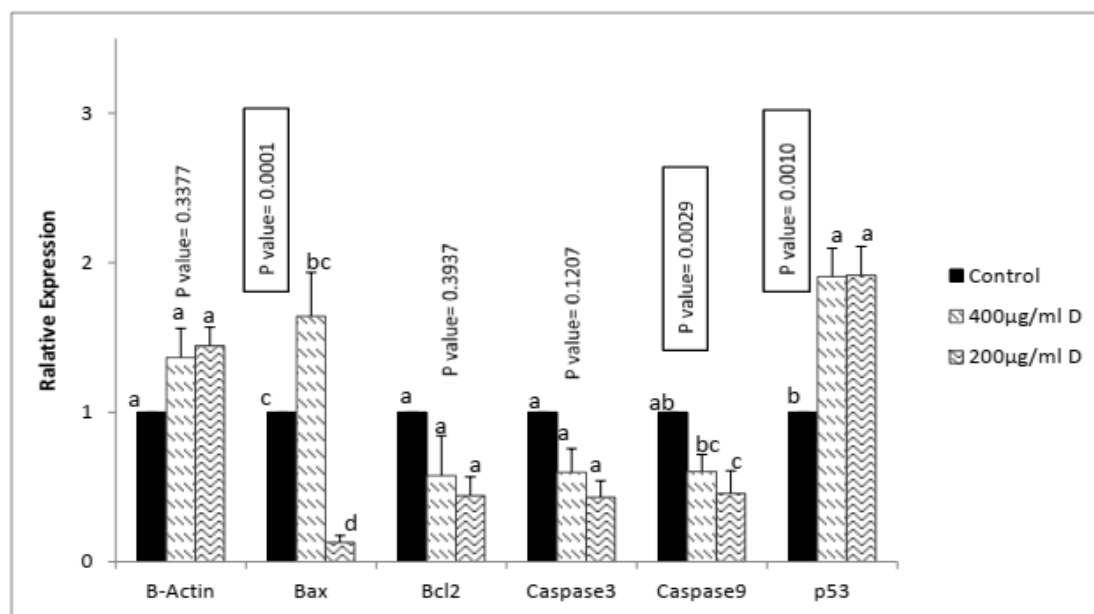
شکل ۱- تصویر وسترن بلات پروتئین های *Bax*, *Bcl-2*, *P53*, *Caspase-3*, *Caspase-9* و β -ACTIN در سلول های رده 4T1 که تحت تیمار با غلظت های مورد نظر کلشی سین خالص قرار گرفته اند (غلظت ها بر حسب میکروگرم/میلی لیتر می باشد). گروه کنترل (Control)، سلول هایی هستند که تحت هیچ تیماری قرار نگرفته اند.

سلولی 4T1: پس از بررسی بیان ژن های دخیل در آپوپتوز در سلول سرطانی 4T1 در سطح mRNA، میزان بیان پروتئین های مرتبط با آپوپتوز مثل *P53*، *BAX*، *BCL2*، *Caspase-3* و *Caspase-9* در کنار پروتئین رفرنس β -Actin بررسی شد (شکل ۱). باندهای حاصل از وسترن بلات با نرم افزار ImageJ مورد آنالیز قرار گرفت. نتایج آنالیزها در نمودار ۴ و جدول ۲ آورده شده است.

تیمار سلول های رده 4T1 با کلشی سین و بررسی آپوپتوز با آزمایش Annexin V-PI: آزمایش Annexin V-PI جهت مشاهده میزان آپوپتوز زودرس و دیررس انجام گرفت. جهت بررسی درصد سلول های

می دهد. در مورد ژن *Bax* در غلظت ۲۰۰ میکرو گرم در میلی لیتر کلشی سین نسبت به کنترل ۴/۲۷ فولد افزایش بیان داشته است. در غلظت ۴۰۰ میکرو گرم در میلی لیتر، این ژن افزایش بیان ۱/۷۲ برابری را نسبت به حالت کنترل نشان می دهد. در مورد ژن *Bcl-2* در غلظت ۲۰۰ میکرو گرم در میلی لیتر کلشی سین نسبت به کنترل ۰/۲۱ فولد کاهش بیان داشته است. در غلظت ۴۰۰ میکرو گرم در میلی لیتر دارو این ژن، کاهش بیان ۰/۶۱ برابری را نسبت به حالت کنترل نشان می دهد.

بررسی آپوپتوز با آزمایش وسترن بلات در رده



نمودار ۴- نتایج دانسیتومتری پروتئین های B-ACTIN, BAX, BCL-2, Caspase3, Caspase9, P53 با نرم افزار ImageJ در سلول های رده 4T1 (D). کلشی سین خالص). هر ستون نمایشگر میانگین \pm SE از سه تکرار مستقل است. داشتن حروف مشترک به معنای نداشتن تفاوت معنادار و حروف متفاوت به معنای داشتن تفاوت معنادار است.

جدول ۲- درصد تغییرات باندهای پروتئینی B-ACTIN, BAX, BCL-2, Caspase3, Caspase9, P53 نسبت به باندهای پروتئینی گروه کنترل در سلول های رده 4T1 در تمامی موارد گروه کنترل ۱۰۰٪ در نظر گرفته شده است. علامت (-) نشان دهنده کاهش درصد باندها نسبت به گروه کنترل است.

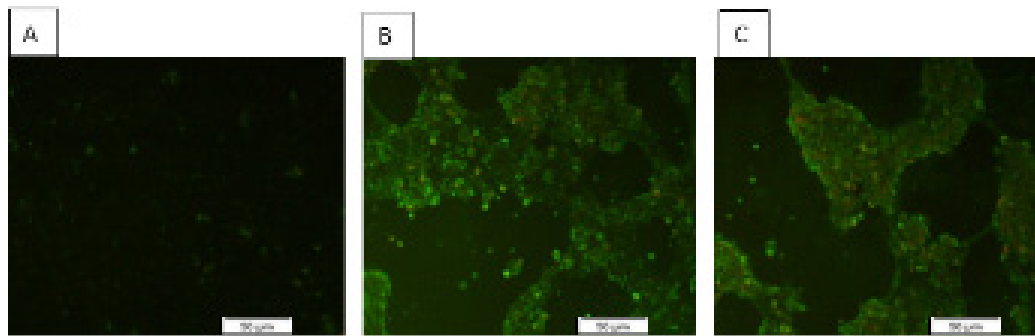
	B-ACTIN	BAX	BCL2	Caspase3	Caspase9	P53
۴۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر کلشی سین	%۳۶	%۶۴	-%۴۲	-%۴۰	-%۳۹	%۹۰
۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر کلشی سین	%۴۴	-%۸۷	-%۵۵	-%۵۶	-%۵۴	%۹۱

آماري تغییرات قطر تومورها در گروه کنترل و گروه های تیمار شده با دارو کلشی سین در نمودار ۶ آورده شده است.

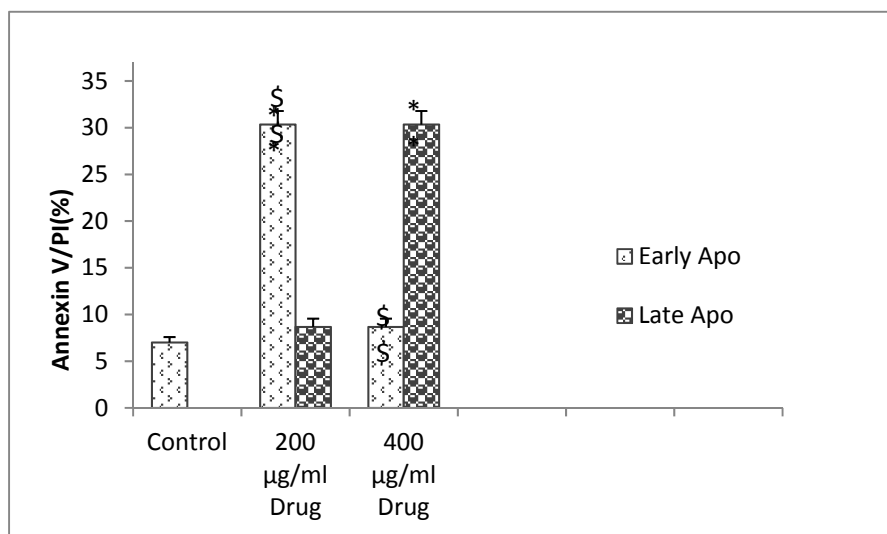
مطالعات بافت شناسی و سلول شناسی: اثربخشی داروی کلشی بر القای آپوپتوز، با آزمایش های بافت شناسی ارزیابی شد. به طور خلاصه در بافت توموری گروه تیمار شده با دارو کلشی سین شواهد آپوپتوز، ناحیه تخریب و نکروز به مقدار بیشتری نسبت به گروه کنترل مشاهده شد. در گروه تیمار شده تهاجم سلول های توموری به عضلات مجاور نسبت به گروه کنترل کمتر بود. در بافت تومورهای تیمار شده به مقدار زیادی نفوذ سلول های التهابی در مرکز توده توموری مشاهده شد. در بافت توموری موش های گروه کنترل (بدون تیمار) علائم بدخیمی شدیدتری نسبت به گروه تیمار شده دیده شد. علاوه بر این ۳ موش از ۵ موش گروه کنترل (بدون دریافت دارو) دارای متاستاز

با آپوپتوز اولیه و آپوپتوز ثانویه تعداد ۱۰۰ سلول در هر تیمار با همان تعداد سلول بدون تیمار با میکروسکوپ فلورسانس شمارش شد و درصد هر نوع سلول مشخص گردید (شکل ۲). نتایج آزمایش Annexine V-PI در سلول های 4T1، افزایش معناداری در هر دو نوع آپوپتوز (دیررس و زودرس) را در سلول های تیمار شده با کلشی سین خالص نسبت به سلول های بدون تیمار نشان داد (نمودار ۵).

نتایج مطالعات درون تنی (in vivo): بعد از ایجاد تومور، فعالیت ضد توموری داروی کلشی سین در موش های سرطانی مورد مقایسه قرار گرفت. بافت ها توموری پس از جداسازی، تثبیت و رنگ آمیزی با هماتوکسیلین اتوزین با میکروسوپ از لحاظ وجود علائم سرطانی بررسی شدند. همچنین اندازه قطر تومورها در سه گروه موش های مورد مطالعه قبل از درمان و بعد از گذشت ده روز از زمان تجویز خوراکی دارو بررسی شد. آنالیز



شکل ۲- تصویر میکروسکوپ فلورسانس Annexin V-PI سلول‌های 4T1 (A 400X) سلول‌های کنترل (تیمار نشده)، (B) سلول‌های تیمار شده با غلظت ۲۰۰ میکروگرم/میلی لیتر داروی کلشی سین، (C) سلول‌های تیمار شده با غلظت ۴۰۰ میکروگرم/میلی لیتر داروی کلشی سین.



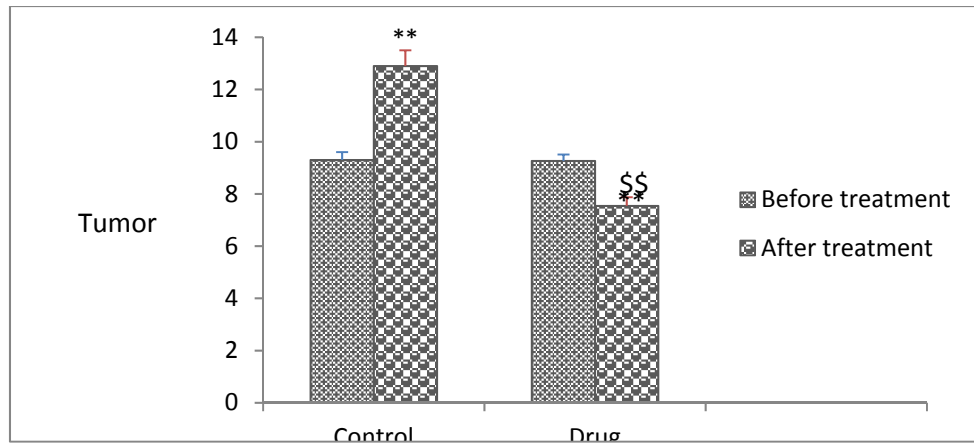
نمودار ۵- نتایج آپوپتوز زودرس و دیررس در آزمایش Annexin V-PI در سلول‌های رده 4T1 که تحت تاثیر تیمار با غلظت‌های ۲۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم در میلی لیتر داروی کلشی سین قرار گرفته اند. از لحاظ آماری سطوح معناداری بین غلظت‌های مورد نظر در آپوپتوز زودرس و دیررس نسبت به کنترل به صورت $p^* < 0.05$ و $p^{**} < 0.001$ و سطوح معناداری بین آپوپتوز زودرس و دیررس در هر غلظت به صورت $p^S < 0.05$ و $p^{SS} < 0.001$ نشان داده شده است.

شیمی درمانی اثرات جانبی مختلفی دارند و کلشی سین نیز از این امر مستثنی نیست. کلشی سین خاصیت ضد توموری دارد ولی به علت سمیت، مصرف آن دارای محدودیت است. ادعا می شود که کلشی سین به دلیل نزدیک بودن دوز درمانی و سمی آن، در فهرست درمانی محدودی قرار دارد و این موضوع باعث سردرگمی زیادی در بین متخصصین بالینی شده است (۱۹). به رغم وجود جنبه های تاریک این داروی باستانی و به دلیل اثبات خاصیت ضد تکثیر آن، دانشمندان به دنبال مشتقاتی از این دارو هستند که اثرات سمی کمتری داشته و بتوانند در درمان از آن بهره بگیرند. با این وجود گزارش های اندکی راجع به اثرات ضدسرطانی کلشی سین وجود دارد و تنها در

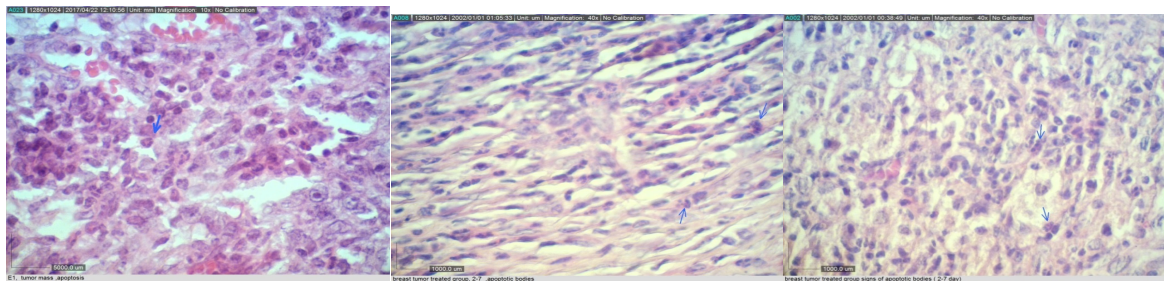
مشهود در ناحیه غدد پستانی بودند که این تومورهای ثانویه نیز جهت بررسی به آزمایشگاه منتقل شدند. در شکل ۳ تصاویری از بافت‌های توموری بعد از درمان به همراه مناطقی که نشان دهنده وقوع آپوپتوز می باشد نشان داده شده است.

بحث

امروزه استفاده از آلكالوئيد‌هاى گياهي كه اثرات مهاري بر پيشرفت تومورهاي بدخيم دارند و يكي از زمينه هاي مهم پژوهشي به شمار مي رود، كلشي سين مي باشد. كلشي سين مجموعه اي از اعمال سلولي از جمله ميتوز، طويل شدن سلول، مورفولوژي و حركت سلول را متوقف مي كند. داروهاي مورد استفاده در



نمودار ۶- نتایج بررسی میانگین قطر تومورهای موشی در سه گروه مورد مطالعه قبل و بعد از تیمار با داروی کلشی سین (گروه کنترل بدون تیمار است). از لحاظ آماری سطوح معناداری بین اختلاف قطر تومورها قبل و بعد از تیمار در هر گروه به صورت $p^* < 0.05$ و $p^{**} < 0.01$ و سطوح معناداری بین اختلاف قطر تومورها بعد از تیمار نسبت به گروه کنترل به صورت $p^s < 0.05$ و $p^{ss} < 0.01$ نشان داده شده است.



شکل ۳- مشاهده بافت تومورهای جدا شده از موش های بآلب/ سی. (الف، ب و ج) بافت تومور موش درمان شده با داروی کلشی سین، فلش ها اجسام آپوپتوزی را نشان می دهند. نمای پرولیفراتیو خفیف مشاهده می شود (H&E×400).

موشی) بعد از تزریق به موش BALB/c به سرعت تومورهای تهاجمی ایجاد می کنند. این تومورها بسیار شبیه سرطان پستان انسان می باشند. رده ی سلولی 4T1 به عنوان یک مدل حیوانی برای سرطان پستان مرحله چهارم عمل می کند. مقایسه این رده سلولی با رده سلول سرطان پستان انسانی MCF7 با توجه به اینکه این دو رده سلولی دارای اثرات تهاجمی و منشا های متفاوت می باشند، نشان داد که میزان سمیت در این دو رده سلولی تفاوت قابل توجهی با هم دارند (۲۳). این موضوع می تواند بیان کننده تاثیر گذاری متفاوت کلشی سین بر روی لاین های سلولی سرطان پستان و همچنین بیان کننده تفاوت احتمالی اثربخشی بالینی کلشی سین در سرطان های مختلف و همچنین در یک نوع سرطان مشخص ولی با منشاء های متفاوت باشد.

در خصوص خواص ضد تکثیری در مطالعه حاضر مشاهده گردید کلشی سین در غلظت حدود ۲۰۰

چند مورد اثرات آپاپتوزی این ماده در سلول های عصبی (۲۰) و کبدی (۱۴) و اثر درمانی برای موارد مبتلا به سیروز کبدی و صفراوی (۲۲ و ۲۱) گزارش شده است. لذا، لازمه توجه به شناخت تاثیر این ماده بر روی سلول های رده سرطان پستان به عنوان مطالعه برون تنی و مدل موشی تومور پستانی به عنوان مطالعه درون تنی، پیش از پیش اهمیت این پژوهش را تایید می کند.

در مطالعه حاضر کلشی سین خالص در غلظت های ۴۰۰-۲۰۰ میکروگرم در میلی لیتر بر سلول های سرطانی پستان موشی (4T1) اثر داده شد و مشاهده گردید کلشی سین در غلظت حدود ۳۰۰ میکروگرم در میلی لیتر ۵۰٪ سلول های سرطانی 4T1 را از بین بردند، در حالی که این مقدار کشندگی کلشی سین در سلول های سرطانی MCF-7 (۲۳) به ترتیب ۱ میکروگرم در میلی لیتر بود.

رده سلولی 4T1 (سلول های آدنوکارسینوما ی پستانی

لیتر داروی اپیروبیسین (Epirubicin) است (۲۸ و ۲۷). در مطالعه دیگری که توسط همین گروه بر روی لاین های سلول سرطانی روده (AGS & NCI-N87) انجام شد مشخص گردید که کلشی سین بر روی این سلول های سرطانی نیز اثر ضد تکثیر دارد و این تاثیر در غلظت ۶ نانوگرم در میلی لیتر دارو می باشد (۲۹).

همچنین چن و همکارانش در سال ۲۰۱۲ کلشی سین را بر روی سلول‌های نرمال کبدی در دوزهای مختلف اثر دادند که مشخص گردید کلشی سین تکثیر سلول‌های نرمال کبدی (L-02) را در غلظت ۴ میکرو گرم در میلی لیتر و بعد از ۴۸ ساعت از تاثیر دارو به میزان ۵۰٪ کاهش داده و همچنین موجب تغییر مورفولوژی سلول شده است (۱۴). نتایج مطالعه حاضر با مطالعات قبلی تفاوت فاحشی داشت که این امر به دلیل تفاوت در منشاء و تهاجمی بودن رده سلولی 4T1 می باشد.

مرگ سلولی برنامه ریزی شده به طور دقیق به کنش و برهم کنش برخی از محصولات ژنی بستگی دارد که فرآیند خودکشی سلول را فعال یا مهار می کند. بیشتر از ۱۰۰ ژن مختلف شناسایی شده که بر بقای سلول تاثیر می گذارد. دو خانواده ژنی *caspase* و *Bcl-2* در مسیر آپوپتوز درگیر می باشند. خانواده *Bcl-2* دارای ۲ گروه پروتئینی پیش برنده آپوپتوز (*BAX*) و مهار کننده آپوپتوز (*BCL-2*) است. نسبت متوسط این پروتئین ها سرنوشت یک سلول را تعیین می کند. اگر سلول آپوپتوز کند بیان پروتئین *BCL-2* کاهش و بیان پروتئین *BAX* افزایش می یابد و در نهایت منجر به تضعیف و باز شدن منافذ غشایی میتوکندری می گردد. در نهایت سیتوکروم C از میتوکندری آزاد و بعد از نشت به سیتوزول با پروتئین *Apaf-1* ترکیب شده تا پروکاسپاز ۹ را به کاسپاز ۹ تبدیل کند و در نهایت کاسپاز ۳ فعال شده و آپوپتوز القا شود. کلشی سین جزء داروهای آنتی میکروتوبول می باشد (ناپایدار کننده میکروتوبول ها) و عوامل ناپایدار کننده میکروتوبول راه انداز آپوپتوز در سلوهای سرطانی هستند. در مورد نقش خانواده *Bcl-2* در تنظیم آپوپتوز و عوامل میکروتوبول در مسیر آپوپتوز نشان داد که اختلال در ساختار میکروتوبول ها به وسیله داروهای آنتی میکروتوبول موجب القاء ژن سرکوبگر *P53*، مهارکننده سیکلین وابسته به کیناز *P21* و فعال

میکروگرم در میلی لیتر ۵۰٪ از تکثیر سلول های سرطانی 4T1 جلوگیری نموده است، در حالی که این مقدار ممانعت از تکثیر کلشی سین در سلول های سرطانی MCF-7، ۴ نانو گرم در میلی لیتر بود (۲۳). نتایج به دست آمده نشان داد ممانعت از تکثیر سلول ها توسط کلشی سین وابسته به دوز است. اگر چه این موضوع که یک دارو در غلظت پایین تری از تکثیر سلول های سرطانی جلوگیری کند، ولی در غلظت بالاتری از این مقدار برای سلول ها کشنده باشد، در کاندید شدن بهتر یک دارو در شیمی درمانی حائز اهمیت است؛ ولی بر خلاف رده سلولی MCF-7 (۲۳) در مورد رده سلولی موشی (4T1) این اختلاف با تفاوت کمتری مشهود بود. تفاوت فاحش در دوز توکسیک و ممانعت از تکثیر کلشی سین بر روی دو رده سلولی MCF-7 و 4T1 بیانگر این مطلب است که مانند خیلی از داروهای ضد سرطان اثر بخشی این دارو با توجه به نوع تومور و تهاجمی بودن سلول های سرطانی می تواند بسیار متفاوت باشد. به نظر می رسد تفاوت قابل توجه بین دوز ممانعت کننده از تکثیر در دو رده سلولی MCF-7 و 4T1 شاید ناشی از جهش ژن p53 در سلول های سرطان سینه موش (4T1) باشد.

در پژوهش های پیشین اثر مهار کننده کلشی سین بر تکثیر برخی از انواع سلول های سرطانی نشان داده شده است. در مطالعه ای که توسط یانگ و همکارانش در سال ۲۰۰۷ انجام شد مشخص گردید که کلشی سین تکثیر سلول های CGCs (سلول های گرانول مخچه) در ۲۴ ساعت را در غلظت ۰/۴ میکروگرم در میلی لیتر حدود ۴۰ درصد کاهش می دهد و باعث شروع آپوپتوز در سلول های نرونی می شود (۲۰-۲۶). همچنین طی مطالعه ای دیگر، لین و همکارانش در سال ۲۰۱۳ اثر کلشی سین را بر دو رده سلولی سرطانی کبدی (Hepatocellular carcinoma) HCC و

فیبروبلاست های وابسته به سرطان انسان CAFs (Cancer associated fibroblasts) بررسی کردند و نشان دادند که در هر دو رده سلولی، کلشی سین در غلظت های ۲ و ۶ نانوگرم در میلی تکثیر سلول ها را به طور قابل توجهی مهار می کند. همچنین نشان دادند که اثر ضد تکثیری ۶ نانوگرم در میلی کلشی سین بر رده های سلولی HCC مانند اثر ۱ میکروگرم در میلی

از این رو در این مطالعه علاوه بر تعیین مقدار کمی بیان mRNA های ژن های دخیل در مسیر آپوپتوز به کمک تکنیک Real-Time PCR، بیان این ژن ها در سطح پروتئین نیز توسط تکنیک وسترن بلات به طور کیفی مورد بررسی قرار گرفت.

در رده سلولی 4T1 افزایش معنی دار پروتئین BAX، افزایش معنی دار کاسپاز ۹ و پروتئین P53 نسبت به گروه کنترل مشاهده شد. نتایج به دست آمده نشان داد که بین مقدار بیان mRNA و بیان پروتئین مربوطه در خصوص ژن های P53, BCL2, BAX ارتباط مشخصی وجود ندارد. اگرچه بررسی بیان پروتئین های دخیل در آپوپتوز نیز نشان دهنده اثر کلشی سین خالص بر القاء آپوپتوز می باشد (افزایش بیان پروتئین های P53, BAX و کاهش بیان BCL-2).

مطالعه درون تنی نشان داد که در گروه تیمار شده با داروی کلشی سین، بافت توموری شواهد آپوپتوز را به مقدار بیشتری نسبت به گروه کنترل نشان می دادند و در گروه تحت درمان ناحیه تخریب و نکروز، خیلی وسیع تر از گروه تیمار نشده بود. در بافت های توموری موش های گروه کنترل (بدون درمان)، علائم بدخیمی شدیدتر از گروهی بود که تحت درمان قرار گرفته بودند و اشکال میتوزی غیر طبیعی به وفور دیده می شد. همچنین در گروه تحت درمان و گروه کنترل هیچ متاستازی به کبد و طحال مشاهده نشد. در نهایت می توان نتیجه گرفت که مصرف کلشی سین خالص به صورت خوراکی باعث کاهش اندازه تومورهای القاء شده در موش ها، جلوگیری از تکثیر بیشتر و متاستاز و القای آپوپتوز شده است.

مطالعات نشان داده است که تومورهایی که رشد سریع تری دارند مانند تومورهای حاصل از سلول های سرطانی رده 4T1 میزان تهاجم و متاستازشان به بافت های اطراف بیشتر است، ولی سلول های این تومورها (با نسبت سلول های در حال تقسیم زیاد) بیشترین حساسیت را به ترکیبات توکسیک سیکل سلولی مانند کلشی سین دارند (۳۴). استفاده پیوسته از این ترکیبات باعث می شود درصد بالایی از سلول هایی که در معرض قرار می گیرند، نابود شوند. کاهش اندازه تومورها و متاستاز سلول ها به نقاط دیگر در موش های تحت درمان با کلشی سین به وضوح در مطالعه حاضر

کردن چندین پروتئین کیناز می شود که پروتئین کینازها در ارتباط مستقیم یا غیرمستقیم با فسفریلاسیون Bcl-2 و القاء آپوپتوز می شود (۳۰ و ۱۴).

مکانیسم القاء آپوپتوز کلشی سین در سلول های مختلف متفاوت است. بر طبق مطالعات قبلی به طور مثال در سلول های نوروبی آپوپتوز وابسته به کاسپاز ۳ است (۳۱). مطالعات گذشته نشان می دهد کلشی سین در غلظت ۴ میکروگرم/میلی لیتر فسفریلاسیون JNK, p38MAPKs و کاسپاز ۳ را فعال می کند و در نهایت باعث آپوپتوز در سلول های نوروبی می شود (۲۵).

در مطالعه ای که روی سلول های نرمال کبدی انجام شد، مشخص گردید کلشی سین در مدت ۲۴ ساعت بیان BAX را افزایش و BCL-2 را کاهش می دهد (همه از راه وابسته به دوز) و باعث فعال شدن کاسپاز ۳ و ۹ می گردد ولی تغییری در فعالیت کاسپاز ۸ نسبت به کنترل ایجاد نمی کند (۱۴). از این رو در مطالعه حاضر بیان کاسپاز ۸ مطالعه نشد. ضمناً در این مطالعه و سایر مطالعاتی که در گذشته انجام گرفته مشخص شده کلشی سین باعث توقف سلول در G2/M می شود. در این مطالعه برای بررسی اثر کلشی سین بر القاء مرگ سلولی در سلول های 4T1، بیان mRNA ژن های Bcl-2, Bax, P53 متعاقب تیمار سلولی اندازه گیری شد. نتایج نشان داد که کلشی سین به مقدار قابل توجهی بیان mRNA ژن Bax و P53 را افزایش و مقدار بیان ژن Bcl-2 را کاهش می دهد.

بسیاری از اطلاعات را نمی توان تنها با مطالعه بر روی ژن ها به دست آورد. پروتئین ها (و نه ژن ها) مسئول ایجاد فنوتیپ سلولی هستند و مکانیسم امراض، پیری و اثرات محیطی را مستقیماً از داده های ژنومی نمی توان استنباط کرد. بنابراین از طریق مطالعه پروتئین ها است که می توان تغییرات پروتئینی را مطالعه کرده و خصوصیات آن ها را بررسی و هدف های دارویی را از طریق آن ها مشخص کرد. مطالعات نشان داده که در بعضی موارد بین میزان بیان یک ژن و mRNA حاصل از آن و میزان پروتئین تولید شده رابطه مستقیمی وجود ندارد. بنابراین تنها شناسایی mRNA و یا تعیین سطح بیان آن نمی تواند به طور دقیق و درست نشان دهنده سطح بیان پروتئین باشد (۳۲ و ۳۳).

breast cancer. *Cancer Cell*. 2007; 11(2):103-5.

7. Easton DF, Pooley KA, Dunning AM, Pharoah PD, Thompson D, Ballinger DG, et al. Genome-wide association study identifies novel breast cancer susceptibility loci. *Nature*. 2007; 447(7148):1087-93.

8. Jin-Jian L, Jiao-Lin B, Xiu-Ping C, Min H, Yi-Tao W. Alkaloids isolated from natural herbs as the anticancer agents. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2012; Available from: <http://dx.doi.org/10.1155/2012/485042>.

9. Forkosh E, Kenig A, Ilan Y. Introducing variability in targeting the microtubules: Review of current mechanisms and future directions in colchicine therapy. *Pharmacol Res Perspect*. 2020; 8:e00616.

10. Dasgeb B, Kornreich D, McGuinn K, Okon L, Brownell I, Sackett DL. Colchicine: an ancient drug with novel applications. *Br J Dermatol*. 2018; 178(2): 350–356.

11. Slobodnick A, Shah B, KrasnoKutsky S: Update on colchicine, 2017. *Rheumatology*. 2018; 57:i4i11.

12. Lin ZY, Kuo CH, Wu DC, Chuang WL: Anticancer effects of clinically acceptable colchicine concentrations on human gastric cancer cell lines. *Kaohsiung J Med Sci*. 2016; 32: 68-73.

13. Lin ZY, Wu CC, Chuang YH, et al. Anticancer mechanisms of clinically acceptable colchicine concentrations on hepatocellular carcinoma. *Life Sci*. 2013; 93(8): 323–8.

14. Chen XM, Liu J, Wang T, Shang J. Colchicine-induced apoptosis in human normal liver L-02 cells by mitochondrial mediated pathways. *Toxicol In Vitro*. 2012; 26: 649-655.

15. Wu CC, Lin ZY, Kuoc CH, Chuang WL: Clinically acceptable colchicine concentrations have potential for the palliative treatment of human cholangiocarcinoma. *Kaohsiung J Med Sci*. 2015; 31: 229-234.

16. Leung YY, Yao Hui LL, Kraus VB: Colchicine-Update on mechanisms of action and therapeutic uses. *Seminars in arthritis and rheumatism*. 2015; 45: 341-350.

17. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using RealTime Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Method. *Methods*. 2001; 25(4): 402-8.

18. Mostafaie A. Protein electrophoresis in gel: Theoretical and practical guide. 2nd ed. Yadavaran Pub. 1382; P. 151-168.

19. Finkelstein Y, Aks SE, Hutson JR, Juurlink DN, Nguyen P, Dubnov-Raz G, et al. Colchicine poisoning: the dark side of an ancient drug. *Clin Toxicol (Phila)*. 2010; 48(5): 407-14.

20. Yang Y, Zhu X, Chen Y, Wang X, Chen R. p38 and JNK MAPK, but not ERK1/2 MAPK, play important role in colchicine-induced cortical neurons apoptosis. *Eur J Pharmacol*. 2007; 576(1): 26-33.

نتیجه‌گیری

مکانیسم سمیت کلشی سین برای درمان سرطان باشد هنوز به اندازه کافی روشن نیست. در تحقیق حاضر بررسی نتایج حاصل از همه آزمون‌ها نشان داد که کلشی سین نقش موثری در مهار تکثیر سلول‌های سرطان پستان موشی دارد و آپوپتوز را از طریق افزایش بیان ژن‌ها و پروتئین‌های پروآپوپتوتیک Bax و p53، کاهش بیان ژن و پروتئین آنتی آپوپتوتیک Bcl2 و در نهایت فعال کردن کاسپازها القاء می‌کند.

تقدیر و تشکر

این مقاله برگرفته از پایان نامه دکتری رشته ی زیست شناسی سلولی و مولکولی بوده و در مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی کرمانشاه انجام گرفته است. به این وسیله از همکاران مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی به خاطر همکاری در مراحل مختلف این مطالعه تقدیر و تشکر به عمل می‌آید.

References

1. World Cancer Research Fund International. Breast Cancer Statistics Available at <http://www.wcrf.org/int/cancer-facts-figures/data-specific-cancers/breast-cancer-statistics>.
2. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eswar S, Mathers C, Rebelo MA. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN. *Int J Cancer*. 2015; 136(5):E359-86.
3. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Mathers C, Parkin DM, Piñeros M, Znaor A, Bray F. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *Int J Cancer*. 2019; 144(8):1941–1953.
4. Tavassoli FA, Devillee P, eds. World Health Organization classification of tumors: pathology and genetics of tumors of the breast and female genital organs. 8th ed. In: DeVita VT, Lawrence TS, Rosenberg SA, eds. *Cancer Principles & Practice of Oncology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 2008.
5. Antoniou AC, Easton DF. Models of genetic susceptibility to breast cancer. *Oncogene*. 2006; 25(43):5898-905
6. Walsh T, King MC. Ten genes for inherited

21. Morgan TR, Weiss DG, Nemchausky B, Schiff ER, Anand B, Simon F, et al. Colchicine treatment of alcoholic cirrhosis: a randomized, placebo-controlled clinical trial of patient survival. *Gastroenterology*. 2005; 128(4): 882-90.
22. Kaplan MM, Alling DW, Zimmerman HJ, Wolfe HJ, Sepersky RA, Hirsch GS, et al. A prospective trial of colchicine for primary biliary cirrhosis. *N Engl J Med*. 1986; 315(23): 1448-54.
23. Adham Foumani E, Irani SH, Shokoohinia Y, Mostafaie A. Colchicine of *Colchicum autumnale*, A traditional anti-inflammatory medicine, induces apoptosis by activation of apoptotic genes and proteins expression in human breast (MCF-7) and mouse breast (4T1) cell lines. *Cell J*. 2022; 24(11):647-656.
24. Brewton LS, Haddad L, Azmitia EC. Colchicine-induced cytoskeletal collapse and apoptosis in N-18 neuroblastoma cultures is rapidly reversed by applied S-100 β . *Brain Research*. 2001; 912(1):9-16.
25. Jorda EG, Verdaguer E, Canudas AM, Jiménez A, Bruna A, Caelles C, et al. Neuroprotective action of flavopiridol, a cyclin-dependent kinase inhibitor, in colchicine-induced apoptosis. *Neuropharmacology*. 2003; 45(5): 672–83.
26. Mitsui C, Sakai K, Ninomiya T. Involvement of TLCK-sensitive serine protease in colchicine-induced cell death of sympathetic neurons in culture. *J Neurosci Res*. 2001; 66(4): 601–11.
27. Lunardi G, Vannozzi MO, Bighin C, Del Mastro L, Stevani I, Schettini G, et al. Influence of trastuzumab on epirubicin pharmacokinetics in metastatic breast cancer patients. *Annals Oncol*. 2003; 14: 1222-26.
28. Lin ZY, Yeh ML, Huang CI, Chen SC, et al: Potential of novel colchicine dosage schedule for the palliative treatment of advanced hepatocellular carcinoma. *Kaohsiung J Med Sci*. 2021; 37:616-623.
29. Lin ZY, Kuo CH, Wu DC, Chuang WL. Anticancer effects of clinically acceptable colchicine concentrations on human gastric cancer cell lines. *Kaohsiung J Med Sci*. 2016;32(2):68-73.
30. Hata AN, Engelman JA, Faber AC. The BCL2 Family: Key Mediators of the Apoptotic Response to Targeted Anticancer Therapeutics. *Cancer Discov*. 2015;5(5):475-87.
31. Zhai AF, Zhang Y, Zhu XN, Liang JT, Wang XL, Lin YC. Secalonic acid a reduced colchicine cytotoxicity through suppression of JNK, p38 MAPKs and calcium influx. *Neurochem Int*. 2010; 58(1): 85–91.
32. Koussounadis A, Langdon SP, Um IH, et al. Relationship between differentially expressed mRNA and mRNA-protein correlations in a xenograft model system. *Scientific Reports* 2015; 5: 10775–10775.
33. Liu Y, Beyer A, Aebersold R. On the Dependency of Cellular Protein Levels on mRNA Abundance. *Cell*. 2016; 165(3):535-550.
34. Barton-Burke M, Wilkes GM. *Cancer Chemotherapy and Cell Cycle Kinetics*. In: *Cancer Therapies*: Jones and Bartlett. 2006; 15-30.