

## بررسی اثر سمیت سلولی و آپوپتوزی لیگوستیلید (Z-Ligustilide) بر سلول‌های سرطان پستان MCF-7 و سلول‌های طبیعی فیروبلاست انسانی HDF1BOM با استفاده از آزمون‌های MTT و Annexin

سعید میرزاییان<sup>۱\*</sup>، خلیل خاشعی و رنامخواستی<sup>۲</sup>

### چکیده

زمینه و هدف: سرطان پستان به منزله‌ی یکی از شایع‌ترین انواع سرطان و دومین علت شایع مرگ ناشی از سرطان در زنان است. در مطالعه حاضر، اثر لیگوستیلید (ماده مؤثر کلوس) بر روی رده‌ی سلول‌های سرطان پستان MCF-7 در مقایسه با رده‌ی سلول‌های طبیعی فیروبلاست انسانی HDF1BOM مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفت.

روش بررسی: سلول‌های رده‌ی MCF-7 و HDF1BOM پس از کشت، با غلظت‌های مختلف لیگوستیلید (Z-Ligustilide) (Z)-3-butylidene-4,5-dihydrophthalide (Z) (۰، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر) به مدت ۴۸ و ۷۲ ساعت تیمار شدند. سپس توانایی زیستی با استفاده از دستگاه الیزا ریدر با روش رنگ‌سنجی MTT و میزان وقوع آپوپتوز با استفاده از دستگاه فلوسیتومتری و کیت انکسین-پروپیدیوم یدید (Annexin-PI) در دو زمان بررسی گردید. تحلیل آماری با استفاده از نرم‌افزارهای SPSS و FlowJo و آزمون‌های ANOVA و Huynh-Feldt انجام شد.

یافته‌ها: نتایج آزمون MTT برای رده سلولی MCF-7 کاهش درصد توانایی زیستی در همه غلظت‌ها را نشان داد (در تیمار ۴۸ ساعته؛ از ۷۰/۶۰٪ (۵۰ mg/ml) به ۶/۸۰٪ (۲۰۰ mg/ml)، در تیمار ۷۲ ساعته؛ از ۶۱/۹۵٪ (۵۰ mg/ml) به ۵/۸۴٪ (۲۰۰ mg/ml)). همچنین نتایج آزمون Annexin نشان داد که میزان القای آپوپتوز وابسته به زمان و غلظت نبوده و در بیشتر گروه‌ها افزایش یافته است. بیشترین درصد آپوپتوز در تیمار ۴۸ ساعته؛ ۹۸/۳٪ (۵۰ mg/ml) و در تیمار ۷۲ ساعته؛ ۹۷/۴٪ (۱۰۰ mg/ml) بود. نتایج آزمون MTT برای رده سلولی HDF1BOM کاهش درصد توانایی زیستی در هر دو زمان نسبت به گروه کنترل را نشان داد (در تیمار ۴۸ ساعته؛ از ۹۷/۲۴٪ (۵۰ mg/ml) به ۵/۹۷٪ (۲۰۰ mg/ml)، در تیمار ۷۲ ساعته؛ از ۹۰/۹۳٪ (۵۰ mg/ml) به ۵/۲۶٪ (۲۰۰ mg/ml)). همچنین طبق نتایج آزمون Annexin سلول‌هایی که در مرحله ابتدایی آپوپتوز قرار دارند درصد بیشتری را نشان می‌دهد (در تیمار ۴۸ ساعته؛ ۴/۲۱٪ (۱۵۰ mg/ml)، در تیمار ۷۲ ساعته؛ ۱/۶۷٪ (۲۰۰ mg/ml)). لیگوستیلید سمیت سلولی قابل توجهی را در سلول‌های HDF1BOM نشان نداد.

نتیجه‌گیری: با توجه به اینکه لیگوستیلید از طریق القای آپوپتوز اثر مهارى بر رشد، تکثیر و تهاجم سلول‌های سرطانی دارد؛ به نظر می‌رسد آن می‌تواند برای کاهش تکثیر سلولی در سرطان پستان استفاده شود.

واژه‌های کلیدی: لیگوستیلید، آپوپتوز، توان‌زیستی، انکسین، سرطان پستان، سلول‌های فیروبلستی

دریافت مقاله: مهر ۱۳۹۹

پذیرش مقاله: اردیبهشت ۱۴۰۰

\*نویسنده مسئول:

سعید میرزاییان:

دانشکده علوم پایه واحد شهرکرد دانشگاه آزاد اسلامی

Email:

mirzaeian71@gmail.com

۱ کارشناس ارشد بیوشیمی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

۲ مربی گروه ژنتیک، دانشکده پزشکی، واحد کازرون، دانشگاه آزاد اسلامی، کازرون، ایران

سرطان، بیماری ناشی از تقسیم خارج از کنترل سلول‌ها در بدن است که توانایی حمله یا گسترش به دیگر قسمت‌های طبیعی بدن را دارند. بعضی از انواع سرطان به خصوص اگر در مرحله اولیه تشخیص داده شوند به راحتی درمان می‌شوند (۱ و ۲). سرطان پستان به منزله یکی از شایع‌ترین انواع سرطان و دومین علت شایع مرگ ناشی از سرطان در زنان است (۳). افزایش بروز سرطان پستان در زنان عمدتاً به علت تغییرات در عوامل خطر ساز باروری و شیوه زندگی مانند سن اولین بارداری، سن اولین قاعدگی، درمان جایگزینی هورمونی، بیماری پستان خوش خیم، تراکم ماموگرافی، سابقه خانوادگی سرطان پستان و جهش‌های BRCA می‌باشد (۴ و ۵). برای درمان سرطان پستان می‌توان از درمان‌های هدفمند استفاده کرد اما توجه به عوارض جانبی داروهای شیمیایی بر بافت‌ها و سلول‌های بدن، ایجاد مقاومت دارویی و ضعیف شدن پیش‌آگهی‌ها، ما را به سمت استفاده از ترکیبات گیاهان دارویی با عوارض و سمیت کمتر سوق داده است که البته از نظر مطالعاتی نیز از اهمیت بالایی برخوردار است (۶ و ۷). کرفس کوهی یا کلوس که برای اولین بار با نام علمی *Kelussia odoratissima Mozaff* در ایران شناسایی و معرفی شد (۸) یکی از گیاهان ارزشمند خانواده چتریان (Apiaceae) است که در ارتفاعات بالا رشد می‌کند و به عنوان گیاه دارویی و ادویه مورد استفاده قرار می‌گیرد (۹). مطالعات آزمایشگاهی انجام شده نشان داد که این گیاه دارای خواص فیبرینولیتیک، ضد درد، ضد التهاب، ضد اضطراب، آرام بخشی و آنتی‌اکسیدانی است (۱۰ و ۱۱). مطالعات ترکیبات اسانس کرفس کوهی که توسط GC/MS تجزیه و تحلیل شده‌اند، نشان می‌دهد که ترکیب عمده‌ی اسانس از قسمت‌های هوایی گیاه *Z-Ligustilide* است (۱۲-۱۵). لیگوستیلید یک ترکیب با مشخصه‌ی فتالاید است و از مهم‌ترین ترکیبات شناسایی شده در اسانس اکوتیپ‌های مختلف کرفس کوهی است (۱۶ و ۱۷). فعالیت دارویی گزارش شده از لیگوستیلید شامل ضد سرطان (۱۸)، ضد التهاب (۱۹)، ضد هپاتوکسیک (۲۰)، حفاظت نرون‌ها (۲۱) و آنتی‌اکسیدانی است و از سلول‌ها در برابر رادیکال‌های آزاد محافظت می‌کند (۲۲). سلول‌های سرطانی رشد کرده در شرایط *in vitro* در تعیین پیچیدگی‌های زیست‌شناسی تومور و پیگیری جدی برای شناسایی اهداف دارویی جدید برای توسعه‌ی طیف گسترده‌ای از داروهای ضد سرطان خاص از اهمیت بالایی برخوردارند. MCF-7 یک رده سلول سرطانی است که در سال ۱۹۷۰ از یک زن ۶۹ ساله قفقازی به دست آمده است (۲۳). از این رو در نتیجه‌ی نیاز به تحقیقات هر چه بیشتر جهت تأیید اثرات ضد سرطانی

لیگوستیلید، در مطالعه‌ی حاضر اثر آن روی سمیت سلولی و آپوپتوز در رده سلولی آدنوکارسینوما پستان انسان (MCF-7) و سلول‌های طبیعی فیبروبلاست انسانی (HDF1BOM) ارزیابی گردید.

## روش بررسی

این مطالعه، پژوهشی تجربی است که در سال ۱۳۹۶ در مرکز تحقیقات سلولی-تکوینی مجتمع آزمایشگاهی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد و آزمایشگاه مرکزی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان انجام شد. بررسی آماری با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه ANOVA و آزمون Huynh-Feldt از طریق نرم‌افزارهای SPSS و FlowJo انجام شد. حدود اطمینان برای همه آزمایش‌ها ۹۹٪ در نظر گرفته شد و  $P < 0/05$  معنی‌دار محسوب گردید.

### • کشت رده سلول‌های سرطانی و نرمال

رده‌های سلولی MCF-7 و HDF1BOM مورد نیاز برای انجام این تحقیق از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران تهیه گردید و در محیط کشت DMEM حاوی Fetal Bovin Serum (FBS) ۱۰٪ و Penicillin-Streptomycin ۱٪ درون انکوباتور CO<sub>2</sub> دار (۳۷°C، CO<sub>2</sub> ۵٪ و O<sub>2</sub> ۹۵٪) کشت داده شد. پس از چندین نوبت پاساژ و افزایش سلول‌ها از آن‌ها برای انجام آزمایش استفاده شد.

### • تهیه و آماده‌سازی ماده موثر لیگوستیلید

ماده موثر لیگوستیلید به صورت آماده و به حالت مایع از شرکت Sigma-Aldrich با شماره محصول (۴۴۳۱۰۱۰) تهیه گردید. با استفاده از حلال اتانول غلظت‌های ۰، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر از لیگوستیلید تهیه شد و برای تیمار رده‌های سلولی MCF-7 و HDF1BOM استفاده گردید.

### • روش MTT

اثر سمیت سلولی لیگوستیلید بر توانایی زیستی رده‌های سلولی MCF-7 و HDF1BOM از طریق آزمون MTT (Dimethyl thiazolyl-diphenyl tetrazolium bromide)، با استفاده از کیت (Sigma-Aldrich) Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide با شماره محصول (۲۹۸۹۳۱) ارزیابی شد. در این روش نمک زرد رنگ متیل تیازولیل تترازولیوم بروماید (MTT)، توسط آنزیم سوکسینات دهیدروژناز سلول‌های فعال، به ترکیب غیرمحلول و ارغوانی فورمازان تبدیل می‌شود (۲۴). برای این منظور، تعداد  $5 \times 10^3$  سلول درون

کیت Annexin-V-FLUOS Staining Kit (Sigma-Aldrich) با شماره محصول (۱۱۹۸۸۵۴۹۰۰۱) بررسی گردید. در این راستا، تعداد  $1 \times 10^6$  سلول در هر چاهک پلیت ۶ چاهکی کشت داده شد و به مدت ۲۴ ساعت انکوباسیون صورت گرفت. بعد از اتمام زمان انکوباسیون، به منظور تیمار ۴۸ و ۷۲ ساعته سلول‌ها، محیط رویی آن‌ها با ۲ میلی‌لیتر از غلظت‌های مختلف لیگوستیلید جایگزین گردید. در ادامه سلول‌ها طی ۲ مرحله با محلول PBS سرد شست‌وشو داده شدند و با افزودن بافر به آن‌ها، سوسپانسیون سلولی تهیه شد. نهایتاً رنگ‌های Annexin-V متصل به FLUOS (Sigma-Aldrich) و PI (Propidium iodide) به لوله‌های فلوسیتومتری حاوی سوسپانسیون اضافه گردید و بعد از ۱۵ دقیقه انکوباسیون در دما و محیط تاریک اتاق لوله‌ها جهت خوانش نتایج به دستگاه فلوسایتومتری منتقل شدند. نهایتاً داده‌های حاصل با نرم‌افزار FlowJo تحلیل شدند.

### یافته‌ها

جدول ۱: تأثیر غلظت‌های مختلف لیگوستیلید بر توانایی زیستی رده سلولی MCF-7 در مدت‌زمان ۴۸ و ۷۲ ساعت

غلظت زمان	۰ mg/ml	۵۰ mg/ml	۱۰۰ mg/ml	۱۵۰ mg/ml	۲۰۰ mg/ml
۴۸ ساعت	۱۰۰±۰	۷۰/۶۰±۳/۷۸	۳۳/۷۳±۲/۲۶	۲۳/۰۹±۲/۲۱	۶/۸۰±۰/۱۵
۷۲ ساعت	۱۰۰±۰	۶۱/۹۵±۵/۰۹	۲۵/۹۷±۵/۴۶	۱۳/۳۱±۰/۲۶	۵/۸۴±۰/۳۷

\* داده‌ها به صورت  $\text{mean} \pm \text{SD}$  نمایش داده شده‌اند.

\*  $P < 0.001$ ، اختلاف معنی‌دار نسبت به سطح معنی‌داری

در تیمار ۷۲ ساعت نیز درصد توانایی زیستی کاهش یافت و از ۶۱/۹۵ درصد در غلظت ۵۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر به ۵/۸۴ درصد در غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر رسید. تجزیه و تحلیل داده‌های نتایج نشان داد که بیشترین سمیت مربوط به غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر و در انکوباسیون ۷۲ ساعت است (جدول ۱).

چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه کشت داده شد و پلیت‌ها ظرف مدت ۲۴ ساعت انکوبه گردید. سپس سلول‌های گروه‌های آزمایشی و کنترل با غلظت‌های ۰، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر از لیگوستیلید برای مدت ۴۸ و ۷۲ ساعت تیمار گردیدند. بعد از اتمام زمان معلوم پلیت‌ها از انکوباتور خارج شدند و پس از حذف محیط رویی، شست‌وشو با PBS صورت گرفت. در مرحله بعد محلول MTT با غلظت ۵ میلی‌گرم/میلی‌لیتر به چاهک‌ها اضافه گردید و سلول‌ها به مدت ۳ ساعت انکوبه شدند. در نهایت ۱۰۰ میکرولیتر DMSO به هر چاهک اضافه شد و جذب نوری DMSO، با کمک دستگاه ELISA reader در طول موج ۴۹۲ نانومتر اندازه‌گیری شد.

### • روش فلوسیتومتری

در تحقیق حاضر اثر لیگوستیلید بر میزان آپوپتوز رده‌های سلولی MCF-7 و HDF1BOM از طریق آزمون Annexin-V، با استفاده از

تأثیر غلظت‌های مختلف لیگوستیلید با استفاده از آزمون MTT نشان داد که درصد توانایی زیستی سلول‌های سرطان پستان MCF-7 که به مدت ۴۸ ساعت در معرض غلظت‌های مختلف لیگوستیلید قرار گرفتند، در همه‌ی غلظت‌ها کاهش یافت؛ به طوری که از ۷۰/۶۰ درصد در غلظت ۵۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر به ۶/۸۰ درصد در غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر رسید.

جدول ۲: تأثیر غلظت‌های مختلف لیگوستیلید بر توانایی زیستی رده سلولی HDF1BOM در مدت‌زمان ۴۸ و ۷۲ ساعت

غلظت زمان	۰ mg/ml	۵۰ mg/ml	۱۰۰ mg/ml	۱۵۰ mg/ml	۲۰۰ mg/ml
۴۸ ساعت	۱۰۰±۰	۹۷/۲۴±۷/۳۹	۸۵/۸۹±۸/۹۶	۲۷/۹۳±۳/۳۵	۵/۹۷±۰/۵۷
۷۲ ساعت	۱۰۰±۰	۹۰/۹۳±۱۱/۵۴	۷۰/۸۳±۵/۰۷	۲۱/۳۹±۲/۲۹	۵/۲۶±۰/۱۹

\* داده‌ها به صورت  $\text{mean} \pm \text{SD}$  نمایش داده شده‌اند.

\*  $P < 0.001$ ، اختلاف معنی‌دار نسبت به سطح معنی‌داری

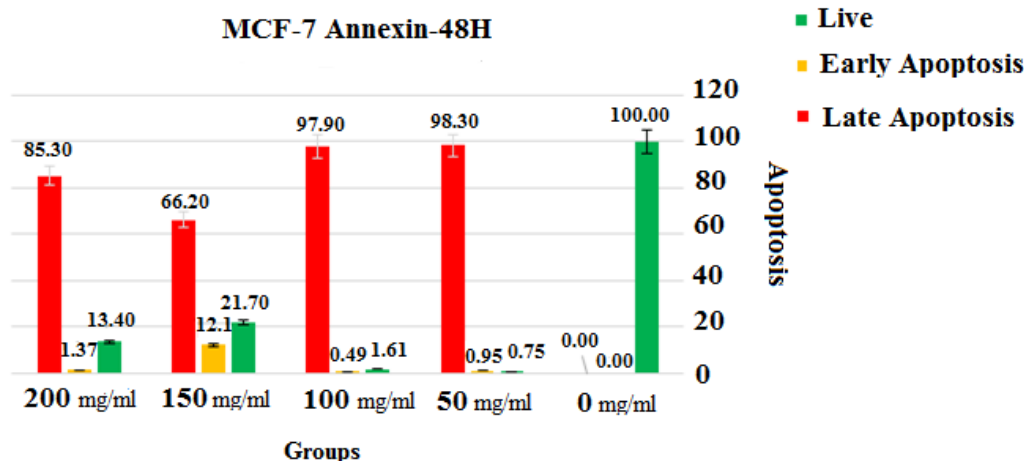
به طوری که از ۹۷/۲۴ درصد در غلظت ۵۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر به ۵/۹۷ درصد در غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر رسید. در تیمار ۷۲ ساعت نیز درصد توانایی زیستی کاهش یافت؛ به طوری که از ۹۰/۹۳ درصد در غلظت ۵۰

تأثیر غلظت‌های مختلف لیگوستیلید بر میزان توانایی زیستی رده‌ی سلول‌های طبیعی فیبروبلاست انسانی HDF1BOM با استفاده از آزمون MTT نشان‌دهنده‌ی کاهش توانایی زیستی در تیمار ۴۸ ساعت بود،

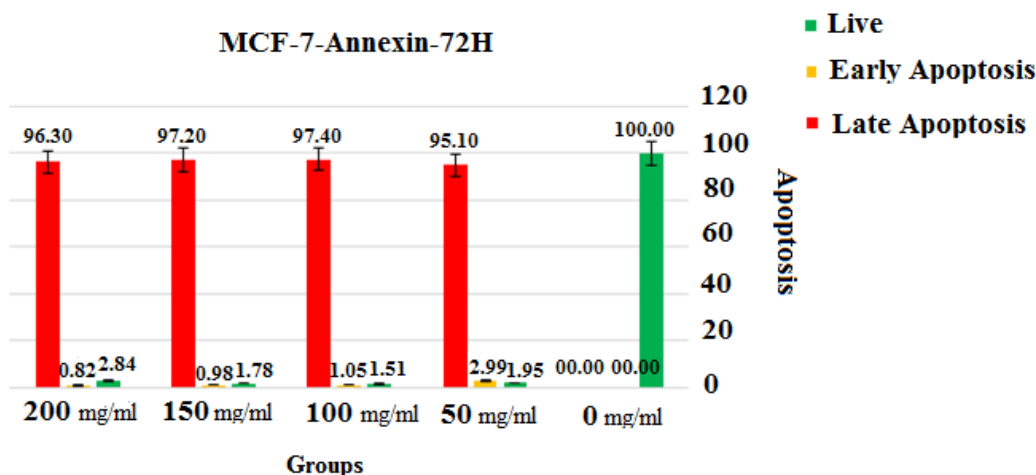
غلظت‌های مختلف لیگوستیلید قرار گرفتند، در همه‌ی غلظت‌ها افزایش یافته و درصد سلول‌هایی که در مراحل انتهایی آپوپتوز هستند، نسبت به گروه کنترل افزایش چشم‌گیری داشته است و القای آپوپتوز به صورت غیر وابسته به غلظت در بیشتر گروه‌ها به یک اندازه افزایش یافته است.

میلی گرم/میلی لیتر به ۵/۲۶ درصد در غلظت ۲۰۰ میلی گرم/میلی لیتر رسید. تجزیه و تحلیل داده‌های نتایج نشان داد که بیشترین سمیت مربوط به غلظت ۲۰۰ میلی گرم/میلی لیتر و در انکوباسیون ۷۲ ساعت است (جدول ۲).

نتایج آزمون Annexin V-FLUOS نشان داد که میزان القای آپوپتوز سلول‌های سرطان پستان MCF-7 که به مدت ۴۸ و ۷۲ ساعت در معرض



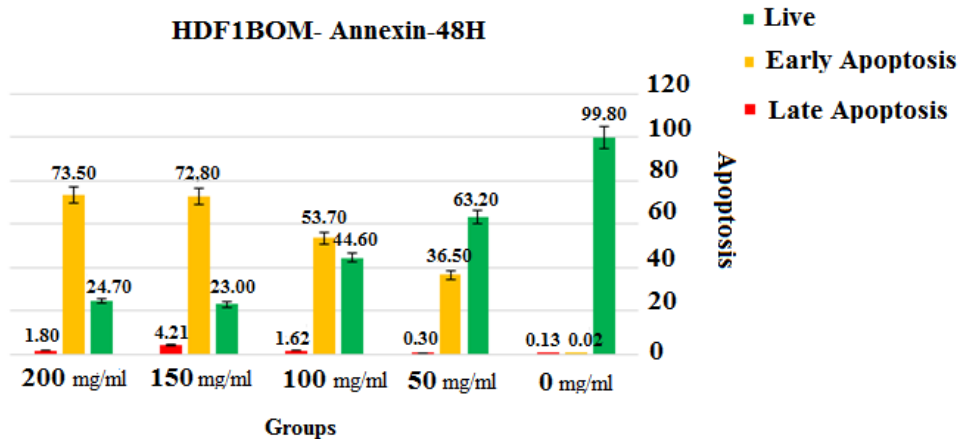
شکل ۱: تأثیر لیگوستیلید بر القای آپوپتوز در رده سلولی MCF-7 در مدت زمان ۴۸ ساعت ( $P < 0.001$ )، اختلاف معنی‌دار نسبت به سطح معنی‌داری)



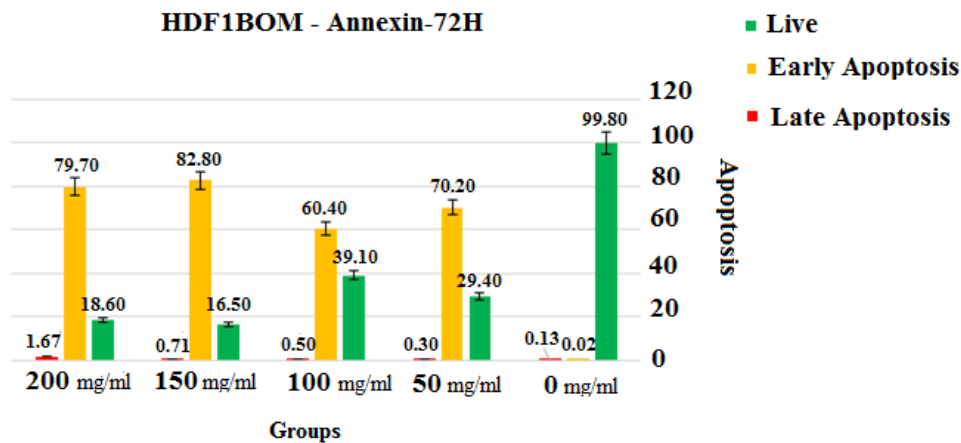
شکل ۲: تأثیر لیگوستیلید بر القای آپوپتوز در رده سلولی MCF-7 در مدت زمان ۷۲ ساعت ( $P < 0.001$ )، اختلاف معنی‌دار نسبت به سطح معنی‌داری)

بیشتر از سایر غلظت‌هاست (۲/۹۹ درصد) (شکل ۲). نتایج حاصل از آزمون Annexin V-FLUOS نشان داد که میزان القای آپوپتوز سلول‌های طبیعی فیروبلاست انسانی HDF1BOM که برای مدت زمان ۴۸ و ۷۲ ساعت در معرض غلظت‌های مختلف لیگوستیلید قرار گرفتند، در همه غلظت‌ها افزایش چندانی نداشته است ولی درصد سلول‌هایی که در مراحل پیش‌آپوپتوز قرار دارند نسبت به گروه کنترل افزایش چشم‌گیری داشته است.

در تیمار ۴۸ ساعت بیشترین درصد آپوپتوز (۹۸/۳ درصد) در غلظت ۵۰ میلی گرم/میلی لیتر لیگوستیلید رخ داد. همچنین سلول‌هایی که در مرحله‌ی پیش آپوپتوز هستند در غلظت ۱۵۰ میلی گرم/میلی لیتر لیگوستیلید بیشتر از سایر غلظت‌هاست (۱۲/۱ درصد) (شکل ۱). همچنین در تیمار ۷۲ ساعت، بیشترین درصد آپوپتوز (۹۷/۴ درصد و ۹۷/۲) به ترتیب مربوط به غلظت‌های ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی گرم/میلی لیتر لیگوستیلید است و سلول‌هایی که در مرحله‌ی پیش آپوپتوز هستند در غلظت ۵۰ میلی گرم/میلی لیتر لیگوستیلید



شکل ۳: تاثیر لیگوستیلید بر القای آپوپتوز در رده سلولی HDF1BOM در مدت زمان ۴۸ ساعت ( $P < 0.001$ )، افتلاف معنی‌دار نسبت به سطح معنی‌داری)



شکل ۴: تاثیر لیگوستیلید بر القای آپوپتوز در رده سلولی HDF1BOM در مدت زمان ۷۲ ساعت ( $P < 0.001$ )، افتلاف معنی‌دار نسبت به سطح معنی‌داری)

HDF1BOM و وقوع آپوپتوز تاثیر پذیرفته از لیگوستیلید بررسی و ارزیابی گردید. نتایج حاصل نشان داد که میزان توانایی زیستی در رده سلولی MCF-7 و HDF1BOM با افزایش دوز لیگوستیلید کاهش یافته است. به طور مشابه، صادقی سامانی و همکاران عصاره‌ی هیدروالکلی کلوس و آویشن دنایی را استخراج و تاثیر آن بر روی رده سلولی MCF-7 را با استفاده از آزمون MTT مورد ارزیابی قرار دادند و به این نتیجه رسیدند که ترکیب عصاره‌ی هیدروالکلی کلوس و آویشن دنایی اثر ضدسرطانی وابسته به دوز و زمان بر سلول‌های سرطانی MCF-7 دارد (۲۵). در تحقیقی که توسط برزگر فلاح و همکاران بر روی عصاره گیاه کرفس کوهی انجام شد نشان داد که ترکیب اصلی اسانس Z-Ligustilide است که دارای خواص آنتی‌اکسیدانی قوی، اثرات ضدالتهابی و خواص محافظت نوروئی قوی است (۲۶). Lin و Chao در سال ۲۰۱۱ عصاره گیاه چای گلپر را استخراج کردند و دریافتند که Z-Ligustilide دارای اعمال ضدالتهاب،

بیشترین میزان آپوپتوز (۴/۲۱ درصد) در تیمار ۴۸ ساعت و غلظت ۱۵۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر لیگوستیلید رخ داد. همچنین سلول‌هایی که در مرحله‌ی پیش آپوپتوز هستند در غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر لیگوستیلید بیشتر از سایر غلظت‌هاست (۷۳/۵ درصد) و بیشترین سلول‌های زنده نیز در غلظت ۵۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر دیده می‌شود (۶۳/۲ درصد) (شکل ۳). همچنین در تیمار ۷۲ ساعت، بیشترین درصد آپوپتوز (۱/۶۷ درصد) مربوط به غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر لیگوستیلید است و سلول‌هایی که در مرحله‌ی پیش آپوپتوز هستند در غلظت ۱۵۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر لیگوستیلید بیشتر از سایر غلظت‌هاست (۸۲/۸ درصد) و در مقایسه با گروه کنترل، بیشترین سلول‌های زنده در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر دیده می‌شود (۳۹/۱ درصد) (شکل ۴).

## بحث

در این تحقیق، توانایی زیستی در رده‌های سلولی MCF-7 و

## نتیجه گیری

نتایج این پژوهش بیانگر آن است که کلوس و ترکیب اصلی آن یعنی لیگوستیلید، می تواند با تاثیرگذاری بر مسیر مرگ برنامه ریزی شده سلولی، آپوپتوز را در سلول های سرطانی پستان القا نماید. لذا با توجه به مسئله عدم پاسخ دهی سلول های سرطانی پستان به راهکارهای درمانی مرسوم و از آنجائی که مقاومت به مرگ سلولی و عدم وجود تعادل بین تقسیم و رشد سلولی با میزان مرگ و میر سلولی منجر به عدم کنترل تکثیر سلول های توموری می شود، به نظر می رسد استفاده از لیگوستیلید با کاهش توانایی زیستی و تکثیر سلولی در پیشگیری و درمان سرطان پستان موثر واقع شود.

## تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان نامه کارشناسی ارشد با عنوان «بررسی اثر سمیت سلولی و آپوپتوزی لیگوستیلید (Z-Ligustilide) بر سلول های سرطان پستان MCF-7 و سلول های طبیعی فیرو بلاست انسانی HDF1BOM با استفاده از آزمون های MTT و Annexin» مصوب دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد به کد اخلاق IR.IAU. REC.1398.003 در سال ۱۳۹۶ می باشد و هیچ کمک مالی خاصی از سوی سازمان های تامین مالی در بخش های دولتی، تجاری و غیرانتفاعی دریافت نکرده است.

ضد سرطان، حفاظت نورونی و ضد هپاتوتوکسیک است و میزان حیات سلول های سرطانی HT-29 کلون شده را کاهش داده است. علاوه بر این، Z-Ligustilide اثر سیتوتوکسیکی در برابر رده های سلولی تومور مغزی و سلول های سرطان خون دارد (۲۷). همچنین نتایج آزمون Annexin نشان می دهد که میزان القای آپوپتوز در رده سلولی MCF-7 وابسته به زمان و غلظت نبوده و تقریباً در بیشتر غلظت ها به یک اندازه افزایش یافته است ولی در مورد رده سلولی HDF1BOM سلول هایی که در مرحله انتهایی آپوپتوز قرار دارند، افزایش قابل توجهی نداشته اند ولی درصد سلول هایی که در مرحله پیش آپوپتوز هستند افزایش چشم گیری داشته است. Ma و همکاران در سال ۲۰۱۷ به بررسی اثر Z-Ligustilide و tamoxifen بر روی رده سلولی سرطان پستان ER $\alpha$  (MDA-MB-231, MDA-MB-453, HS578t) با استفاده از آزمون انکسین پرداختند و به این نتیجه رسیدند که Z-LIG همراه با TAM منجر به آپوپتوز سلول های سرطان پستان ER $\alpha$  می شود و مهار رشد سلولی به وسیله این ترکیب ممکن است به دلیل آپوپتوز باشد (۲۸). در مطالعه دیگری که اخیراً در سال ۲۰۲۰ منتشر شده است، القای آپوپتوز به واسطه لیگوستیلید در سلول های سرطانی پروستات نشان داده شده است (۲۹). در این مطالعه به دلیل محدودیت در جمع آوری نمونه های بیوپسی بافتی بررسی تنها در سطح سلول صورت گرفته است، سایر محققان می توانند اثر لیگوستیلید را در سطح بافت روی نمونه های بیوپسی پستان نیز سنجش نمایند.

## References

1. Fadaka A, Ajiboye B, Ojo O, Adewale O, Olayide I & Emuwohochere R. Biology of glucose metabolism in cancer cells. *Journal of Oncological Sciences* 2017; 3(2): 45-51.
2. Jain R, Gahlyan P, Dwivedi S, Konwar R, Kumar S, Bhandari M, et al. Design, Synthesis and evaluation of 1H-1, 2, 3-Triazol-4-yl-methyl Tethered 3-Pyrrolylisatins as potent anti-breast cancer agents. *Chemistry Select* 2018; 3(19): 5263-8.
3. Huang S, Chong N, Lewis N E, Jia W, Xie G & Garmire LX. Novel personalized pathway-based metabolomics models reveal key metabolic pathways for breast cancer diagnosis. *Genome Medicine* 2016; 8(1): 34.
4. Rafi I, Chowdhury S, Chan T, Jubber I, Tahir MA & De Lusignan S. Improving the management of people with a family history of breast cancer in primary care: Before and after study of audit-based education. *BMC Family Practice* 2013; 14(1): 105.
5. Holm J, Eriksson L, Ploner A, Eriksson M, Rantalainen M, Li J, et al. Assessment of breast cancer risk factors reveals subtype heterogeneity. *Cancer Research* 2017; 77(13): 3708-17.
6. Sabzichi M, Hamishehkar H, Ramezani F, Sharifi S, Tabasinezhad M, Pirouzpanah M, et al. Luteolin-loaded phytosomes sensitize human breast carcinoma MDA-MB 231 cells to doxorubicin by suppressing Nrf2 mediated signalling. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 2014; 15(13): 5311-6.
7. Pirouzpanah M, Pirouzpanah S, Sabzichi M, Pashaei-Asl R, Pashaei-Asl MM & Samadi N. The effects of silibinin on the induction of apoptosis and inhibition of cell growth in MCF-7 breast cancer cell line. *Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology* 2015; 9(4): 1-10 [Article in Persian].

8. Hojjati M, Sedighi Hafshejani M & Shahrani M. Effect of alcoholic extract of *Kelussia odoratissima* Mozaffarian on ileum contractions in rats. *Quarterly Journal of Sabzevar University of Medical Sciences* 2012; 19(2): 156-63[Article in Persian].
9. Mirhossieni F, Rahimmalek M & Ghasemi Pirbalouti A. Effect of oven and shade drying methods on essential oil yield and chemical composition of *Kelussia odoratissima* Mozaff. *Journal of Medicinal Herbs* 2014; 4(4): 152-6[Article in Persian].
10. Rabbani M, Sajjadi SE & Sadeghi M. Chemical composition of the essential oil from *Kelussia odoratissima* Mozaff And the evaluation of its sedative and anxiolytic effects in mice. *Clinics (Sao Paulo)* 2011; 66(5): 843-8.
11. Jafarzadeh L, Habibian R, Rafieian Kopaei M & Mohammadzadeh Z. Effect of hydroalcoholic extract of *Kelussia odoratissima* Mozaffarian on uterus contractions of mature rats. *Quarterly of the Horizon of Medical Sciences (OFOGH-E-DANESH)* 2015; 21(3): 169-74[Article in Persian].
12. Mirhosseini F, Rahimmalek M, Pirbalouti AG & Taghipoor M. Effect of different drying treatments on essential oil yield, composition and color characteristics of *Kelussia odoratissima* Mozaff. *Journal of Essential Oil Research* 2015; 27(3): 204-11.
13. Khajali F, Ahmadipour B, Rafiei F & Hassanpour H. Antioxidative, Antihyperlipidemic, and growth-promoting effects of *Kelussia odoratissima* in Meat-type Chickens. *Poultry Science Journal* 2015; 3(1): 37-46.
14. Omidbaigi R, Sefidkon F & Saeedi K. Essential oil content and composition of *kelussia odoratissima* mozaff. As an Iranian endemic plant. *Journal of Essential Oil-Bearing Plants* 2008; 11(6): 594-7.
15. Ghasemi M, Mirlohi A, Ayyari M & Shojaeiyan A. *Kelussia odoratissima* mozaff As a rich source of essential fatty acids and phthalides. *Journal of Herbmед Pharmacology* 2015; 4(4): 115-20.
16. Su ZY, Khor TO, Shu L, Lee JH, Saw CLL, Wu TY, et al. Epigenetic reactivation of *Nrf2* in murine prostate cancer TRAMP C1 cells by natural phytochemicals *Z-ligustilide* and *Radix angelica sinensis* via promoter CpG demethylation. *Chemical Research in Toxicology* 2013; 26(3): 477-85.
17. Salimi M, Ebrahimi A, Shojaee Asadi Z & Saei Dehkordi SS. Essential oil composition of *Kelussia odoratissima* Mozaff Iranian *Journal of Medicinal and Aromatic Plants* 2010; 26(2): 147-56[Article in Persian].
18. Kan WL, Cho CH, Rudd JA & Lin G. Study of the anti-proliferative effects and synergy of phthalides from *angelica sinensis* on colon cancer cells. *Journal of Ethnopharmacology* 2008; 120(1): 36-43.
19. Liu L, Ning ZQ, Shan S, Zhang K, Deng T, Lu XP, et al. Phthalide lactones from *Ligusticum chuanxiong* inhibit lipopolysaccharide-induced TNF- $\alpha$  production and TNF- $\alpha$ -mediated NF- $\kappa$ B Activation. *Planta Medica* 2005; 71(9): 808-13.
20. Dietz BM, Liu D, Hagos GK, Yao P, Schinkovitz A, Pro SM, et al. *Angelica sinensis* and its alkylphthalides induce the detoxification enzyme nad(p)h: Quinone oxidoreductase 1 by alkylating keap1. *Chemical Research in Toxicology* 2008; 21(10): 1939-48.
21. Huang SH, Lin CM & Chiang BH. Protective effects of *angelica sinensis* extract on amyloid Beta-Peptide-Induced Neurotoxicity. *Phytomedicine* 2008; 15(9): 710-21.
22. Yu Y, Du JR, Wang CY & Qian ZM. Protection against hydrogen peroxide-induced injury by *Z-ligustilide* in PC12 cells. *Experimental Brain Research* 2008; 184(3): 307-12.
23. Lee AV, Oesterreich S & Davidson NE. MCF-7 cells—changing the course of breast cancer research and care for 45 years. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* 2015; 107(7): djv073.
24. Gomez Perez M, Fourcade L, Mateescu MA & Paquin J. Neutral red versus MTT assay of cell viability in the presence of copper compounds. *Analytical Biochemistry* 2017; 535(1): 43-6.
25. Sadeghisamani F, Sazgar H & Ghasemi pirbalouti A. Investigation cytotoxic effect of hydroalcoholic extract from combination of *Kelussia odoratissima* Mozaff and *thymus daenesis celak* on MCF-7 cancer cells line. *Journal of Jahrom University of Medical Sciences* 2016; 14(2): 59-67[Article in Persian].
26. Barzegar Fallah N, Baery N, Soleymankhani M, Malekmohammadi N, Alimoradi H, Parsa A, et al. *Kelussia odoratissima* Mozaff attenuates thromboembolic brain injury, possibly due to its *Z-ligustilide* content. *Brain Injury* 2016; 30(7): 926-32.

27. Chao WW & Lin BF. Bioactivities of major constituents isolated from *Angelica sinensis* (Danggui). *Chinese Medicine* 2011; 6(29): 1-7.
28. Ma H, Li L, Dou G, Wang C, Li J, He H, et al. Z-ligustilide restores tamoxifen sensitivity of ERa negative breast cancer cells by reversing MTA1/IFI16/HDACs complex mediated epigenetic repression of ERa. *Oncotarget* 2017; 8(17): 29328-45.
29. Ma J, Mei J, Lu J, Wang Y, Hu M & Ma F. Ligustilide promotes apoptosis of cancer-associated fibroblasts via the TLR4 pathways. *Food and Chemical Toxicology* 2020; 135(1): 110991.

# The Cytotoxicity and Pro-Apoptotic Effect of Ligustilide (Z-Ligustilide) on MCF-7 Breast Cancer Cells and HDF1BOM Human Fibroblast Cells by Using MTT and Annexin Tests

Saeid Mirzaeian<sup>1\*</sup> (M.S.), Khalil Khashei Varnamkhasti<sup>2</sup> (Ph.D.)

1 Master of Science in Biochemistry, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

2 Instructor, Department of Genetics, School of Medicine, Kazerun Branch, Islamic Azad University, Kazerun, Iran

## Abstract

Received: Sep 2020

Accepted: Apr 2021

**Background and Aim:** Breast cancer is one of the most common types of cancer and the second leading cause of cancer death in women. The effect of ligustilide - isolated from the *Kelussia* on MCF-7 breast cancer cell line compared with human fibroblast cell line (HDF1BOM) was evaluated in the present study.

**Materials and Methods:** MCF-7 and HDF1BOM cell lines were treated for 48 and 72 hours with different concentrations (0, 50, 100, 150 and 200 mg/ml) of Z-ligustilide ((ligustilide (Z)-3-butylidene-4,5-dihydrophthalide)). Then, bioavailability was analyzed by ELISA reader using MTT kit and Apoptosis was assessed by flow cytometry using an Annexin V-FITC/PI kit in two times. Statistical analysis was accomplished by ANOVA and Huynh-Feldt tests using SPSS and FlowJo software.

**Results:** The results of MTT test showed reduce bioavailability of MCF-7 cell line in all concentrations (from 70.60% in 50 mg/ml to 6.80% in 200 mg/ml (for 48 h of treatment), from 61.95% in 50 mg/ml to 5.84% in 200 mg/ml (for 72 h of treatment)). Also, the results of the Annexin test showed that the induction of apoptosis is not time and concentration dependent manner, and it had increased in most groups. Highest percentage of apoptosis were; 98.3% in 50 mg/ml (for 48 h of treatment), and 97.4 % in 100 mg/ml (for 72 h of treatment). The results of MTT test showed reduce bioavailability of HDF1BOM cell line in both times compared to the control group (from 97.24% in 50 mg/ml to 5.97% in 200 mg/ml (for 48 h of treatment), from 90.93% in 50 mg/ml to 5.26% in 200 mg/ml (for 72 h of treatment)). Also, according to the results of Annexin, early apoptotic cells show a higher percentage (4.21% in 150 mg/ml (for 48 h of treatment), 1.67% in 200 mg/ml (for 72 h of treatment)). Ligustilide did not show considerable cytotoxicity in HDF1BOM cells.

**Conclusion:** Due to the fact that ligustilide has an inhibitory effect on the growth, proliferation and invasion of cancer cells by inducing apoptosis, it seems that ligustilide can be used to reduce cell proliferation of breast cancer.

**Keywords:** Ligustilide, Apoptosis, Bioavailability, Annexin, Breast Cancer, Fibroblast Cells

\*Corresponding Author:

Mirzaeian S

Email:

mirzaeian71@gmail.com