

Effects of Spirulina Extract on Proliferation, Apoptosis, Nitric Oxide Production, and Activation of the Fas/FasL–ASK1–p38 Pathway in Breast and Prostate Cancer Cells

Azita Faramarzi¹,
Mona Pazhouhi¹,
Afin Ali Mohammad²,
Cirous Jalili³

¹ Associate professor, Department of Anatomical Sciences, School of Medicine, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran

² Student, Student Research Committee, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran

³ Professor, Department of Anatomical Sciences, School of Medicine, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran

(Received March 16, 2025; Accepted August 30, 2025)

Abstract

Background and purpose: Chemotherapy is a standard treatment for cancer patients. However, the development of resistance significantly reduces the therapeutic efficacy of anticancer drugs. According to previous studies, Spirulina exhibits potential anticancer properties. Given the need for new therapeutic approaches, this study was designed to evaluate the effects of Spirulina on cell proliferation, apoptosis, nitric oxide production, and the expression of apoptosis-related genes in breast and prostate cancer cells.

Materials and methods: In this experimental study, after preparing the hydroalcoholic extract of Spirulina, the effects of various concentrations of the extract on the viability of breast cancer, prostate cancer, and fibroblast cells were evaluated. The percentage of DNA fragmentation and nitric oxide production were measured. Real-time PCR was performed to analyze the expression of ASK1, p38, Fas, and FasL genes in RNA extracted from control and treated cells. The data were analyzed statistically.

Results: After 24, 48, 72, and 96 hours of treatment with the hydroalcoholic extract of Spirulina, the viability of breast and prostate cancer cells decreased in a concentration- and time-dependent manner. After 24 hours, the IC₅₀ concentration of the Spirulina extract significantly increased apoptosis and nitric oxide production ($P < 0.05$) and caused a significant upregulation in the expression of ASK1, p38, Fas, and FasL genes in both cancer cell lines ($P < 0.05$).

Conclusion: The hydroalcoholic extract of Spirulina induces programmed cell death in breast and prostate cancer cells by activating the Fas/FasL–ASK1–p38 pathway and modulating nitric oxide production. Considering the critical role of drug resistance in reducing the effectiveness of conventional cancer therapies, Spirulina may be regarded as a natural compound with potentially low toxicity, suitable for the development of novel or complementary therapeutic strategies.

Keywords: spirulina, prostate cancer, breast cancer, apoptosis, Nitric oxide

J Mazandaran Univ Med Sci 2025; 35 (249): 20-31 (Persian).

Corresponding Author: Cirous Jalili - School of Medicine, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran
(E-mail: cjalili@yahoo.com)

اثرات عصاره اسپیرولینا بر تکثیر، آپوپتوز، ترشح نیتریک اکساید و فعالسازی مسیر Fas/FasL-ASK1-p38 در سلول های سرطان پستان و پروستات

آزیتا فرامرزی^۱مونا پژوهی^۱ته فین علی محمد^۲سیروس جلیلی^۳

چکیده

سابقه و هدف: شیمی درمانی به عنوان درمان استاندارد برای بیماران مبتلا به سرطان در نظر گرفته می شود. با این حال، مقاومت به درمان، کارایی دارو برای درمان سرطان را به طور قابل توجهی کاهش می دهد. بر طبق مطالعات قبلی اسپیرولینا دارای اثرات ضد سرطانی می باشد. با توجه به ضرورت شناسایی روش های درمانی جدید، این مطالعه با هدف تعیین اثرات اسپیرولینا بر تکثیر، آپوپتوز، ترشح نیتریک اکساید و بیان ژن های مرتبط با آپوپتوز در سلول های سرطان پستان و پروستات، انجام پذیرفت.

مواد و روش ها: در این مطالعه تجربی-آزمایشگاهی، بعد از تهیه عصاره هیدروالکلی اسپیرولینا اثر غلظت های مختلف عصاره بر زنده ماندن سلول های سرطان پستان، سرطان پروستات و فیروبلست بررسی شد. درصد قطعه، قطعه DNA شدن و سطح نیتریک اکساید اندازه گیری شد. برای تجزیه و تحلیل بیان بیان ژن های *Fas*، *p38*، *ASK1* و *FasL*، RNA سلول های کنترل و بیمار شده از تست Real-time PCR استفاده شد. تجزیه و تحلیل آماری داده ها با نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ انجام شد و سطح معنی داری ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته ها: پس از ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت تیمار با عصاره هیدروالکلی اسپیرولینا زنده ماندن سلول های سرطان پستان و پروستات به روشی وابسته به غلظت و زمان کاهش یافت. پس از ۲۴ ساعت، غلظت IC50 عصاره اسپیرولینا آپوپتوز و تولید نیتریک اکساید را به صورت معنی داری افزایش داد ($P < 0/05$) و باعث افزایش معنی دار در بیان ژن های *Fas*، *p38*، *ASK1* و *FasL* در هر دو رده سلولی سرطانی شد ($P < 0/05$).

استنتاج: عصاره هیدروالکلی اسپیرولینا می تواند از طریق فعالسازی مسیر Fas/FasL-ASK1-p38 و مهار تولید نیتریک اکساید، مرگ برنامه ریزی شده سلولی را در سرطان پستان و پروستات تحریک کند. با توجه به نقش مقاومت دارویی در کاهش اثربخشی درمان های سرطان، اسپیرولینا می تواند به عنوان یک ترکیب طبیعی کم عارضه در توسعه راهبردهای درمانی جدید یا تکمیلی مورد توجه قرار گیرد.

واژه های کلیدی: اسپیرولینا، سرطان پروستات، سرطان پستان، آپوپتوز، نیتریک اکساید

Email: cjalili@yahoo.com

مؤلف مسئول: سیروس جلیلی - کرمانشاه دانشکده پزشکی گروه علوم تشریح، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران

۱. دانشیار، گروه علوم تشریحی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران

۲. دانشجو، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران

۳. استاد، گروه علوم تشریحی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱۲/۲۶ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۴۰۴/۱/۱۹ تاریخ تصویب: ۱۴۰۴/۶/۸

مقدمه

سرطان یکی از علل عمده مرگ در سراسر جهان است و بعد از بیماری‌های قلبی-عروقی در ایالت متحده و اروپا دومین عامل اصلی مرگ می‌باشد. بر طبق آمار سازمان بهداشت جهانی (WHO) (World Health Organization) تعداد مبتلایان به سرطان در سال ۲۰۰۸، ۱۲/۷ میلیون نفر اعلام شد و پیش‌بینی می‌شود که این رقم تا سال ۲۰۳۰ به ۲۲/۲ میلیون نفر افزایش یابد (۱، ۲). سرطان پروستات به‌عنوان دومین سرطان شایع در میان مردان و پنجمین علل مرگ و میر در دنیا شناخته شده است. میزان وقوع و کشندگی سرطان پروستات در دنیا با افزایش سن ارتباط دارد و سن متوسط در زمان تشخیص بیماری به ۶۶ سال رسیده است (۳). در سراسر دنیا، سرطان پستان مهم‌ترین نوع سرطان در زنان است، و ۲۵ درصد از تمام موارد سرطان را به خود اختصاص می‌دهد (۴).

آپوپتوز نقش اساسی در رشد طبیعی و هموستاز بافت ایفا می‌کند و هنگامی که تنظیم نشود باعث ایجاد بیماری‌های مختلف از جمله سرطان، خود ایمنی و اختلالات عصبی می‌شود. کیناز تنظیم کننده سیگنال آپوپتوز ۱ (ASK1) (Apoptosis Signal-Regulating Kinase) یک عضو خانواده پروتئین کیناز کیناز (MAPKKK) (Mitogen-Activated Protein Kinase) فعال شده با میتوزن است و در پاسخ به H_2O_2 ، TNF و Fas از طریق مکانیسم‌های متمایز فعال می‌شود و آن سیگنال‌ها را به MAP کینازهای فعال شده تحت استرس مانند JNK و p38 می‌رساند. بیان بیش از حد آلل نوع وحشی یا فعال، JNK، ASK1 و p38 را فعال می‌کند و از طریق فعال‌سازی کاسپاز وابسته به میتوکندری، آپوپتوز را در سلول‌های مختلف القا می‌کند. یازده نوع MAPs استاندارد مختلف تا به امروز به‌عنوان فعال کننده‌های بالادست مسیر JNK و/یا p38 شناسایی شده‌اند. با این حال، نقش مسیرهای سیگنال دهی JNK/p38 در طول آپوپتوز، همان‌طور که با بیان پروتئین‌های غالب منفی در شرایط

آزمایشگاهی یا با هدف قرار دادن برخی از آن ژن‌ها مورد سنجش قرار می‌گیرد، بحث برانگیز بوده است (۵). اسپیرولینا یک مکمل غذایی محبوب است که از جلبک‌های سبز آبی (سیانوباکتری‌ها) از جنس *Arthrospira* به دست می‌آید. آن‌ها آزادانه در آب شور شناور هستند. اسپیرولینا به‌طور معمول در مخازن آب قلیایی در مناطق نیمه گرمسیری و گرمسیری آمریکا، آسیا و آفریقای مرکزی رشد می‌کند و به صورت تجاری تولید می‌شود. با توجه به محتوای بالای مواد مغذی و اثرات درمانی متفاوت، اسپیرولینا در بین مصرف کنندگان محبوب است و به عنوان یک مکمل غذایی مصرف می‌شود (۶). بسیاری از مطالعات نشان می‌دهد که اسپیرولینا دارای غلظت بالایی از متابولیت‌های اولیه و ثانویه ارتقاءدهنده سلامتی است (۷). برخی از فیکوبیلی پروتئین‌ها اخیراً دارای فعالیت ضد سرطانی هستند. برای مثال، C-PC طبیعی (کمپلکس پروتئین-رنگدانه محلول در آب) خالص شده از اسپیرولینا با مهار تکثیر سلول‌های نوپلاسم و اختلال در چرخه سلولی سرطان مرتبط است (۸-۱۲).

بیماران مبتلا به سرطان پیشرفته یا عود کننده پیش آگهی بدی دارند و بقای یک ساله آن‌ها تنها ۱۰ تا ۲۰ درصد است. شیمی درمانی به عنوان درمان استاندارد برای بیماران مبتلا به سرطان پیشرفته یا عود کننده در نظر گرفته می‌شود. با این حال، مقاومت به درمان ممکن است ایجاد شود، بنابراین کارایی دارو برای درمان سرطان پیشرفته یا عود کننده به‌طور قابل توجهی به خطر می‌افتد. به خوبی شناخته شده است که مصرف منظم برخی از مواد طبیعی، به اصطلاح عوامل شیمیایی پیشگیری کننده، می‌تواند خطر ابتلا به سرطان‌های خاص را کاهش دهد. با توجه به ضرورت شناسایی روش‌های درمانی جدید، این مطالعه با هدف تعیین اثرات اسپیرولینا بر تکثیر، آپوپتوز، ترشح نیتریک اکساید و بیان ژن‌های مرتبط با آپوپتوز در سلول‌های سرطان پستان و پروستات، انجام شد.

مواد و روش‌ها

پژوهش فوق حاصل طرح تحقیقاتی مصوب دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه با کد ۴۰۳۰۰۸۱ است که در دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه انجام گرفته است. کد اخلاق طرح IR.KUMS.MED.REC.1403.004 می‌باشد. این مطالعه از نوع تجربی-آزمایشگاهی بود که در آزمایشگاه کشت سلول گروه علوم تشریح دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه انجام شد.

تهیه عصاره

پودر جلبک خوراکی اسپیرولینا برند آلگوتب (<https://algotab.com/>) خریداری شد و در دمای اتاق و در سایه خشک شد. سپس توسط آسیاب خرد شد. مقدار ۲۰۰ گرم از پودر آسیاب شده را در یک لیتر حلال (آب مقطر- اتانول با نسبت ۵۰) ریخته و به مدت ۲ روز در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد و در تاریکی انکوبه شد. سپس عصاره از کاغذ صافی واتمن شماره ۴۲ عبور داده شد. محلول حاصل به منظور تبخیر حلال‌های موجود در آن در دمای ۴۵ درجه سانتی گراد به مدت ۴ روز قرار داده شد. پودر باقی مانده به عنوان عصاره استفاده شد.

کشت سلول

در این پژوهش، سه رده سلول‌های سرطانی پستان (MCF7)، پروستات (LNCaP) و فیروبلاست (SKM) در داخل فلاسک ۲۵ سانتی متر مربع به صورت کشت شده از انستیتو پاستور ایران خریداری شد. سلول‌های سرطانی در محیط کشت RPMI ۱۶۴۰ و سرم جنینی گاو 10 FBS درصد به همراه ۱ درصد آنتی بیوتیک‌های استرپتومایسین و پنی سیلین کشت داده شدند و هر سه رده سلولی را در انکوباتور ۵ درصد CO₂ و دمای ۳۷ درجه سانتی گراد نگهداری شد. سلول‌های نرمال فیروبلاست در محیط کشت DMEM حاوی ۱۰ درصد

سرم FBS کشت داده شد. سلول‌های سرطانی پستان و پروستات بعد از ده مرحله پاساژ منظم و سلول‌های فیروبلاست بعد از ۵ مرحله پاساژ آماده شدند.

تست زنده مانی

بعد از شمارش سلولی به میزان ۱۰۰ میکرولیتر شامل تقریباً ۱۵ هزار سلول از سوسپانسیون سلولی در پلیت‌های ۹۶ خانه ریخته و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور حاوی CO₂ و دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به منظور چسبیدن به کف پلیت قرار داده شد. سپس محیط کشت رویی سلول‌ها خارج و محیط حاوی عصاره اسپیرولینا و هم چنین محیط کشت فاقد سرم به عنوان کنترل به سلول‌ها اضافه شد. بعد از ۲۴ ساعت به هریک از چاهک‌ها به میزان ۱۰ میکرولیتر MTT اضافه شد و بعد از آن که ۴ ساعت در انکوباتور نگهداری شدند به هریک از چاهک‌ها ۱۵۰ میکرولیتر DMSO اضافه شد و بعد از ۳۰ دقیقه جذب سلول‌ها توسط دستگاه الیزا ریدر در طول موج‌های جذب ۴۹۰ و ۶۳۰ خوانده و میزان بقا سلول حاصل کسر جذب هر نمونه بر نمونه کنترل (تیمار نشده) بود. سپس میزان IC₅₀ توسط نرم افزار Compusyn برای هر رده سلولی محاسبه شد (۱۳).

تست آپوپتوز

در صد قطعه، قطعه قطعه شدن DNA پس از انکوباسیون با استفاده از رنگ آمیزی دی فنیل آمین اندازه گیری شد. به صورت مختصر، بعد از تیمار، تعداد پنج میلیون عدد سلول در ۱ میلی لیتر از بافر Tris tris-propanesu lonic methylamino] (hydroxymethyl) acid - Ethylenediaminetetraacetic acid به حالت سوسپانسیون درآمد. ۱ میلی لیتر از هر نمونه در یک میکروتیوب (میکروتیوب B سلول‌های تیمار شده) ریخته شد. سپس سلول‌ها سانتریفیوژ شدند (۲۰۰ گرم، ۱۰ دقیقه، ۴ درجه سانتی گراد) و محلول رویی به یک میکروتیوب جدید (میکروتیوب S) منتقل شد. ۱ میلی لیتر از محلول به رسوب در میکروتیوب B اضافه شد. تریتون X-100/Tris/EDTA اضافه شد و به شدت ورتکس شد تا

داخلی) مربوطه محاسبه شد. سطح بیان نسبی ژن هدف به β -اکتین با استفاده از معادله $2^{-\Delta CT}$ توصیف شد (۱۴). توالی پرایمرها به شرح زیر می باشد.

Fas	Forward	5'-
ATGCACACTCTGCGATGAAG-3'		
	Reverse	5'-
CAGTGTTCACAGCCAGGAGA-3'		
FasL	Forward	5'-
GCAGAAGGAAGTGGCAGAAC-3'		
	Reverse	5'-
TTAAATGGGCCACACTCCTC-3'		
ASK1	Forward	5'-
GCTCCTGGTACAGCCATTGAAGA-3'		
	Reverse	5'-
AGGACATCCACCAGCGTGAATC-3'		
p38	Forward	5'-
ATGGGTGCATGTGTGCATGA-3'		
	Reverse	5'-
CTACTGATGGCAGGAGCCTGTG-3'		
β -actin	Forward	5'-
GGAGATTACTGCCCTGGCTCCTA-3'		
	Reverse	5'-
GACTCATCGTACTCCTGCTTGCTG-3'		

سنجش نیتریک اکساید

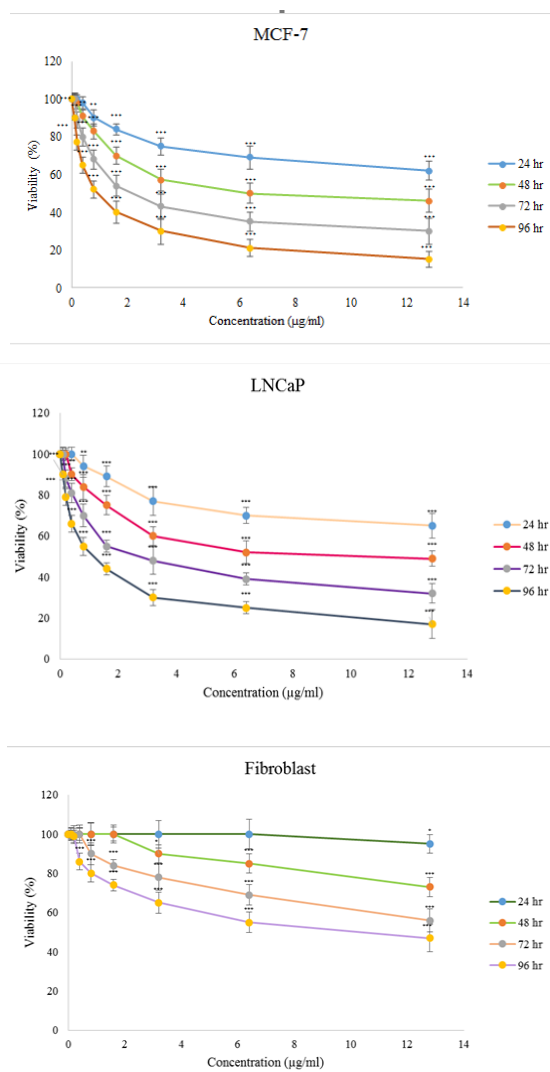
به منظور این سنجش از اندازه گیری سطح متابولیت های نترات در محیط کشت با روش رنگ سنجی بر مبنای واکنش گریس استفاده شد. عامل گریس شامل سولفانامید و آمین آروماتیک (N-(1-naphthyl)ethylenediamine) است. این بررسی در دو مرحله انجام شد. مرحله اول پروتئینه کردن می باشد که در ابتدا تداخل پروتئینی با مخلوط کردن ۴۰۰ میکرولیتر محیط روی سلول های تیمار شده با ۶ میلی گرم پودر سولفات روی و سانتریفیوژ به مدت ۱۲ دقیقه در ۱۲۰۰۰ rpm و دمای ۵°C حذف شد. مرحله بعدی سنجش نیتريت و نترات تام بود. روش کار واکنش گریس براساس یک فرآیند دو مرحله ای است. مرحله اول تبدیل نترات به نیتريت با استفاده از یک نترات ردوکناز است. در این مرحله در میکروپلیت های الیزا ابتدا ۱۰۰ میکرو لیتر از نمونه پروتئین زدایی شد و سپس ۱۰۰ میکرولیتر

کروماتین تکه تکه شده پس از لیز سلولی آزاد شود. سپس، برای جدا کردن کروماتین تکه تکه شده از میکروتیوب B سالم، محلول سانتریفیوژ شد (۲۰۰۰ گرم، ۱۰ دقیقه، ۴ درجه سانتی گراد). محلول رویی به میکروتیوب T منتقل شد و ۱ میلی لیتر محلول X-100/Tris/EDTA به رسوب در میکروتیوب B اضافه شد. ۱ میلی لیتر محلول تری کلرواستیک اسید ۲۵ درصد به هر ۳ میکروتیوب اضافه شد و به مدت یک شب (در دمای ۴ درجه سانتی گراد) برای رسوب DNA انکوبه شد. سپس، هر ۳ میکروتیوب سانتریفیوژ شدند (۲۰۰۰ g، ۱۰ دقیقه، ۴ درجه سانتی گراد). محلول رویی جدا شد و ۱۶۰ میکرولیتر اسید تری کلرواستیک ۵ درصد به رسوب باقی مانده اضافه شد (به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۹۰ درجه سانتی گراد حرارت داده شد). ۳۲۰ میکرولیتر محلول فنیل آمین به هر میکروتیوب اضافه و ورتکس شد. محتویات میکروتیوب ها به مدت یک شب (در دمای اتاق) انکوبه شدند. ۲۰۰ میکرولیتر از هر نمونه برای اندازه گیری جذب در طول موج ۶۰۰ نانومتر استفاده شد. درصد DNA قطعه قطعه شده با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد (۱۴).

$$\text{DNA fragmentation (\%)} = (\text{absorption rate of S} + \text{absorption rate of T} + \text{absorption rate of B} / \text{absorption rate of S} + \text{absorption rate of T}) \times 100$$

سنجش بیان ژن

بر اساس پروتکل سازنده معرف DENAzist (تهران، ایران) RNA کل سلول های کنترل و تیمار شده استخراج شد. RNA در ۸۰- درجه سانتی گراد ذخیره شد. برای تعیین غلظت RNA از اسپکتروفتومتر نانودراپ استفاده شد. RNA کل با استفاده از کیت (Vivantis Technologies, Selangor DE, Malaysia) به cDNA تبدیل شد. در نهایت Real-time PCR (Real-time polymerase chain reaction)، توسط کیت مخصوص (SYBR Premix Ex Taq Technology, Takara Bio Inc., Shiga, Japan) انجام شد. تفاوت در مقادیر چرخه آستانه (CT) (Threshold Cycle) ژن هدف با ژن β -اکتین (کنترل



تصویر شماره ۱: اثر عصاره هیدروالکلی اسپیرولینا بر زنده مانی سلول های MCF-7، LNCaP و فیبروبلاست، زنده مانی با روش MTT سنجیده شد. داده ها میانگین $\pm$ S.E.M. مقادیر از سه آزمایش مستقل و به عنوان درصد نسبت به مقادیر کنترل بیان می شود، * نشان دهنده $P < 0.05$ ؛ ** نشان دهنده $P < 0.01$ و *** نشان دهنده $P < 0.001$ در مقایسه با کنترل

اثر عصاره هیدروالکلی اسپیرولینا بر آپوپتوز سلول ها

اثر غلظت IC50 عصاره هیدروالکلی اسپیرولینا بر آپوپتوز در تصویر شماره ۲، نشان داده شده است. پس از ۲۴ ساعت، عصاره هیدروالکلی اسپیرولینا آپوپتوز را به صورت معنی داری به میزان ۱۰/۵ برابر و ۱۲/۵ برابر به ترتیب در رده های سلولی MCF-7 و LNCaP افزایش داد ($P < 0.05$).

محلول کلرید وانادیوم III (۸ میلی گرم در میلی لیتر) اضافه شد تا نیترات ها به نیتريت تبدیل شوند. مرحله دوم اضافه کردن عامل گریس است که نیتريت را به ترکیب آزو با رنگ بنفش تبدیل می نماید. در این مرحله مخلوط سولفانامید و NEDD افزوده و به مدت ۳۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه گردید. پس از انجام واکنش و تشکیل رنگ جذب نمونه ها در ۵۴۰ نانومتر توسط دستگاه الایزا ریدر اندازه گیری شد. غلظت های مختلف سدیم نیترات به عنوان استاندارد استفاده شد.

به منظور آنالیز آماری داده ها از نسخه ۱۶ نرم افزار SPSS استفاده شد. سطح معنی داری تست های آماری در مورد همهی تست ها $P < 0.05$ در نظر گرفته شد. تمام داده ها بر اساس میانگین $\pm$ انحراف معیار نشان داده شدند. از آزمون t-test و One-way Anova استفاده شد. نرمال بودن داده ها با استفاده از تست کولموگروف-اسمیرنوف سنجیده شد.

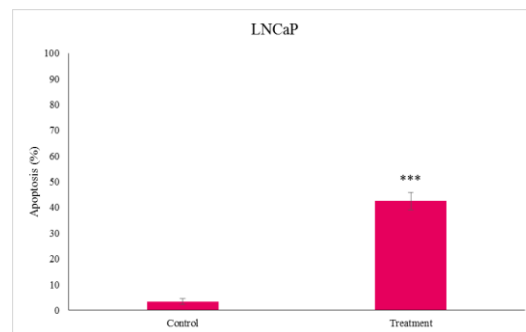
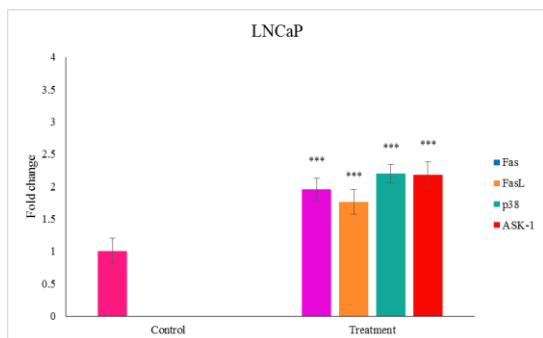
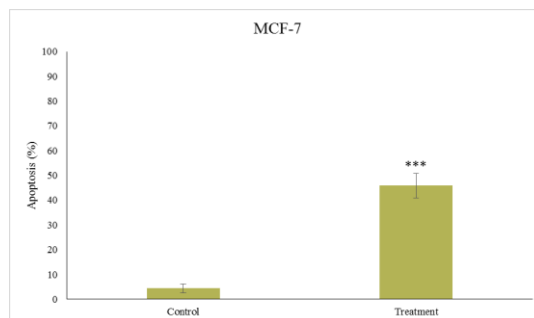
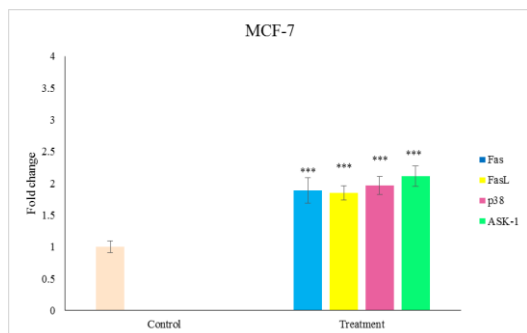
یافته ها

اثر عصاره هیدروالکلی اسپیرولینا بر زنده مانی سلول ها

اثر غلظت های مختلف اسپیرولینا بر زنده ماندن سلول های MCF-7، LNCaP و فیبروبلاست در تصویر شماره ۱ نشان داده شده است. پس از ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت، اسپیرولینا زنده ماندن سلولی را به روشی وابسته به غلظت و زمان کاهش داد. مقادیر IC50 عصاره هیدروالکلی اسپیرولینا برای سلول های MCF-7، LNCaP و فیبروبلاست در جدول شماره ۱ نشان داده شده است. کم ترین مقدار IC50 مربوط به رده سلولی MCF-7 و بیش ترین مقدار مربوط به سلول های فیبروبلاست بود.

جدول شماره ۱: مقادیر IC50 عصاره هیدروالکلی اسپیرولینا بر حسب میکروگرم/میلی لیتر برای سلول های MCF-7، LNCaP و فیبروبلاست بعد از ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت تیمار

	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت	۹۶ ساعت
MCF-7	54.23 ± 2.88	6.15 ± 0.19	1.05 ± 0.19	0.88 ± 0.04
LNCaP	67.13 ± 3.10	11.75 ± 0.54	3.45 ± 0.33	0.90 ± 0.03
فیبروبلاست	3421.97 ± 97.56	100.45 ± 1.83	24.86 ± 1.41	12.75 ± 0.79



تصویر شماره ۳: اثر عصاره هیدروالکلی اسپیرولینا بر بیان ژن مرتبط با مسیر آپوپتوز در سلول های MCF-7 و LNCaP بیان ژن توسط روش Real-time PCR سنجیده شد. داده ها میانگین $\pm$ S.E.M از سه مقادیر از سه آزمایش مستقل و به عنوان درصد نسبت به مقادیر کنترل بیان می شود. ***: نشان دهنده $P < 0.001$ در مقایسه با کنترل

تصویر شماره ۲: اثر عصاره هیدروالکلی اسپیرولینا بر آپوپتوز سلول های MCF-7 و LNCaP آپوپتوز با روش رنگ آمیزی دی فیل آمین سنجیده شد. داده ها میانگین $\pm$ S.E.M از سه آزمایش مستقل و به عنوان درصد نسبت به مقادیر کنترل بیان می شود. ***: نشان دهنده $P < 0.001$ در مقایسه با کنترل

بحث

در این مطالعه خواص ضد سرطان اسپیرولینا بررسی شد. غلظت های مختلف اسپیرولینا پس از ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت، زنده ماندن سلولی را به روشی وابسته به غلظت در سلول های MCF-7، LNCaP و فیروبلاست کاهش داد. در مرحله بعد IC_{50} برای هر رده سلولی محاسبه شد. این مقادیر نشان دهنده این موضوع است که سلول های سرطان پستان بیش ترین حساسیت را به اثرات سمی نشان دادند و حساسیت سلول های سرطان پروستات کم تر از سرطان پستان بود. مقدار IC_{50} خیلی بالا سلول های نرمال فیروبلاست نشان دهنده اثرات سمی بسیار خفیف برای سلول های غیر سرطانی می باشد.

اثر عصاره هیدروالکلی اسپیرولینا بر بیان ژن های مرتبط با آپوپتوز بیان برخی از ژن های دخیل در آپوپتوز ($p38$, $ASK1$, Fas و $FasL$) مورد سنجش قرار گرفتند. پس از ۲۴ ساعت تیمار با غلظت IC_{50} ، اسپیرولینا افزایش معنی دار در بیان ژن های مورد سنجش در هر دو رده سلولی سرطانی مشاهده شد ($P < 0.05$) (تصویر شماره ۳). این افزایش به میزان $1/89$ ، $1/85$ ، $1/97$ و $2/11$ برابر در رده سلولی MCF-7 و $1/96$ ، $1/76$ ، $2/2$ و $2/18$ برابر در رده سلولی LNCaP به ترتیب برای ژن های Fas ، $FasL$ ، $p38$ و $ASK1$ بود.

اثر عصاره هیدروالکلی اسپیرولینا بر تولید نیتریک اکساید هم چنین تولید نیتریک اکساید مورد سنجش قرار گرفتند. پس از ۲۴ ساعت تیمار با غلظت IC_{50} ، کاهش معنی دار میزان نیتریک اکساید در هر دو رده سلولی سرطانی مشاهده شد ($P < 0.05$) (تصویر شماره ۴).

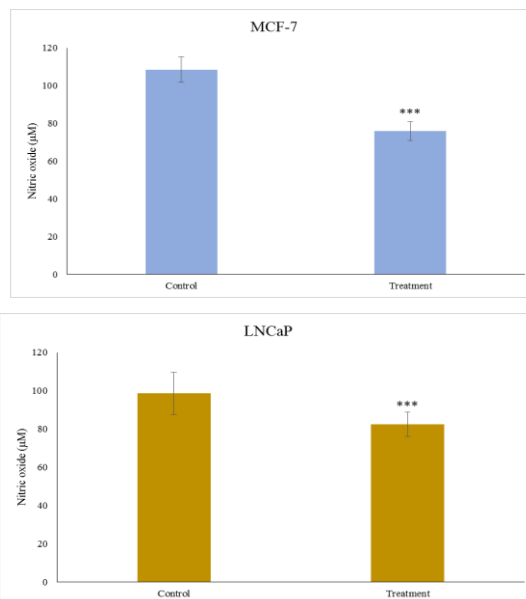
هم چنین خواص ضد سرطان C-Phycocyanin، یک ماده طبیعی دریایی خالص شده از اسپرولینا مورد بررسی قرار گرفته است. مطالعه نشان داد که C-phycocyanin از تکثیر سلولی جلوگیری می کند و توانایی تشکیل کلونی سلول های MDA-MB-231 را کاهش می دهد (۹). نتایج این مطالعه تایید کننده مطالعه حاضر می باشد.

بررسی اثر غلظت IC50 اسپرولینا بر آپوپتوز نشان داد که پس از ۲۴ ساعت، آپوپتوز را به صورت معنی داری در هر دو رده سلول سرطانی افزایش داد ($P < 0.05$). مطالعه قبلی نیز نشان داد C-phycocyanin باعث توقف چرخه سلولی G0/G1 با کاهش سطح بیان پروتئین Cyclin D1 و CDK-2 و افزایش سطح بیان پروتئین p21 و p27 شد. علاوه بر این، C-phycocyanin با فعال کردن مسیر گیرنده مرگ سطح غشای سلولی باعث آپوپتوز سلولی شد (۹). نتایج این مطالعه تایید کننده مطالعه حاضر می باشد.

سپس بیان برخی از ژن های دخیل در آپوپتوز مورد سنجش قرار گرفتند. پس از ۲۴ ساعت تیمار با غلظت IC50، اسپرولینا افزایش معنی دار در بیان ژن های *Fas*، *p38*، *ASK1* و *FasL* در هر دو رده سلولی سرطانی مشاهده شد ($P < 0.05$).

مطالعات قبلی نشان داده است که فیکوسیانین PC بیان پروتئین CD59 و پروتئین *Fas* القا کننده آپوپتوز را افزایش می دهد و فعالیت تکثیر سلول های *Hela* کاهش یافت، در حالی که PC بر بیان پروتئین CD59 و *Fas* و تولید مثل سلول های غیر سرطانی طبیعی هیچ تاثیری نداشت (۸). نتایج این مطالعه تایید کننده مطالعه حاضر می باشد.

نشان داده شده است که مرگ سلولی ناشی از C-phycocyanin از طریق مسیرهای سیگنالینگ MAPK انجام شده است. C-Phycocyanin قادر به القای آپوپتوز سلولی MDA-MB-231 با فعال کردن مسیرهای سیگنالینگ MAPK *p38* و JNK بود و در عین حال مسیر ERK را مهار می کرد و این نتایج همسو با نتایج مطالعه حاضر می باشد (۹).



تصویر شماره ۴: اثر عصاره هیدروالکلی اسپرولینا بر تولید نیتریک اکساید در سلول های MCF-7 و LNCaP بیان ژن توسط روش Real-time PCR سنجیده شد. داده ها میانگین $\pm$ S.E.M مقادیر از سه آزمایش مستقل و به عنوان درصد نسبت به مقادیر کنترل بیان می شود. ***: نشان دهنده ($P < 0.001$) در مقایسه با کنترل

کشف عوامل موثر جدید برای درمان سرطان یکی از موضوعات جالب و چالش برانگیز در صنعت داروسازی است. اکثر عوامل شیمی درمانی عوارض جانبی جدی مانند سرکوب مغز استخوان ایجاد می کنند (۱۵). از این رو، توسعه یک عامل ضد سرطان جدید با عوارض جانبی کم تر، یک چالش بزرگ در درمان سرطان است.

اثر ضد سرطانی اسپرولینا در مطالعات قبلی نیز بررسی شده است. در یک مطالعه مکانیزم ضد سرطان فیکوسیانین (PC) از اسپرولینا بررسی شده است. PC با کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون هیدروکسیل آپاتیت خالص شد. در این مطالعه تأثیر PC بر تکثیر سلول های *Hela* (سرطان سرویکس) با روش MTT و بیان پروتئین *Fas* به روش ایمونوهیستوشیمی تعیین شد. نتایج نشان داد که PC می تواند بیان پروتئین CD59 را در سلول های *Hela* تقویت کند و از تکثیر سلول های *Hela* جلوگیری کند (۸). نتایج این مطالعه تایید کننده مطالعه حاضر می باشد.

در شرایط پاتولوژیک، به ویژه سرطان، سلول‌ها توانایی خود را برای آپوپتوز از دست می‌دهند که منجر به تکثیر کنترل نشده می‌شود، بنابراین القای آپوپتوز می‌تواند راهبردی مطلوب در برابر سرطان باشد (۱۶). القای آپوپتوز یکی از مهم‌ترین نشانگرهای عوامل ضد تومور سیتوتوکسیک است. برخی از ترکیبات طبیعی باعث ایجاد مسیرهای آپوپتوز می‌شوند که از طریق مکانیسم‌های مختلف در سلول‌های سرطانی مسدود می‌شوند. نظرسنجی‌های متعدد گزارش کردند که افراد مبتلا به سرطان معمولاً از گیاهان یا محصولات گیاهی استفاده می‌کنند. آلکالوئیدهای Vinca، Texans، Camptothecins، Podo phyllotoxin از نظر بالینی به عنوان عوامل ضد سرطان مشتق شده از گیاه استفاده می‌شود. ترکیبات فنلی رژیم غذایی انسان شامل مجموعه‌ای از پلی‌فنول‌های گیاهی است. مطالعات نشان داده است که این فنل‌ها اثرات سیتوتوکسیک بر تومورهای مختلف دارند. مکانیسم این ترکیبات از طریق آپوپتوز انجام می‌شود. کورکومین (دیفرولیل متان) یک ترکیب فنلی است که از ریزوم گونه کورکوما به دست می‌آید. با استفاده از کورکومین، تحقیقات پیش از بالینی سرطان نشان داده است که این گیاه در اکثر سرطان‌ها از جمله کولورکتال، لوزالمعده، معده و پروستات، روند سرطان‌زایی را مهار می‌کند. هم‌چنین در مراحل مختلف سرطان زاء، تکثیر، رگرایی و متاستاز موثر است. علاوه بر این، کورکومین به عنوان یک حساس‌کننده شیمیایی عمل می‌کند و منجر به افزایش فعالیت سایر عوامل ضد سرطانی در درمان سرطان‌های مقاوم به چند دارو و مقاوم به شیمی‌درمانی می‌شود. از این رو، کورکومین از طریق مسدود کردن مسیر سیگنالینگ NF- κ B پاسخ سلول‌های تومور به دوکسوروبیسین را افزایش می‌دهد. مطالعات کارآزمایی بالینی فاز دوم نشان داده‌اند که کورکومین با دوز ۸۰۰۰ میلی‌گرم در روز برای انسان سمی نیست. Ginger یک ترکیب فنلی است که از ریزوم آن در طب سنتی استفاده

زیادی می‌شود. ترکیبات فنلی این گیاه از طریق آپوپتوز در سلول‌های سرطانی فعالیت سیتوتوکسیک نشان می‌دهد. رسوراترول یک فیتوالکسین است که در انگور یافت می‌شود. نشان داده شد که رسوراترول باعث آپوپتوز در سلول‌های HL60 و T47D (سلول‌های سرطان پستان) می‌شود. این ماده آپوپتوز را از طریق آپوپتوز وابسته به سیگنال CD95 در سلول‌های HL60 و T47D القا می‌کند. علاوه بر این، نشان داده شد که چنین کمپلکسی بیان CD95L را در سلول‌های HL60 و T47D افزایش می‌دهد. فلاونوئید مطالعات اولیه نشان داد که پلی‌هیدروکسی فنل‌ها مانند فلاونوئیدها باعث بروز کم سرطان کولون و سینه می‌شوند. جنستین یک فیتواسترول متعلق به خانواده فلاونوئیدها است. القای آپوپتوز توسط جنستین در سلول‌های لوسمی HL-60 پرومیلوسیتی انسانی با استفاده از آنالیز فلوسایتمتری تایید شده است. Biocalein یک فلاونوئید موجود در داروهای گیاهی شو-سایکو-تواست که باعث القای آپوپتوز در رده‌های سلولی کارسینوم سلولی کبدی (HCC) می‌شود. از طریق مهار توپوایزومراز II عمل می‌کند. کوئرسیتین توسط کورسیتین تحریک شده از طریق آزادسازی سیتوکروم-c به سیتوزول و فعال شدن کاسپاز ۹/۲۰ آپوپتوز را القا می‌کند. (-UCN 01) 7-hydroxystaurosporine Alkaloids یک آلکالوئید است که اثرات سیتوتوکسیک سمیت سلولی سیس-دیامین دی‌کلروپلاتین II و آپوپتوز را در سلول‌های سرطانی تخمدان افزایش می‌دهد. علاوه بر این، UCN-01 با ۵-فلوراسیل اثر هم‌افزایی بر روی تولید آپوپتوز دارد. Sugiyama و همکاران (۱۷) نشان دادند که القای آپوپتوز و مهار چرخه سلولی در فازهای G1 مهم‌ترین عامل تعیین‌کننده حساسیت سلول‌های سرطانی به UCN-01 است و کاهش در سطح بیان چرخه نقش مهمی در ممانعت از چرخه سلولی در فاز G1 توسط UCN دارد. لکترین‌ها برای چندین سال، Viscum album L (VAL) در درمان کمکی سرطان

استفاده شده است. VAL سیستم ایمنی را تحریک می کند و به طور خاص فعالیت و تعداد سلول های NK و نوتروفیل ها را افزایش می دهد. در مطالعه دیگری، لکترین سیتوتوکسیک (KML-C) جدا شده از عصاره دارو اش کره ای (Viscum album C (coloratum اثرات سیتوتوکسیک و آپوپتوز را بر سلول های تومور نشان داد (۱۸). Terpenoids Xanthorrhizol یک کمپلکس ترپوئیدی سسکی است که از ریزوم (zingiberaceae) curcuma xanthorrhizza Roxb مشتق شده است. مطالعات مختلف in vivo نشان داده است که Xanthorrhizol از تشکیل و توسعه تومورها جلوگیری می کند. بیان پروتئین اورنیتین دکربوکسیلاز، سیکلو اکسژناز-۲ (cox-2) را کاهش می دهد و فعالیت سیگنالینگ NF-KB را سرکوب می کند. علاوه بر این، نشان داده شد که Xanthorrhizol از طریق کاهش cox-2 و ماتریکس متالوپپتیداز ۹ (MMP-9) در مدل متاستاز ریه موش in vivo، فعالیت متاستاتیکی را اعمال می کند (۱۹).

مسیر سیگنالینگ p38 mitogen- (MAPK) activated protein kinase را می توان با انواع محرک ها فعال کرد. تنظیم و نقش این مسیر در آپوپتوز ناشی از گیرنده مرگ نامشخص است و ممکن است به گیرنده مرگ خاص و نوع سلول بستگی داشته باشد. نشان داده شده است که اتصال لیگاند Fas به Fas، MAPK p38 را در سلول ها فعال می کند و فعال سازی این مسیر برای مرگ سلول ها با واسطه Fas لازم است. فعال p38 MAPK Bcl-xL و Bcl-2 را فسفریله می کند و از تجمع این مولکول های ضد آپوپتوز در داخل میتو کندری جلوگیری می کند. در نتیجه، از دست دادن پتانسیل غشای میتو کندری و آزاد شدن سیتوکروم c منجر به فعال شدن کاسپاز ۹ و متعاقباً کاسپاز ۳ می شود. بنابراین، فعال شدن MAPK p38 یک پیوند مهم بین Fas و مسیر مرگ میتو کندری برای القا آپوپتوز سلول ها است (۲۰).

هم چنین نتایج این مطالعه نشان داد که اسپیرولینا دارای اثرات مهار بر تولید نیتریک اکساید در سلول های سرطان پستان و پروستات بود. یافته های متناقض قابل توجهی در مقالات در مورد اثرات دو وجهی نیتریک اکساید در سرطان زایی و پیشرفت تومور وجود دارد که پیامدهای مهمی برای درمان دارد. چندین مطالعه پیش بالینی و بالینی نشان داده اند که اثرات جانبی و ضد توموری نیتریک اکساید به جنبه های مختلفی از جمله، سطح تولید، محیط اکسیداتیو/کاهشی (اکسیداتیو/کاهشی) که در آن این رادیکال در آن قرار می گیرد، وجود یا عدم وجود عناصر انتقال نیتریک اکساید و ریز محیط تومور بستگی دارد (۲۱). به طور کلی، چهار دسته اصلی از درمان های ضد سرطان مبتنی بر نیتریک اکساید وجود دارد. این چهار دسته شامل، اهدا کنندگان نیتریک اکساید، مهار کننده های فسفودی استراز (PDE-i) (Phosphodiesterase Inhibitors)، فعال کننده های محلول گوانیل سیکلاز (sGC) (Guanylyl Cyclase) و تعدیل کننده های ایمنی می باشد (۲۱).

سرکوب بیان FasL توسط تعدادی از عوامل از جمله نیتریک اکساید نشان داده شده است. نیتریک اکساید بیان FasL و آپوپتوز را با تداخل در توانایی AP-1 برای القای بیان FasL مهار می کند (۲۲). احتمالاً عصاره هیدروالکلی اسپیرولینا از طریق کاهش غلظت نیتریک اکساید داخل سلولی باعث افزایش بیان FasL و القا مسیر Fas/FasL-ASK1-p38 می شود.

از جمله محدودیت های اصلی این مطالعه عدم جداسازی اجزای تشکیل دهنده عصاره هیدروالکلی اسپیرولینا به منظور یافتن جز یا اجزای مسئول خواص ضد سرطانی و القا کننده آپوپتوز این عصاره می باشد که برای مطالعات آینده پیشنهاد می شود.

اسپیرولینا دارای اثرات ضد تکثیری بر سلول های سرطان پستان و پروستات است و باعث القا آپوپتوز از طریق کاهش سطح نیتریک اکساید درون سلولی و فعال سازی مسیر Fas/FasL-ASK1-p38 می شود.

سپاسگزاری

پژوهش فوق حاصل طرح تحقیقاتی مصوب دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه با کد ۴۰۳۰۰۸۱ است که در دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه انجام گرفته است. دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه حامی

مالی این مقاله می باشد. هیچ گونه تعارض منافع بین نویسندگان وجود ندارد. نویسندگان این مقاله نهایت تشکر و قدردانی خود را از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه اعلام می دارند.

References

1. Anand P, Kunnumakkara AB, Sundaram C, Harikumar KB, Tharakan ST, Lai OS, et al. Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. *Pharm Res* 2008; 25(9): 2097-2116. PMID: 18626751.
2. Kushi LH, Doyle C, McCullough M, Rock CL, Demark-Wahnefried W, Bandera EV, et al. American Cancer Society Guidelines on nutrition and physical activity for cancer prevention: reducing the risk of cancer with healthy food choices and physical activity. *CA Cancer J Clin* 2012; 62(1): 30-67. PMID: 22237782.
3. Rawla P. Epidemiology of Prostate Cancer. *World J Oncol* 2019; 10(2): 63-89. PMID: 31068988.
4. Łukasiewicz S, Czezelewski M, Forma A, Baj J, Sitarz R, Stanisławek A. Breast Cancer-Epidemiology, Risk Factors, Classification, Prognostic Markers, and Current Treatment Strategies-An Updated Review. *Cancers (Basel)* 2021; 13(17): 4287. PMID: 34503097.
5. Tobiume K, Matsuzawa A, Takahashi T, Nishitoh H, Morita K, Takeda K, et al. ASK1 is required for sustained activations of JNK/p38 MAP kinases and apoptosis. *EMBO Rep* 2001; 2(3): 222-228. PMID: 11266364.
6. Hosseini S, Shahbazizadeh S, Khosravi-Darani K, Mozafari M. *Spirulina paltensis*: food and function. *Curr Nutr Food Sci* 2013; 9: 189-193.
7. Parvin M, Habib MA, Huntington T, Hasan M. A review on culture, production and use of *Spirulina* as food for humans and feeds for domestic animals and fish. *Aquaculture* 2008; 33: 1-33.
8. Li B, Zhang X, Gao M, Chu X. Effects of CD59 on antitumoral activities of phycocyanin from *Spirulina platensis*. *Biomed Pharmacother* 2005; 59: 551-560. PMID: 16271846.
9. Jiang L, Wang Y, Liu G, Liu H, Zhu F, Ji H, et al. C-Phycocyanin exerts anticancer effects via the MAPK signaling pathway in MDA-MB-231 cells. *Cancer Cell Int* 2018; 18: 12. PMID: 29416441.
10. Jiang L, Wang Y, Yin Q, Liu G, Liu H, Huang Y, et al. Phycocyanin: a potential drug for cancer treatment. *J Cancer* 2017; 8: 3416-3429. PMID: 29151925.
11. Small E. *Spirulina* - food for the universe. *Biodiversity* 2011; 12: 255-265.
12. Lu J, Ren DF, Xue YL, Sawano Y, Miyakawa T, Tanokura M. Isolation of an antihypertensive peptide from alcalase digest of *spirulina platensis*. *J Agric Food Chem* 2010; 58: 7166-7171. PMID: 20509691.
13. Khazaei M, Pazhouhi M, Khazaei S. Temozolomide and tranilast synergistic antiproliferative effect on human

- glioblastoma multiforme cell line (U87MG). *Med J Islam Repub Iran* 2019; 33: 39. PMID: 31456963.
14. Abdolmaleki A, Pazhouhi M, Rashidi I, Heshmati S, Jalili C, Khani-Hematabadi F. Molecular Basis of Apoptosis Induced by Taraxasterol on Human Melanoma Cell Line Growth Inhibition: An in-Vitro Study. *J Adv Med Biomed Res* 2024; 32(153): 288-298.
 15. Pan Y, Ma S, Cao K, Zhou S, Zhao A, Li M, et al. Therapeutic approaches targeting cancer stem cells. *J Cancer Res Ther* 2018; 14(7): 1469-1475. PMID: 30589025.
 16. Mohammad RM, Muqbil I, Lowe L, Yedjou C, Hsu HY, Lin LT, et al. Broad targeting of resistance to apoptosis in cancer. *Semin Cancer Biol* 2015; 35: S78-S103. PMID: 25936818.
 17. Sugiyama K, Akiyama T, Shimizu M, Tamaoki T, Courage C, Gescher A, Akinaga S. Decrease in susceptibility toward induction of apoptosis and alteration in G1 checkpoint function as determinants of resistance of human lung cancer cells against the antesignaling drug UCN-01 (7-Hydroxystaurosporine). *Cancer Res.* 1999 Sep 1;59(17):4406-12. PMID: 10485490.
 18. Yoon TJ, Yoo YC, Kang TB, Shimazaki K, Song SK, Lee KH, Kim SH, Park CH, Azuma I, Kim JB. Lectins isolated from Korean mistletoe (*Viscum album coloratum*) induce apoptosis in tumor cells. *Cancer Lett.* 1999 Feb 8;136(1):33-40. doi: 10.1016/s0304-3835(98)00300-0. PMID: 10211936.
 19. Safarzadeh E, Sandoghchian Shotorbani S, Baradaran B. Herbal medicine as inducers of apoptosis in cancer treatment. *Adv Pharm Bull* 2014; 4(Suppl 1): 421-427. PMID: 25364657.
 20. Farley N, Pedraza-Alva G, Serrano-Gomez D, Nagaleekar V, Aronshtam A, Krahl T, et al. p38 mitogen-activated protein kinase mediates the Fas-induced mitochondrial death pathway in CD8⁺ T cells. *Mol Cell Biol* 2006; 26(6): 2118-2129. PMID: 16507991.
 21. Mintz J, Vedenko A, Rosete O, Shah K, Goldstein G, Hare JM, et al. Current Advances of Nitric Oxide in Cancer and Anticancer Therapeutics. *Vaccines (Basel)* 2021; 9(2): 94. PMID: 33513777.
 22. Kavurma MM, Khachigian LM. Signaling and transcriptional control of Fas ligand gene expression. *Cell Death Differ* 2003; 10(1): 36-44. PMID: 12655294.