ORIGINAL ARTICLE

Investigating the Effects of Peiminine and Hyperthermia Therapy on the Induction of Apoptosis in MCF-7 Cell Line

Ali Miri[1,2],
Hadi Esmaeili Gouvarchinghaleh[3],
Akbar Ghorbani Alvanegh[2],
Vahid Jajarmi[4,5]

[1] PhD Student in Molecular Medicine, Student Research Committee, School of Advanced Technologies in Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[2] Human Genetics Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[3] Assistant Professor, Applied Virology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[4]Assistant Professor, Department of Medical Biotechnology, School of Advanced Technologies in Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[5] Cellular and Molecular Biology Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

(Received April 10, 2023 ; Accepted August 23, 2023)

Abstract

Background and purpose: Today, cancer is considered as the second cause of death in the world. Often, the treatment of all types of cancer is very complicated. The discovery of new anti-cancer drugs with high effectiveness, low toxicity, the ability to select normal cells from cancerous cells, and low cost is one of the concerns of the world's pharmaceutical communities. Nowadays, the use of natural compounds based on their synergistic effects has opened a new therapeutic horizon in the management of different types of cancers. The aim of this study was to investigate the synergistic effects of peiminine and hyperthermia therapy on the induction of apoptosis in MCF-7 cell line.

Materials and methods: In the present experimental-laboratory study, after culturing MCF-7 cells in 96-well plates, they were treated with peiminine (5.12 µg/ml for 24 h) and hyperthermia (41^{0}C for 1 h) independently and simultaneously. Then the cell viability rate, apoptosis percentage, ROS production rate, LDH release rate, and caspase 8 and 9 activity level were measured.

Results: The results of the present study showed that peiminine and hyperthermia therapy caused a significant decrease in cell viability as well as a significant increase in the percentage of apoptosis, ROS production, and LDH release compared with the control group. By measuring the activity of caspase 8 and 9, it was determined that peiminine induced apoptosis through both mitochondrial and extracellular pathways. It was also found that peiminine and hyperthermia therapy, in combination, had synergistic antiproliferative effects.

Conclusion: According to the results of the present study, it seems that peiminine, as a natural product, when used in combination with hyperthermia therapy has synergistic antiproliferative and apoptosis-inducing effects. This suggests that it can be used as a complementary method in cancer treatment.

Keywords: peiminine, hyperthermia therapy, apoptosis, lactate dehydrogenase, caspase, MCF-7 cell line

J Mazandaran Univ Med Sci 2023; 33 (225): 84-93 (Persian).

Corresponding Author: Vahid Jajarmi - School of Advanced Medical Technologies, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran. (E-mail: jajarmiv@gmail.com)

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-08-03]

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره سی و سوم شماره 225 مهر سال 1402 (93-84)

اثرات پیمینین در ترکیب با هایپرترمیاتراپی بر القای آپوپتوز در رده سلولی MCF-7

علی میری[1,2]
هادی اسمعیلی گورچین قلعه[3]
اکبر قربانی الوانق[2]
وحید جاجرمی[4,5]

چکیده

سابقه و هدف: امروزه سرطان به عنوان دومین عامل مرگ و میر در دنیا مطرح است که اغلب درمان انواع سرطان‌ها بسیار پیچیده بوده و کشف داروهای جدید ضد سرطان، با اثربخشی بالا، سمیت کم، قدرت انتخاب سلول طبیعی از سرطانی و هزینه پایین از دغدغه‌های جوامع دارویی دنیا است. در این بین کاربرد ترکیبات طبیعی با تکیه بر اثرات هم افزایی آن‌ها افق درمانی جدیدی را در مدیریت انواع سرطان‌ها باز کرده است. هدف از مطالعه حاضر بررسی اثرات پیمینین در ترکیب با هایپرترمیاتراپی بر القای آپوپتوز در رده سلولی MCF-7 می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در مطالعه تجربی-آزمایشگاهی حاضر بعد از کشت سلول‌های MCF-7 در پلیت 96 خانه اقدام به تیمار آن‌ها با پیمینین (5/12 µg/ml به مدت 24 ساعت) و هایپرترمیا تراپی (41 ^{0}C به‌مدت 1 ساعت) به‌صورت مستقل و همزمان شد. سپس میزان زنده مانی، درصد آپوپتوز، میزان تولید رادیکال آزاد اکسیژن، میزان آزادسازی لاکتات دهیدروژناز و سطح فعالیت کاسپاز 8 و 9 سنجیده شد.

یافته‌ها: نتایج مطالعه حاضر نشان داد که پیمینین و هایپرترمیاتراپی موجب کاهش معنی‌دار زنده مانی، افزایش درصد آپوپتوز، افزایش میزان تولید رادیکال آزاد اکسیژن و آزادسازی لاکتات دهیدروژناز در مقایسه با گروه کنترل می‌شود. با اندازه‌گیری میزان فعالیت کاسپاز 8 و 9 مشخص شد پیمینین از طریق هر دو مسیر میتوکندریایی و خارج سلولی موجب القای آپوپتوز می‌شود. هم‌چنین مشخص شد که پیمینین و هایپرترمیاتراپی در ترکیب با هم دارای اثرات هم افزایی ضدتکثیری می‌باشند.

استنتاج: باتوجه به نتایج مطالعه حاضر به‌نظر می‌رسد پیمینین به‌عنوان یک محصول طبیعی در ترکیب با هایپرترمیاتراپی دارای اثرات سینرژیستیک ضد تکثیری و القاکننده آپوپتوزی می‌باشد که می‌تواند به‌عنوان یک روش مکمل در درمان سرطان پستان مورد توجه قرار گیرد.

واژه های کلیدی: پیمینین، هایپرترمیاتراپی، آپوپتوز، لاکتات دهیدروژناز، کاسپاز، رده سلولی MCF-7

مقدمه

در سال‌های اخیر با توجه به تغییر سبک زندگی، کنترل نسبی بیماری‌های واگیر، افزایش عوامل خطر محیطی و مسن شدن جمعیت شیوع انواع سرطان‌ها با سرعت غیرقابل کنترلی در حال افزایش است(1). سرطان دومین

مولف مسئول: وحید جاجرمی - تهران: دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دانشکده فناوری‌های پیشرفته پزشکی E-mail: jajarmiv@gmail.com
1. دانشجوی دکتری پزشکی مولکولی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده فناوری‌های پیشرفته پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
2. مرکز تحقیقات ژنتیک انسانی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله عج، تهران، ایران
3. استادیار، مرکز تحقیقات ویروس شناسی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله عج، تهران، ایران
4. استادیار، گروه بیوتکنولوژی پزشکی، دانشکده فناوری‌های پیشرفته پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
5. مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
تاریخ دریافت : 1402/1/21 تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : 1402/2/10 تاریخ تصویب : 1402/5/22

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-08-03]

عامل شایع مرگ و میر در کشورهای توسعه یافته و سومین عامل مرگ در کشورهای در حال توسعه است. افزایش شیوع این بیماری غیر واگیردار در سال‌های اخیر و اثرات مستقیم و غیرمستقیم آن بر ابعاد مختلف جسمی- روانی و اجتماعی زندگی بشر سبب شده است که سرطان به‌عنوان مشکل عمده بهداشتی قرن شناخته شود(2). طبق مطالعات مختلف سالانه بیش از 7 میلیون نفر در جهان در اثر ابتلا به سرطان جان خود را از دست می‌دهند. در این بین سرطان پستان شایع‌ترین نوع سرطان بوده و بر اساس گزارشات سالانه در جهان بیش از 1/1 میلیون موارد جدید سرطان پستان شناسایی می‌شود(3).

روش‌های معمول درمان سرطان شامل جراحی، پرتو درمانی، شیمی درمانی و سایر روش‌های درمانی اغلب موجب کوچک کردن سرطان یا متوقف کردن پیشرفت سرطان می‌شوند. اغلب درمان‌های متداول سرطان، دارای عوارض جانبی جدی بوده و در بهترین حالت، تنها چند سال برطول عمر بیمار می‌افزایند و اغلب به‌صورت غیر انتخابی موجب از بین رفتن سلول‌های طبیعی و از دست رفتن کارآیی آن‌ها نیز می‌شوند(4). محققان ثابت کرده‌اند درمان سرطان با تکیه بر ترکیبات طبیعی به‌صورت مکمل درمانی، می‌تواند در کنترل سرطان و کاهش مقدار مصرف دارو سودمند واقع شود(5).

پیمینین یک ترکیب طبیعی و فعال زیستی (آلکالوئید) است که از پیاز گیاه لاله واژگون به دست می‌آید. مطالعات مختلف ثابت کرده‌اند که پیمینین خواص ضد توموری قوی در برابر سرطان‌های متعدد دارد و در طب چینی در درمان بیماری‌های مختلف کاربرد دارد(6). پیمینین موجب سرکوب رشد سلول‌های سرطانی کولورکتال با القای مرگ سلولی اتوفاژی می‌شود(7). هم‌چنین موجب افزایش حساسیت سلول‌های سرطانی معده مقاوم به درمان، به داروی شیمی درمانی می‌شود(8).

هایپرترمیا تراپی بافت توموری باعث افزایش حساسیت آن بافت نسبت به داروهای شیمی درمانی و رادیوتراپی شده ولی اثری بر تغییر سمیت دارو بر روی بافت طبیعی ندارد(9). مقاومت بافت‌های طبیعی نسبت به افزایش حساسیت نسبت به هایپرترمیاتراپی ناشی از سیستم دفاعی ذاتی سلول‌های طبیعی است که اغلب در سلول‌های سرطانی دچار جهش شده است(10). محققان ثابت کرده‌اند تیمار سلول‌های سرطانی به کمک حرارت دادن با چند درجه بالاتر از دمای فیزیولوژیک بدن موجب از بین رفتن سلول‌های سرطانی و افزایش اثرگذاری سایر روش‌های درمانی معمولی از قبیل رادیوتراپی و شیمی درمانی می‌شود(11). مطالعات میکروسکوپی نشان داده‌اند که هایپرترمیاتراپی موجب کاهش پایداری غشای سیتوپلاسمی و ایجاد تغییرات اساسی در اسکلت سلولی،کاتابولیسم و آنابولیسم سلولی، ماتریکس هسته ای، تولید پروتئین‌های شوک حرارتی، بیان فاکتور رونویسی و تغییر در سرعت سنتز DNA و RNA می‌شود(12).

یکی از مکانیسم‌های اساسی در کنترل رشد سلول‌های سرطانی القای مرگ برنامه ریزی شده سلولی به کمک عوامل سیتوتوکسیک از طریق مسیرهای داخل و خارج سلولی می‌باشد. گیرنده‌های مسیرهای القا کننده آپوپتوز باعث اختلال در عملکرد میتوکندری و فعال شدن کاسپازها می‌شوند. در طی فرآیند آپوپتوز، کاسپازها در سلول‌های متعدد فعال می‌شوند و نقش مهمی در شروع و انجام آپوپتوز دارند(13). به‌طور کلی دو مسیر اصلی القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی شامل مسیر داخل سلولی یا میتوکندریایی و مسیرخارج سلولی شناخته شده است که در مطالعات آزمایشگاهی با سنجش میزان کاسپاز 8 (شروع کننده مسیر خارج سلولی) و کاسپاز 9 (شروع کننده مسیر میتوکندریایی) مسیر القای آپوپتوز توسط عوامل سایتوتوکسیک مشخص می‌شود(14).

با توجه به مطالب مذکور هدف از مطالعه حاضر بررسی اثرات هم افزایی پیمینین و هایپرترمیاتراپی بر القای آپوپتوز در رده سلولی MCF-7 می‌باشد.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-08-03]

مواد و روش‌ها:

مواد شیمیایی

برای اجرای مطالعه تجربی-آزمایشگاهی حاضر، پیمینین (Pure-one Bio Technology, CO., LTD) با خلوص 99/8درصد، آکریدین اورنج/ پروپیدیوم، کیت LDH ، کیت سنجش کاسپاز 8 و 9 (CUSABIO-China) از شرکت فارمد آیتک دارو، کیت کمی ROS، محیط کشت RPMI-1640، پودر MTT (3-[۴،۵-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide)، دی‌متیل سولفوکسید (DMSO) از کالا زیست خریداری شد.

آماده سازی پیمینین

5/12 µg میکروگرم از پیمینین (Pure-one Bio Technology, CO., LTD) با خلوص 99/8 درصد در یک میلی‌لیتر آب تزریقی حل شده و 50 میکرولیتر از آن برای تیمار سلول‌های MCF-7 استفاده شد(8).

هایپرترمیا

جهت بررسی تاثیر هایپرترمیا، سلول‌های MCF-7 داخل انکوباتور به‌مدت 1 ساعت در دمای 41 درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند(15).

کشت سلول‌های MCF-7 و طراحی مطالعه

سلول‌های MCF-7 (موسسه پاستور-ایران) در محیط کشت RPMI-1640 حاوی 10 درصد FBS در پلیت 96 خانه در دمای 37 درجه سانتی‌گراد در محیط مرطوب شده حاوی 5 درصد CO2 به مدت 24 ساعت انکوبه شدند. سپس سلول‌ها طبق جدول زیر تیمار شدند (جدول شماره 1).

جدول شماره 1: مشخصات گروه های مورد مطالعه

شماره گروه	مشخصات
گروه اول (کنترل)	10^4 سلول MCF-7 در هر چاهک پلیت 96 خانه‌بدون تیمار
گروه دوم (پیمینین)	10^4 سلول MCF-7 در هر چاهک پلیت 96 خانه به همراه 50 µl از محلول پیمینین 5/12 µg/ml (8)
گروه سوم (هایپرترمیاتراپی)	10^4 سلول MCF-7 در هر چاهک پلیت 96 خانه به همراه 1 ساعت حرارت $41\ ^0C$
گروه چهارم (ترکیبی)	10^4 سلول MCF-7 در هر چاهک پلیت 96 خانه به همراه پیمینین و هایپرترمیاتراپی
گروه پنجم (دکسوروبیسین)	10^4 سلول MCF-7 در هر چاهک پلیت 96 خانه به همراه 50 µl از محلول 4 µM دکسوروبیسین (16)

تعیین زنده مانی سلول‌های MCF-7

طبق مطالعه اسمعیلی و همکاران (2019)(15)، بعد از گذشت 48 ساعت از تیمار سلول‌های سرطانی در گروه‌های مختلف، مقدار 20 µl از محلول MTT (5 mg/ml در PBS) به تمامی چاهک‌های پلیت 96 خانه اضافه شد و به مدت 4 ساعت در انکوباتور CO2 دار و دمای $37\ ^0C$ انکوبه شدند. سپس به منظور محلول شدن کریستال‌های بنفش فورمازان، 100 µl DMSO به تمامی چاهک‌ها اضافه شد و به‌مدت 20 دقیقه در انکوباتور CO2 دار و دمای $37\ ^0C$ انکوبه شد. میزان جذب نوری چاهک‌ها به کمک دستگاه الایزا ریدر و در طول موج 550 nm خوانده شد.

تعیین درصد آپوپتوز سلول‌های MCF-7

به منظور تعیین درصد آپوپتوز سلول‌های سرطانی از رنگ‌آمیزی آکریدین اورنج و پروپیدیوم یدید و میکروسکوپ فلورسنت طبق مطالعه اسمعیلی و همکاران (2019)(15) استفاده شد. به‌طور خلاصه، سلول‌های تیمار شده در گروه‌های مختلف به نسبت مساوی با 10 µl از آکریدین اورنج و 10 µl از پروپیدیوم یدید رنگ‌آمیزی شده و زیر میکروسکوپ فلورسنت با شمارش 5 میدان میکروسکوپی درصد سلول‌های آپوپتوز شده محاسبه شد. بدین صورت که سلول‌های سبز رنگ و نارنجی رنگ به‌ترتیب مشخصه سلول‌های سالم و آپوپتوزی بود.

تعیین میزان تولید ROS توسط سلول‌های MCF-7

میزان تولید ROS درون سلولی با استفاده از روش میکروپلیت- فلوریمتری طبق دستورالعمل سازنده (کیازیست، ایران) اندازه‌گیری شد. به‌طور خلاصه، 25×10^3 سلول در یک پلیت سیاه 96 چاهکی در هر چاهک توزیع شد. پس از 24 ساعت، سلول‌ها با غلظت‌های در نظر گرفته شده از گروه‌های موردنظر تیمار شدند. پس از 48 ساعت انکوباسیون،

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-08-03]

محیط رویی خارج و 100 میکرولیتر معرف DCFDA (dichlorodihydrofluorescein diacetate) به هر چاهک اضافه شد و در دمای 37 درجه سانتی‌گراد به مدت 45 دقیقه انکوبه شد. در نهایت، فلورسانس با تحریک و انتشار در Ex/Em=485/528 نانومتر با استفاده از یک میکروپلیت خوان فلورسانس ارزیابی شد.

تعیین میزان آزادسازی LDH توسط سلول‌های MCF-7

لاکتات دهیدروژناز آنزیمی است که به‌طور گسترده در سیتوزول وجود دارد که لاکتات را به پیروات تبدیل می‌کند. هنگامی که یکپارچگی غشای پلاسمایی از بین می‌رود، لاکتات دهیدروژناز به محیط کشت آزاد شده و سطح خارج سلولی آن افزایش می‌یابد. میزان آزاد سازی لاکتات دهیدروژناز طبق مطالعه اسمعیلی و همکاران (2019)(15) سنجیده شد. مایع رویی سلول‌های گروه‌های مختلف بعد از 48 ساعت جمع‌آوری شد و با محلول‌های موجود در کیت تجاری مخلوط و انکوبه شد. سپس میزان جذب نوری در طول موج 492 nm خوانده شد.

تعیین فعالیت کاسپاز 8 و 9

غلظت پروتئین کاسپاز 8 و 9 توسط کیت الایزای تجاری در سلول‌های گروه‌های مختلف طبق مطالعه اسمعیلی و همکاران (2019)(15) و دستورالعمل شرکت سازنده کیت سنجیده شد.

آنالیز آماری

داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS آنالیز شد. اطلاعات به‌صورت میانگین ± انحراف معیار بیان شد. بعد از اطمینان از نرمال بودن توزیع متغیرهای کمی با استفاده از آزمون کولموگروف - اسمیرنوف، برای تجزیه و تحلیل اطلاعات از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه و توکی تست استفاده شد. در تمامی ارزیابی‌ها P<0/05 به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

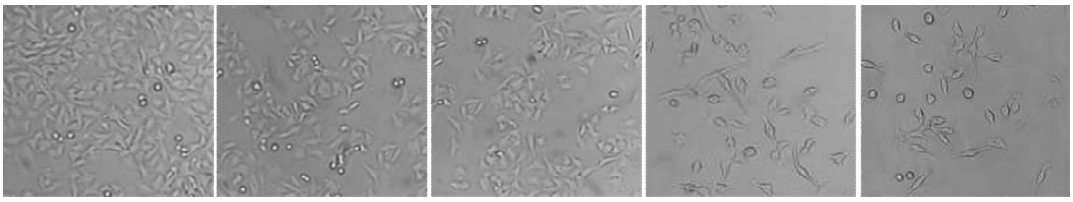
یافته‌ها

کشت سلول‌های MCF-7

همان‌طورکه در تصویر شماره 1 نشان داده شده است، سلول‌های MCF-7 در محیط RPMI-1640 و 10 درصد FBS کشت داده شدند. بعد از رسیدن به تراکم 80 درصد طراحی مطالعه انجام شد.

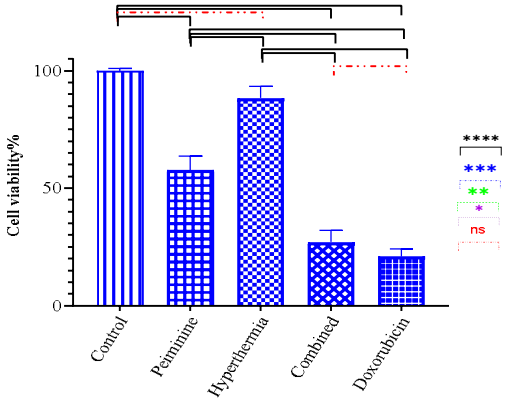
نتایج میزان زنده مانی

همان‌طورکه در نمودار شماره 1 مشاهده می‌شود میزان زنده مانی در تمامی گروه‌های مطالعه به جز هایپرترمیا کاهش معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل داشته است. بین گروه درمان ترکیبی و پیمینین ارتباط معنی‌داری وجود داشت (P<0/0001) اما بین گروه درمانی دوکسوروبیسین و گروه درمان ترکیبی ارتباط معنی داری مشاهد نشد (P>0/05). گروه دوکسوروبیسین بیش‌ترین کاهش زنده مانی را در مقایسه با گروه کنترل نشان داد (P<0/0001).



تصویر شماره 1 : سلول‌های MCF-7 با 80 درصد تراکم (بزرگ نمایی 100x).

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-08-03]



نمودار شماره 1: میزان زنده مانی سلول‌های MCF-7 بعد از تیمار در گروه‌های مختلف نشان داده شده است

* : نشان‌دهنده معنی‌داری در سطح P<0/05،

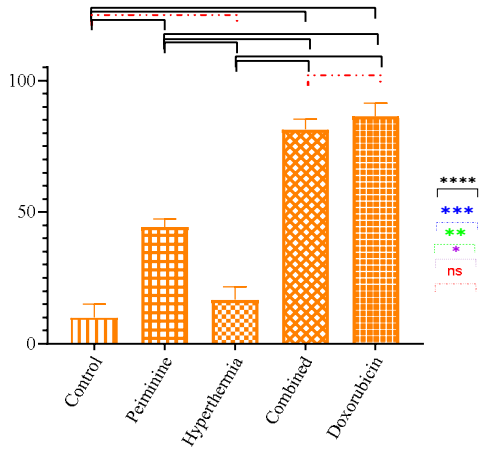
** : نشان‌دهنده معنی‌داری در سطح P<0/01،

*** : نشان‌دهنده معنی‌داری در سطح P<0/001،

**** : نشان‌دهنده معنی‌داری در سطح P<0/0001.

نتایج میزان آپوپتوز

همان‌طورکه در بخش روش مطالعه ذکر شد، جهت بررسی میزان القای آپوپتوز از رنگ‌آمیزی آکریدین اورنج و پروپیدیوم یدید و میکروسکوپ فلورسنت استفاده شد. بدین صورت که سلول‌های سبز رنگ و نارنجی رنگ به‌ترتیب مشخصه سلول‌های سالم و آپوپتوزی بود (تصویر شماره 2). نتایج حاصل از تست آپوپتوز در راستای نتایج تست MTT نشان داد که تیمار سلول‌های MCF-7 با پیمینین موجب افزایش درصد آپوپتوز سلول‌های MCF-7 در مقایسه با گروه کنترل می‌شود (P<0/0001) اما تیمار با هایپرترمیاتراپی کاهش معنی‌داری را نشان نداد(P>0/05). هم‌چنین مقایسه نتایج هرکدام از عوامل درمانی به تنهایی و ترکیب با هم نشان داد که پیمینین و هایپرترمیاتراپی دارای اثرات هم افزایی می‌باشند و بین گروه درمان ترکیبی با دکسوروبیسین اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد(P>0/05) (نمودار شماره 2).



نمودار شماره 2: درصد آپوپتوز سلول های MCF-7 بعد از تیمار در گروه های مختلف نشان داده شده است

* : نشان‌دهنده معنی‌داری در سطح P<0/05،

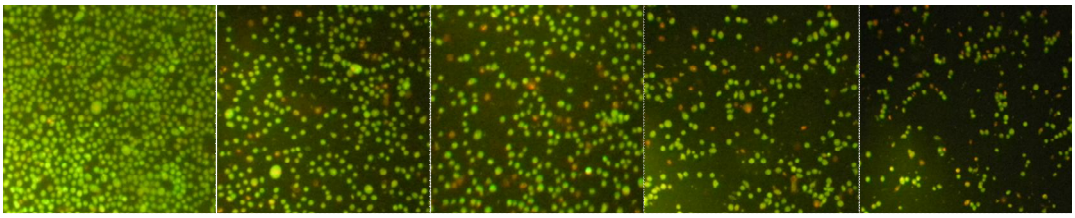
** : نشان‌دهنده معنی‌داری در سطح P<0/01،

*** : نشان‌دهنده معنی‌داری در سطح P<0/001،

**** : نشان‌دهنده معنی‌داری در سطح P<0/0001.

نتایج میزان تولید ROS و آزادسازی لاکتات دهیدروژناز

طبق نتایج ارزیابی ROS و LDH مشخص شد که پیمینین موجب افزایش معنی‌دار تولید رادیکال آزاد اکسیژن و آزادی سازی لاکتات دهیدروژناز در مقایسه

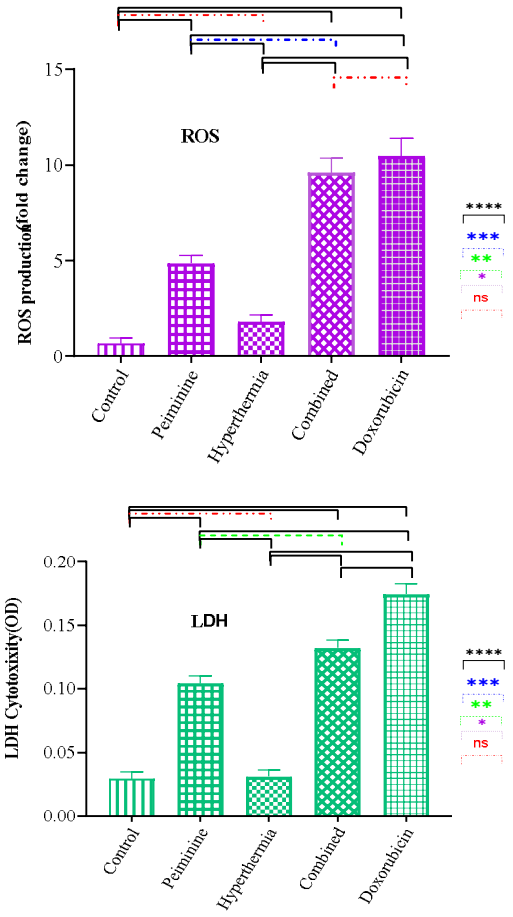


دوکسوربیسین　　درمان ترکیبی　　گرما درمانی　　پمینین　　کنترل

تصویر شماره 2: ارزیابی درصد آپوپتوز سلول های MCF-7 بعد از تیمار در گروه های مختلف درمانی (بزرگ نمایی x100).

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-08-03]

با گروه کنترل می‌شود(P<0/0001). هم‌چنین نتایج نشان داد هایپرترمیاتراپی تغییر معنی‌داری در میزان ROS و LDH ایجاد نمی کند(P>0/05). جهت بررسی اثرات هم افزایی مشخص شد که پیمینین و هایپرترمیاتراپی به‌صورت سینرژیستیک موجب افزایش معنی‌دار تولید رادیکال آزاد اکسیژن و آزادی‌سازی لاکتات دهیدروژناز در مقایسه با گروه کنترل می‌شود. بین گروه درمان ترکیبی با دکسوروبیسین در تولید رادیکال آزاد اکسیژن اختلاف معنی داری مشاهده نشد(P>0/05).



نمودار شماره 3: میزان تولید رادیکال آزاد اکسیژن و آزاد سازی لاکتات دهیدروژناز توسط سلول های MCF-7 در گروه‌های تیمار شده به صورت میانگین ± انحراف معیار نشان‌داده شده است

*: نشان‌دهنده معنی‌داری در سطح P<0/05،

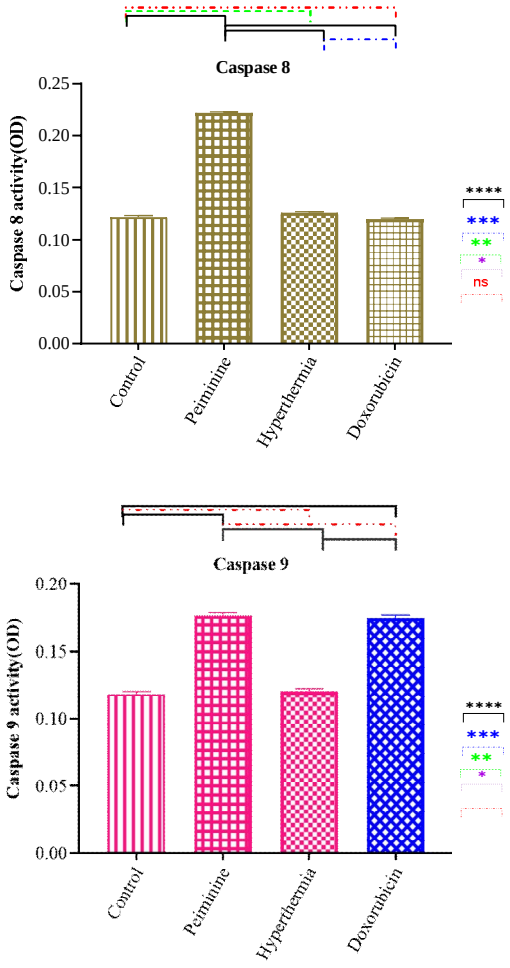
**: نشان‌دهنده معنی‌داری در سطح P<0/01،

***: نشان‌دهنده معنی‌داری در سطح P<0/001،

****: نشان‌دهنده معنی‌داری در سطح P<0/0001.

میزان فعالیت کاسپاز 8 و 9

اندازه‌گیری فعالیت کاسپاز 8 و 9 نشان داد که پیمینین از هر دو مسیر میتوکندریایی و خارج سلولی و دوکسوروبیسین از مسیر میتوکندریایی موجب القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی MCF-7 می‌شود. اما تغییرات هر دو کاسپاز در گروه درمانی با هایپرترمیاتراپی در مقایسه با گروه کنترل معنادار نبود(P>0/05).



نمودار شماره 4: میزان فعالیت کاسپاز 8 و 9 در گروه‌های مختلف سلول‌های MCF-7 به صورت میانگین ± انحراف معیار نشان‌داده شده است

*: نشان‌دهنده معنی‌داری در سطح P<0/05،

**: نشان‌دهنده معنی‌داری در سطح P<0/01،

***: نشان‌دهنده معنی‌داری در سطح P<0/001،

****: نشان‌دهنده معنی‌داری در سطح P<0/0001.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-08-03]

بحث

امروزه محققان در صدد یافتن روش‌های جایگزین با تکیه بر ترکیبات طبیعی جهت کاهش عوارض داروهای شیمی درمانی و کاهش دوز مصرف داروها می‌باشند. مطالعه حاضر با هدف بررسی اثرات هم افزایی پیمینین به عنوان یک ترکیب طبیعی به همراه هایپرترمیاتراپی بر میزان زنده مانی و تکثیر رده سلولی MCF-7 (سرطان پستان انسان) طراحی شد. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که پیمینین و هایپرترمیاتراپی موجب کاهش معنی‌دار زنده مانی، افزایش درصد آپوپتوز، میزان تولید رادیکال آزاد اکسیژن و آزادسازی لاکتات دهیدروژناز در مقایسه با گروه کنترل می‌شود. با اندازه‌گیری میزان فعالیت کاسپاز 8 و 9 مشخص شد پیمینین از طریق هر دو مسیر میتوکندریایی و خارج سلولی موجب القای آپوپتوز می‌شود. هم‌چنین مشخص شد که پیمینین و هایپرترمیاتراپی در ترکیب با هم دارای اثرات هم‌افزایی ضد تکثیری می‌باشند. هم‌چنین نتایج این مطالعه نشان داد که تیمار همزمان سلول‌های MCF-7 با هایپرترمیا تراپی قابلیت رقابت با دوکسوروبیسین که به‌عنوان یک داروی تجاری در شیمی درمانی محسوب می‌شود را دارد. مطالعات مختلف ثابت کرده‌اند که دوکسوروبیسین باعث ایجاد آسیب اکسیداتیو در سلول‌های تومور و آزادسازی آهن از آن‌ها می‌شود. مکانیسم آسیب اکسیداتیو یک مکانیسم مهم ضد تومور در سلول‌های سرطانی محسوب می‌شود(16). فاکتور هسته‌ای کاپا (NF-kB) یک فاکتور رونویسی است که بیان صدها ژن که در تنظیم رشد، تمایز، توسعه و مسیر آپوپتوز سلولی در سیتوپلاسم نقش دارند را تنظیم می‌کند(17). هم‌چنین دوکسوروبیسین با فعال‌سازی سیستم پروتئازوم یوبیکوئیتین موجب تنظیم بیان فاکتور رونویسی NF-kB می‌شود. فعال‌شدن بیش از حد NF-kB منجر به افزایش بسیاری از عملکردهای سلولی می‌شود که در چندین نوع تومور نشان داده شده است(18). بنابراین دوکسوروبیسین بیان پروتئین‌های ضدآپوپتوزی و میزان بیان ژن NF-kB را کاهش داده و هم زمان موجب افزایش تولید هیدروژن پراکساید می‌شود(17).

جباری و همکاران در سال 2018 در نتایج مطالعه خود گزارش کردند که هایپرترمیاتراپی در ترکیب با نانوذرات کربنات کلسیم به‌صورت سینرژیستیک موجب کاهش زنده مانی و افزایش میزان آپوپتوز سلول‌های MCF-7 می‌شود(19). لی و همکاران (2021) نشان دادند که پیمینین به صورت وابسته به دوز موجب کاهش زنده مانی، افزایش درصد آپوپتوز و کاهش متاستاز سلول‌های HT29 سرطان کولورکتال می‌شود(20). در روش هایپرترمیاتراپی، بافت‌ها تا دمای بالاتری از دمای فیزیولوژیک بدن معمولاً در محدوده 41-45 درجه سانتی‌گراد گرما داده می‌شوند. هایپرترمیاتراپی اغلب همزمان با رادیوتراپی و/یا شیمی درمانی کاربرد داشته و برای سالیان متمادی مورد بررسی قرار گرفته و موفقیت قابل توجهی در درمان سرطان‌های پیشرفته و عودکننده داشته است(21). لین و همکاران(2013) گزارش کردند که هایپرترمیاتراپی موجب افزایش حساسیت و کاهش زنده مانی سلول‌های MCF-7 درترکیب با پاکلی تاکسل می‌شود(22). مورل و همکاران (2018) نشان دادند که هایپرترمیاتراپی موجب القای آپوپتوز از مسیر میتوکندریایی در سلول‌های سرطانی می‌شود(23). محققان ثابت کرده‌اند که پیمینین سمیت خود را از طریق افزایش تولید ROS و راه اندازی استرس اکسیداتیو القا می‌کند. وانگ و همکاران(2015) و اسمعیلی و همکاران (2019) نشان دادند که سمیت سلولی داروهای شیمی درمانی به ارتباط بین تولید فعال ROS و بیان ژن‌ها در مواجهه با دارو بستگی دارد. همچنین ثابت شده است که افزایش میزان ROS با القای آپوپتوز از مسیر میتوکندریایی با کاهش سطح بیان کاسپاز-8 و نیز افزایش بیان پروتئین‌های کاسپاز-9 ارتباط دارد(۲۴،۱۵). یول و همکاران (2021) گزارش کردند که پیمینین از مسیر میتوکندریایی موجب القای آپوپتوز و کاهش زنده مانی در سلول‌های استئوسارکوما می‌شود(7). هم‌چنین Chao

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-08-03]

و همکاران (2019) نشان دادند که پیمینین در ترکیب با آدریامایسین موجب القای آپوپتوز از هر دو مسیر میتوکندریایی و خارج سلولی در سرطان معده می‌شود(8). نتایج مطالعه حاضر نیز نشان داد که پیمینین با افزایش تولید ROS و از طریق هر دو مسیر میتوکندریایی و خارج سلولی موجب افزایش آپوپتوز در سلول‌های MCF-7 می‌شود. لاکتات دهیدروژناز یک آنزیم سیتوپلاسمی است که افزایش آن در مایع رویی ناشی از پارگی غشای سلولی می‌باشد(25). نتایج مطالعه حاضر نیز نشان داد که تیمار با پیمینین موجب افزایش آزاد سازی لاکتات دهیدروژناز از سلول های MCF-7 می‌شود که مقدار آن در گروه تیمار همزمان پیمینین و هایپرترمیاتراپی به‌طور معنی‌داری بیش‌تر از تیمار به صورت مستقل بود. شریفی و همکاران (2014) نشان دادند که دوکسوروبیسین موجب القای آپوپتوز از مسیر میتوکندریایی در سلول‌های سرطانی می‌شود(26). در مطالعه حاضر نیز مشخص شد که دوکسوروبیسین موجب افزایش آپوپتوز از مسیر میتوکندریایی در سلول‌های MCF-7 می‌شود.

تضاد منافع : نویسندگان تصریح می‌کنند که هیچ گونه تضاد منافعی در مطالعه حاضر وجود ندارد.

سپاسگزاری

این مقاله حاصل طرح مصوب شورای پژوهشی کمیته پژوهشی دانشجویان دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی به شماره ثبت 66618/ص و کد اخلاق IR.SBMU.RETECH.REC.1400.958 می‌باشد.

References

1. Zanini S, Renzi S, Limongi AR, Bellavite P, Giovinazzo F, Bermano G. A review of lifestyle and environment risk factors for pancreatic cancer. Eur J Cancer 2021; 145: 53-70.
2. Lu L, Mullins CS, Schafmayer C, Zeißig S, Linnebacher M. A global assessment of recent trends in gastrointestinal cancer and lifestyle-associated risk factors. Cancer Commun 2021; 41(11): 1137-1151.
3. Trayes KP, Cokenakes SE. Breast cancer treatment. Am Fam Physician 2021; 104(2): 171-178.
4. Burguin A, Diorio C, Durocher F. Breast cancer treatments: updates and new challenges. J Pers Med 2021; 11(8): 808.
5. Yap KM, Sekar M, Fuloria S, Wu YS, Gan SH, Rani NN, et al. Drug delivery of natural products through nanocarriers for effective breast cancer therapy: A comprehensive review of literature. Int J Nanomedicine 2021; 16: 7891-7941.
6. Lyu Q, Tou F, Su H, Wu X, Chen X, Zheng Z. The natural product peiminine represses colorectal carcinoma tumor growth by inducing autophagic cell death. Biochem Biophys Res Commun 2015; 462(1): 38-45.
7. Yu L, Chen Y, Yuan S, Cao Y, Bi Z. Peiminine induces G0/G1-phase arrest, apoptosis, and autophagy via the ROS/JNK signaling pathway in human osteosarcoma cells in vitro and in vivo. Front Pharmacol 2021; 12: 770846.
8. Chao X, Wang G, Tang Y, Dong C, Li H, Wang B, et al. The effects and mechanism of peiminine-induced apoptosis in human hepatocellular carcinoma HepG2 cells. PLoS One 2019; 14(1): e0201864.
9. Soleimani K, Arkan E, Derakhshankhah H, Haghshenas B, Jahanban-Esfahlan R, Jaymand M. A novel bioreducible and pH-responsive magnetic nanohydrogel based on β-cyclodextrin for chemo/hyperthermia therapy of cancer. Carbohydr Polym 2021; 252: 117229.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-08-03]

10. Mehak, Thummer RP, Pandey LM. Surface modified iron-oxide based engineered nanomaterials for hyperthermia therapy of cancer cells. Biotechnol Genet Eng Rev 2023: 1-47.
11. Dutta J, Kundu B. Theoretical evaluation of bio-thermal response in human tissue subjected to pulse-laser induced hyperthermia therapy for cancer treatment. International Journal of Thermal Sciences 2022; 172(part B): 107346.
12. Muthana M, Multhoff G, Pockley AG. Tumour infiltrating host cells and their significance for hyperthermia. International Journal of Hyperthermia 2010; 26(3): 247-255.
13. Fiandalo MV, Kyprianou N. Caspase control: protagonists of cancer cell apoptosis. Exp Oncol 2012; 34(3): 165-175.
14. Shi Y, Wang F, He J, Yadav S, Wang H. Titanium dioxide nanoparticles cause apoptosis in BEAS-2B cells through the caspase 8/t-Bid-independent mitochondrial pathway. Toxicology Letters 2010; 196(1): 21-27.
15. Esmaeili Govarchin Ghaleh H, Zarei L, Mansori Motlagh B, Jabbari N. Using CuO nanoparticles and hyperthermia in radiotherapy of MCF-7 cell line: synergistic effect in cancer therapy. Artificial cells, Nanomedicine, and Biotechnology 2019; 47(1): 1396-1403.
16. Pilco-Ferreto N, Calaf GM. Influence of doxorubicin on apoptosis and oxidative stress in breast cancer cell lines. International Journal of Oncology 2016; 49(2): 753-762.
17. Kiningham KK, Cardozo ZA, Cook C, Cole MP, Stewart JC, Tassone M, et al. All-trans-retinoic acid induces manganese superoxide dismutase in human neuroblastoma through NF-kappaB. Free Radical Biology and Medicine 2008; 44(8): 1610-1616.
18. Mantovani A. Molecular pathways linking inflammation and cancer. Current Molecular Medicine 2010; 10(4): 369-373.
19. Jabbari N, Zarei L, Esmaeili Govarchin Galeh H, Mansori Motlagh B. Assessment of synergistic effect of combining hyperthermia with irradiation and calcium carbonate nanoparticles on proliferation of human breast adenocarcinoma cell line (MCF-7 cells). Artif Cells Nanomed Biotechnol 2018; 46(sup2): 364-372.
20. Li J, Qin Y, Wang W, Yang K, Zhang M. Peiminine inhibits the progression of colorectal cancer through up-regulating miR-760 via declining the expression of long noncoding RNA LINC00659. Anti Cancer Drugs 2021; 32(2): 148-156.
21. Chatterjee DK, Diagaradjane P, Krishnan S. Nanoparticle-mediated hyperthermia in cancer therapy. Ther Deliv 2011; 2(8): 1001-1014.
22. Lin Y, Liu Z, Li Y, Liao X, Liao S, Cen S, et al. Short-term hyperthermia promotes the sensitivity of MCF-7 human breast cancer cells to paclitaxel. Biol Pharm Bull 2013; 36(3): 376-383.
23. Morle A, Garrido C, Micheau O. Hyperthermia restores apoptosis induced by death receptors through aggregation-induced c-FLIP cytosolic depletion. Cell Death & Disease 2015; 6(2): e1633.
24. Wang S, Liu H, Zhang Y, Xin H. The effect of CuO NPs on reactive oxygen species and cell cycle gene expression in roots of rice. Environ Toxicol Chem 2015; 34(3): 554-561.
25. Alarifi S, Ali D, Alkahtani S, Alhader MS. Iron oxide nanoparticles induce oxidative stress, DNA damage, and caspase activation in the human breast cancer cell line. Biol Trace Elem Res 2014; 159(1-3): 416-424.
26. Sharifi S, Barar J, Hejazi MS, Samadi N. Doxorubicin changes Bax/Bcl-xL ratio, caspase-8 and 9 in breast cancer cells. Adv Pharm Bull 2015; 5(3): 351-359.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-08-03]