



مقاله پژوهشی

بررسی بیان ژن آنتی اکسیدان و سمیت در سلول‌های سرطانی تیمار شده با ماده مؤثره طبیعی فروتینین

شهرزاد ناجی، احسان کریمی*، مسعود همایونی تبریزی

گروه زیست‌شناسی، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۸/۱۲/۲۴

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۸/۰۶/۱۲

چکیده

زمینه و هدف: یکی از شایع‌ترین بدخیمی‌ها در بین زنان ایرانی سرطان پستان است. یکی از استراتژی‌ها در حوزه مبارزه با سرطان، فعال نمودن سیستم ایمنی ذاتی و اکتسابی مبارزه کننده با سرطان است که دارای قدرت تمایز و عملکرد انتخابی است. امروزه به دلیل عوارض جانبی روش‌های درمانی، تلاش‌های فراوانی جهت کشف ترکیبات طبیعی که دارای قدرت انتخابی در محدودیت سرطان‌ها هستند انجام گرفته است. هدف از مطالعه حاضر بررسی عملکرد ضد توموری فروتینین به عنوان ترکیب مشتق از گیاه فرولا بر رده سلولی MDA-MB-231 سلول‌های سرطانی پستان و سلول‌های نرمال (HDF) است.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش برای بررسی سمیت فروتینین علیه سلول‌های سرطانی سینه و مقایسه آن با سلول نرمال از آزمون MTT استفاده شد. علاوه بر این، سلول‌های سرطانی تیمار شده با فروتینین از نظر مورفولوژیک توسط بررسی‌های میکروسکوپی و جهت ارزیابی تغییرات بیان ژن‌های مربوط به آپوپتوز با استفاده از روش Real-time PCR مورد مطالعه قرار گرفتند.

نتایج: بر اساس یافته‌های به دست آمده در این مطالعه، میزان درصد زیستایی سلول‌های MDA در غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به ترتیب ۶۲/۲، ۵۱/۸ و ۴۱/۷۳ درصد حاصل شد. بیان ژن کاتالاز به عنوان ژن القاء کننده آپوپتوز نیز در سلول‌های فوق تیمار شده با غلظت ۳۰ میکرومول به صورت وابسته به دوز افزایش نشان داد.

نتیجه‌گیری: با توجه به عدم مشاهده تأثیرات سمی فروتینین بر سلول‌های نرمال فیبروبلاست پوستی (HDF)، پیشنهاد می‌شود فروتینین می‌تواند جایگزین مناسبی جهت استفاده درمانی در مبتلایان به سرطان سینه و صدمات ناشی از استرس اکسیداتیو باشد.

کلمات کلیدی: سرطان سینه، فروتینین، آپوپتوز، آنزیم کاتالاز

مقدمه

سرطان پس از بیماری‌های قلبی و عروقی و نیز تصادفات، یکی از شایع‌ترین علل مرگ‌ومیر در ایران محسوب می‌شود. یکی از شایع‌ترین سرطان‌ها در میان زنان سرطان پستان است (۱) که حدود ۱۰۰ برابر بیشتر از مردان بوده (۲) و میزان ابتلا به آن در میان زنان اروپایی و زنان آمریکایی به ترتیب به عنوان اولین و دومین سرطان کشنده شناخته شده است (۳). بیش از ۷۰۰۰۰ مورد جدید سرطان در کشور سالانه اتفاق می‌افتد، با این روند در دو دهه‌ی آینده انتظار می‌رود این آمار به دو برابر رقم فعلی

افزایش یابد (۴). از مهم‌ترین عوامل ابتلا به سرطان سینه می‌توان به سن اولین قاعدگی (۵)، اضافه وزن (۶)، سن اولین زایمان (۷)، سقط جنین (۸)، بارداری بیشتر از دو فرزند (۹)، مدت زمان شیردهی (۱۰) و مصرف سیگار (۱۱) اشاره کرد، این عوامل از طریق استرس اکسیداتیو اثرات خود را نشان می‌دهند (۱۲)، استرس اکسیداتیو عامل اصلی سرطان است (۱۳). وجود رادیکال‌های آزاد در بدن تا حدودی طبیعی و ضروری است. آن‌ها علاوه بر ایجاد برخی آسیب‌ها، باعث ترمیم نیز می‌شوند. عدم تعادل میان اکسیدان‌ها (رادیکال‌های آزاد) و آنتی‌اکسیدان‌ها موجب ایجاد استرس اکسیداتیو می‌شود (۱۴، ۱۵). هنگامی که میزان رادیکال‌های آزاد تولید شده از میزان فرایندهای ترمیمی

*نویسنده مسئول: احسان کریمی، گروه زیست‌شناسی، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی،

Email: ehsankarimi@mshdiau.ac.ir

مشهد، ایران

https://orcid.org/0000-0002-5011-9611

انجام گرفته است. در مطالعه حاضر فعالیت‌های تکثیر سیتوتوکسیک و آپوپتوزی فروتینین را بر روی سلول‌های سرطان پستان MDA و سلول نرمال HDF بررسی شد.

مواد و روش‌ها

عصاره گیری

به منظور استحصال فروتینین، ۵۰۰ گرم پودر ریشه گیاه در ۳ لیتر حلال دی کلرو متان خیسانده شده و ۹۳ گرم عصاره پس از ۳۶ ساعت عصاره گیری به روش خیساندن به دست آمد. میزان ۲۰ گرم از عصاره استخراج شده به روش کروماتوگرافی ستونی توسط ستون سیلیکاژل و با استفاده از حلال‌های اتیل استات و اتردوپترول تحت جداسازی ترکیبات قطبی و غیر قطبی قرار گرفت. فروتینین به عنوان مشتق سزکویی ترین، آخرین ترکیب جدا شده از ریشه گیاه *Ferula ovina* بود.

کشت سلولی

برای انجام این آزمایش، رده سلول‌های سرطان پستان MDA و سلول‌های نرمال انسانی HDF از آزمایشگاه بوعلی خریداری شد. رده‌های سلولی با محیط کشت مناسب در فلاسک ۹۶ خانه کشت داده شد که در این آزمایش از محیط کشت DMEM^۱ استفاده گردید، برای استفاده از محیط کشت به آن سرم و آنتی‌بیوتیک در زیر هود اضافه شد و سپس در انکوباتور با CO₂ ۱۰ درصد و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با رطوبت مناسب انکوبه گردید و هر سه روز یکبار محیط کشت آن‌ها تعویض شد. به ازای هر ۱۰۰ سی‌سی محیط کشت نیاز به ۱ سی‌سی پنی‌سیلین (۱۰۰ mg/ml)، ۱۰ سی‌سی سرم جنین گاوی (FCS) و ۱ سی‌سی استرپتومایسین (۱۰۰ mg/ml) است.

بررسی سمیت سلولی

برای سنجش سمیت سلولی و تعیین IC₅₀ آزمون MTT (۳-۴ و ۵-۵ دی متیل تیاژول - ۲-۲ نیل) [۲ و ۵-۵ دی فنیل تترازولیوم بروماید] که یک سنجش کالریمتریک است استفاده شد. در این روش ابتدا در هر یک از چاهک‌های یک پلیت ۹۶ خانه‌ای، ۵×۱۰^۳ سلول‌های MDA کشت داده شدند بعد از چسبیدن و رشد سلول‌ها و تراکم سلولی طی دوره انکوباسیون محیط رویی تخلیه گردید و محیط جدید حاوی غلظت‌های مختلف فروتینین

آن‌ها بیش‌تر می‌شوند باعث تغییر در عملکرد و ساختار مولکول‌های زیستی بدن از جمله پروتئین‌ها، اسیدهای نوکلئیک و لیپیدها و در نهایت آسیب بافتی می‌شود (۱۶-۱۳). آنتی‌اکسیدان‌ها جزو مکانیسم‌های دفاعی بدن در مقابل اکسیدان‌ها هستند، که نقش مهمی در حفظ ردوکس و برقراری تعادل بین واکنش‌های اکسایش و کاهش بدن ایفا می‌کنند. از جمله فراوان‌ترین و مهم‌ترین آنتی‌اکسیدان‌های غیر آنزیمی می‌توان به ویتامین C، ویتامین A، ویتامین E، آلبومین، فلاونوئیدها، گلوکاتینون‌ها، اسید اوریک، تیوردوکسین‌ها و متابولیت‌های پلی فنول اشاره کرد و نیز آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی که شامل سوپر اکسید دیسموتاز، گلوکاتینون پراکسیداز و کاتالاز هستند. فراوان‌ترین آنزیم آنتی‌اکسیدانی در پراکسی‌زوم‌ها، کاتالاز است که سبب تجزیه پر اکسید هیدروژن به آب و اکسیژن می‌گردد (۱۹-۱۵).

گیاهان منابع غنی از مواد تشکیل دهنده فیتو شیمیایی هستند که برای کشف محصولات جدید و توسعه داروها به کار می‌روند (۲۰). گیاهان دارای نقش‌های مختلف دارویی از جمله ضد میکروبی، آنتی‌اکسیدانی، ضد سرطانی، ضد قارچی و ضد ویروسی هستند. همچنین ویژگی آنتی‌اکسیدانی فیتوشیمیایی آن‌ها می‌تواند باعث کاهش استرس اکسیداتیو در سیستم‌های بیولوژیک شود (۲۱). *Ferula* (کما) از تیره umbelliferae و متعلق به خانواده Apiaceae و زیر خانواده Apioideae است. این گیاه در کشورهای مختلفی یافت شده که در ایران ۳۰ گونه‌ی این جنس گزارش شده است (۲۲). در این گیاه ترکیبات فعال بیولوژیکی مهمی یافت می‌شود که می‌تواند مقاومت دارویی سلول‌های سرطانی را معکوس کنند (۲۳) از جمله این ترکیبات، مشتقات سزکویی ترین (۲۴، ۲۵)، کومارین‌ها (۲۶، ۲۷)، کومارین گلیکوزیدها (۲۸) و ترکیبات گوگردی (۲۹، ۳۰) هستند. فروتینین یک هیدروکربن حلقوی و استروژن قوی گیاهی است که دارای نقش‌های مهم و به اثبات رسیده‌ای است و دارای اثرات ضد ویروسی، درمان بیماری‌های رحمی، ضد سرطانی و قاعده آور است (۳۱) و همچنین در ورم مفاصل، آرمایش بخشی درد مفاصل و روماتیسم اثر دارد (۲۱، ۳۲). با توجه به اینکه متابولیت‌های ثانویه تمام گونه‌های *Ferula* در ریشه گیاه ذخیره می‌شوند اکثر تحقیقات بر روی ریشه گیاه *F. ovina*

^۱Dulbecco's modified Eagle's medium

شمارش گردیده و در ۴ فلاسک ۲۵ جهت ارزیابی تأثیر فروتینین در غلظت‌های مختلف تقسیم شدند. جهت بررسی بیان ژن کاتالاز به روش real-time PCR پس از استخراج RNA و تولید cDNA، پرایمرهای موردنیاز تهیه شد (جدول ۱). در این روش از شناساگرهای فلورسانت استفاده شده و به‌منظور بررسی تغییرات بیان ژن هدف، از ژن GAPDH استفاده گردید. جهت ارزیابی نتایج، تغییر بیان ژن‌ها نسبت به یکدیگر با استفاده از روش $\Delta\Delta Ct$ بررسی گردید.

نتایج

بررسی اثرات سمیت سلولی فروتینین در سلول‌های MDA-MB-231

در این مطالعه سمیت سلولی القاء شده بر رده سلولی سرطان پستان (MDA-MB-231) در تیمار با فروتینین در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ و ۷۲ ساعت بررسی شد (نمودار ۱). نتایج به‌دست‌آمده از این بررسی اثرات مهاری فروتینین را بر رشد سلول‌های سرطانی پستان نشان داد. به‌طوری‌که سلول‌های MDA در تیمار با غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر فروتینین در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و

افزوده و برای ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در انکوباتور قرار گرفت. آزمایش در ۳ غلظت ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از فروتینین با سه تکرار انجام شد. بعد از انکوباسیون با فروتینین در مدت‌های مدنظر به هر یک از چاهک‌ها مقدار ۲۰ میکرولیتر از محلول MTT اضافه و پلیت‌ها به مدت سه تا چهار ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. پس از انکوباسیون و خارج نمودن محیط کشت حاوی MTT، به بلورها ۱۰۰ میکرولیتر حلال DMSO اضافه شد و شدت رنگ تولیدی توسط دستگاه ELISA plate reader در طول موج ۵۷۰ نانومتر موردسنجش قرار گرفت.

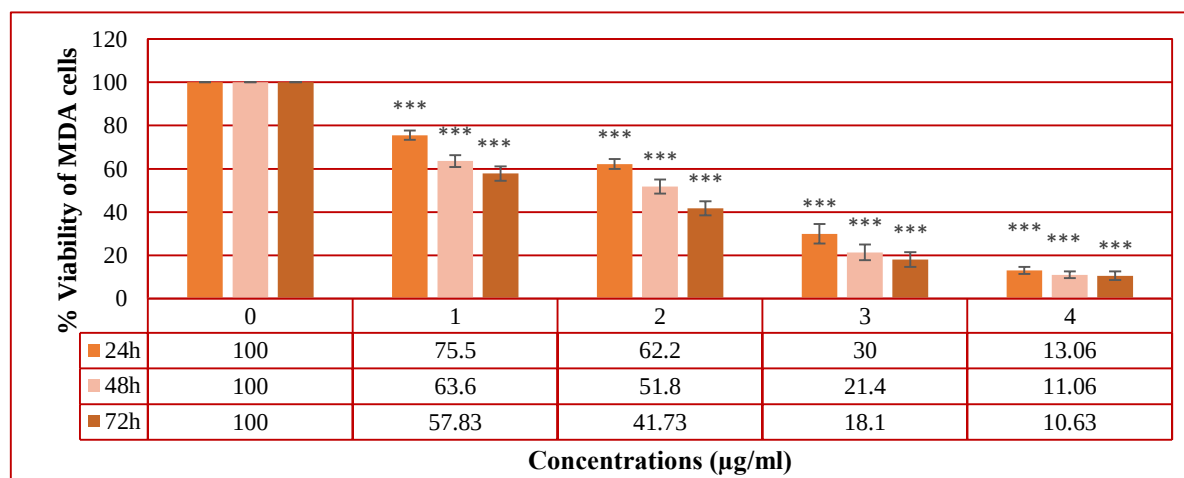
بررسی بیان ژن آنزیم کاتالاز با استفاده از Real time PCR

سلول‌های نرمال رده HDF انسانی در فلاسک ۷۵ حاوی محیط رشد RPMI 1640 همراه با ۱۰ درصد FBS و ۱ میلی‌لیتر آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین-استرپتومایسین به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس در شرایط ۵ درصد کربن دی‌اکسید و ۸۰ درصد رطوبت کشت داده شدند. پس از پراکنش سطحی ۸۵٪، سلول‌ها با استفاده از تریپسین جداسازی شده،

جدول ۱- توالی پرایمر

Genes	Forward 5'→3'	Reverse 5'→3'
GAPDH	5'-TGTGTCCGTCGTGGATCTGA-3'	5'-TTGCTGTTGAAGTCGCAGGAG-3'

CAT 5' CGTGCTGAATGAGGAACAGA3' 5' AGTCAGGGTGGACCTCAGTG3'



نمودار ۱- اثر سمیت سلولی فروتینین بر سلول‌های MDA-MB-231 در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت. با افزایش غلظت و زمان اثرات سمیت سلولی افزایش یافته است. داده‌ها در سطح $P < 0.001$ *** معنی‌دار است.

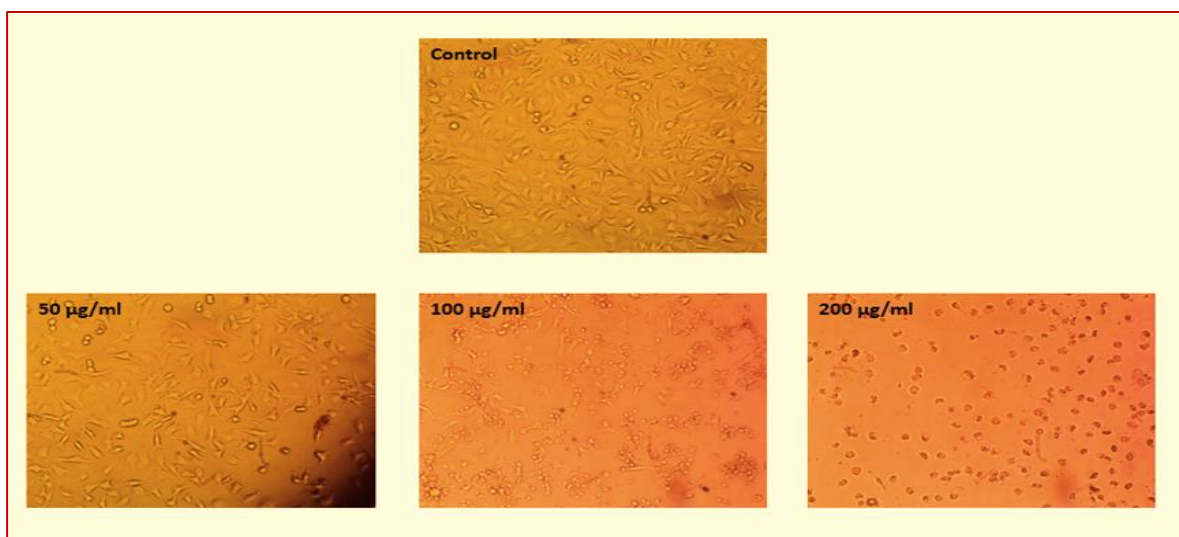
بررسی اثرات سمیت سلولی فروتینین در سلول‌های نرمال انسانی (HDF)

جهت بررسی اثرات سمیت سلولی فروتینین بر سلول‌های نرمال بدن انسان و ارزیابی عوارض جانبی آن از سلول‌های فیبروبلاست پوست انسانی رده HDF استفاده شد. بر اساس نتایج به دست آمده درصد زیستایی این سلول‌ها در تیمارهای ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعته با غلظت ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر فروتینین، ۶۸/۱۶، ۶۱ و ۵۸/۵ درصد است که نشان‌دهنده عملکرد انتخابی این ترکیب علیه سلول‌های سرطانی است (نمودار ۲).

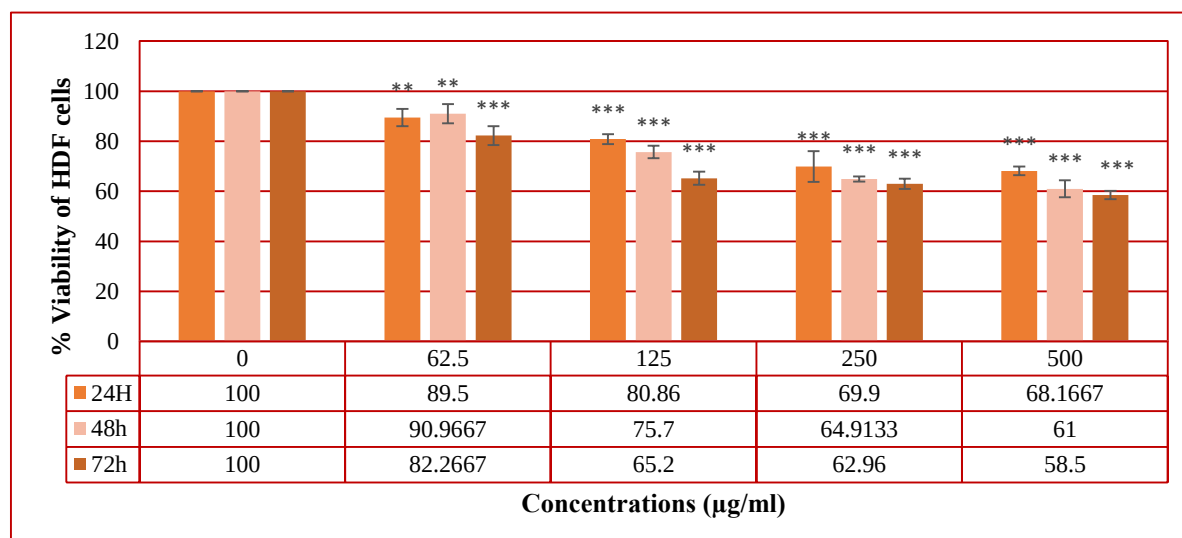
۷۲ ساعت به ترتیب دارای درصد زیستایی ۶۲/۲، ۵۱/۸ و ۴۱/۷ درصد می‌باشند.

بررسی مورفولوژی سلول‌های MDA تحت تیمار با فروتینین

خصوصیات مورفولوژیک سلول‌های MDA تیمار شده با فروتینین در غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر با گروه کنترل مورد مقایسه قرار گرفت. نتایج نشان داد که تیمار با فروتینین باعث کاهش اندازه و تعداد سلول‌ها می‌شود که نشان‌دهنده اثرات سایتوتوکسیک وابسته به غلظت فروتینین است (شکل ۱).



شکل ۱- بررسی تغییرات مورفولوژیک سلول‌های MDA تیمار شده با فروتینین



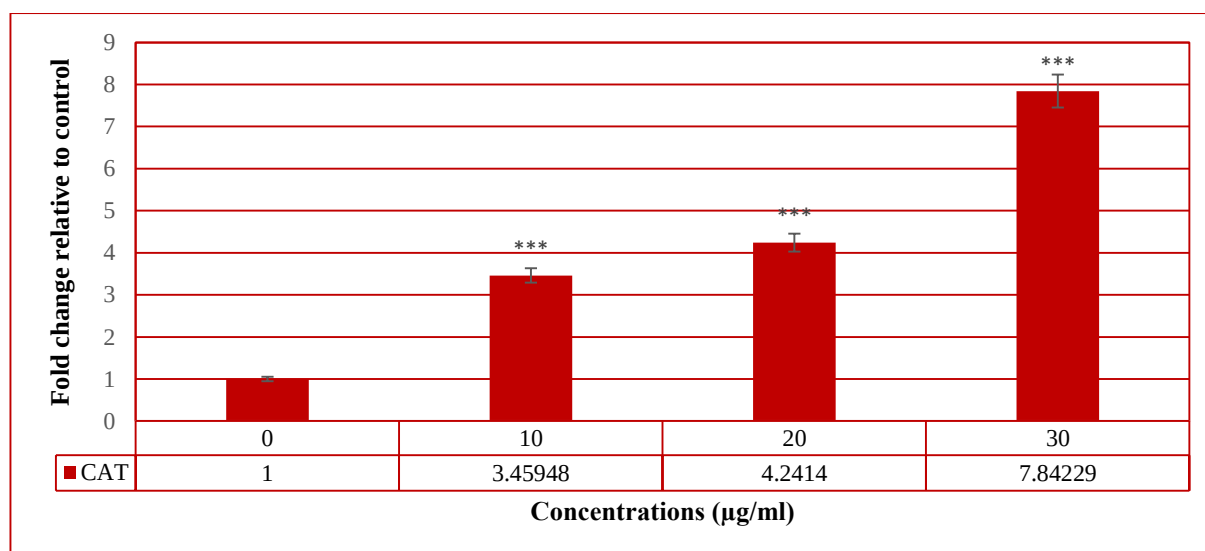
نمودار ۲- اثر سمیت سلولی فروتینین بر سلول‌های نرمال انسانی HDF در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت. داده‌ها در سطح $P < 0.001$ *** معنی‌دار است.

و آسیب به آن یکی از مهم‌ترین موانع و محدودیت در استفاده از این روش درمانی محسوب می‌گردد. از این‌رو استفاده از فروتینین در سال‌های اخیر بسیار مورد توجه قرار گرفته است. در سال ۲۰۰۹ Paola Zanoli و همکاران اثر این ماده را بر روی فعالیت جنسی متأثر از گیرنده استروژن نوع آلفا در رت‌های ماده مورد ارزیابی قرار دادند. نتایج به‌دست‌آمده از این بررسی نشان داد که فروتینین در صورت مصرف به‌تنهایی سبب افزایش بیان ژن‌های گیرنده استروژن نوع آلفا در هیپوتالاموس می‌شود. همچنین مشخص گردید در صورت مصرف هم‌زمان فروتینین با استرادیول بنزوات^۳، فروتینین خصوصیت ضد استروژنیک پیدا کرده و از این ماده می‌توان به‌صورت انتخابی به‌عنوان تنظیم‌کننده گیرنده استروژن در امور درمانی و کلینیکال استفاده نمود (۳۳). در سال

تغییرات بیان ژن کاتالاز در سلول‌های MDA تیمار شده با فروتینین

نتایج حاصل از بررسی بیان ژن به روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز^۲ (Real Time PCR) نشان داد که بیان ژن کاتالاز در سلول‌های MDA تحت تیمار با فروتینین تا غلظت ۳۰ میکرومول به‌صورت وابسته به دوز و معنی‌داری افزایش یافته است.

میزان بیان ژن کاتالاز در غلظت ۱۰ میکرومول فروتینین در حدود ۳ برابر و در غلظت ۳۰ میکرومول حدود ۷ برابر نسبت به گروه کنترل افزایش یافته است. به‌طور کلی می‌توان گفت فروتینین تأثیر خود را بر بیان ژن آنتی‌اکسیدانی کاتالاز اعمال نموده است (نمودار ۳).



نمودار ۳- تغییرات بیان ژن CAT در سلول‌های MDA تیمار شده با غلظت‌های ۱۰، ۲۰، ۳۰ میکرومول فروتینین

۲۰۰۹ Carla Palumbo و همکاران خصوصیت دیگری از این ماده را بررسی کردند آن‌ها در پی روش جایگزین هورمون درمانی (HRT)^۴ برای زنان مبتلا به پوکی استخوان از فروتینین استفاده نمودند تا این بیماران از اثرات مضر ناهنجاری نقص استروژن در امان بمانند نتایج این مطالعه نشان داد که مصرف فروتینین می‌تواند در رت‌های دچار ovariectomy اثرات ناهنجاری نقص استروژن را که مشابه با هورمون درمانی است مهار نماید و نیز

بحث

روش‌های درمانی مختلفی جهت درمان سرطان از جمله شیمی‌درمانی، پرتودرمانی، هورمون درمانی و عمل جراحی کاربرد دارند. اگرچه استفاده از روش شیمی‌درمانی جهت مبارزه با تومورهای متاستاز دهنده بهترین پاسخ درمانی را دارند؛ اما اثرات جانبی این داروها در کنار مقاومت سیستم ایمنی بدن بیمار

^۲Real time Polymeras chain reaction

^۳estradiol benzoate

^۴ Hormone Replacement Therapy

فروتینین بر سلول‌های سرطان پستان رده MCF7 و سرطان مثانه رده TCC در مقایسه با داروهای شایع مورد استفاده در سرطان از جمله دوکسوروبیسین (Doxorubicin) بسیار پایین بوده و نیز میزان آسیب آن به DNA سلول‌های سرطانی رده‌های فوق بسیار بیشتر است ($p < 0.001$). همچنین میزان اثر فروتینین بر مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی در رده‌های ذکر شده مورد سنجش قرار گرفت و مشخص شد این ترکیب می‌تواند ترکیب مناسبی جهت استفاده درمانی در بیماران مبتلا به سرطان داشته باشد (۲۳). همچنین این ترکیب قادر است به عنوان یک استراتژی درمانی به تنهایی و یا در همکاری با ترکیبات دارویی مختلف و روش‌های مبارزه با سرطان از جمله شیمی درمانی در آینده نزدیک مورد استفاده قرار بگیرد. ارزیابی سایر ژن‌های مربوط به آنزیم‌های آنتی اکسیدانی و ژن‌های درگیر در روند آپوپتوز و نیز بررسی تأثیرات ضد سرطانی فروتینین بر سلول‌های سرطانی رده‌های مختلف از عواملی است که در مطالعات بعدی مدنظر قرار خواهند گرفت.

تشکر و قدردانی

این مقاله منتج از پایان‌نامه دانشجویی خانم شهرزاد ناجی (کد ثبت پایان‌نامه: ۱۱۱۳۰۵۲۰۹۵۲۰۰۶) جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد رشته زیست‌شناسی گرایش بیوشیمی از دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد است. بدین وسیله از زحمات بی‌دریغ اساتید ارجمند گروه زیست‌شناسی دانشکده علوم پایه دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد صمیمانه سپاسگزاری می‌گردد.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ‌گونه تعارض منافی را اعلام نکرده‌اند.

در مقایسه با استرادیول بنزوات ترکیب فروتینین می‌تواند سبب مهار قدرتمند کاهش توده استخوان شود. همچنین استفاده از ترکیب فروتینین می‌تواند افزایش وزن پس از عمل ovariectomy را مهار نماید (۳۴). در سال ۲۰۱۰، Afaf Geroushi و همکاران خصوصیت ضدالتهابی فروتینین را مورد مطالعه قرار دادند. نتایج نشان داد غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم فروتینین دارای خاصیت ضدالتهابی است (۳۵). همچنین در سال ۲۰۱۳ Raafat KM اثرات ضد نورودژنراتیو ترکیب فروتینین بر روی رده سلولی human Jukart T-cell را مورد بررسی قرار دادند. به طور کلی این پژوهش نشان داد که فروتینین در غلظت‌های کم (< 0.5 میکروگرم در میلی لیتر) اثر حمایتی از خود نشان می‌دهد در حالی که در غلظت‌های بالاتر (> 10 میکروگرم در میلی لیتر) سبب بروز اثرات سیتوتوکسیک شدید می‌گردد (۳۶). در سال ۲۰۱۴ ناهید ارقیانی و همکاران اثرات سیتوتوکسیک و آپوپتوتیک فروتینین را در محیط درون تنی و برون تنی بر رده‌های مختلف سلول‌های سرطانی شامل CT26، HT29 و NIH/3T3 مورد بررسی قرار دادند. نتایج این مطالعه به طور کلی هم سو با نتایج ماحصل از این مطالعه بوده و نشان می‌دهد در هر دو مطالعه خصوصیات سیتوتوکسیک ترکیب فروتینین وابسته به زمان و غلظت بوده و با افزایش این فاکتورها میزان سمیت آن بر رده‌های سلولی مورد آزمایش افزایش می‌یابد (۳۷). در سال ۲۰۱۴ مریم مقدم متین و همکاران خواص مختلف فروتینین را بر روی سلول‌های سرطان پستان رده MCF7 و سرطان مثانه رده TCC مورد ارزیابی قرار دادند.

نتیجه گیری

در این مطالعه مشخص گردید میزان دوز کشنده ترکیب

References

1. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. CA: a cancer journal for clinicians. 2005;55(2):74-108.
2. Borrás JM, Piñol J, Izquierdo A, Borràs J. Análisis de la incidencia, la supervivencia y la mortalidad según las principales localizaciones tumorales, 1985-2019. cáncer de pulmón. Medicina clínica. 2008;131:53-7.
3. Matsuda A, Matsuda T, Shibata A, Katanoda K, Sobue T, Nishimoto H, et al. Cancer incidence and incidence rates in Japan in 2007: a study of 21 population-based cancer registries for the Monitoring of Cancer Incidence in Japan (MCIJ) project. Japanese journal of clinical oncology. 2013;43(3):328-36.



4. Naghavi M, Abolhassani F, Pourmalek F, Lakeh MM, Jafari N, Vaseghi S, et al. The burden of disease and injury in Iran 2003. *Population health metrics*. 2009;7(1):9.
5. Bidgoli SA, Ahmadi R, Zavarhei MD. Role of hormonal and environmental factors on early incidence of breast cancer in Iran. *Science of the total environment*. 2010;408(19):4056-61.
6. Hsieh CC, Trichopoulos D, Katsouyanni K, Yuasa S. Age at menarche, age at menopause, height and obesity as risk factors for breast cancer: associations and interactions in an international case-control study. *International journal of cancer*. 1990;46(5):796-800.
7. Humpel N, Jones SC. "I Don't Really Know, So It's a Guess": Women's Reasons for Breast Cancer Risk Estimation. *Asian Pacific Journal of cancer prevention*. 2004;5(4):428-32.
8. Tang M-TC, Weiss NS, Malone KE. Induced abortion in relation to breast cancer among parous women: a birth certificate registry study. *Epidemiology*. 2000; 11(2):177-80.
9. Peccatori FA, Azim HA, Scarfone G, Gadducci A, Bonazzi C, Gentilini O, et al. Weekly epirubicin in the treatment of gestational breast cancer (GBC). *Breast cancer research and treatment*. 2009;115(3):591-594.
10. Langsenlehner U, Wolf G, Langsenlehner T, Gerger A, Hofmann G, Clar H, et al. Genetic polymorphisms in the vascular endothelial growth factor gene and breast cancer risk. The Austrian "tumor of breast tissue: incidence, genetics, and environmental risk factors" study. *Breast cancer research and treatment*. 2008;109(2):297-304.
11. Xue F, Willett WC, Rosner BA, Hankinson SE, Michels KB. Cigarette smoking and the incidence of breast cancer. *Archives of internal medicine*. 2011; 171(2):125-33.
12. Nelson NJ. Migrant studies aid the search for factors linked to breast cancer risk. *Journal of the National Cancer Institute*. 2006;98(7):436-8.
13. Gönenç A, Tokgöz D, Aslan S, Torun M. Oxidative stress in relation to lipid profiles indifferent stages of breast cancer. 2005;42(3):190-194.
14. Dayem AA, Choi H-Y, Kim J-H, Cho S-G. Role of oxidative stress in stem, cancer, and cancer stem cells. *Cancers*. 2010;2(2):859-84.
15. Abdel-Salam OM, Youness ER, Hafez HF. The antioxidant status of the plasma in patients with breast cancer undergoing chemotherapy. *Open Journal of Molecular and Integrative Physiology*. 2011;1(03):29.
16. Sosa V, Moliné T, Somoza R, Paciucci R, Kondoh H, LLeonart ME. Oxidative stress and cancer: an overview. *Ageing research reviews*. 2013;12(1):376-90.
17. Brewer MS. Natural Antioxidants: Sources, Compounds, Mechanisms of Action, and Potential Applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2011; 10(4):221 - 247.
18. Gönenç A, Erten D, Aslan S, Akıncı M, Şimşek B, Torun M. Lipid peroxidation and antioxidant status in blood and tissue of malignant breast tumor and benign breast disease. *Cell biology international*. 2006;30(4):376-80.
19. El-Hefny MA, Karimova ST, Afandiev AM. Lipid peroxidation and antioxidant status in breast cancer patients before and after therapy. *Med J Cairo Univ*. 2009;77:37-42.
20. Stephens MAC, Wand G. Stress and the HPA axis: Role of glucocorticoids in alcohol dependence. *Alcohol research: current reviews*. 2012;34(4): 468-483.
21. Shakya AK. Medicinal plants: future source of new drugs. *International Journal of Herbal Medicine*. 2016;4(4):59-64.
22. Pimenov M, Leonov M. The Asian Umbelliferae biodiversity database (ASIUM) with particular reference to South-West Asian taxa. *Turkish Journal of Botany*. 2004;28(1-2):139-45.
23. Matin MM, Nakhaeizadeh H, Bahrami AR, Iranshahi M, Arghiani N, Rassouli FB. Ferutinin, an apoptosis inducing terpenoid from *Ferula ovina*. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2014;15(5):2123-8.
24. Miski M, Jakupovic J. Daucane esters from *Ferula rigidula*. *Phytochemistry*. 1990;29(1):173-8.
25. Shikishima Y, Takaishi Y, Honda G, Ito M, Takeda Y, Tori M, et al. Sesquiterpenes from *Ferula penninervis*. *Journal of natural products*. 2002;65(12):1897-903.
26. Nabiev A, Khasanov TK, Malikov V. A new terpenoid coumarin from *Ferula kopetdaghensis*. *Chemistry of Natural Compounds*. 1982;18(1):44-6.
27. El-Razek MHA, Ohta S, Hirata T. Terpenoid coumarins of the genus *Ferula*. *Heterocycles*. 2003;60(3):689-716.



28. Iranshahi M, Mojarab M, Sadeghian H, Hanafi-Bojd MY, Schneider B. Polar secondary metabolites of *Ferula persica* roots. *Phytochemistry*. 2008;69(2):473-8.
29. Iranshahi M, Amin G-R, Amini M, Shafiee A. Sulfur containing derivatives from *Ferula persica* var. *latisepta*. *Phytochemistry*. 2003;63(8):965-6.
30. Al-Said MS, Sattar EA, El-Ferally FS, Nahrstedt A, Coen M. New sulfides from *Ferula rutabensis*. *International journal of pharmacognosy*. 1996;34(3):189-93.
31. Nakhaeizadeh H, Moghaddam Matin M, Bahrami AR, Iranshahi M, Behnam Rassouli F, Haghighitalab A, editors. Investigating the cytotoxic effects of monoterpenoid ferutinin on bladder carcinoma cells. *Iranian Congress on Biology and Applications of Stem Cells*; 2011; 04:27.
32. Gurib-Fakim A. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular aspects of Medicine*. 2006;27(1):1-93.
33. Zavatti M, Benelli A, Montanari C, Zanolli P. The phytoestrogen ferutinin improves sexual behavior in ovariectomized rats. *Phytomedicine*. 2009;16(6-7):547-54.
34. Palumbo C, Ferretti M, Bertoni L, Cavani F, Resca E, Casolari B, et al. Influence of ferutinin on bone metabolism in ovariectomized rats. I: role in preventing osteoporosis. *Journal of bone and mineral metabolism*. 2009;27(5):538-45.
35. Geroushi A, Auzi AA, Elhwuegi AS, Elzawam F, Elsherif A, Nahar L, et al. Antiinflammatory sesquiterpenes from the root oil of *Ferula hermonis*. *Phytotherapy Research*. 2011;25(5):774-7.
36. Raafat K. Exploration of the protective effects of some natural compounds against neurodegeneration exploiting glycine receptors in vivo model. *Natural Products Chemistry & Research*. 2013;1(3):1-6.
37. Arghiani N, Matin MM, Bahrami AR, Iranshahi M, Sazgarnia A, Rassouli FB. Investigating anticancer properties of the sesquiterpene ferutinin on colon carcinoma cells, in vitro and in vivo. *Life sciences*. 2014;109(2): 87-94.



Original Article

Evaluation of the Antioxidant Gene Expression and Cytotoxicity Potential of Natural Bioactive Compound of Ferutinin Against the Cancer Cell Line

Naji SH, Karimi E*, Homayouni-Tabrizi M

Department of Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran

Received: 03 Sep 2019

Accepted: 14 Mar 2020

Abstract

Background & Objective: One of the most common malignancies among Iranian women is breast cancer. One of the strategies in the field of cancer prevention is the activation of an inherent and acquired cancer immune system that has the power to differentiate and select an action. Today, due to the side effects of therapies, numerous attempts have been made to discover natural compounds that have selective power in limiting cancers. The purpose of the present study was to evaluate the anti-tumor function of ferutinin as a ferula-derived plant compound on MDA-MB-231 cell line in breast cancer cells.

Materials & Methods: MTT test was used to study the toxicity of ferutinin against breast cancer cells and compare it with normal cells. Moreover, the morphologic investigation of Ferutinin-treated MDA cells was accomplished with microscopic observations, and the expression of the apoptotic gene was carried out by Real-time PCR.

Results: The results demonstrate that the viability of MDA cells after 24, 48, and 72 hours' treatment with ferutinin (100 µg / ml) were reported 62.2, 51.8, and 41.73 percent respectively. Furthermore, the gene expression of Catalase increased with the dose-dependent manner in a concentration of 30 µM whereas no cytotoxic effects of ferutinin were observed on normal HDF cell line.

Conclusion: Regarding the lack of cytotoxic effects of ferutinin on normal HDF cells, it is suggested that ferutinin could be an appropriate therapeutic alternative in patients with breast cancer and oxidative stress consequences.

Keywords: Breast Cancer, Ferutinin, Apoptosis, Catalase Enzyme

*Corresponding Author: Karimi Ehsan, Department of Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran
Email: ehsankarimi@mshdiau.ac.ir
<https://orcid.org/0000-0002-5011-9611>