

## Original Article

### The effect of extract of *Dunaliella salina* L. on expression of anti-apoptotic *BCL2* in HeLa cell line

Mahdie- Sadat Lajavardi<sup>✉</sup>, Mahsa Kavousi<sup>\*✉</sup>

Department of Biology, East Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

\*Corresponding author; E-mail: mkavoosi@iauet.ac.ir

Received: 28 Aug 2019 Accepted: 18 Nov 2019 First Published online: 23 May 2021

Med J Tabriz Uni Med Sciences. 2021;43(2):186-192

#### Abstract

**Background:** After breast cancer, cervix neoplasm is the most common disease among young women. Nowadays, natural substances are used in the treatment of diseases, because of the known side effects of the chemical drugs. *Dunaliella* is a green alga that lives in the saltwater lakes of Iran and is abundant in antioxidant substances. This paper aimed to study the effect of *Dunaliella* extract on the expression of the anti-apoptotic *BCL-2* gene in HeLa cell line. Expression of this gene is increased during cancer. It is expected that gene expression will be reduced if the alga extract is effective.

**Methods:** HeLa was prepared from the Center for Genetic and Biological Reserves of Iran and cultured. After culture, cells were divided into two treatment and control groups. Different concentrations of algae extract were applied to the treatment group for 48 hours. Then its toxicity was measured using MTT assay and  $IC_{50}$  was determined. RNA was extracted from cells of two groups, to determine the relative amount of gene expression at a concentration of  $IC_{50}$ . Then Real-time PCR was used.

**Results:** The result of Real-time PCR showed that the relative expression of *BCL-2*, in treatment group cells that were affected by algae extract, was four times lower than the control group. Since the P-value is less than 0.05 (P-value = 0), this decrease is significant.

**Conclusion:** After 48 hours, at a concentration of  $IC_{50}$  of algae extract, the relative expression of *BCL-2* was four times lower than control group.

**Keywords:** *BCL-2*, Cervix neoplasms, *Dunaliella salina*, MTT assay, Real-time PCR

**How to cite this article:** Lajavardi M-S, Kavousi M. [The effect of extract of *Dunaliella salina* L. on expression of anti-apoptotic *BCL2* in HeLa cell line]. Med J Tabriz Uni Med Sciences. 2021;43(2):186-192. Persian.

## مقاله پژوهشی

اثر عصاره جلبک دونالیلا بر روی بیان ژن آنتی آپوپتوتیک *Bcl-2* در رده سرطانی *Hela*مهديه السادات لاجوردی<sup>1</sup>، مهسا کاوسی\*<sup>2</sup>گروه زیست شناسی، واحد تهران شرق، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران  
\*نویسنده مسئول؛ ایمیل: mkavoosi@iauet.ac.irدریافت: ۱۳۹۸/۶/۶ پذیرش: ۱۳۹۸/۸/۲۷ انتشار برخط: ۱۴۰۰/۳/۲  
مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز. ۱۴۰۰؛ ۴۳(۲): ۱۸۶-۱۹۲

## چکیده

**زمینه:** سرطان دهانه رحم، پس از سرطان پستان فراوانترین بیماری در بین زنان جوان است. امروزه در درمان بیماری‌ها از مواد طبیعی استفاده می‌شود چون داروهای شیمیایی، عوارض جانبی شناخته شده‌ای دارند. جلبک سبز دونالیلا که در دریاچه‌های آب شور ایران زندگی می‌کند، غنی از مواد آنتی‌اکسیدان است. هدف مقاله حاضر، بررسی اثر عصاره دونالیلا بر روی میزان بیان ژن ضد آپوپتوز *Bcl-2* در رده سلولی *Hela* است. میزان بیان این ژن در هنگام بروز سرطان افزایش می‌یابد. انتظار می‌رود که در صورت مؤثر بودن عصاره جلبکی، میزان بیان ژن کاهش یابد.

**روش کار:** عصاره جلبک دونالیلا و رده سلولی سرطان دهانه رحم از مرکز ذخایر زیستی و ژنتیکی ایران تهیه و کشت داده شد. پس از کشت، سلول‌های سرطانی به دو گروه تیمار و کنترل تقسیم شدند. غلظت‌های مختلفی از عصاره جلبک به مدت ۴۸ ساعت بر روی گروه تیمار تأثیر داده شد. سپس سمیت آن با استفاده از *MTT assay* سنجیده و میزان *IC<sub>50</sub>* تعیین شد. برای تعیین میزان نسبی بیان ژن در غلظت متناظر با *IC<sub>50</sub>*، *IC*، *IC<sub>20</sub>*، *IC<sub>40</sub>*، *IC<sub>60</sub>* از سلول‌های دو گروه استخراج و *Real-time PCR* انجام شد.

**یافته‌ها:** نتیجه *Real-time PCR* نشان داد که میزان بیان نسبی ژن *Bcl-2* در سلول‌های گروه تیمار، که تحت تأثیر عصاره جلبک بودند، در مقایسه با گروه کنترل، به میزان چهار برابر کاهش پیدا کرد. با توجه به اینکه  $p\text{-value} < 0.05$  است ( $p\text{-value} = 0$ ) این کاهش معنی دار است.

**نتیجه‌گیری:** در غلظت متناظر با *IC<sub>50</sub>* از عصاره جلبک بعد از ۴۸ ساعت، میزان بیان نسبی ژن *Bcl-2* در رده سلولی سرطانی *Hela* چهار برابر کمتر از گروه کنترل بود.

**کلید واژه‌ها:** دونالیلا، سرطان دهانه رحم، ژن *Bcl-2*، آنتی اکسیدان

**نحوه استناد به این مقاله:** لاجوردی م س، کاوسی م. اثر عصاره جلبک دونالیلا بر روی بیان ژن آنتی آپوپتوتیک *Bcl-2* در رده سرطانی *Hela*. مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز. ۱۴۰۰؛ ۴۳(۲): ۱۸۶-۱۹۲

حق تألیف برای مؤلف محفوظ است.

این مقاله با دسترسی آزاد توسط دانشگاه علوم پزشکی تبریز تحت مجوز کرییتیو کامنز (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>) منتشر گردیده که طبق مفاد آن هرگونه استفاده تنها در صورتی مجاز است که به اثر اصلی به نحو مقتضی استناد و ارجاع داده شده باشد

## مقدمه

فعالیت‌های بیولوژیک در ترکیبات زیستی طبیعی فعال در جلبک‌ها دارای اثرات گسترده ضد باکتریایی، ضد توموری و فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی هستند. در مطالعه ترن و همکاران (۱۳) جلبک دونالیلا متعلق به خانواده Polyblepharidaceae، راسته Volvocales، رده Chlorophyceae و شاخه Chlorophyta معرفی شده است. دونالیلا سالینا (*Dunaliella salina* L) نوعی از ریزجلبک‌های هالوفیل، تک سلولی، سبز رنگ و متعلق به کلروفیتا است که در دریاها و آب‌های شور در نواحی گرمسیری تا قطبی دیده می‌شود. بر مبنای تحقیق دل کمپو و همکاران (۱۴)، دونالیلا در محیط‌های آبی که میزان شوری بالایی داشته باشد، از جمله دریاچه حوض سلطان، خلیج فارس و ارومیه رشد بالایی دارد. این جلبک در محدوده وسیعی از تغییرات pH رشد می‌کند. بر اساس پژوهش مورتی و همکاران (۱۵) این جلبک محدوده بالایی از شوری دریا (۳ تا ۳۱٪) و محدوده دمایی از زیر صفر تا بالای ۳۸ درجه را تحمل می‌کند. ریزجلبک دونالیلا سالینا با دارا بودن ترکیبات آنتی-اکسیدانی، ضد توموری و تولید محصولات استراتژیک کاروتنوئید بویژه بتاکاروتن می‌تواند به عنوان داروی ضد سرطان طبیعی مورد بررسی بیشتر قرار گیرد. امروزه استفاده از ترکیبات طبیعی به جای داروهای شیمیایی پر عوارض در درمان بیماری‌ها رو به افزایش است. این مطالعه، به منظور بررسی میزان تأثیر آنتی‌اکسیدان عصاره جلبک دونالیلا سالینا که یک ترکیب طبیعی است، بر روی سلول‌های سرطانی انجام شد. میزان بازدارندگی عصاره استخراج شده در رشد رده سلولی Hela با استفاده از روش MTT بررسی و میزان بیان ژن *Bcl-2* با استفاده از Real-time PCR سنجیده شد.

## روش کار

عصاره جلبک از مرکز ذخایر زیستی و ژنتیکی ایران تهیه شد. پس از تعیین غلظت عصاره  $1000 \mu\text{g/ml}$  از وزن خشک عصاره توزین و با رقت‌سازی متوالی غلظت‌های تعیین شده ۵، ۲، ۱، ۰/۵، ۰/۱، ۰/۰۵ و ۰/۰۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تهیه شدند. به منظور بررسی تأثیر رقت‌های مختلف عصاره جلبک در میزان رشد سلول‌های سرطانی، رده سلولی Hela از مرکز ذخایر زیستی و ژنتیکی ایران تهیه و پاساژ داده شد. ۱۰۰ میکرولیتر از سلول‌ها (۱۰ هزار سلول) در ظرف کشت ۹۶ خانه در محیط RPMI ۱۶۴۰، حاوی ۱۰ درصد سرم کشت داده شدند. سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد  $\text{CO}_2$  انکوبه شدند. برای بررسی تأثیر عصاره جلبک بر روی بقای سلول‌های سرطانی رده سلولی Hela از روش MTT Assay استفاده شد. سلول‌ها به صورت دو گروه تیمار و کنترل با ۳ تکرار در نظر گرفته شدند. همچنین گروه سلولی که با ترکیب تیمار نشدند، به عنوان سلول‌های گروه کنترل در نظر گرفته شدند. در ظرف کشت ۹۶

بر اساس مطالعه چاکرزه‌هی و همکاران (۱) سرطان دهانه‌ی رحم پس از سرطان پستان، شایع‌ترین سرطان در ایران بوده و دومین عامل مرگ و میر ناشی از سرطان در زنان جوان ۳۰ تا ۴۲ ساله می‌باشد. شارومی و همکاران (۲) معتقدند که این بیماری با احتمال ۹۵٪ در خانم‌های بالاتر از ۳۰ سال و با احتمال ۱٪ در سن قبل از ۲۵ سالگی ایجاد می‌شود. در مطالعه گلانی و همکاران (۳) معلوم شده است که تقریباً سالیانه ۴۶۰ هزار مورد جدید و ۲۳۰ هزار مرگ ناشی از سرطان دهانه‌ی رحم در کشورهای در حال توسعه اتفاق می‌افتد. دویتا و همکاران (۴) عقیده دارند که این بیماری از رشد فزاینده و نامنظم سلول‌های اپی‌تلیالی دهانه‌ی رحم و ریزش مداوم سلول‌ها ایجاد می‌شود. یاو و همکاران (۵) نشان دادند که پروتئین‌کوژن‌ها در حالت طبیعی مسئول تنظیم تقسیم و رشد سلول‌ها هستند. زمانی که پروتئین‌کوژن‌ها موتاسیون یافته و میزان بیان بالایی داشته باشند، آنکوژن نامیده می‌شوند. تا به حال بیش از یکصد نوع آنکوژن شناسایی شده است. سوپریا و همکاران (۶) معتقدند که آپوپتوز مرگ برنامه‌ریزی شده و تنظیم شده توسط سلول است. بنا به مطالعه گالوزی و همکاران (۷) چندین ژن در تولید آپوپتوز نقش مهمی دارند، از جمله *Bcl-2*، *Bcl-XL*، *P<sub>53</sub>*، *Bcl-1*، *Mcl-1*، پروتئین *Bcl-2* می‌تواند در ایجاد و ممانعت از آپوپتوز مؤثر باشد. همکاری پروتئین‌های *Mcl-1* و *Bax*، *Bak*، *Bad*، *Bim* پروتئین‌های *Bcl-2* و *Bcl-XL* اثر ضد آپوپتوز دارند. در حالی که دیگر پروتئین‌های *Bax*، *Bak*، *Bad*، *Bim* در ایجاد آپوپتوز نقش مؤثری را ایفا می‌کنند. مطالعات ابراهیمی و همکاران (۸) نشان می‌دهد که گیاهان، سبزی‌ها و ادویه‌ها می‌توانند یک منبع غذایی مفید در پیشگیری از سرطان باشند. گیاهان دارویی از منابع مهم آنتی-اکسیدان‌ها هستند که سازگاری زیادی با فیزیولوژی بدن انسان دارند و با افزایش قدرت آنتی‌اکسیدان‌های پلاسما و به دلیل داشتن عوارض جانبی کمتر، احتمال ابتلا به بعضی از بیماری‌ها مانند سرطان، بیماری‌های قلبی و سکنه مغزی را کاهش می‌دهند. نتیجه تحقیق میانگ و همکاران (۹) نشان داد که در انواع گیاهان خشکی-زی بسیاری از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی مثل ویتامین E، ویتامین C، فلاونوئیدها، کاروتنوئیدها و املاح معدنی مانند سلنیوم وجود دارد. در مطالعه حبیبی و همکاران (۱۰) معلوم شد که کاروتنوئیدها گروه مهمی از رنگدانه‌های طبیعی محلول در چربی و ترکیبات هیدروفوب با خواص آنتی‌اکسیدانی هستند. گائنی و همکاران (۱۱) نشان دادند که این ترکیبات در داخل کلروپلاست‌ها و کروموپلاست‌های گیاهان و برخی از ارگان‌های فیتوپلانکتونیک مثل جلبک‌ها، برخی از قارچ‌ها و باکتری‌ها ذخیره و جمع‌آوری می‌شوند. بر اساس تحقیق ویجاپاسکار و همکاران (۱۲) جلبک‌های دریایی مخزن پایان‌ناپذیری از مواد اولیه مورد استفاده در داروسازی، پزشکی، صنایع غذایی، آرایشی و بهداشتی هستند.

مرجع در این مطالعه *GAPDH* بود که میزان بیان ژن *Bcl-2* در مقایسه با آن، در دو گروه کنترل و تیمار سنجیده شد. توالی ژن های مورد نظر از مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی (NCBI) به دست آمد. سپس توسط سایت NCBI و نرم افزار Primer-BLAST اتصال پرایمرها به توالی های دیگر مورد بررسی قرار گرفت و بعد از اطمینان از درست بودن، ساخت آن به شرکت ماکروژن سفارش داده شد. توالی پرایمرهای مورد بررسی در جدول ۱ آمده است.

جدول ۱: توالی پرایمرهای مورد استفاده

Gene	Primer pair sequences	Ampl icon length	Tm (°C)	CG %	Accession N
<i>Bcl-2</i> Forward	۳' TTGGCCCCCGTTG ۵'-CTT	۶۵	۹۷ ۵۸	۵۰ ۶۲	XM ۰۱۱۷۰۲۵۹۱
<i>Bcl-2</i> Reverse	۳' CGGTTATCGTACC ۵'-CCGTTCTC	۶۵	۲۷ ۶۰	۱۴ ۵۷	XM ۰۱۱۷۰۲۵۹۱
<i>GAPDH</i> Forward	۳' GAAGGTGAAGGT ۵'-CGGAGTC	۲۲۶	۱۸ ۵۷	۸۹ ۵۷	۲ ۰۰۱۳۵۷۹۴۳ _NM
<i>GAPDH</i> Reverse	۳' GAAGATGGTGAT ۵'-GGGATTTC	۲۲۶	۷۲ ۵۳	۴۵	۲ ۰۰۱۳۵۷۹۴۳ _NM

تست PCR برای هر تکرار در نمونه های تیمار و کنترل به طور جداگانه برای بررسی ژن های *GAPDH* و *Bcl-2* انجام شد. با استفاده از شیب خط منحنی به دست آمده و رابطه زیر بازده واکنش برای هر پرایمر محاسبه شد.

$$1 - \text{Slope} = E^{-1/\text{Slope}} \quad E = \text{بازده واکنش} \quad E = \text{شیب خط منحنی}$$

تکثیر ژن ها صورت گرفته و تعیین کمیت نسبی در آن به وسیله اندازه گیری میزان افزایش نور فلوروسانس در اثر اتصال سایر گرین توسط دستگاه ۷۵۰۰ ABI Real-time PCR system (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, USA) انجام شد. سپس با استفاده از  $\Delta\Delta Ct$  میزان بیان ژن محاسبه شد.

### یافته ها

تیمار رده سلولی *Hela* با غلظت های مختلف از عصاره جلبک در غلظت های متوالی طی مدت ۴۸ ساعت انجام و سپس میزان زنده ماندن آن ها در مقایسه با گروه کنترل که تحت تأثیر عصاره قرار نگرفته بودند، با تست MTT انجام شد. پس از ترسیم نمودار و به کمک فرمول بهترین خط، میزان  $IC_{50}$  عصاره جلبک در دوره زمانی ۴۸ ساعت بدست آمد (نمودار ۱). مقدار  $IC_{50}$  برابر  $mg/ml$  ۲۰ بدست آمد. بنابراین، با نتیجه به دست آمده از MTT Assay می توان گفت که غلظت  $mg/ml$  ۲۰ از عصاره می تواند نیمی از سلول های سرطانی *Hela* را بکشد.

چاهکی،  $100 \mu l$  از سلول ها در محیط کشت حاوی ۱۰٪ سرم کشت داده شده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای  $37^{\circ}C$  و  $5\% CO_2$  انکوبه شدند. به چاهک های گروه تیمار، رقت های عصاره جلبک اضافه شدند و انکوباسیون به مدت ۴۸ ساعت ادامه یافت.  $20 \mu l$  از محلول رنگ MTT به تمام چاهک ها اضافه شده و انکوباسیون به مدت ۴ ساعت ادامه یافت. سپس مایع رویی حذف شده و  $100 \mu l$  DMSO به هر چاهک اضافه شد. بعد از پیتاژ، جذب در طول موج  $570 \text{ nm}$  با استفاده از Elisa Reader،  $2100$  Awareness Technology Stat Fax Microplate Reader خوانده شد. با توجه به اینکه برای هر غلظت و همچنین برای کنترل، سه بار تست تکرار شده بود لذا از سه جذب حاصل میانگین گرفته شد و به کمک فرمول زیر درصد تأثیر عصاره جلبک روی مرگ سلولی در هر غلظت تعیین گردید.

$$\left( \frac{\overline{OD}_{\text{treated}}}{\overline{OD}_{\text{untreated}}} \right) \times 100 = \text{the \% inhibition}$$

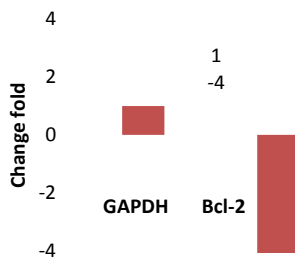
در نهایت با رسم منحنی نقطه ای در نرم افزار Excel و تعیین بهترین خط ممکن و با کمک فرمول خط میزان غلظتی از عصاره جلبک که در زمان ۴۸ ساعت  $IC_{50}$  بدست آمد. بر اساس نتایج MTT غلظتی از عصاره جلبکی که ۵۰ درصد سلول های *Hela* را می کشد ( $IC_{50}$ ) محاسبه گردید. برای آن که میزان تأثیر عصاره جلبک بر روی میزان نسبی بیان ژن بررسی شود، باید RNA استخراج شود. با استفاده از کیت استخراج RNXTm-Plus و بر اساس پروتوکل شرکت Sina. Colon، RNA سلول های گروه کنترل و تیمار استخراج شد. خلوص و غلظت RNA استخراج شده توسط c Spectrophotometer (Nano Drop Nano ۲۰۰۰ Technologies, Wilmington, DE, USA) Drop بررسی شد. کیفیت RNA توسط ژل آگارز ۱/۵٪ مورد مطالعه قرار گرفت. پس از کسب اطمینان از صحت انجام استخراج، برای سنتز cDNA از کیت Revert Aid First Stand cDNA Synthesis Kit شرکت Thermo Scientific استفاده شد. مواد لازم برای سنتز cDNA، ۴۰ Random Hexamer، ۱۰۰ Oligo dt،  $1 \mu l$  میکرومولار به حجم  $10 \mu l$  و dNTP ۱۰ میلی مولار به حجم  $1 \mu l$  امی باشد که با هم مخلوط شدند.  $50 \text{ ng}/\mu l$  RNA به هر لوله افزوده و ۵ دقیقه در  $65^{\circ}C$  و سپس بلافاصله در یخ قرار داده شد. پس از حدود دو دقیقه مخلوط واکنش با مقادیر Nuclease free water به حجم  $10 \times 4/5 \mu l$  M-MuLV buffer به حجم  $2 \mu l$  M-MuLV، ۲۰ واحد در میکرولیتر به حجم  $0/5 \mu l$  تهیه و به هر لوله به مقدار  $7 \mu l$  از این مخلوط اضافه گردید به طوری که حجم نهایی واکنش در نهایت  $20 \mu l$  شد. واکنش به مدت ۶۰ دقیقه در  $42^{\circ}C$  قرار داده شد. برای غیر فعال کردن آنزیم MMULV، محلول به مدت ۱۰ دقیقه در دمای  $72$  درجه سانتی گراد قرار داده شد. ژن

تغییر میزان بیان ژن غیر معنی‌دار بوده و نمی‌توان گفت که عصاره جلبک در از بین بردن سلول‌ها سرطانی مؤثر بوده است. با توجه به ستون شش جدول ۲ نتایج حاصل، در بازه اطمینان تعیین شده قرار دارند. از این رو می‌توان نتیجه گرفت که با اطمینان ۹۵٪ نتایج قابل اطمینان هستند.

جدول ۲: نتیجه مربوط به تغییرات بیان ژن *Bcl-2* در مواجهه با عصاره جلبک

Gene	Type	Reaction Efficiency	Expression	Std. Error	95% C.I.	P(H1)	Result
<i>GAPDH</i>	REF	۱/۰	۰/۶۶۶	-۰/۸۷۱ ۰/۵۵۶	-۰/۸۹۰ ۰/۵۳۴	۰/۰۴۸	
<i>Bcl-2</i>	TRG	۱/۰	۰/۱۶۶	-۰/۱۸۱ ۰/۱۰۵	-۰/۱۹۹ ۰/۰۹۷	۰/۰۰۰	DOWN

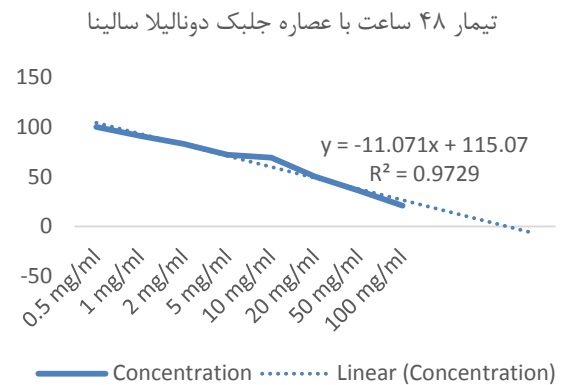
با توجه به جدول ۲ و مقایسه میزان بیان ژن *Bcl-2* و *GAPDH* این نتیجه به دست آمد که در گروه تیمار با عصاره جلبکی، میزان بیان ژن *Bcl-2* چهار برابر کمتر شده است. برای این که اطمینان حاصل شود که کاهش نسبی میزان بیان ژن در اثر عصاره جلبک بوده است، باید به مقدار *p-value* توجه شود. با توجه به این که مقدار *p-value* محاسبه شده عدد صفر یعنی کمتر از ۰/۰۵ است، نتیجه به دست آمده، معنی‌دار است. بنابراین با اطمینان می‌توان گفت که عصاره جلبک در کاهش میزان بیان ژن ضد آپوپتوز مؤثر بوده است و در گروه تیمار، که تحت تأثیر عصاره بوده‌اند، نسبت به گروه کنترل، که عصاره جلبک را دریافت نکرده‌اند، میزان بیان ژن *Bcl-2* به مقدار چهار برابر کاهش یافته است. در نمودار ۲ می‌توان میزان بیان ژن‌های مورد مطالعه را در گروهی که با عصاره جلبکی تیمار شده‌اند مشاهده کرد. میزان بیان ژن مرجع عدد یک و مقداری ثابت می‌باشد و میزان نسبی بیان ژن *Bcl-2* در اثر تیمار با عصاره جلبک به نسبت چهار برابر کاهش داشته است.



نمودار ۲: میزان نسبی بیان ژن *Bcl-2* در تیمار سلول‌های HeLa با عصاره جلبک

## بحث

در تحقیق لی و همکاران (۱۶) که بر روی خاصیت آنتی-اکسیدانی جلبک دونالیلا سالینا بر روی ماهی و بررسی فاکتورهای رشد، درصد بقا، رنگ پوست، گوشت آن انجام شده است ثابت شد که بتاکاروتن، باعث افزایش رنگدانه در پوست و گوشت ماهی، افزایش وزن، کاهش درصد تلفات و در نهایت باعث



نمودار ۱: نمودار  $IC_{50}$  در تیمار ۴۸ ساعت با عصاره جلبک  $IC_{50} = 20 \text{ mg/ml}$

برای بررسی میزان تأثیر عصاره بر روی میزان نسبی بیان ژن ضد آپوپتوز، لازم است که Real time PCR انجام شود. بنابراین کیفیت و کمیت RNA استخراج شده از سلول‌های هر دو گروه کنترل و تیمار بررسی شد. به منظور کسب اطمینان از عدم تجزیه RNA استخراج شده، کیفیت نمونه‌های RNA به کمک الکتروفورز ژل آگارز و کمیت آن‌ها با اسپکتروفتومتری بررسی شد. در بررسی ژل دو باند ۱۸S و ۲۸S rRNA ریبوزومی به وضوح مشاهده شد که بیانگر عدم تجزیه RNA می‌باشد. در بررسی با اسپکتروفتومتری نیز نسبت جذب در ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر  $280 \text{ ng/}\mu\text{l}$  به دست آمد که نشان‌دهنده درجه خلوص بالای RNA و نیز آغستگی کم آن با پروتئین و DNA ژنومی می‌باشد. در کل این نتیجه حاکی از آن است که rRNA استخراجی می‌تواند برای ساخت cDNA و انجام Real time PCR مورد استفاده قرار گیرد. قبل از انجام Real time PCR ضروری است که برای اطمینان از عملکرد صحیح پرایمرها، واکنش PCR با پرایمرهای مذکور انجام شود. نتیجه‌ی PCR نشان داد که کارایی پرایمرها مورد تأیید می‌باشد. سپس Real time PCR انجام شد. با بررسی منحنی ذوب ژن‌ها می‌توان گفت که هیچ‌گونه آلودگی در نمونه‌های تکثیر یافته وجود نداشته است. منحنی‌های مربوط به ژن‌های *GAPDH* و *Bcl-2* به صورت جداگانه و تک بودند، که نشان می‌دهد باند غیراختصاصی ایجاد نشده است. دمای نشان داده شده در این منحنی معادل دمای محاسبه شده در نرم‌افزار است. در نهایت، نتایج با استفاده از نرم‌افزار REST۲۰۰۹.V ۲/۰/۱۳ آنالیز گردید. روش اندازه‌گیری میزان بیان ژن‌های مورد نظر به صورت Relative (نسبی) بوده است. به عبارت دیگر میزان بیان ژن هدف به نسبت میزان بیان ژن رفرنس محاسبه شده است. در این نرم‌افزار محاسبات آماری بر اساس مقادیر ورودی Ct انجام شده و مقدار *p-value* مشخص می‌شود. در این مطالعه مقدار *p-value* کمتر از ۰/۰۵ محاسبه شد. یعنی اگر مقدار *p-value* به دست آمده برای بیان ژن، بیشتر از ۰/۰۵ باشد

می‌کند. نتایج این مطالعه می‌تواند مورد استفاده صنایع داروسازی برای تولید داروهای ضد سرطان و بیماران مبتلا به سرطان دهانه‌ی رحم قرار گیرد.

### نتیجه‌گیری

در پژوهش حاضر سلول‌های رده HeLa به دو گروه کنترل و تیمار تقسیم شدند. گروه تیمار به مدت ۴۸ ساعت تحت تأثیر غلظت‌های مختلفی از عصاره قرار گرفت و بعد MTT assay انجام شد. نتیجه نشان داد که مقدار  $IC_{50}$  ۲۰ mg/ml بوده است. سپس میزان بیان ژن ۲-Bcl نسبت به ژن مرجع در هر دو گروه کنترل و تیمار با Real Time PCR بررسی شد. نتایج نشان داد که عصاره جلبک بعد از ۴۸ ساعت در غلظت متناظر با  $IC_{50}$  باعث شده است که میزان بیان نسبی ژن ۲-Bcl در رده سلولی سرطانی HeLa چهار برابر کاهش یابد که با توجه به مقدار  $p$ -value نتیجه به دست آمده معنی‌دار است.

### قدردانی

این مقاله از پایان نامه کارشناسی ارشد رشته ژنتیک دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شرق استخراج شده و هیچ‌گونه حامی مالی نداشته است. بدین وسیله نگارندگان مقاله از تمام کسانی که یاریگر این تحقیق بوده‌اند سپاسگزاری می‌کنند.

### ملاحظات اخلاقی

این مطالعه با رعایت ملاحظات اخلاقی، با کد شناسایی ۲۰۱۰۵۵۳۹۵۲۰۵۵۳۳۰۲۸۳۳۰ از شورای پژوهشی واحد تهران شرق تایید شده است.

### منابع مالی

این تحقیق هیچ‌گونه حامی مالی نداشته است.

### منافع متقابل

در این تحقیق هیچ‌گونه تضاد منافع وجود ندارد.

### مشارکت مؤلفان

م. ک طراحی و تحلیل نتایج مطالعه و م. ل اجرا را به عهده داشته‌اند. نگارش مقاله توسط م. ک انجام شده و م. ل نسخه نهایی آن را خوانده‌اند. مقاله مورد تأیید نویسندگان می‌باشد.

افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی (سوپراکسیداز و پراکسیداز) می‌شود. هم چنین تأثیر پودر خشک شده این جلبک بر روی رشد، عملکرد ایمنی و کاهش بیماری در میگوی ببری سیاه مورد آزمایش قرار گرفت که باعث افزایش وزن و کاهش عفونت ویروسی سندرم بیماری لکه سفید و همچنین باعث کاهش استرس در میگو شد. لازم به ذکر است که شدت رنگ در این میگو، با مقدار دونالیلا موجود در جیره غذایی ارتباط مستقیم داشت. در آزمایشی دیگر بر روی لاروهای گونه‌هایی از طوطی ماهی که با روتیفراهای غنی شده با بتاکاروتن تغذیه شده بودند، افزایش بقای لاروی مشاهده شد. نتیجه پژوهش کیم و همکاران (۱۷) نشان داد که بتا کاروتن می‌تواند خطر ابتلا به سرطان معده را کاهش دهد. نتیجه تحقیق کاتا و همکاران (۱۸) نیز به صورت همسویه نشان داد که بتاکاروتن با از بین بردن رادیکال‌های آزاد مانع سرطان پوست گردیده است. مزمو و همکاران (۱۹) نشان دادند که بتاکاروتن می‌تواند مورفولوژی سلول‌های سرطان شش H-۶۹ NCI را تغییر داده و باعث کاهش رشد و تقسیم سلولی در آن‌ها گردد. محققان در آمریکا ثابت کردند که عصاره جلبک‌های دونالیلا و اسپیرولینا، بتاکاروتن، آلفاتوکوفرول و کانتزانترین می‌تواند باعث القای فاکتور نکروز تومور (TNF- $\alpha$ ) گردد که منجر به کاهش خطر سرطان اپیدرموئید کیسه دهانی در موش می‌گردد. نتیجه مطالعه خو و همکاران (۲۰) در درمان سرطان بافت فیبروزی در موش‌ها با عصاره دونالیلا سالیبا نشان داد که میزان آنزیم کاتالاز و سوپر اکسید دسموتاز در سرم خون موش‌های درمان شده، افزایش یافته است که نقش مهمی در حذف رادیکال‌های توکسیک نامطلوب را دارند. از سوی دیگر باعث کاهش قابل ملاحظه‌ای در سطح DNA و RNA در بافت کبد و کلیه موش‌ها می‌شود. این پدیده نقش مهمی در تغییر شکل تومور ایفا کرده و نشان‌دهنده درمان موش - های سرطانی می‌باشد. شو و همکاران (۲۱) نشان دادند که عصاره اتانولی دونالیلا باعث مرگ سلولی در رده سلولی اپی‌تلیومی سرطان شش انسان با تغییر در میزان بیان پروتئین‌هایی که تنظیم کننده چرخه سلولی هستند می‌شوند، در نتیجه چرخه سلولی متوقف می‌شود. بنابراین، با افزایش غلظت عصاره و افزایش زمان در معرض گذاری، میزان درصد مرگ و میر سلول‌های سرطانی نیز افزایش پیدا می‌کند. در پژوهش محمدی و همکاران (۲۲) که بر روی تأثیر گیاه گزنه بر روی سرطان دهانه رحم انجام شده بود نشان داده شد که گیاه گزنه به دلیل دارا بودن ترکیبات شیمیایی مؤثر برای سمیت سلولی، اثر مهارکنندگی رشد بر روی رده سلول - های سرطانی HeLa داشته و باعث مرگ سلولی آپوپتوزی در این سلول‌ها گردیده است. نتیجه مطالعه دیگری از محمدی و همکاران (۲۳) نشان داد که عصاره گیاه گزنه مانع از رشد تومور سرطان پستان در موش‌ها می‌شود و آپوپتوز را در سلول‌های سرطانی القا

## References

- Chakerzehi A, Eivazi Arvanagh N, Saedi S, Hematti M, Mohiti Ardakani J, Moradi A, et al. Effect of Quercetin on RAC1 Gene Expression as a Marker of Metastasis in Cervical Cancer Cells. *Zahedan Journal of Research in Medical Sciences*. 2015 May 31;17(5). doi: 10.17795/zjrms962.
- Sharomi O, Malik T. A model to assess the effect of vaccine compliance on Human Papillomavirus infection and cervical cancer. *Applied Mathematical Modelling*. 2017 Jul 1;47:528-50. doi: 10.1016/j.apm.2017.03.025.
- Galani E, Christodoulou C. Human papilloma viruses and cancer in the post-vaccine era. *Clinical microbiology and infection*. 2009 Nov 1;15(11):977-81. doi: 10.1111/j.1469-0691.2009.03032.x.
- DeVita Jr VT, Rosenberg SA. Two hundred years of cancer research. *New England Journal of Medicine*. 2012 Jun 7;366(23):2207-14. doi: 10.1056/NEJMra1204479.
- Yao Y, Dai W. Genomic instability and cancer. *Journal of carcinogenesis & mutagenesis*. 2014;5. doi: 10.4172/2157-2518.1000165.
- Supriya V. Novel Bcl2 inhibitor, disarray induces apoptosis by disruption of Bcl2-Bak interaction. *Biochemical Pharmacology*. 2017;52:45-53. doi: 10.1016/j.bcp.2017.02.015
- Galluzzi L, Vitale I, Aaronson SA, Abrams JM, Adam D, Agostinis P, et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death & Differentiation*. 2018 Mar;25(3):486-541. doi: 10.1038/s41418-017-0012-4.
- Ebrahimi E, Parsania M, Hosseini dost H. Effect of Different Concentrations of Alcoholic Extract of Aloe Vera Leaves on Coleopteran Cells Reproduction (Hela). *Journal of Physiology and Animal Husbandry*. 2015;29(8):51-8. [Persian]
- Cho M, Lee HS, Kang IJ, Won MH, You S. Antioxidant properties of extract and fractions from *Enteromorpha prolifera*, a type of green seaweed. *Food Chemistry*. 2011 Aug 1;127(3):999-1006. doi: 10.1016/j.foodchem.2011.01.072.
- Habibi G, Arjomandzadegan M, Tayeboom M, Didgar F, Sarmadian H, Sadrnia M, et al. Comparison of antibacterial effects of a carrier produced in microemulsion system from aqueous extract of Aloe vera with selected antibiotics on Enterobacteriaceae. *Iranian journal of microbiology*. 2018 Oct;10(5):334. PMID: 30675330.
- Ghaeni M, Roomiani L. Review for application and medicine effects of Spirulina, microalgae. *Journal of Advanced Agricultural Technologies*. 2016 Jun;3(2):114-7. doi: 10.18178/joaat.3.2.114-117.
- Vijayabaskar P, Shiyamala V. Antibacterial activities of brown marine algae (*Sargassum wightii* and *Turbinaria ornata*) from the Gulf of Mannar Biosphere Reserve. *Advances in Biological Research*. 2011;5(2):99-102. doi: 10.1016/S2221-1691(12)60136-1
- Tran D, Doan N, Louime C, Giordano M, Portilla S. Growth, antioxidant capacity and total carotene of *Dunaliella salina* DCCBC15 in a low cost enriched natural seawater medium. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2014 Jan;30(1):317-22. doi: 10.1007/s11274-013-1413-2.
- Del Campo JA, García-González M, Guerrero MG. Outdoor cultivation of microalgae for carotenoid production: current state and perspectives. *Applied microbiology and biotechnology*. 2007 Apr;74(6):1163-74. doi: 10.1007/s00253-007-0844-9.
- Chidambara Murthy KN, Rajesha J, Vanitha A, Swamy MM, Ravishankar GA. Protective effect of *Dunaliella salina*-A marine micro alga, against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats. *Hepato Res*. 2005 Dec;33(4):313-9. doi: 10.1016/j.hepres.2005.08.008. PMID: 16890175.
- Li F, Huang S, Lu X, Wang J, Lin M, An Y, Wu S, Cai M. Effects of dietary supplementation with algal astaxanthin on growth, pigmentation, and antioxidant capacity of the blood parrot (*Cichlasoma citrinellum* × *Cichlasoma synspilum*). *Journal of Oceanology and Limnology*. 2018 Sep;36(5):1851-9. doi: 10.1007/s00343-019-7172-7
- Kim JH, Lee J, Choi IJ, Kim YI, Kwon O, Kim H, Kim J. Dietary Carotenoids Intake and the Risk of Gastric Cancer: A Case—Control Study in Korea. *Nutrients*. 2018 Aug;10(8):1031. doi: 10.3390/nu10081031.
- Katta R, Brown DN. Diet and skin cancer: The potential role of dietary antioxidants in nonmelanoma skin cancer prevention. *Journal of skin cancer*. 2015 Jan 1;2015. doi: 10.1155/2015/893149.
- Mezzomo N, Ferreira SR. Carotenoids functionality, sources, and processing by supercritical technology: a review. *Journal of Chemistry*. 2016 Jan 1;2016. doi: 10.1155/2016/3164312.
- Xu Y, Ibrahim IM, Wosu CI, Ben-Amotz A, Harvey PJ. Potential of new isolates of *Dunaliella salina* for natural  $\beta$ -carotene production. *Biology*. 2018 Mar;7(1):14. doi: 10.3390/biology7010014.
- Sheu MJ, Huang GJ, Wu CH, Chen JS, Chang HY, Chang SJ, Chung JG. Ethanol extract of *Dunaliella salina* induces cell cycle arrest and apoptosis in A549 human non-small cell lung cancer cells. *in vivo*. 2008 May 1;22(3):369-78. PMID: 18610750.
- Mohammadi A, Baradaran B. Apoptotic Effect of Dichloromethanol Extract of *Urtica dioica* on Cancer Cells. *Journal of Ardabil University of Medical Sciences & Health Services*. 2012;15(3):283-90. [Persian]
- Mohammadi A, Mansoori B, Baradaran PC, Khaze V, Aghapour M, Farhadi M, et al. *Urtica dioica* extract inhibits proliferation and induces apoptosis and related gene expression of breast cancer cells in vitro and in vivo. *Clinical breast cancer*. 2017 Oct 1;17(6):463-70. doi: 10.1016/j.clbc.2017.04.008