

# بررسی اثر عصاره اسپیرولینا پلاتنسیس بر بقای سلولی و تغییر بیان ژن آپوپتوزی BAD در سلول‌های آدنوکارسینومای معده انسان AGS

سید جهانبخش دانیالی<sup>۱</sup>، لیلا روحی<sup>۱\*</sup>

## مقاله پژوهشی

**مقدمه:** در این مطالعه اثر عصاره اسپیرولینا پلاتنسیس با خواص ضد التهابی و پیشگیری از سرطان و تقویت سیستم ایمنی بر بقای سلولی و تغییر بیان ژن آپوپتوزی BAD در سلول‌های آدنوکارسینومای معده انسان رده AGS مورد بررسی قرار گرفت. **روش بررسی:** در پژوهش تجربی حاضر، با کشت رده سلولی AGS در محیط کشت DMEM-F12 حاوی ۱۰٪ سرم جنین گاوی و تیمار سلول‌ها در غلظت‌های ۱۰، ۲۰ و ۴۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر از عصاره جلبک اسپیرولینا پلاتنسیس و انکوباسیون ۲۴ و ۴۸ ساعته، سمیت سلولی با روش رنگ‌سنجی MTT طبق دستورالعمل کیت در هر دو زمان انکوباسیون مورد بررسی قرار گرفت. سلول‌های رده AGS سپس با غلظتی از عصاره که سبب کاهش ۵۰ درصدی بقای سلولی گردید (۴۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر) برای بررسی بیان ژن BAD ظرف مدت ۴۸ ساعت انکوبه شدند. سپس میزان بیان ژن BAD با آنالیز RT-Real Time-PCR مورد بررسی قرار گرفت. آنالیز آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS version 16 و آزمون من ویتنی انجام شد. **نتایج:** نتایج این پژوهش نشان داد که بقای سلولی سلول‌های رده AGS آدنوکارسینومای معده، در مقایسه با گروه کنترل در دوز ۲۰ (P<0.001) و ۴۰ (P<0.0001) میکروگرم/ میلی‌لیتر در زمان انکوباسیون ۴۸ ساعت به طور معنی‌داری کاهش می‌یابد. به‌علاوه تیمار سلول‌های رده AGS با دوز ۴۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر عصاره جلبک اسپیرولینا پلاتنسیس و انکوباسیون آن برای مدت ۴۸ ساعت، افزایش معنی‌دار بیان ژن BAD (P<0.001) را نشان داد. **نتیجه‌گیری:** نتایج بیانگر آن هستند که عصاره جلبک اسپیرولینا پلاتنسیس قادر است با القاء بیان ژن BAD و جلوگیری از تکثیر، از بقای سلولی سلول‌های آدنوکارسینومای معده بکاهد.

**واژه‌های کلیدی:** آدنوکارسینومای معده، بیان ژن، BAD، اسپیرولینا پلاتنسیس

**ارجاع:** دانیالی سید جهانبخش، روحی لیلا. بررسی اثر عصاره اسپیرولینا پلاتنسیس بر بقای سلولی و تغییر بیان ژن آپوپتوزی BAD در سلول‌های آدنوکارسینومای معده انسان AGS. مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد ۱۴۰۴؛ ۳۳ (۱۱): ۴۹-۹۶۳۹.

۱- گروه زیست‌شناسی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

\* (نویسنده مسئول)؛ تلفن: ۰۹۱۲۶۰۴۳۳۰۵، پست الکترونیکی: Lrouhibiology@iaou.ac.ir، صندوق پستی: ۱۶۶

## مقدمه

سرطان به دسته‌ای از توده‌های سلولی که دارای خصوصیات بدخیم باشند، اطلاق می‌گردد. امروزه سرطان‌ها شایع‌ترین و شدیدترین بیماری‌های مشاهده شده در طب بالینی می‌باشند (۱،۲). در بین انواع بدخیمی‌ها، آدنوکارسینومای معده یکی از سرطان‌های شایع در سراسر جهان می‌باشد. علی‌رغم کاهش که در سال‌های اخیر در میزان بروز این سرطان رخ داده است اما همچنان به عنوان پنجمین سرطان شایع در جهان و چهارمین علت مرگ در اثر سرطان به حساب می‌آید (۳). سن شایع این بدخیمی دهه ششم عمر است اما وقوع آن در سنین پایین‌تر نیز شایع می‌باشد. سرطان معده از جمله بیماری‌هایی است که اگر زود تشخیص داده شود به‌طور کامل قابلیت علاج داشته و برعکس در صورتی که دیر تشخیص داده شود ممکن است متاستاز رخ دهد. درمان اصلی سرطان معده در مراحل اولیه جراحی و در مراحل پیشرفته اقدامات جراحی به همراه شیمی‌درمانی و رادیو درمانی می‌باشد که معمولاً با نتایج خوبی همراه نیستند (۴). بنابراین یک نیاز فوری برای ایجاد راهکارهای درمانی موثرتر، به منظور بهبود طول مبتلایان وجود دارد. از آنجایی که مقاومت به مرگ سلولی و عدم وجود تعادل بین تقسیم سلولی و مرگ سلولی، منجر به عدم کنترل تکثیر سلول‌های توموری می‌شود، هم‌اکنون توجه‌ها به سوی شناسایی ترکیبات درمانی که قادر به مهار تکثیر سلول‌های توموری باشند، جلب شده است. برخی از این ترکیبات با هدف قرار دادن پروتئین‌های ضد آپوپتوزی منجر به افزایش پروتئین‌های پروآپوپتوزی می‌شوند و القاء آپوپتوز در سلول‌های سرطانی را تسهیل می‌نمایند، و بدین طریق باعث مرگ سلول‌های توموری می‌شوند. از جمله آنها می‌توان به ترکیبات با منشأ طبیعی اشاره کرد (۵،۶). استفاده از ترکیبات طبیعی به عنوان دارو به دنبال دارا بودن اثرات جانبی کمتر در مقایسه با ترکیبات شیمیایی، همواره مورد توجه بوده است و به‌عنوان یک ترکیب هدف درمانی جدید در کارهای تحقیقاتی مبتنی بر فرآیندهای آزمایشگاهی و بالینی مورد بررسی قرار می‌گیرند. از

گذشته ترکیبات طبیعی منبع منحصربه‌فردی برای تأمین داروهای مصرفی جامعه بشری بوده‌اند و به خاطر عدم بروز مشکلات بیشتر در اثر استفاده از آنها نقش مهمی در درمان بیماری‌های انسانی ایفا نموده‌اند (۷). بر این اساس، محققان همیشه در راستای یافتن ترکیباتی با خواص ضد توموری که توانایی جلوگیری از گسترش و رشد سلول‌های سرطانی را داشته باشند، بوده‌اند، که در این میان آبزین دریایی بواسطه خواص تغذیه‌ای و دارویی آن‌ها همواره مورد توجه قرار گرفته‌اند (۸). جلبک سبز-آبی اسپیرولینا، یکی از مهم‌ترین این آبزین است که از سوی محققان علوم تغذیه به آن اشاره شده است و کشفیات زیادی در خصوص خواص تغذیه‌ای و دارویی آن موجود می‌باشد. این جلبک رشته‌ای، متعلق به خانواده سیانوباکترها، دارای فیلامنت‌های فرمانند، فتوسنتزکننده و بسیار کوچک است که دو جنس آرترواسپریا و پلاتنسیس آن مهم‌ترین اسپیرولیناهای خوراکی به حساب می‌آیند و به طور تجاری در سرتاسر جهان تولید می‌گردند. اسپیرولینا پلاتنسیس به دلیل داشتن اجزا و ترکیبات آنتی‌اکسیدانی مانند فایکوسیانین، سلنیوم، کارتنوئیدها، اسید چرب گامالینونیک، عامل دارویی بالقوه‌ای برای بیماری‌های القاء شده به‌وسیله تنش اکسیداسیونی نظیر سرطان می‌باشد (۹،۱۰). از این‌رو، هم‌اکنون اسپیرولینا پلاتنسیس از سوی سازمان بهداشت جهانی به‌عنوان یک گزینه درمانی بالقوه جهت درمان سرطان اعلام گردیده است (۱۱،۱۲). در مطالعه حاضر نیز اثر عصاره اسپیرولینا پلاتنسیس بر بقای سلولی و تغییر بیان ژن آپوپتوزی *BAD* (پروتئین محصول ژن *BAD* با تشکیل هتروداپمر با پروتئین *BCL-2* عملکرد ضد آپوپتوزی *BCL-2* را مهار می‌نماید و منجر به القاء آپوپتوز می‌شود (۷) در سلول‌های آدنوکارسینومای معده انسان (AGS) مورد بررسی قرار گرفت.

## روش بررسی

این مطالعه به‌صورت تجربی در شش ماهه اول سال ۱۴۰۳ در مراکز تحقیقاتی سلولی-تکوینی، بیوتکنولوژی و گیاهان دارویی مجتمع آزمایشگاهی دانشگاه آزاد اسلامی واحد

اتمام زمان انکوباسیون ۲۴ و ۴۸ ساعته، محیط رویی تیمار گردآوری شد و مقدار  $20 \mu\text{l}$  محلول MTT به هر چاهک اضافه گردید و انکوباسیون چهار ساعته صورت گرفت. در نهایت جذب نمونه‌ها توسط دستگاه (ELISA-reader, Awareness Technology, USA) با طول موج  $540 - 630 \text{ nm}$  خوانش گردید (۱۳). اطلاعات مربوط به اثر غلظت‌های مختلف عصاره اسپیرولینا پلاتنسیس بر رشد سلول AGS با شاخص  $\text{IC}_{50}$  (غلظتی از دارو که رشد سلول را نسبت به کنترل ۵۰ درصد کاهش می‌دهد) ارائه شدند.  $\text{IC}_{50}$ ها از طریق رسم منحنی‌های رشد سلول در برابر رقت‌های مختلف سوپرناتانت و از طریق رسم معادله رگرسیون غیر خطی منحنی‌های رشد سلول در برابر غلظت سوپرناتانت محاسبه گردید.

**سنجش بیان ژن:** به منظور بررسی میزان بیان ژن *BAD*، تعداد  $3 \times 10^5$  سلول در پلیت‌های ۶ خانه کشت داده شد، و سپس، با غلظت ۴۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر عصاره اسپیرولینا پلاتنسیس در بازه زمانی ۴۸ ساعت تیمار و انکوبه شدند. پس از گذشت زمان انکوباسیون ۴۸ ساعته، سلول‌ها در دو گروه؛ گروه تست شامل غلظت ۴۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر از عصاره اسپیرولینا پلاتنسیس و گروه کنترل، برداشت و پس از شستشو با بافر PBS، Total RNA سلولی با استفاده از معرف *RNX-PLUS* (RNX-PLUS Solution for total RNA) جدا گردید. به منظور انجام مرحله *Heat block* (isolation)، جدا گردید. به منظور انجام مرحله *Heat block* نمونه‌های حاصل از مرحله قبل در دستگاه ترموسایکلر با دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه قرار داده شدند. در ادامه تمام توالی‌های RNA با استفاده از کیت سنتز cDNA *PrimeScript<sup>TM</sup> RT Reagent kit (Perfect Real)* (Takara, Time)، به cDNA تبدیل و به فریزر -۲۰ درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. سنجش میزان بیان ژن *BAD* با استفاده از دستگاه *Real Time PCR* مدل *Rotor gene* (Rotor gene 3000 corbett, Australia) مورد ارزیابی قرار گرفت. برای انجام واکنش، مخلوط واکنشی متشکل از cDNA، به مقدار ۱ میکرولیتر، پرایمر رفت و برگشت هر کدام به مقدار ۰/۵ میکرولیتر، RNase-free water، به مقدار ۵/۵ میکرولیتر و

شهرکرد به صورت تجربی با مجوز اخلاق در پژوهش انجام شد. رده سلولی AGS از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران خریداری شد. در محیط کشت DMEM-F12 (Dulbecco's Modified Eagle's medium) (Gibco, USA) حاوی ۱۰ درصد FBS (Foetal Bovine Serum) (Gibco, USA) و یک درصد Penstrep (Penicillin-) (Gibco, USA) در انکوباتور (Streptomycin) (Gibco, USA) در انکوباتور (Germany) با فشار ۵ درصد گاز  $\text{CO}_2$ ، رطوبت ۹۰ درصد و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، در فلاسک کشت سلول ۷۵ سانتی‌متر مربع کشت داده شد. محیط کشت هفته‌ای سه بار تعویض و برای برداشت کردن سلول‌ها از محلول تریپسین/EDTA استفاده شد. اسپیرولینا پلاتنسیس به صورت آماده و به حالت جامد از شرکت دانش پژوهان قشم با نام تجاری اسپیرولینا (سوپر فود) تهیه گردید. برای تهیه عصاره از این ماده در مرکز تحقیقات گیاهان دارویی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، پودر اسپیرولینا پلاتنسیس درون فالکون ریخته شد و حلال اتانولی ۹۶ درصد به آن اضافه و اقدام به عصاره‌گیری با حرارت و درجه خلوص بالا شد (مدت زمان ۲۰ دقیقه). مایع حاصل توسط تبخیرکننده چرخشی در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد تا خروج کامل حلال استخراجی و دستیابی به عصاره غلیظ و ویسکوز تغلیظ گردید. عمل عصاره‌گیری سه بار تکرار گردید و تا زمان استفاده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

**سنجش بقای سلولی:** بقای سلولی رده AGS تیمار شده با غلظت‌های مختلف عصاره اسپیرولینا پلاتنسیس و گروه کنترل (فاقد تیمار و صرفاً در معرض محیط کشت) توسط تست MTT، با استفاده از کیت *CellTiter 96® Non-* (MTT Radioactive Cell Proliferation Assay) با شماره محصول G4000 مورد ارزیابی قرار گرفت. به این ترتیب که تعداد  $5 \times 10^3$  سلول در هر چاهک پلیت ۹۶ چاهکی کشت داده شد و سپس با غلظت‌های ۱۰ (گروه I)، ۲۰ (گروه II) و ۴۰ (گروه III) میکروگرم/ میلی‌لیتر عصاره اسپیرولینا پلاتنسیس برای مدت زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت تیمار و انکوبه گردید. پس از

## تجزیه و تحلیل آماری

نهایتاً بررسی آماری با استفاده از آزمون من‌ویتنی (به‌طور کلی آزمون ناپارامتریک به نرمال بودن یا نبودن توزیع داده‌ها حساس نیست و در هر شرایطی قابل استفاده است) از طریق نرم‌افزار SPSS version 16 انجام شد. حدود اطمینان برای همه آزمایشات ۹۵٪ در نظر گرفته شد و  $P < ۰.۰۵$  معنی‌دار محسوب گردید.

۱۲/۵ میکرولیتر مسترمیکس (Master Mix RT-PCR) (Ampliqon) تهیه گردید (۱۴). توالی پرایمرهای پیشرو (Forward) و پسرو (Reverse) ژن‌های *GAPDH* و *BAD* با استفاده از نرم افزار Oligo6 طراحی و سپس با Blast نمودن آنها در NCBI از صحیح بودن آنها اطمینان حاصل شد و نهایتاً توسط شرکت Macrogen سنتز شدند (جدول ۱). از ژن *GAPDH* به‌عنوان کنترل داخلی استفاده شد. سپس مخلوط واکنش پس از آماده‌سازی با حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر تحت تاثیر برنامه‌ی دمایی ذکر شده در (جدول ۲) قرار گرفت.

جدول ۱: مشخصات پرایمر مربوط به ژن‌های *GAPDH* و *BAD*

Official Name (gene)	Primers	Amplification size	Annealing Tem (°C)
1 <i>BAD</i>	F GGAGGATGAGTGACGAGTTTGTG	23	61
	R GGGTGGAGTTTCGGGATGT	19	
3 <i>GAPDH</i>	F GCCAAAAGGGTCATCATCTCTGC	23	64
	R GGTCACGAGTCCTTCCACGATAC	23	

جدول ۲: شرایط دمایی واکنش Rael Time PCR

۱ سیکل	۹۵ درجه سانتی گراد	۱۰ دقیقه	PCR initial denaturation step
	۹۵ درجه سانتی گراد	۱۵ ثانیه	Denaturation
۴۰ سیکل	۶۱ درجه سانتی گراد	۶۰ ثانیه	Annealing <i>BAD</i> gene
	۶۱ درجه سانتی گراد	۶۰ ثانیه	Annealing <i>GAPDH</i> gene

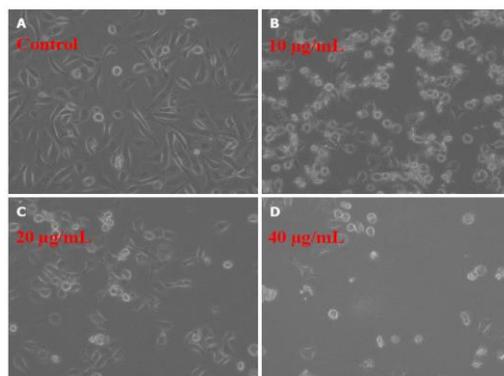
بقای سلولی و تعیین نقطه  $IC_{50}$ : آنچه که از نتایج تست MTT می‌توان برآورد کرد، این است که بقای سلولی سلول‌های رده آدنوکارسینومای معده انسان (AGS)، تحت تیمار با غلظت‌های مختلف عصاره جلبک اسپیرولینا پلاتنسیس (۱۰، ۲۰ و ۴۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر) ظرف مدت زمان انکوباسیون ۲۴ و ۴۸ ساعت، در سایر گروه‌های آزمایشی نسبت به گروه کنترل کاهش یافته است. این کاهش در هر دو زمان به صورت وابسته به زمان و دوز عصاره می‌باشد (نمودار ۱). در این پژوهش عصاره جلبک اسپیرولینا پلاتنسیس در نقطه  $IC_{50}$  به‌عنوان غلظتی که بقای سلولی را ۵۰ درصد کاهش می‌دهد ۴۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر بوده است (نمودار ۲). بقای سلولی

## نتایج

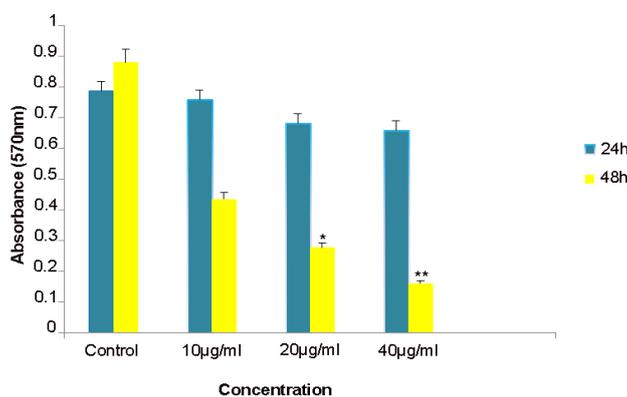
سنجش میکروسکوپی سلول‌های تحت تیمار: سلول‌های سرطانی AGS در غلظت‌های مختلف عصاره جلبک اسپیرولینا پلاتنسیس (۱۰، ۲۰ و ۴۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر) برای مدت زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت کشت داده شدند. تصویر زیر (شکل ۱، A-D) انکوباسیون سلول‌های تحت تیمار با غلظت‌های مختلف عصاره‌ی جلبک اسپیرولینا را نشان می‌دهد که مشاهدات میکروسکوپی حاکی از کاهش تعداد سلول‌ها در گروه‌های تحت تیمار در مقایسه با گروه کنترل به‌صورت وابسته به غلظت می‌باشد.

تغییر بیان ژن **BAD**: تیمار سلول‌های رده AGS با عصاره جلبک اسپیرولینا پلاتنسیس و انکوباسیون آن‌ها برای مدت ۴۸ ساعت نشان داد که میزان بیان ژن **BAD** افزایش یافته است. نمودار زیر (نمودار ۳) این افزایش بیان معنی‌دار را در ژن **BAD** براساس  $\Delta\Delta Ct$  نمایش می‌دهد.

سلول‌های رده AGS آدنوکارسینومای معده، در مقایسه با گروه کنترل در دوز ۲۰ ( $P < 0.001$ ) و ۴۰ ( $P < 0.0001$ ) میکرو-گرم / میلی‌لیتر در زمان انکوباسیون ۴۸ ساعت کاهش معنی‌داری را نشان داد.

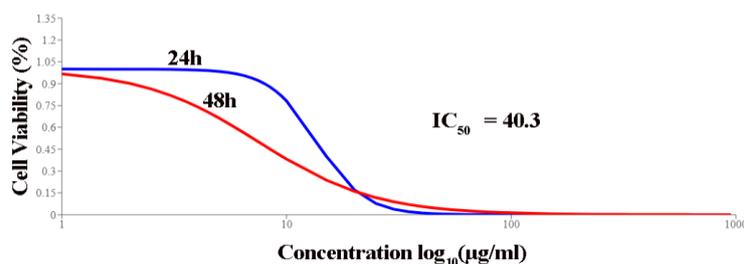


شکل ۱: تاثیر غلظت‌های مختلف عصاره جلبک اسپیرولینا پلاتنسیس بر رده سلولی AGS

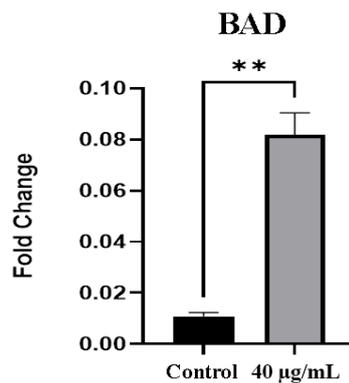


نمودار ۱: اثر عصاره جلبک اسپیرولینا پلاتنسیس بر بقای سلولی رده سلولی AGS در مدت زمان انکوباسیون ۲۴ و ۴۸ ساعت.

$P < 0.001$ ,  $P < 0.0001$  در مقابل گروه کنترل



نمودار ۲: غلظت ۴۰ میکروگرم / میلی‌لیتر عصاره جلبک اسپیرولینا پلاتنسیس در نقطه  $IC_{50}$  در روش MTT



نمودار ۳: نمودار میزان بیان ژن *BAD* بر اساس Ct در غلظت ۴۰ میکروگرم/میلی‌لیتر و زمان انکوباسیون ۴۸ ساعت.

$P < 0.001$  \*\* اختلاف معنی‌دار در مقابل گروه کنترل

خواص ضد توموری که توانایی جلوگیری از گسترش و رشد سلول‌های سرطانی را داشته باشند پیشرفت‌های قابل‌توجهی داشته است. با توجه به عوارض جانبی ترکیبات صناعی و داروهای فارماکولوژیک ضد سرطان، محققان همیشه در راستای یافتن ترکیبات طبیعی فاقد عوارض جانبی بوده‌اند و در این میان آبیان دریائی بواسطه فراوانی و تنوع بسیار بالای آن‌ها همواره قابل‌توجه قرار گرفته‌اند. یکی از مهم‌ترین این آبیان که آثار و فوائد فراوانی از سوی محققان علوم تغذیه برای آن بیان شده و کشفیات زیادی در خصوص خواص تغذیه‌ای و دارویی آن به‌دست آمده است، جلبک سبز - آبی اسپیرولینا پلاتنسیس می‌باشد. اسپیرولینا یکی از نوید بخش‌ترین ریز جلبک‌ها بوده که از سوی سازمان بهداشت جهانی به عنوان راه حل درمانی سودمند برای فردا و هم‌چنین به عنوان غذای برتر معرفی شده است. فواید و برتری این ریز جلبک نسبت به سایر منابع غذایی گیاهی و دیگر جلبک‌ها، بسیار زیاد و قابل توجه می‌باشد. اسپیرولینا پلاتنسیس به صورت بالقوه منبع بزرگی از ترکیباتی است که می‌توانند جهت تولید مواد اولیه فرآورده‌های غذایی استفاده شود. کاربرد اسپیرولینا پلاتنسیس و متابولیت‌های آن‌ها روند جالبی در بهبود ارزش فرآورده‌های غذایی سالم ایجاد کرده است. اسپیرولینا غنی‌ترین افزودنی به لحاظ پروتئین، اسیدهای چرب ضروری مثل گامالینولنیک، ویتامین‌ها خصوصاً ویتامین B12 و پیش‌ساز ویتامین A، مواد معدنی به‌خصوص آهن و

## بحث

یکی از معضلات امروزی در جوامع بشری سرطان معده می‌باشد که به‌عنوان یک بیماری چند عاملی در نتیجه تداوم آسیب‌های ناشی از مواجهه مداوم با عوامل سرطان‌زا ایجاد می‌شود. علی‌رغم کاهش قابل‌ملاحظه در بروز این نوع بدخیمی در طول دهه‌های گذشته، در اکثر کشورهای صنعتی هنوز این بیماری دومین علت شایع مرگ و میر افراد در اثر سرطان می‌باشد که سالیانه باعث مرگ حدود یک میلیون نفر در سرتاسر جهان می‌شود (۱۵،۱۶). مبتلایان به آدنوکارسینومای معده دارای بقاء ۵ ساله هستند و در بیش از ۹۰٪ موارد درمان تومور معدی با جراحی، تنها شانس درمانی می‌باشد. اما به دلیل اینکه در حال حاضر تشخیص زودهنگام سرطان معده امکان‌پذیر نیست و معمولاً تشخیص زمانی صورت می‌گیرد که سرطان به‌طور موضعی پیشرفت کرده است و به درون دیواره معده نفوذ نموده، این شانس به کمتر از ۳۰٪ کاهش می‌یابد (۱۷). لذا با توجه به افزایش روز افزون تعداد مبتلایان که شمار زیادی از آنها پس از گذراندن مراحل دشوار عمل‌های جراحی باز هم دچار عود بیماری می‌شوند و از آنجایی‌که مقاومت به مرگ سلولی و عدم وجود تعادل بین تقسیم سلولی و مرگ سلولی منجر به عدم کنترل تکثیر سلول‌های توموری می‌شود، امروزه نیاز به ترکیبات درمانی که قادر به مهار تکثیر سلول‌های توموری باشند، به شدت احساس می‌شود. امروزه تحقیق در راستای یافتن ترکیباتی با

در این تحقیق تیمار سلول‌های AGS سرطان معده، با دوز ۴۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر عصاره جلبک اسپیرولینا پلاتنسیس و انکوباسیون آن برای مدت ۴۸ ساعت، افزایش معنی‌دار میزان بیان ژن *BAD* ( $P < 0.001$ ) را نشان داد. به علاوه تحقیقات ارائه شده در زیر شواهد محکمی بر اثبات صداقت نتایج حاصل شده از تحقیق حاضر می‌باشند: پینرو و همکارانش در سال ۲۰۰۱، به بررسی ساز و کار عملکردی پروتئین فیکوسیاینین در عصاره جلبک اسپیرولینا پلاتنسیس پرداختند. نتایج حاصل از بررسی نشان داد که عملکرد آنتی-اکسیدانی عصاره جلبک اسپیرولینا پلاتنسیس به واسطه‌ی حضور پروتئین فیکوسیاینین اعمال می‌گردد (۱۸). رناتا و همکارانش، خواص ضد سرطانی ترکیب شمیایی تترا پیرول موجود در جلبک سبز- آبی اسپیرولینا پلاتنسیس را بر روی سلول‌های سرطانی پانکراس مورد بررسی قرار دادند. نتایج حاصل از بررسی نشان داد که این ترکیب باعث کاهش رشد سلول‌های سرطانی پانکراس تحت تیمار با اسپیرولینا می‌شود (۱۹). چینگ هیا و همکارانش، اثر آنتی‌اکسیدانی، ایمن‌سازی و ضدالتهابی جلبک اسپیرولینا پلاتنسیس را در موش و انسان مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد که با مصرف جلبک اسپیرولینا پلاتنسیس به‌عنوان مکمل غذایی فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی سلولی، مهار پراکسیداسیون چربی، فعالیت آنزیم سوپراکسیداز دیسموتاز و آنزیم کاتالاز افزایش می‌یابد (۲۰). لیو و همکارانش، به بررسی خواص ضد سرطانی ترکیب c-cp مشتق شده از جلبک اسپیرولینا پلاتنسیس پرداختند. نتایج نشان داد که این ترکیب دارای خواص آنتی‌اکسیدانی، ضد توموری و افزایش ایمنولوژیک دارد (۲۱).

### نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از تست MTT و RT-Real Time PCR صورت گرفته در تحقیق حاضر، حاکی از آن است که عصاره جلبک اسپیرولینا پلاتنسیس قادر است احتمالاً از طریق تاثیرگذاری بر بیان ژن آپوتوزی *BAD*، بقای سلولی سلول‌های سرطانی معده انسان را کاهش دهد و از این طریق در درمان سرطان معده مؤثر واقع گردند.

کلسیم، رنگدانه‌ها به‌خصوص فایکوسیاینین و سولفولپیدها می‌باشد. نداشتن دیواره سلولی سلول‌زی باعث شده که جذب مواد مغذی آن بسیار راحت‌تر صورت گیرد. کم بودن میزان اسید نوکلئیک (کمتر از ۰.۴٪) اسپیرولینا، یکی دیگر از برتری‌های این ریزجلبک نسبت به سایر منابع پروتئینی مشابه می‌باشد. اسپیرولینا به دلیل داشتن اجزا و ترکیبات آنتی‌اکسیدانی مانند فایکوسیاینین، سلنیوم، کارتنوئیدها اسیدچرب گامالینونیک عامل دارویی بالقوه‌ای جهت بیماری‌های القاء شده به‌وسیله تنش اکسیداسیونی می‌باشد. فیکوبیلی پروتئین موجود در اسپیرولینا به واسطه خاصیت جذب رادیکال‌های آزاد می‌تواند به عنوان داروی ضد سرطان و ضد تومور مورد استفاده قرار بگیرد. در نتیجه فراوانی ترکیبات زیستی مهم در اسپیرولینا، فرصت‌های جدیدی را در تولید محصولات غذایی فراسودمند فراهم می‌کنند که در این‌میان وعده‌های غذایی می‌توانند گزینه بسیار مناسبی برای غنی‌سازی با این ریزجلبک باشند (۸). در تحقیق حاضر نیز توانایی عصاره جلبک اسپیرولینا پلاتنسیس در تغییر بیان ژن رمزکننده‌ی پروتئین پروآپتوزی *BAD* دخیل در مسیر مرگ سلولی و جلوگیری از تکثیر و رشد سلول‌های آدنوکارسینومای معده، مورد بررسی قرار گرفت. در این تحقیق بقای سلولی سلول‌های تحت تیمار با عصاره جلبک اسپیرولینا پلاتنسیس از طریق کیت MTT مورد ارزیابی قرار گرفت. بدین صورت که سلول‌ها برای مدت زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت تحت تاثیر غلظت‌های مختلف عصاره جلبک اسپیرولینا پلاتنسیس (۱۰۲۰ و ۴۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر) انکوبه شدند و غلظتی از عصاره که سبب کاهش ۵۰ درصدی بقای سلولی می‌شود، محاسبه گردید. نتایج حاصل شده از این تست حاکی از آن می‌باشد که عصاره جلبک اسپیرولینا پلاتنسیس قادر است بقای سلولی سلول‌های سرطانی معده را در دوز ۴۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر به پایین‌ترین مقدار خود رساند. به‌علاوه در این تحقیق عصاره جلبک اسپیرولینا پلاتنسیس در تغییر بیان ژن آپوتوزی *BAD* دخیل در مسیر مرگ سلولی در سلول‌های رده AGS سرطان معده، مورد بررسی قرار گرفت.

## ملاحظات اخلاقی

پروپوزال این تحقیق توسط دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد تایید شده است (کد اخلاق: IR.IAU.SHK.REC.1403.266).

## مشارکت نویسندگان

لیلا روحی در ارائه ایده، لیلا روحی در طراحی مطالعه، جهانبخش دانیالی در جمع‌آوری داده‌ها، لیلا روحی و جهانبخش دانیالی در تجزیه و تحلیل داده‌ها مشارکت داشته و همه نویسندگان در تدوین، ویرایش اولیه و نهایی مقاله و پاسخگویی به سوالات مرتبط با مقاله سهیم هستند.

## سپاس‌گزاری

این مقاله حاصل پایان‌نامه تحت عنوان "بررسی اثر عصاره اسپیرولینا پلاتنسیس بر بقای سلولی و تغییر بیان ژن آپوپتوزی BAD در سلول‌های آدنوکارسینومای معده انسان AGS" در مقطع کارشناسی ارشد در سال ۱۴۰۳ دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد می‌باشد که با حمایت دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد انجام شده است.

حامی مالی: ندارد

تعارض در منافع: وجود ندارد.

## References:

- 1-Nasr Isfahani H, Rouhi L, Ziya Jahromi N, Khashei Varnamkhasti K. *Effect of citric acid on p53 and p21 genes expression of the human gastric Adenocarcinoma cell line (AGS)*. PJMS 2022; 18(4): 17-24. [Persian]
- 2-Molocea CE, Tsokanos FF, Herzig S. *Exploiting common aspects of obesity and cancer cachexia for future therapeutic strategies*. Curr Opin Pharmacol 2020;53:101-116.
- 3-Yang WJ, Zhao HP, Yu Y, Wang JH, Guo L, Liu JY, et al. *Updates on Global Epidemiology, Risk and Prognostic Factors of Gastric Cancer*. World J Gastroenterol 2023; 29(16): 2452-68.
- 4-Zaręba KP, Zińczuk J, Dawidziuk T, Poczynicz A, Guzińska-Ustymowicz K, Kędra B. *Stomach cancer in young people - a diagnostic and therapeutic problem*. Prz Gastroenterol 2019;14(4):283-285.
- 5-Broecker-Preuss M, Viehof J, Jastrow H, Becher-Boveleth N, Fuhrer D, Mann K. *Cell Death Induction by the BH3 Mimetic GX15-070 in Thyroid Carcinoma Cells*. J Exp Clin Cancer Res 2015; 34(1): 69.
- 6-Broecker-Preuss M, Becher-Boveleth N, Müller S, Mann K. *The BH3 Mimetic Drug ABT-737 Induces Apoptosis and Acts Synergistically with Chemotherapeutic Drugs in Thyroid Carcinoma Cells*. Cancer Cell Int 2016; 16(1): 27.
- 7-Zhu L, Li L, Li Y, Wang J, Wang Q. *Chinese Herbal Medicine as an Adjunctive Therapy for Breast Cancer*. Evid Based Complement Alternat Med 2016; 2016: 9469276.
- 8-Romanos M, Andrada-Serpa MJ, dos S, Ribeiro A, Yoneshigue-Valentin Y, Costa SS. *Inhibitory effect of extracts of Brazilian marine algae on human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1)-induced syncytium formation in vitro*. Cancer invests 2002; 20(1): 46-54.

- 9- Li L, Liu H, Zhang P. *Effect of Spirulina Meal Supplementation on Growth Performance and Feed Utilization in Fish and Shrimp: A Meta-Analysis*. Aquac Nutr 2022; 2022:8517733.
- 10- Karkos PD, Leong SC, Karkos CD, Sivaji N, Assimakopoulos DA. *Spirulina in clinical practice: evidence-based human applications*. Evid Based Complement Alternat Med 2011; 2011:531053.
- 11- Wang Z, Zhang X. *Inhibitory Effects of Small Molecular Peptides from Spirulina (Arthrospira) Platensis on Cancer Cell Growth*. Food Funct 2016; 7(2): 781-8.
- 12- Fayyad RJ, Ali ANM, Dwaish AS, Al-Abboodi AKA. *Anticancer Activity of Spirulina Platensis Methanolic Extracts Against L20B and MCF7 Human Cancer Cell Lines*. Plant Arch 2019; 19(1): 1419-26.
- 13- Malaki MS, Rouhi L, Khashei Varnamkhasti K. *Cytotoxic and Antimicrobial Effects of Lactobacillus Sakei on Human Colorectal Adenocarcinoma Cell Line (HT29) and Some Pathogenic Microorganisms*. Tehran Univ Med J 2021; 78(10): 644-50. [Persian]
- 14- Varnamkhasti KK, Tavakoli P, Rouhi L, Raisi S. *Cytotoxicity, Apoptosis Induction and Change of P53, PARP, P21 and Bcl-2 Genes Expression in the Human Anaplastic Thyroid Carcinoma Cells Line (SW-1736) with Curcumin*. Genetics & Applications 2021; 5(1): 10-17.
- 15- Caldas C, Carneiro F, Lynch HT, Yokota J, Wiesner GL, Powell SM, et al. *Familial Gastric Cancer: Overview and Guidelines for Management*. J Med Genet 1999; 36(12): 873-80.
- 16- Siegel RL, Kratzer TB, Giaquinto AN, Sung H, Jemal A. *Cancer statistics, 2025*. CA Cancer J Clin 2025;75(1):10-45.
- 17- Norouzinezhad F, Erfani H, Norouzinejad A, Ghaffari F, Kaveh F. *Epidemiological Characteristics and Trend in the Incidence of Human Brucellosis in Iran from 2009 to 2017*. J Res Health Sci 2021; 21(4): e00535.
- 18- Piñero Estrada JE, Bermejo Bescós P, Villar del Fresno AM. *Antioxidant Activity of Different Fractions of Spirulina Platensis Protean Extract*. Farmaco 2001; 56(5-7): 497-500.
- 19- Koničková R, Vaňková K, Vaníková J, Váňová K, Muchová L, Subhanová I, et al. *Anti-Cancer Effects of Blue-Green Alga Spirulina Platensis, A Natural Source of Bilirubin-Like Tetrapyrrolic Compounds*. Ann Hepatol 2014; 13(2): 273-83.
- 20- Wu Q, Liu L, Miron A, Klímová B, Wan D, Kuča K. *The Antioxidant, Immunomodulatory, and Anti-Inflammatory Activities of Spirulina: An Overview*. Archives of toxicology 2016; 90(8): 1817-40.
- 21- Liu Q, Huang Y, Zhang R, Cai T, Cai Y. *Medical Application of Spirulina Platensis Derived C-Phycocyanin*. Evid Based Complement Alternat Med 2016; 2016: 7803846

## Evaluation the influence of *Spirulina platensis* extract on cell viability and change the expression of apoptotic *BAD* gene in the AGS human gastric adenocarcinoma cells

Seyed Jahanbakhsh Daniyali<sup>1</sup>, Leila Rouhi<sup>\*1</sup>

### Original Article

**Introduction:** In this study, the influence of *Spirulina platensis* extract with anti-inflammatory, cancer prevention and immune system strengthening properties on cell viability and changes in *BAD* apoptotic gene expression in human gastric adenocarcinoma cells of the AGS line was investigated.

**Conclusion:** The results indicate that *Spirulina platensis* algae extract is able to reduce the cell survival of gastric adenocarcinoma cells by inducing *BAD* gene expression and preventing proliferation.

**Methods:** In the present experimental study, by culturing the AGS cell line in DMEM-12 medium with 10% fetal bovine serum and treating the cells at concentrations of 10, 20 and 40  $\mu\text{g/ml}$  of *Spirulina platensis* algae extract and incubating for 24 and 48 hours, cytotoxicity was examined using the MTT colorimetric method according to the kit instructions at both incubation times. The AGS line cells were then incubated with a concentration of *Spirulina platensis* extract at IC50 point (40  $\mu\text{g /mL}$ ) for 48 hours to assess the expression level of the *BAD* gene via real-time RT-PCR. Statistical analysis was accomplished using Mann-Whitney test using SPSS 16 software.

**Results:** The results of this study indicated that the cell viability of AGS gastric Adenocarcinoma cell line significantly decreased at concentration of 20 ( $P<0.001$ ) and 40 ( $P<0.0001$ )  $\mu\text{g/mL}$  compared to the control group. In addition, AGS cell line treatment with *Spirulina platensis* extract at a dose of 40  $\mu\text{g/mL}$  and 48 incubation time, showed a significant increased expression of *BAD* gene ( $P<0.001$ ).

**Conclusion:** The results indicate that *Spirulina platensis* extract can reduce the viability of gastric adenocarcinoma cells by inducing expression of *BAD* gene that preventing proliferation.

**Keywords:** Gastric Adenocarcinoma, Gene Expression, *BAD*, *Spirulina platensis*.

**Citation:** Daniyali S.J, Rouhi L. Evaluation the influence of *Spirulina platensis* extract on cell viability and change the expression of apoptotic *BAD* gene in the AGS human gastric adenocarcinoma cells. J Shahid Sadoughi Uni Med Sci 2026; 33(11): 9639-49

<sup>1</sup>Department of Biology, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

\*Corresponding author: Tel: 09126043305, email: Lrouhibiology@iau.ac.ir