دانشور پزشکی

دوماهنامه علمی–پژوهشی
دانشگاه شاهد
سال بیست‌وهفتم – شماره ۱۴۳
آبان ۱۳۹۸

تأثیر اسانس رزماری بر بیان ژن آنتی آپوپتوز BCL-XL در رده سلولی MCF-7 سرطان پستان

نویسندگان: مژگان شخص نیایی[1]، نرگس نیکونهاد[2*]، فاطمه حقیر السادات[3]

۱. کارشناسی ارشد ژنتیک، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه علم و هنر، یزد، ایران
۲. استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه علم و هنر، یزد، ایران
۳. استادیار، گروه علوم و فناوری‌های نوین، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی و درمانی شهید صدوقی، یزد، ایران

*نویسنده مسئول: نرگس نیکونهاد **E-mail: nikounahad_1976@yahoo.com**

دریافت: ۱۳۹۸/۰۶/۲۷
آخرین اصلاح‌ها: ۱۳۹۸/۰۸/۲۲
پذیرش: ۱۳۹۸/۰۹/۰۳

چکیده

مقدمه و هدف: سرطان پستان شایع‌ترین سرطان در میان زنان است که به طرق مختلف مورد درمان قرار می‌گیرد. در این راستا، استفاده از داروهای گیاهی به علت عوارض جانبی کمتر از اهمیت ویژه‌ای برخوردار بوده و ترکیبات موجود در گیاهان قادر به مهار تکثیر و رشد تومور می‌باشند. رزماری یکی از گیاهانی است که به دلیل خاصیت آنتی‌اکسیدانی می‌تواند دارای خواص ضدسرطانی از طریق اثر بر مسیرهای سلولی باشد. هدف از انجام این مطالعه ارزیابی اثر اسانس رزماری بر بیان ژن BCL-XL بر سرطان پستان است.

مواد و روش‌ها: به منظور ارزیابی سمیت سلولی اسانس رزماری سلول‌های MCF-7 به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در معرض غلظت‌های مختلفی از اسانس قرار گرفته و قابلیت زنده ماندن آنها با استفاده از روش MTT مورد بررسی قرار گرفت. سپس، سلول‌های MCF-7 به مدت ۲۴ ساعت در معرض اسانس قرار داده شدند تا میزان بیان ژن BCL-XL با استفاده از تکنیک Real Time PCR مورد سنجش قرار گیرد.

نتایج: نتایج نشان می‌دهد که مرگ سلولی وابسته به زمان و دوز است. تأثیر مقادیر مختلف اسانس بر میزان بقای سلول‌های سرطانی از نظر آماری معنی‌دار ($p<0.05$) بوده و کمترین درصد بقا در ۷۲ ساعت ۱۹ درصد است. نتایج Real Time PCR نشان‌دهنده‌ی کاهش بیان ژن BCL-XL بوده و وابسته به دوز است.

نتیجه‌گیری: اسانس رزماری دارای اثر سایتوتوکسیک بر روی سلول‌های سرطانی پستان بوده و با کاهش بیان ژن آنتی آپوپتوتیک BCL-XL می‌تواند سبب القای اثر ضد سرطانی باشد.

واژگان کلیدی: اسانس رزماری، ژن BCL-XL، سلول MCF-7، سرطان پستان

مقدمه

سرطان یکی از مهم‌ترین مشکلات سلامتی افراد جامعه و شایع‌ترین علت مرگ و میر در جهان است. سرطان حاصل رشد و تکثیر بی رویه سلول به علت جهش در DNA است. در نتیجه‌ی جهش‌های ایجاد شده در DNA پروتو انکوژن‌ها به انکوژن ها تبدیل می‌شوند و بیان آن‌ها تغییر می‌کند که منجر به افزایش تکثیر سلولی می‌گردد. در نتیجه یک سلول عادی به سلول تکثیر شونده بدخیم تبدیل می‌شود(۱, ۲). در بین انواع مختلف سرطان، سرطان پستان که ۲۳٪ همه سرطان‌ها در زنان را شامل می‌شود شایع‌ترین سرطان در بین زنان محسوب می‌شود و یکی از مهم‌ترین عوامل نگران‌کننده سلامتی زنان در جهان است(۳, ٤). سرطان پستان، به صورت تغییرات رشد خارج از کنترل سلول‌ها در بافت پستان تعریف می‌شود که این رشد غیر طبیعی در غدد تولید کننده شیر (لوبول‌ها) یا در مجاری که لوبول ها را به نوک پستان مرتبط می‌سازند (داکت)، ایجاد می‌گردد(۵). این سلول‌ها دارای رشد غیرطبیعی و نقص در فرآیند آپوپتوز می‌باشند نقص در آپوپتوز نقش مهمی در رشد سلول‌های سرطانی دارد. یکی از خانواده‌های ژنی درگیر در آپوپتوز میتوکندریایی، ژن‌های خانواده Bcl-2 می‌باشند. BCL-XL یک ژن آنتی آپوپتوتیک از خانواده Bcl-2 بوده و در غشای خارجی میتوکندری قرار دارد. این ژن سلول‌ها را از مرگ برنامه ریزی شده سلول محافظت می‌کند(٦). روش هایی که در درمان سرطان استفاده می‌شوند: شامل جراحی و رادیوتراپی، پیوند مغز استخوان، درمان ایمنوتراپی، هایپرتومی و شیمی‌درمانی است که بیشترین کاربرد را دارد. از عوارض این روش می‌توان به ریزش مو، اختلالات خواب، مشکلات حافظه و تمرکز اشاره کرد(۷). نظر به عوارض ناخوشایند داروهای شیمی‌درمانی، استفاده از گیاهان دارویی به علت عوارض جانبی کمتر از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. ترکیبات موجود در گیاهان قادر به مهار تکثیر و رشد تومور از طریق مسیرهای فیزیولوژیک هستند(۸). رزماری متعلق به خانواده‌ی Labiabida است. ترکیبات اصلی فعال رزماری عبارتند از اسید کافئیک، اسید رزمارینیک (RA)، اورسولیک اسید (UA)، اسید کارنوزیک (CA) و کارنوسول. تقریباً ۹۰٪ از کل فعالیت آنتی‌اکسیدانی رزماری از کارنوسول و اسیدکارنوزیک (CA) استخراج می‌شود(۹). با توجه به تأثیراتی که پلی فنل‌های موجود در رزماری بر روی بیان ژن‌های آپوپتوزی دارند، این تحقیق برای کاهش بیان ژن BCL-XL که عامل اصلی در ایجاد سلول‌های سرطانی هستند مهم واقع شده است.

هدف از انجام این مطالعه بررسی اثر اسانس رزماری بر بیان ژن BCL-XL در رده سلولیMCF-7 سرطان پستان است.

مواد و روش ها

مواد مورد نیاز

مواد مورد نیاز جهت کشت سلول (RPMI، Penicillin-streptomycin، Fetal bovine serum و ...) از شرکت BioIdea و Inocolon خریداری شد. کیت سنتز cDNA از شرکت پارس توس و کیت استخراج RNA از شرکت دنا زیست تهیه شد.

گیاه رزماری

گیاه رزماری از مرکز رشد واحدهای فناور گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی یزد تهیه و تا زمان استفاده به صورت خشک شده نگهداری شد.

استخراج اسانس

برای تهیه اسانس رزماری از دستگاه کلونجر استفاده شد. گیاه پودر شده در داخل ظروف بالن مخصوص ریخته شده و ۲/۳ بالن از آب مقطر پر و پس از ٦ ساعت اسانس گیری اسانس حاصل جمع آوری می‌شود. به دلیل اینکه چگالی اسانس کمتر از آب بوده روی آب قرار می‌گیرد. در نتیجه به وسیله شیر تخلیه دستگاه کلونجر اسانس از آب جدا شده و سپس اسانس به دست آمده در یخچال و دور از نور نگهداری می‌شود.

کشت سلول

رده سلولی سرطان پستان (MCF-7) از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه شد. ابتدا محیط کشت سلول در شرایط کاملاً استریل زیرهود ساخته شد. برای خارج کردن ویال سلولی حالت فریز، محیط کشت حاوی ۲۰٪ سرم ساخته شد. پس از ذوب ویال سلولی و پس از حذف محیط انجمادی، سلول‌ها در فلاسک حاوی مقدار کافی محیط کشت، کشت داده شدند.

بررسی اثر سایتوتوکسیسیتی اسانس رزماری

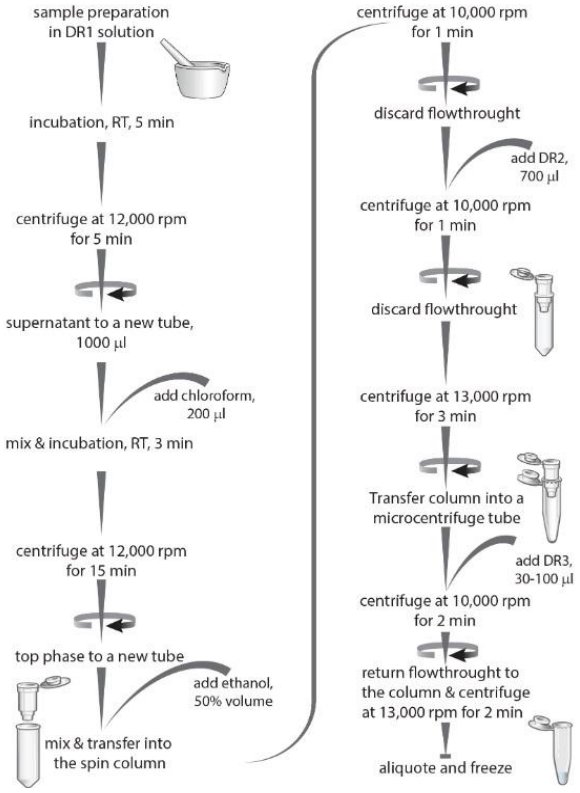
در این مرحله تعداد ۱۰٤ سلول MCF-7 در هر چاهک از پلیت ۹٦ خانه کشت داده شده و پس از ۲٤ ساعت در معرض غلظت‌های مختلفی از اسانس رزماری شامل ۵۰۰، ۲۵۰، ۱۲۵، ۱۰۰، ۵۰، ۲۵ و ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر قرار داده شد. سپس میزان بقای سلول‌ها در زمان‌های ۲٤، ٤۸ و ۷۲ ساعت با استفاده از تست MTT ارزیابی گردید. پلیت های قرار گرفته در معرض تیمارهای مختلف پس از طی زمان مورد نظر در معرض MTT و سپس DMSO قرار داده شدند. سپس در طول موج ۵۷۰ نانومتر توسط میکروپلیت ریدر نتایج قرائت گردید.

محاسبه IC50

برای به دست آوردن درصد توان حیاتی سلول‌ها در مقابل دوز مشخصی از اسانس رزماری محاسبه IC50 در هر یک از زمان‌های ۲٤، ٤۸ و ۷۲ ساعت انجام شد.

استخراج RNA

در این مرحله ابتدا سلول‌ها به تعداد ۵۰۰ هزار عدد درون هر چاهک از پلیت ٦ خانه اضافه شده و پس از چسبیدن سلول‌ها به کف، مقدار مناسبی از اسانس به هر چاهک اضافه شد. بعد از گذشت ۲٤ ساعت استخراج RNA مطابق دستورالعمل کیت خریداری شده (شرکت دنا زیست، مشهد)، انجام شد (تصویر ۱).



تصویر ۱. مراحل استخراج RNA

بررسی کمیت RNA

پس از استخراج RNA برای بررسی کمی آن از uv اسپکتروفوتومتری استفاده شد. برای تعیین میزان غلظت RNA، از دستگاه نانودراپ استفاده شد. بدین منظور از هر تیمار ۲ میکرولیتر RNA برداشته شد و بر روی دستگاه قرار گرفت. سپس میزان غلظت و نسبت A260/A280 تعیین شد که معیاری از میزان آلودگی با پروتئین‌ها و یا DNA را نشان می‌دهد.

بررسی کیفیت RNA

جهت اطمینان از کیفیت RNA استخراج شده، نمونه‌ها روی ژل آگارز ۲ درصد مشاهده شدند. ژل آگارز جهت جداسازی اسیدهای نوکلئیک در یک محیط الکتریکی استفاده می‌شود. ژل آگارز به مولکول‌ها اجازه حرکت می‌دهد، به‌طوری‌که قطعات کوچکتر سریع تر و بیشتر و قطعات بزرگتر کندتر در طول ژل حرکت می‌کنند.

سنتز cDNA

ساخت cDNA از RNA های استخراج شده توسط کیت RT – PCR kit ساخت شرکت پارس طوس مشهد انجام شد. بدین صورت که ۱ میکرولیتر از RNA سنتز شده به ترکیبات مورد اشاره در جدول۱ اضافه گردید. سپس، با استفاده از دستگاه PCR و براساس برنامه دمایی و زمانی اشاره شده در جدول ۲، cDNA سنتز شد.

جدول ۱. مواد مصرفی جهت سنتز cDNA

۳ میکرولیتر	Template RNA
۱۰ میکرولیتر	Buffer-Mix
۲ میکرولیتر	Enzyme Mix
۲۲ میکرولیتر	DEPC-treated water

جدول ۲. سیکل‌های سنتز cDNA

ردیف	مراحل	مدت زمان
۱	انکوبه شدن در دمای ۲۵ درجه	۱۰ دقیقه
۲	انکوبه شدن در دمای ۴۷ درجه	۶۰ دقیقه
۳	پایان واکنش با دمای ۸۵ درجه	۵ دقیقه

تنظیم پرایمرها

تنظیم پرایمرها مطابق (جدول۳) صورت گرفته است:

جدول ۳. مشخصات آغازگرها

نام ژن	توالی	TM	طول محصول
BCL-XL F	ATGGCAGCAGTAAAGCAAGC	۶۰	۱۴۹
BCL-XL R	CGGAAGAGTTCATTCACTACCTGT		
GAPDH F	AGCCACATCGCTCAGACAC	۶۰	۶۶
GAPDH R	GCCCAATACGACCAAATCC		

Real Time PCR

هدف از انجام واکنش Real Time PCR سنجش میزان بیان ژن BCL-XL تحت تأثیر اسانس رزماری است.

جهت انجام Real Time PCR ابتدا در این واکنش مواد زیر با غلظت‌های مناسب تهیه گردید (جدول ٤)

جدول ٤. مواد مصرفی جهت انجام Real Time PCR

مقدار	ماده
۵ میکرولیتر	SYBER-Green Master Mix
۱ میکرولیتر	Forward primer
۱ میکرولیتر	Revers primer
۰.۵ میکرولیتر	cDNA
۴ میکرولیتر	ddH20

میکروتیوب‌های حاوی مواد جدول ٤درون دستگاه Real Time قرار گرفت و بر اساس (جدول ۵) واکنش طی ٤۰ سیکل انجام گرفت.

جدول ۵. برنامه Real Time PCR

دما	زمان	مرحله
۹۵ درجه	۱۵ دقیقه	Pre- denaturing
۹۵ درجه	۲۰ ثانیه	Denaturing
۶۰ درجه	۴۰ ثانیه	Annealing

آنالیز آماری داده‌ها

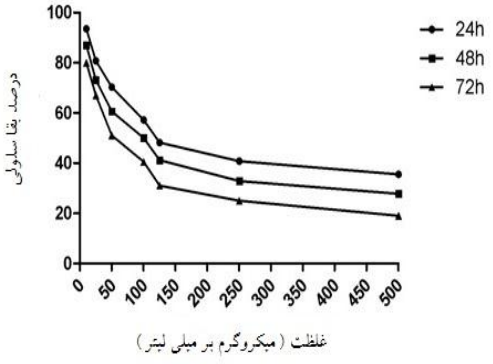
برای بررسی تأثیر اسانس بر در درصد بقا سلولی از آزمون MTT و میزان بیان ژن BCL-XL در سلول‌های تیمار شده با اسانس رزماری از Real Time PCR استفاده شد. آنالیز آماری داده‌های حاصل از مطالعه تأثیرات اسانس رزماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS (نسخه ۲۲) و تست‌های ANOVA و Student't-test صورت گرفته است.

نتایج

بررسی اثر سایتوتوکسیسیتی (سمیت سلولی) بر سلول‌های MCF-7

میزان سایتوتوکسیسیتی اسانس رزماری با استفاده از تست MTT بررسی شد. نتایج نشان داد که میزان سایتوتوکسیسیتی اسانس رزماری وابسته به دوز و زمان است. تأثیر اسانس رزماری در ۳ زمان ٢٤، ٤٨ و ٧٢ ساعت بر درصد بقا سلولی نشان داده شده است. پس از

گذشت ٢٤، ٤٨ و ٧٢ ساعت (در هر سه زمان) درصد بقای سلولی (viability) با افزایش غلظت اسانس کاهش یافته که این کاهش درصد با افزایش غلظت اسانس متناسب بوده است ($p<0.05$). نتایج نشان می‌دهد که در همه دوزها تفاوت معنی‌دار وجود دارد (نمودار ١).



نمودار ١. تأثیر اسانس رزماری بر درصد بقای سلولی در زمان‌های ٢٤، ٤٨ و ٧٢ ساعت

میزان IC50 در این مطالعه برای اسانس رزماری بر روی سرطان پستان، رده سلولی MCF-7 در زمان‌های ٢٤، ٤٨ و ٧٢ ساعت محاسبه و به ترتیب ١١٩/٢، ٩٧ و ٥٣ میکروگرم بر میلی‌لیتر است (جدول ٦).

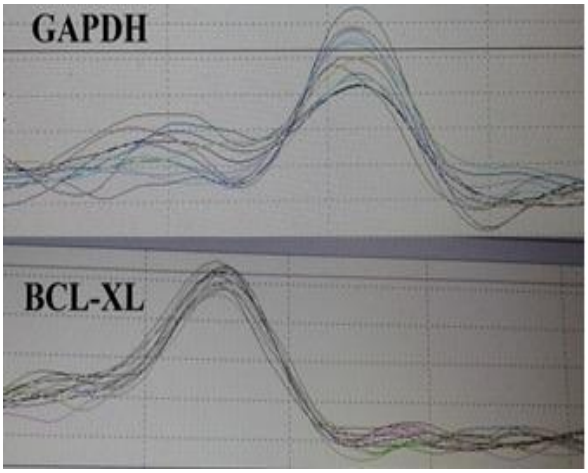
جدول ۶. IC50 برای اثر اسانس رزماری بر روی رده سلولی MCF-7

Time	IC50 (µg/ml)
۲۴ ساعت	۱۱۹/۲
۴۸ ساعت	۹۷
۷۲ ساعت	۵۳

بررسی بیان ژن BCL-XL تحت تأثیر اسانس رزماری

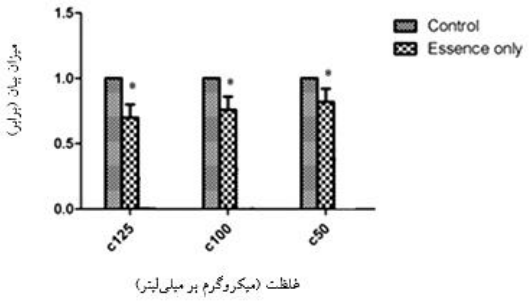
آنالیز منحنی ذوب مربوط به ژن‌های BCL-XL و GAPDH

یکی دیگر از ویژگی‌های دستگاه Real Time PCR رسم منحنی ذوب است. دمای ذوب به طول و تعداد نوکلئوتید ساختمان DNA و درصد GC بستگی دارد (نمودار ٢).



نمودار ۲. منحنی ذوب ژن‌هایBCL-XL و GAPDH در سلول‌های تیمار شده با اسانس رزماری. هر پیک نمایانگر یک محصول PCR است.

میزان بیان ژن BCL-XL در (نمودار ٣) نشان داده شده است. همان طور که مشاهده می‌گردد میزان بیان ژن BCL-XL به عنوان یک ژن مهار کننده آپوپتوز به صورت معناداری پایین آمده است و با افزایش غلظت اسانس نسبت به گروه کنترل کاهش یافته است (جدول ٧).



نمودار ۳. مقایسه میزان بیان ژن BCL-XL در سلول‌های تیمار شده با اسانس رزماری در Real Time.
*$p<0.05$ اختلاف معنادار با گروه کنترل را نشان می‌دهد.

جدول ۷. میزان بیان ژن BCL-XL در غلظت‌های مختلف از اسانس رزماری

ژن BCL-XL	
میزان بیان ژن (برابر)	غلظت (میکروگرم بر میلی‌لیتر)
۰/۷	اسانس با غلظت ۱۲۵
۰/۷۶	اسانس با غلظت ۱۰۰
۰/۸۲	اسانس با غلظت ۵۰
۱	کنترل

بحث و نتیجه‌گیری

سرطان بیماری است که در اثر تغییرات ژنتیکی غیرمعمول به واسطه جهش در ژن‌های مهار کننده تومور و انکوژن ها و اختلالات کروموزومی ایجاد می‌شود؛ اما اخیراً مشخص شده است که سرطان می‌تواند در اثر تغییرات اپی ژنتیکی نیز ایجاد شود. امروزه مشخص شده است که تغییرات اپی ژنتیکی به صورت مکرر در سرطان‌های مختلف روی می‌دهد(۱۰). اسانس رزماری به دلیل عوارض جانبی کمتر و خاصیت آنتی‌اکسیدانی که نسبت به داروهای شیمیایی دارد در درمان سرطان مورد استفاده قرار می‌گیرد. هدف از انجام این مطالعه بررسی اثر اسانس رزماری بر روی سلول‌های سرطان پستان می رده MCF-7 است.

جهت ارزیابی سمیت اسانس رزماری از آزمون MTT که یک ازمون استاندارد برای ارزیابی میزان بقاء سلول است استفاده شد. نتایج حاصل از این پژوهش به طور کلی، اثرات مهاری اسانس رزماری را بر رده سلولی سرطان پستان نشان داد. یافته‌های تحقیقاتی گذشته حاکی از این است که اسانس رزماری گسترش برخی از سلول‌های توموری را مهار می‌کند. در سال ۲۰۱۱، SUONG N. T. NGO و همکارانش اثر رزماری را بر روی سرطان کولورکتال بررسی کردند. نتایج تحقیقات آنها نشان می‌دهد که رزماری توانایی سرکوب کردن تومور در چندین اندام از جمله کولون، پستان، کبد، معده و همچنین ملانوم و سلول‌های لوسمی را دارد(۹). در سال 2015، Borrás-Linares و همکارانش فعالیت ضد سرطانی عصاره برگ رزماری را روی سلول‌های سرطانی روده بزرگ مورد سنجش قرار دادند. آن ها در تحقیقاتشان به این نتیجه رسیدند که کارنوسیک اسید، کارنوسول، ۱۲-متوکسی کارسونیک اسید، taxodione، hinokione و بتولینیک اسید کاندیدهای مشهوری هستند که به فعالیت ضد تکثیری گیاه رزماری در سرطان روده بزرگ کمک کردند(۱۱). در سال ۲۰۱۵، Margarita Gonzalez-Vallinas و همکارانش اثر عصاره رزماری به عنوان یک عامل بالقوه در درمان سرطان بررسی کردند. در گزارش‌ها آن‌ها آمده است که رزماری دارای فعالیت ضد سرطان در مطالعات In Vitro و حیوانی است. خاصیت ضد توموری رزماری به دلیل فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن است. نتایج حاصل از تحقیقات آن‌ها نشان می‌دهد که عصاره رزماری خاصیت ضد توموری مختلف در طیف گسترده‌ای از انواع سرطان را دارد. مفید بودن این عصاره به عنوان عامل مکمل برای بیماران خاص سرطان است(۱۲). در سال ۲۰۱٦، A Valdés و همکارانش اثرات رزماری بر گسترش سلول‌های سرطانی روده بزرگ را بررسی کردند. این گروه در تحقیقاتشان بر سه حوزه تمرکز کردند: ۱. اثرات دامنه و سینتیک پروتئین ۲. تفاوت پروتئومیک بین اثرات سیتواستاتیک و سیتوتوکسیک ۳. مکانیسم ضد انعقادی ناشی از پلی فنول های رزماری . A Valdés و همکارانش توضیح می‌دهند که رزماری دارای مزایای بسیاری است. فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالا رزماری به دلیل وجود ترکیبات پلی فنول آن در سطوح مختلف مولکولی برای تغییر بیان پروتئین است . در نهایت این گروه تحقیقاتی متوجه شد که پلی فنول های رزماری منجر به تغییر پروتئومیک در سلول‌های سرطانی روده بزرگ می‌شود(۱۳).

در سال ۲۰۱۷، CHIŞ Maria-Simona و همکارانش یک بررسی جامع در مورد فعالیت ضد سرطانی اسانس رزماری انجام دادند. نتایج حاصل از آزمایش‌هایشان نشان می‌دهد که اسانس رزماری به دلیل وجود ترکیبات زیست فعال مانند کارنوسول، کارنوسیک اسید، رزمارینیک اسید و کافور می‌تواند اثرات مثبت بر انواع مختلف سرطان داشته باشد(۱٤).

در مرحله بعد تأثیر اسانس رزماری بر بیان ژن‌های BCL-XL بر روی رده سلول سرطانی MCF-7 توسط تکنیک Real Time PCR مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان می‌دهد اسانس رزماری باعث کاهش بیان ژن BCL-XL گردیده است. نتایج تحقیقات صورت گرفته بر روی اسانس گیاهان مختلف بر بیان ژن‌های آنتی‌آپوپتوز در انواع سرطان‌ها نشان‌دهنده‌ی کاهش بیان این ژن‌ها است. در سال ۲۰۱۷، رحیم احمدی و همکارانش تأثیر عصاره برگ سدر بر بیان ژن BCL-2 بر روی رده سلولیMCF-7 مورد بررسی قرار دادند. نتایج حاکی از این است که عصاره برگ سدر باعث کاهش بیان ژن BCL-2 شده است(۱۵). در سال ۲۰۱۵، شیما غفاری و همکارش اثر اسانس گیاه افوربیا کاندیلوکارپا بر بیان ژن BCL-2 در سرطان پستان مورد آزمایش قرار دادند. نتایج نشان می‌دهد که اسانس این گیاه باعث کاهش بیان ژن BCL-2 گردیده است(۱٦). مواد موجود در گیاهان دارویی به دلیل همراه بودن با مواد دیگر از حالت تعادل بیولوژیکی برخوردار بوده در نتیجه به علت اینکه در بدن تجمع نمی‌یابند نسبت به داروهای شیمیایی دارای مزیت هستند. اسانس رزماری دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی به علت وجود ترکیباتی همچون ترکیبات فنولی، رزمارینیک اسید، کافئیک اسید، کارنوزول و فلاوونوئیدها است. رزماری هم به علت دارا بودن خاصیت آنتی‌اکسیدانی که دارد می‌تواند بر روی سرطان مورد بررسی قرار بگیرد. نتایج این مطالعه نشان داد که اسانس رزماری دارای خاصیت ضد سرطانی بر روی سلولی سرطانی پستان رده MCF-7 وابسته به دوز و زمان است که با افزایش غلظت اسانس و زمان میزان سایتوتوکسیسیتی اسانس رزماری هم بیشتر می‌شود و اسانس رزماری باعث کاهش بیان ژن BCL-XL می‌شود.

تعارض منافع: تعارض منافع وجود ندارد.

منابع

1. DeSantis C, Ma J, Bryan L, Jemal A. Breast cancer statistics, 2013. CA: a Cancer Journal for Clinicians 2014;64(1):52-62.
2. Fiaschi T, Chiarugi P. Oxidative stress, tumor microenvironment, and metabolic reprogramming: a diabolic liaison. International Journal of Cell Biology 2012.
3. Nafissi N, Saghafinia M, Motamedi MHK, Akbari ME. A survey of breast cancer knowledge and attitude in Iranian women. Journal of Cancer Research and Therapeutics 2012;8(1):46.
4. Banegas MP, Bird Y, Moraros J, King S, Prapsiri S, Thompson B. Breast cancer knowledge, attitudes, and early detection practices in United States-Mexico border Latinas. Journal of Women's Health 2012;21(1):101-7.
5. Allred DC. Ductal carcinoma in situ: terminology, classification, and natural history. Journal of the National Cancer Institute Monographs 2010;2010(41):134-8.
6. Schott A, Apel I, Nunez G, Clarke M. Bcl-XL protects cancer cells from p53-mediated apoptosis. Oncogene 1995;11(7):1389-94.
7. Nooshinfar E, Bashash D, Mohamadi G , Taghavi A, Shahani M, Hoseini L, et al. Melatonin and its importance in Breast cancer prevention and treatment (A purposed review article). The Iranian Journal of Obstetrics, Gynecology and Infertility 2014;17(118):10-21.
8. Mohammadi-Motlagh H-R, Mansouri K, Mostafaie A. Plants as useful agents for angiogenesis and tumor growth prevention. Physiology and Pharmacology 2010;14(3):302-17.
9. Ngo SN, Williams DB, Head RJ. Rosemary and cancer prevention: preclinical perspectives. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 2011;51(10):946-54.
10. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. Nature 2001;414(6859):105.
11. Borrás-Linares I, Pérez-Sánchez A, Lozano-Sánchez J, Barrajón-Catalán E, Arráez-Román D ,Cifuentes A, et al. A bioguided identification of the active compounds that contribute to the antiproliferative/cytotoxic effects of rosemary extract on colon cancer cells. Food and Chemical Toxicology 2015;80:215-22.

12. González-Vallinas M, Reglero G ,Ramírez de Molina A. Rosemary (Rosmarinus officinalis L.) extract as a potential complementary agent in anticancer therapy. Nutrition and Cancer 2015;67(8):1223-31.

13. Valdés A, Artemenko KA, Bergquist J, García-Cañas V, Cifuentes A. Comprehensive proteomic study of the antiproliferative activity of a polyphenol-enriched rosemary extract on colon cancer cells using nanoliquid chromatography–orbitrap MS/MS. Journal of Proteome Research 2016;15(6):1971-85.

14. Chiș M, Muste S, Păucean A, Man S, Mureșan V, Călian I. A comprehensive review about anticancer and antimicrobial activities of rosemary oil (Rosmarinus officinalis L). Hop and Medicinal Plants 2017;25(1/2):28-37.

15. The effect of hydroalcoholic Ziziphus spina-christi leaf extract on viability of breast cancer cell line (MCF7) and evaluation of Bax and Bcl2 genes expression level. Journal of Kashan University of Medical Sciences 2017; 21(5): 406-412.

16. Ghaffari S, Ahangari Kohan R. Evaluation of the Ephorbia condylocarpa anti-proliferative effects on MCF7 breast cancer cell line and evaluation of apoptotic genes, Bax and Bcl2, expression. Islamic Azad University, East Tehran Branch, Science Faculty, 2015.

Daneshvar

Medicine

Scientific-Research Journal of Shahed University
27th Year, No.143
October- November 2019

Effect of rosemary essential oil on the expression of *BCL-XL*, an anti-apoptotic gene, in MCF-7 cell line breast cancer

Mozhgan Shakhseniaie[1], Narges Nikoonahad Lotfabadi[1*], Fatemah Haghirossadat[2]

1. Biology Department, Faculty of Sciences, Science and Arts University, Yazd, Iran.
2. Department of Advanced Medical Sciences and Technologies, School of Paramedicine, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran.

***Corresponding author e-mail: nikounahad_1976@yahoo.com**

Abstract

Background and Objective: Breast cancer is the most common cancer among women, which is treated via several ways. The use of herbal medicines is very important because of their fewer side effects and compounds of the plants can inhibit the proliferation and growth of the tumor. Rosemary is one of the herbs that due to its antioxidant properties can have anti-cancer properties through cellular pathways. The aim of this study was to evaluate the effect of rosemary extract on *BCL-XL* gene expression in breast cancer cells.

Materials and Methods: In order to evaluate the cellular toxicity of rosemary essential oil, MCF-7 cells were exposed to different concentrations of essential oil for 24, 48 and 72 hours, and their survival was investigated using MTT assay. Then, MCF-7 cells were exposed to essential oil for 24 hours to determine the *BCL-XL* gene expression using the Real Time PCR technique.

Results: The results indicate that cell death is time- and dose-dependent. The effect of different amounts of essential oil on the survival rate of cancer cells was statistically significant ($p<0.05$) and the lowest survival rate at 72 hours was 19%**.** Real Time PCR results show that the expression of the *BCL-XL* gene reduced and this reduction is dose-dependent.

Conclusion: Rosemary essential oil has cytotoxic effect on breast cancer cells and can induce anticancer effects by decreasing the expression of *BCL-XL*, an anti-apoptotic gene.

Keywords: Rosemary essence, *BCL-XL* gene, MCF-7 cell, Breast cancer

Received: 18/09/2019
Last revised: 03/11/2019
Accepted: 24/11/2019

Daneshvar(medicine) shahed University/ 27th year/2019 /NO.143