



دانشگاه علوم پزشکی  
و خدمات بهداشتی درمانی اردبیل

دانشگاه علوم پزشکی اردبیل

دانشکده پزشکی

پایان نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد بیوشیمی بالینی

عنوان:

بررسی تاثیر اسید رتینوئیک تمام ترانس و عصاره هیدروآلکلی دندلیون بر  
میزان بقای رده های سلولی سرطان سینه و بیان ژن های سرکوبگر توموری p53،  
KAI1 و NM23 و آنزیم های متاستاتیک MMP-2 و MMP-9 و ژن  $IL1\beta$  در آنها

نگارش:

حامد رضایی میرزائق

اساتید راهنما:

دکتر رضا علی پناه مقدم

دکتر فرهاد جدی

اساتید مشاور:

دکتر علی نعمتی

مهر ماه ۱۴۰۰

شماره پایان نامه: ۰۶۸



## فهرست مطالب

صفحه	عنوان
۱.....	چکیده:
<b>فصل اول: مقدمه</b>	
۳.....	(۱-۱) اهمیت موضوع و انگیزه تحقیق.....
۴.....	(۱-۲) اهداف و فرضیات طرح.....
۵.....	(۱-۲-۱) هدف کلی طرح.....
۵.....	(۱-۲-۲) اهداف اختصاصی طرح.....
۵.....	(۱-۲-۳) فرضیات.....
۶.....	(۱-۳) تعریف واژه های اختصاصی.....
<b>فصل دوم: بررسی متون</b>	
۷.....	(۲-۱) بیولوژی سرطان.....
۷.....	(۲-۲) اپیدمیولوژی سرطان.....
۸.....	(۲-۳) سرطان سینه.....
۹.....	(۲-۳-۱) تشخیص و پاتوفیزیولوژی سرطان سینه.....
۱۰.....	(۲-۴) اپیدمیولوژی سرطان سینه.....
۱۱.....	(۲-۵) علل ایجاد کننده سرطان سینه.....
۱۱.....	(۲-۵-۱) فاکتور جنس، سن و گروه خونی.....
۱۱.....	(۲-۵-۲) عوامل هورمونی.....
۱۲.....	(۲-۵-۳) عامل وراثت.....
۱۲.....	(۲-۵-۴) سبک زندگی.....
۱۳.....	(۲-۶) ژن های بررسی شده در این مطالعه.....
۱۳.....	(۲-۶-۱) ژن P53.....
۱۳.....	(۲-۶-۲) ژن NM23.....
۱۴.....	(۲-۶-۳) ژن KAI1.....

۱۵.....	MMP-2 و MMP-9 ژن (۲-۶-۴)
۱۶.....	No table of contents entries found. ژن اینترلوکین ۱ بتا (۲-۶-۵)
۱۶.....	Dandelion گیاه (۲-۷)
	(۲-۷-۱) خواص تغذیه ای ، شیمیایی و بیولوژیکی دندلیون.
۱۷.....	
۱۹.....	تاراکستترول..... (۲-۷-۲)
۱۹.....	کلروژنیک و اسید شیکوریک..... (۲-۷-۳)
۱۹.....	سایر ریزمغذی های موجود در دندلیون..... (۲-۷-۴)
۲۰.....	آترا (ATRA) all-trans retinoic acid..... (۲-۸)
۲۱.....	بررسی مطالعات مشابه:..... (۲-۹)

### فصل سوم: مواد و روش کار

۲۳.....	گروههای مورد مطالعه..... (۳-۱)
۲۳.....	مواد و لوازم مورد نیاز:..... (۳-۲)
۲۳.....	مواد و لوازم مورد نیاز برای تهیه عصاره..... (۳-۲-۱)
۲۴.....	مواد و لوازم مورد استفاده برای بخش کشت سلولی..... (۳-۲-۲)
۲۴.....	مواد و لوازم مورد استفاده برای بخش مولکولی..... (۳-۲-۳)
۲۵.....	روش تهیه عصاره هیدرو الکلی گیاه دندلیون..... (۳-۳)
۲۵.....	دفریز کردن سلول ها..... (۳-۴)
۲۶.....	فریز کردن سلول ها..... (۳-۵)
۲۷.....	کشت سلول های سرطانی MCF7 و MDA-MB231..... (۳-۶)
۲۷.....	شمارش تعداد سلول با لام نئوبار..... (۳-۷)
۲۷.....	انجام آزمایش زنده مانی به روش MTT..... (۳-۸)
۲۸.....	تعیین غلظت های مورد نظر برای مواجهه سلولی..... (۳-۹)
۲۸.....	تهیه غلظت های آترا، و عصاره دندلیون مورد استفاده در تیمار با سلول ها..... (۳-۱۰)
۲۹.....	طراحی پرایمر با نرم افزار اولیگو ۷..... (۳-۱۱)
۲۹.....	استخراج RNA از گروه های مورد مواجهه..... (۳-۱۲)



## فهرست اشکال، جداول و نمودارها

شکل ۱-۲: گیاه دندلیون.....	۱۷
جدول ۳-۱: گروه های مورد مطالعه .....	۲۳
جدول ۳-۲: برنامه دمایی ترموسایکلر برای سنتز cDNA .....	۳۳
جدول ۳-۳: برنامه دمایی ریل تایم .....	۳۴
جدول ۴-۱: درصد زنده مانی رده سلولی MCF7 در مواجهه با غلظت های مختلف آترا.....	۳۶
جدول ۴-۲: درصدهای زنده مانی رده سلولی MCF7 در مواجهه با غلظت های مختلف دندلیون.....	۳۶
جدول ۴-۳: درصد زنده مانی رده سلولی MCF7 در مواجهه با غلظت های ثابت آترا و غلظت های مختلف دندلیون.....	۳۷
جدول ۴-۴: درصد زنده مانی رده سلولی MCF7 در مواجهه با غلظت های ثابت دندلیون و غلظت های مختلف آترا.....	۳۷
نمودار ۴-۱: نتایج آزمایش MTT سلولهای رده MCF-7 تحت تاثیر غلظت های افزایشی آترا .....	۳۸
نمودار ۴-۲: نتایج آزمایش MTT سلولهای رده MCF-7 تحت تاثیر غلظت های افزایشی دندلیون.....	۳۹
نمودار ۴-۳: نتایج آزمایش MTT سلولهای رده MCF-7 تحت تاثیر غلظت های ثابت آترا و غلظت های مختلف دندلیون.....	۴۰
نمودار ۴-۴: نتایج آزمایش MTT سلولهای رده MCF-7 تحت تاثیر غلظت های ثابت دندلیون و غلظت های مختلف آترا.....	۴۱
جدول ۴-۵: درصد زنده مانی رده سلولی MDA-MB231 در مواجهه با غلظت های مختلف آترا.....	۴۲
جدول ۴-۶: درصد زنده مانی رده سلولی MDA-MB231 در مواجهه با غلظت های مختلف دندلیون.....	۴۲
جدول ۴-۷: درصد زنده مانی رده سلولی MDA-MB231 در مواجهه با غلظت های ثابت آترا و غلظت های مختلف دندلیون.....	۴۳
جدول ۴-۸: درصد زنده مانی رده سلولی MDA-MB231 در مواجهه با غلظت های ثابت دندلیون و غلظت های مختلف آترا.....	۴۳
نمودار ۴-۵: نتایج آزمایش MTT سلولهای رده MDA-MB231 تحت تاثیر غلظت های افزایشی آترا.....	۴۴
نمودار ۴-۶: نتایج آزمایش MTT سلولهای رده MDA-MB231 تحت تاثیر غلظت های افزایشی دندلیون.....	۴۴
نمودار ۴-۷: نتایج آزمایش MTT رده سلولی MDA-MB231 در مواجهه با غلظت های ثابت آترا و غلظت های مختلف دندلیون.....	۴۵

نمودار ۴-۸ : نتایج آزمایش MTT رده سلولی MDA-MB231 در مواجهه با غلظت های ثابت دندلیون و غلظت های مختلف  
آترا.....۴۶

نمودار ۴-۹:میزان بیان ژن MMP-2 در رده ی سلولی MCF-7.....۴۸

نمودار ۴-۱۰: میزان بیان ژن MMP-2 در رده سلولی MDA-MB231.....۴۹

نمودار ۴-۱۱: میزان بیان ژن MMP-9 در رده سلولی MCF-7.....۵۱

نمودار ۴-۱۲: میزان بیان ژن MMP-9 در رده سلولی MDA-MB231.....۵۲

نمودار ۴-۱۳: میزان بیان ژن p53 در رده سلولی MCF-7 ..... ۵۴

نمودار ۴-۱۴: میزان بیان ژن p53 در رده سلولی MDA-MB231.....۵۵

نمودار ۴-۱۵: میزان بیان ژن KAI1 در رده سلولی MCF-7.....۵۷

نمودار ۴-۱۶: میزان بیان ژن KAI1 در رده سلولی MDA-MB23.....۵۸

نمودار ۴-۱۷: میزان بیان ژن NM23 در رده سلولی MCF-7.....۶۰

نمودار ۴-۱۸: میزان بیان ژن NM23 در رده سلولی MDA-MB231-.....۶۱

نمودار ۴-۱۹: میزان بیان ژن IL1 $\beta$  در رده سلولی MCF-7.....۶۳

نمودار ۴-۲۰: میزان بیان ژن IL1 $\beta$  در رده سلولی MDA-MB231-.....۶۴

## اختصارات:

MDA-MB231	M.D. Anderson Metastasis Breast cancer-231
MCF-7	Michigan Cancer Foundation-7
MMP-2	Metalloproteinase-2
MMP-9	Metalloproteinase-9
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide
FBS	Fetal Bovin Serum
DMSO	Dimethyl Sulfoxide
DMEM	Dulbecco's Modified Eagla Medium
PBS	Phosphate Buffered Saline
ATRA	all-trans retinoic acid
IL-1 $\beta$	Interleukin 1-beta



بررسی تاثیر اسید رتینوئیک تمام ترانس و عصاره دندلیون بر میزان بقای رده های سلولی سرطان سینه و تغییرات بیان ژن های سرکوبگر توموری p53، KAI1 و NM23 و آنزیم های متاستاتیک MMP-2 و MMP-9 و ژن  $IL1\beta$  در آنها

### چکیده:

زمینه: سرطان سینه جزو شایعترین سرطان ها در زنان سرتاسر جهان و ایران محسوب می گردد که سالانه با مرگ و میر زیادی همراه می باشد. یکی از علل اصلی مرگ و میر در این سرطان تهاجم بافتی سلول های سرطانی به بافتهای دیگر و تکثیر سریع آن می باشد. بنابراین یافتن راهی برای مقابله با تکثیر سریع و تهاجم بافتی این سرطان ضروری بنظر می رسد.

هدف: در این مطالعه ما تاثیر دندلیون و یا ترکیب آن با آترا را روی بیان ژن های موثر در تکثیر و متاستاز سلول های سرطانی سینه بررسی کردیم.

مواد و روش ها: در این تحقیق ما از دو رده سلولی سرطان سینه MCF-7 و MDA-MB-231 استفاده کردیم. گروههای مورد آزمایش شامل: کنترل، آترا، دندلیون و ترکیب آترا و دندلیون بودند.  $IC_{50}$  آترا، دندلیون و یا ترکیب آترا و دندلیون توسط آزمایش MTT تعیین شد. میزان بیان ژنهای p53، KAI1، NM23، MMP-2، MMP-9 و  $IL1\beta$  به روش Real-time PCR بررسی شد.

نتایج: مقادیر  $IC_{50}$  برای آترا در رده های سلولی MCF-7 و MDA-MB231 به ترتیب ۴۸ و ۱۴۹ میکرو مولار و برای دندلیون به ترتیب ۱/۶۹ و ۵/۹ mg/ml محاسبه شد. میزان بیان MMP-2 در گروههای آترا، دندلیون و ترکیبی در رده MCF-7 نسبت به کنترل افزایش و در

رده MDA-MB231 کاهش یافته بود ( $P < 0.001$ ). در هر دو رده سلولی تیمار شده با آترا، دندلیون و نیز ترکیبی میزان بیان MMP-9 و IL1 $\beta$  در مقایسه با کنترل کاهش یافته بود ( $P < 0.001$ ). در هر دو رده سلولی تیمار شده با آترا، دندلیون و نیز ترکیبی میزان بیان KAI1 در مقایسه با کنترل افزایش یافته بود ( $P < 0.001$ ). در رده سلولی MCF-7 میزان بیان NM23 در هر سه گروه آترا، دندلیون و ترکیبی در مقایسه با کنترل کاهش یافته بود ( $P < 0.001$ ). در رده سلولی MDA-MB231 میزان بیان NM23 در گروه های آترا و ترکیبی در مقایسه با کنترل کاهش ولی در گروه دندلیون افزایش یافته بود ( $P < 0.001$ ). در رده سلولی MCF-7 بیان p53 در هر سه گروه آترا، دندلیون و ترکیبی در مقایسه با کنترل افزایش ولی در رده سلولی MDA-MB231 میزان بیان p53 فقط در گروه دندلیون افزایش یافته بود ( $P < 0.001$ ).

**نتیجه گیری:** با توجه به داده های این مطالعه برای اولین بار مشخص شد دندلیون و یا ترکیب آن با آترا می تواند بیان ژن های p53، KAI1، NM23، MMP-2، MMP-9، و IL1 $\beta$  که در تکثیر و تهاجم سلول های سرطانی سینه MCF-7 و MDA-MB231 نقش دارند را تحت تاثیر قرار دهد.

**کلمات کلیدی:** سرطان سینه، آترا، دندلیون، متاستاز، ژنهای سرکوبگر توموری