

اثر *Allium cepa* بر مهار رشد سلول‌های توموری در موش BALB/c مدل سرطان پستان

پریسا کریشچی خیابانی*، سایه بیداران

گروه زیست‌شناسی، واحد شهر قدس، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

چکیده

تاریخ دریافت: ۹۵/۱۱/۱۲

تاریخ پذیرش: ۹۶/۰۴/۰۴

مقدمه و هدف مطالعه عوامل مؤثر در تنظیم و تعدیل تعادل سیتوکینی در جهت مهار رشد و گسترش سلول‌های سرطان پستان در زنان اهمیت ویژه‌ای دارد. در این مطالعه اثر *Allium cepa* بر بازدارندگی رشد سلول‌های سرطان پستان در موش ماده BALB/c و مبتلا شده با القای رده سلولی 4T1 بررسی شد.

در تحقیق حاضر، از موش‌های BALB/c ماده مبتلا به سرطان پستان با تزریق و القای رده سلولی موشی (4T1) استفاده شد. در هر گروه سالم، بیمار بدون درمان و گروه تجربی که همراه با القا بیماری، پیاز را با جیره غذایی دریافت می‌کردند، به‌طور تصادفی هشت رأس موش قرار گرفت. به‌صورت روزانه ریشه پیاز قرمز (*Allium cepa*) پس از شستشو کامل آبگیری شد و به هر سر موش در گروه تجربی ۰/۱ ml/100gBW/day عصاره پیاز به‌صورت یک نوبت در روز خورانده شد. هفت هفته پس از القای بیماری توسط رده سلولی 4T1، به موش‌ها بیهوشی عمیق داده شد. طی این هفت هفته، به‌طور یک روز در میان موش‌ها توزین و به‌دنبال پیدایش تومور تا پایان هفته هفتم حجم تومور با کولیس اندازه‌گیری شد. وزن تومور بعد از خروج از بدن توزین شد. طحال نیز خارج شد و در محیط کشت RPMI-1640 حاوی ۱۰ درصد FBS قرار گرفت. برای اندازه‌گیری مقادیر IFN- γ و IL-4 آزمایش ELISA صورت گرفت. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۱۸ انجام شد. در ارزیابی اختلاف بین گروه‌ها از تحلیل واریانس یک‌طرفه و در صورت معنادار بودن آن در تعیین اختلافات بین گروهی از آزمون تعقیبی توکی استفاده شد. همچنین، برای بررسی آزمون فرضیه‌ها و تصمیم‌گیری در مورد پذیرش یا رد فرضیه‌ها، سطح معناداری $p < 0.05$ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها وزن موش‌ها در هر سه گروه روند افزایشی داشت. وزن تومور و حجم تومور در گروه تجربی بیمار تحت درمان در مقایسه با گروه بیمار (شم) کاهش معناداری یافت (به ترتیب $P < 0.05$ ، $P < 0.0001$). مقادیر IFN- γ و IL-4 حاصل از آزمایش ELISA به ترتیب در گروه تجربی بیمار تحت درمان در مقایسه با گروه بیمار (شم) افزایش ($P < 0.05$) و کاهش معناداری ($P < 0.0001$) یافت.

نتیجه‌گیری: براساس نتایج حاصل از این تحقیق *Allium cepa* اثر بازدارندگی بر روند رشد تومور در موش‌های مبتلا به سرطان پستان دارد.

کلیدواژه‌ها:

اینترفرون گاما (IFN- γ)، اینترلوکین ۴ (IL-4)، پیاز *Allium cepa* سرطان پستان، موش Balb/c

مقدمه

تشکیل می‌دهد [۲]. علت اصلی مرگ ناشی از این بیماری وجود متاستاز در این نوع سرطان است [۳]. در شرایط طبیعی و نرمال، سیستم ایمنی توانایی تشخیص و حذف سلول‌های سرطانی در بدو شکل‌گیری را دارد. بنابراین، بررسی وضعیت سیستم ایمنی در محیط شیمیایی اطراف تومور تأثیر بسیار مهمی در تشخیص، پیشرفت و درمان تومور

سرطان پستان نه تنها یکی از مشکلات اصلی در زمینه سلامت زنان مطرح است [۱]، بلکه مشکلات اقتصادی ناشی از درمان برای فرد مبتلا و اطرافیان و در کل جامعه درگیر به‌همراه خواهد داشت. سرطان پستان ۲۳ درصد از کل سرطان‌های جهان و ۱۴ درصد از کل مرگ‌های ناشی از سرطان‌ها را

* نویسنده مسئول: پریسا کریشچی خیابانی

نشانی: بزرگراه فتح-کیلومتر ۲۰-شهر قدس انتهای بلوار شهید کهر-دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهر قدس

تلفن: ۰۹۱۲۱۸۷۶۳۹۵ و ۴۶۸۹۶۰۰۰ دورنگار:

رایانه: parisakerishchi@yahoo.com

شناسه ORCID: 0000-0002-5524-1253

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی سبزوار، دوره ۲۵، شماره ۲، خرداد و تیر ۱۳۹۷، ص ۶۳-۷۱

آدرس سایت: http://jsums.medsab.ac.ir رایانه: journal@medsab.ac.ir

شاپای چاپی: ۱۶۰۶-۷۴۸۷

کوئرسستین، ترکیبات آنتی‌اکسیدانتهی در عصاره استخراج شده از بخش‌های خوراکی پیاز است. اما، مقدار ترکیبات فنلی و کوئرسستین جدا شده از پوست پیاز چندین برابر بیش از بخش‌های خوراکی پیاز است [۱]. همچنین، پیاز دارای ترکیبات مختلفی از جمله پروستاگلاندین‌ها، پکتین، آدنوزین، ویتامین‌های E، C، بعضی ویتامین‌های خانواده B، اسیدهای چرب و اسیدهای آمینه ضروری است [۱۳].

عملکرد سایتوکاین‌ها در بروز یا مهار بیماری‌های مختلف به اثبات رسیده است. سایتوکاین‌ها نقش بسیار مهمی در تنظیم پاسخ ایمنی و بروز التهاب دارد. مهم‌ترین پاسخ‌های مورد نیاز بدن در مقابله با تومور، پاسخ‌های مربوط به لنفوسیت‌های Th1 مثل IFN- γ و لنفوسیت‌های نوع Th2 مثل IL-4 است. لنفوسیت‌های نوع Th2 که مهم‌ترین آن IL-4 است، از جمله سایتوکاین‌هایی است که افزایش سطح بیان آن‌ها ممکن است باعث افزایش تکثیر سلول‌های توموری و گسترش آن‌ها در بدن شود و سایتوکاینی مثل IFN- γ سایتوکاین ضدتکثیری مهمی در جلوگیری از تکامل سلول‌های توموری محسوب می‌شود. از جمله عملکردهای این سایتوکاین تقویت عملکرد عرضه توسط ماکروفاژها، همچنین تقویت عملکرد سلول‌های کشنده طبیعی است [۱۴].

با توجه به ترکیبات مؤثر آنتی‌اکسیدانتهی در پیاز خوراکی قرمز *Allium cepa* انتظار می‌رود از راه تنظیم و تعدیل سایتوکاینی در جهت مهار رشد و گسترش تومور، نقش حمایتی را در درمان سرطان پستان ایفا کند. در بررسی اثر *Allium cepa* بر میزان تکثیر سلول‌های توموری و گسترش و پیشرفت آن در بدن و تکامل سلول‌های توموری مقادیر IFN- γ و IL4 در بافت‌های بدن در موش‌های BALB/c ماده و مبتلا به سرطان سنجش شد.

مواد و روش‌ها

این مطالعه از نوع مداخله‌ای- تجربی است. به منظور القای بیماری از رده سلولی 4T1 (تهیه شده از انستیتو پاستور تهران) استفاده شد که به صورت زیر جلدی به شکم نزدیک پستان (#8 fadpad) موش ماده BALB/c تزریق شد. ۲۴ سرموش (با سن شش تا هفت هفته‌ای) و میانگین وزن (mean \pm SD) ۱۷/۲۹ \pm ۰/۴۰ در شرایط نور و رطوبت و دمای ایتیموم و مناسب در حیوانخانه دانشگاه نگهداری شدند. پس از یک هفته نگهداری، به طور تصادفی در سه گروه تعریف شدند: سالم، بیمار بدون درمان، و گروه تجربی. به گروه تجربی همراه با القا، پیاز را با جیره غذایی دریافت کردند. در هر گروه هشت رأس موش قرار گرفت و هر چهار موش در یک قفس نگهداری شد.

با روش‌های نوین ایمنی درمانی دارد. این سیستم از طریق واسطه‌هایی به نام سایتوکاین‌ها اثر خود را اعمال می‌کند [۴].

مشاهده شده است که در محل تومور میزان ترشح درونی بعضی سایتوکاین‌ها کاهش یافته است. همین امر به تضعیف سیستم ایمنی و در نتیجه به گسترش تومور، متاستاز و بدخیم شدن تومور می‌انجامد [۵].

مطالعات نشان می‌دهد که مواد خوراکی با منشأ گیاهی، پتانسیل پیشگیری از حدود یک سوم سرطان‌ها را دارد [۶]. انسان طی سالیان متمادی به آثار مختلف درمانی گیاهان پی برده است. از مزیت‌های شناخته شده این گیاهان و عصاره آن‌ها عدم وجود عوارض جانبی خاص و خطرناک و گستردگی طیف تأثیر است. از جمله این گیاهان می‌توان به اعضای گونه *Allium* (سیر و پیاز و موسیر) اشاره کرد [۷].

پیاز یکی از پر مصرف‌ترین سبزیجات و حاوی مقادیر بالای فلاونوئید است. همچنین، پیاز بخش مهمی از رژیم غذایی بسیاری از کشورها محسوب می‌شود. بر اساس نتایج این مطالعه، می‌توان ادعان داشت که پیازهای قرمز نسبت به پیازهای سفید مورد مطالعه ترکیبات فنلی بیشتری دارند و ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی آن‌ها بالاست. همچنین، توانایی زیادی در مهار رادیکال‌های آزاد دارد [۸].

گیاهان خانواده *Allium* منبع مهمی از فلاونوئیدهای رژیم غذایی است [۹]. گزارش‌های قبلی نشان داده است که فلاونوئیدهای موجود در غذا و ترکیبات فنولی دیگر مانند کوئرسستین، کامفرول، اسید گالیک و میرستین آثار بیولوژیکی دارد، از جمله فعالیت‌های ضدباکتریایی، ضدویروسی و ضدآلرژیکی. به علاوه، فلاونوئیدهای موجود در پیاز که به صورت گلیکوزیدهایی از کوئرسستین و کامفرول حضور دارد پراکسایش لیپیدها را مهار می‌کند و به منزله آنتی‌اکسیدان‌ها، جمع‌آوری کننده رادیکال‌های آزاد و شلات کننده کاتیون‌های دو ظرفیتی شناخته شده است و نسبت به رادیکال‌های آزاد از جمله گونه‌های اکسیژن فعال واکنش‌پذیر است و آن‌ها را مهار و از آثار مخرب آن‌ها جلوگیری می‌کند. این ترکیبات باعث شده‌است که ارزش دارویی پیاز بیشتر مشخص شود [۱۰-۱۲]. تجمع رادیکال‌های فعال اکسیژن ROS سبب بروز فرایند استرس اکسایشی در بافت‌های بدن می‌شود. تشکیل این رادیکال‌ها سبب تخریب مولکول‌های حیاتی سلول‌ها و در نهایت آسیب سلولی می‌شود. سیستم آنتی‌اکسیدانتهی به واسطه سیستم آنزیمی، دفاع اصلی بدن در برابر آسیب ناشی از رادیکال‌های آزاد است [۱۳].

اما آثار آنتی‌اکسیدانتهی مربوط به فلاونوئید اصلی آن، یعنی کوئرسستین، است. مقادیر بالای ترکیبات فنولی، به خصوص

شد. پس از طی این مدت، مایع رویی آن جمع‌آوری شد. مایع رویی جمع‌آوری‌شده از هر نمونه در لوله‌های اپندرف توزیع و تا زمان انجام آزمایش‌های الیزا در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. در سنجش اینترفرون گاما و اینترلوکین ۴ از کیت الیزا مخصوص سنجش و اندازه‌گیری اینترفرون گاما و اینترلوکین ۴ (eBioscience, Germany) مطابق پروتکل هر دو کیت استفاده شد. برای هر نمونه سه تکرار در نظر گرفته شد.

برای تعیین نحوه توزیع داده‌های غلظت سایتوکاین‌ها از آزمون کولموگروف-اسمیرنوف استفاده شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۱۸ صورت گرفت. برای ارزیابی اختلاف بین گروه‌ها از تحلیل واریانس یک‌طرفه و در صورت معنادار بودن آن جهت تعیین اختلافات بین گروهی از آزمون تعقیبی توکی استفاده می‌شود. همچنین، برای بررسی آزمون فرضیه‌ها و تصمیم‌گیری در مورد پذیرش یا رد فرضیه‌ها، سطح معناداری $P < 0.005$ در نظر گرفته شد.

نتایج

وزن موش‌ها. هر سه گروه طی هفت هفته پس از القای سلول‌های رده 4T1، روند افزایش وزن را نشان دادند، اگرچه در گروه بیمار (شم) این روند سرعت کمتری نسبت به دو گروه کنترل نرمال و گروه تجربی (بیمار تحت درمان) داشت. همچنین، هر سه گروه بعد از القای سلول‌های رده 4T1، در مقایسه با قبل از القا، افزایش وزن معناداری داشتند (شکل ۱).

حجم تومور. در پایان هر هفته حجم تومور در گروه تجربی (تحت درمان) نسبت به گروه بیمار (شم) کاهش نشان داد. این کاهش از هفته سوم به‌طور معناداری نسبت به گروه بیمار (شم) مشاهده شد (شکل ۲).

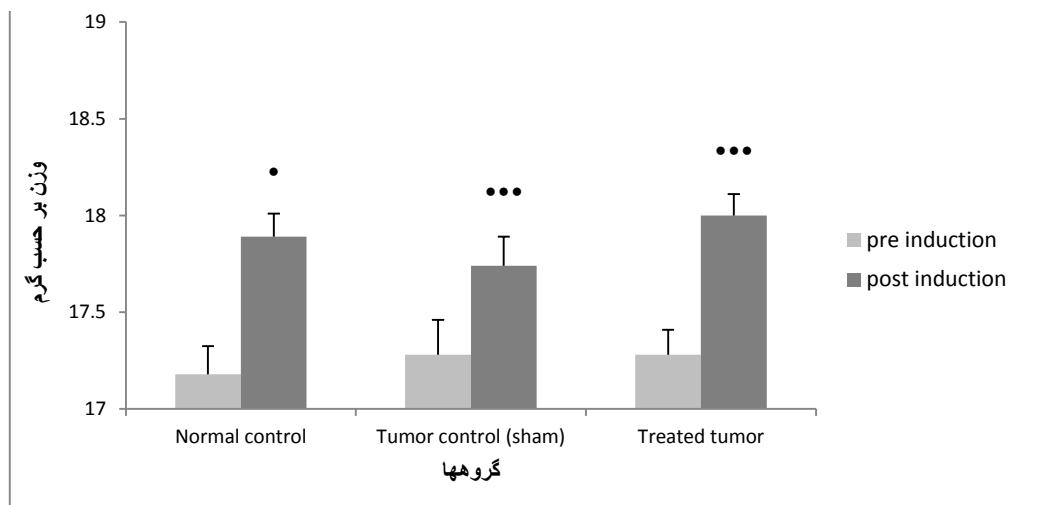
وزن تومور. در پایان هفته هفتم، تومور پس از خروج از بدن موش‌ها توزین شد. وزن تومور در گروه تجربی (تحت درمان) نسبت به گروه بیمار (شم) کاهش معناداری داشت (شکل ۳).

سنجش اینترفرون گاما. در گروه تجربی (بیمار تحت درمان) مقادیر اینترفرون گاما در مقایسه با گروه بیمار (شم) بدون درمان افزایش معناداری یافت ($P < 0.05$)، در صورتی که نسبت به گروه کنترل سالم میزان اینترفرون گاما کاهش معناداری داشت ($P < 0.05$). مقادیر اینترفرون گاما در گروه بیمار بدون درمان (شم) به‌طور معنادار نسبت به گروه سالم در بافت طحال کاهش یافت ($P < 0.001$)؛ شکل ۴).

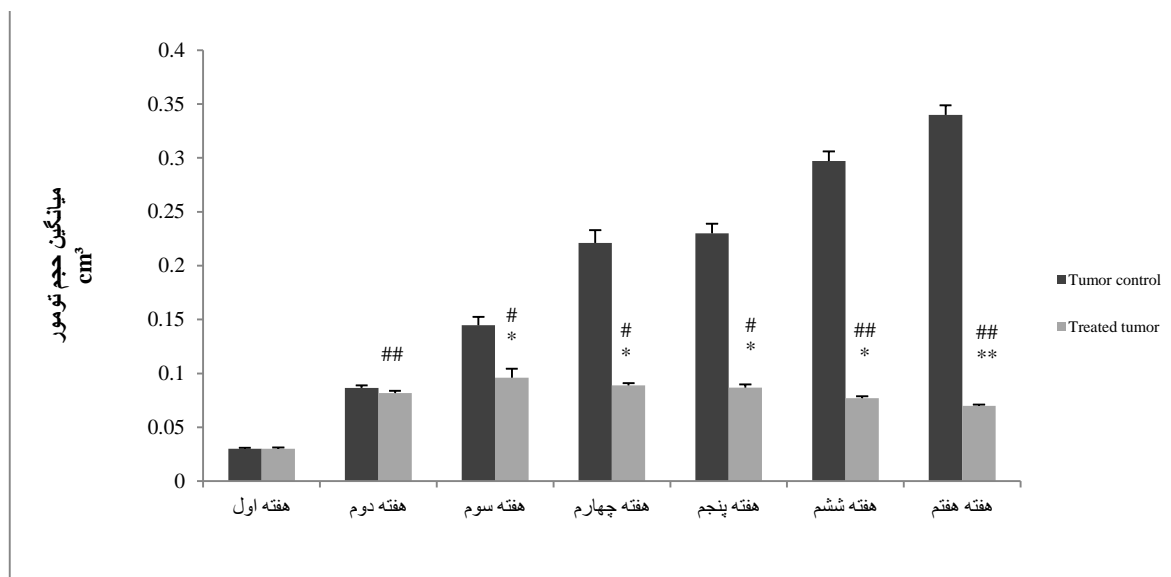
گزارش‌هایی نشان می‌دهد پیاز سبب افزایش آنزیم‌های سم‌زداشده می‌شود و ترکیبات آلی سولفور آن اثر حفاظتی در برابر سرطان دارد [۱۵]. بیشتر این خواص در کل بخش غده‌ای بررسی شد. به‌همین علت از ریشه پیاز قرمز (*Allium cepa*) استفاده شد که به‌صورت روزانه پس از شستشوی کامل با آب معمولی و سپس آب مقطر و حذف ضایعات، آگیری شد [۱۶].

به‌دنبال پیدایش تومور تا پایان هفته هفتم، حجم تومور در دو بعد طول و عرض با کولیس اندازه‌گیری می‌شد و با استفاده از فرمول محاسبه حجم تومور $[V=1/2(L^2 \times w)]$ میزان آن تعیین شد. بزرگ‌ترین بعد تومور طول تومور L و W عرض تومور در نظر گرفته شد. سپس، عدد محاسباتی روز آخر بر روز اول تقسیم شد تا میزان افزایش نسبی حجم تومور برای محاسبه اندازه نهایی تومور در هر موش به‌دست آید [۱۷].

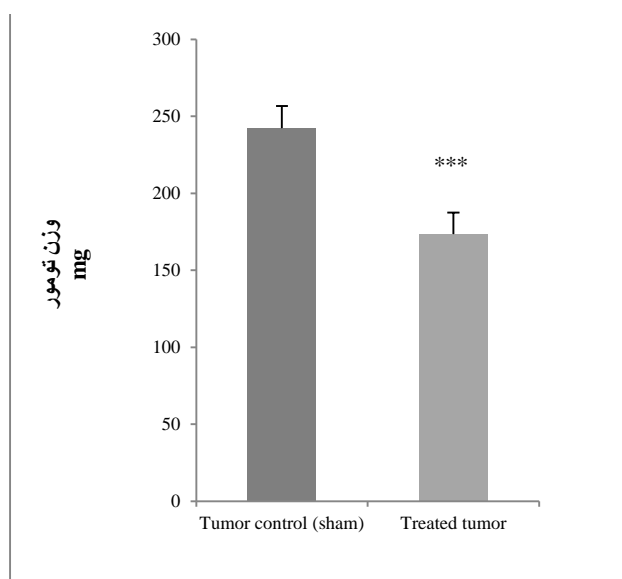
به هر سرموش در گروه تجربی $0.1 \text{ ml}/100\text{gBW}/\text{day}$ عصاره پیاز به‌صورت یک نوبت در روز خوراندند. به گروه کنترل (سالم) و گروه بیمار بدون درمان (شم) حجم مشابهی سرم فیزیولوژی داده شد. برای القای بیماری، رده سلول‌های 4T1 در ناحیه شکم نزدیک به پستان (#8 fadpad) با رقت 5×10^6 تزریق شد. در تمام طول مدت آزمایش به‌طور یک روز در میان موش‌ها توزین شدند. هفت هفته پس از القای بیماری، موش‌ها تحت بی‌هوشی عمیق قرار گرفتند (کتامین $100 \text{ mg}/\text{Kg}$ و زایلازین $10 \text{ mg}/\text{Kg}$ داخل صفاقی)، سپس، تومور و طحال تحت شرایط استریل خارج شد. تومور با ترازوی دیجیتالی توزین و طحال نیز قطعه‌قطعه، در 2 ml محیط کشت RPMI-1640 حاوی ۱۰ درصد FBS با استفاده از ته‌سرنگ ۲ میلی‌لیتری له و تجمعات بافتی حذف شد. بافت حاصل برای تهیه سوسپانسیون سلولی از توری سیمی به قطر 0.2 میلی‌متر عبور داده شد. پس از سانتریفیوژ، سوسپانسیون سلولی به‌دست آمده (۱۰ دقیقه در 200 g)، به‌منظور حذف گویچه‌های سرخ، به رسوب سلولی 5 ml بافر لیزکننده (بافر ACK) افزوده شد. بعد از ۵ دقیقه، ضمن افزودن 10 ml محیط کشت، نمونه‌ها بار دیگر به‌مدت ده دقیقه در 200 g سانتریفیوژ شد. سپس، رسوب سلولی در محیط کشت RPMI حاوی ۱۰ FBS به حالت سوسپانسیون درآمد. پس از فرایند شمارش سلول‌ها، بعد از تعیین زنده‌بودن سلول‌ها با رنگ‌آمیزی با تریپان بلو، سوسپانسیون سلولی به تعداد $1 \times 10^6 \text{ cell}/\text{ml}$ از هر نمونه تهیه شد. این سلول‌ها در پلیت‌های کشت ۲۴ خانه به‌مدت ۷۲ ساعت در انکوباتور حاوی ۵ درصد CO_2 کشت داده



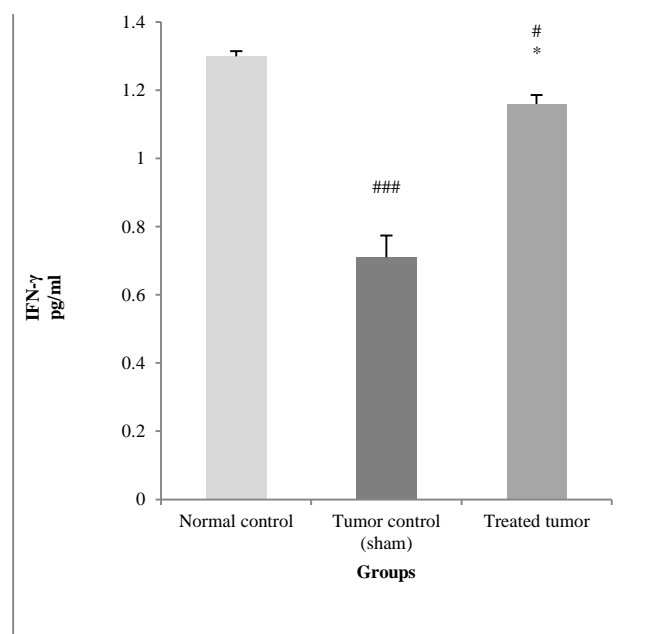
شکل ۱. پس از القای سلول‌های رده 4T1، گروه بیمار (شم) و گروه تجربی تحت درمان اختلاف وزن معناداری با گروه کنترل سالم نداشت. روند افزایش وزن در هر سه گروه پس از القا نسبت به قبل مشاهده می‌شود. در هر گروه این روند افزایش نسبت به هفته نخست قبل از شروع آزمایش تفاوت معناداری مشاهده می‌شود ($n=8$ ، $*P<0.05$ ، $***P<0.001$).



شکل ۲. میانگین حجم تومور در گروه تجربی تحت درمان از هفته سوم به‌طور معناداری در مقایسه با گروه بیمار (شم) بدون درمان کاهش یافت ($n=8$ ، $*P<0.05$ ، $**P<0.001$). مقایسه میانگین حجم تومور در گروه تجربی تحت درمان نسبت به گروه بیمار (شم) همان هفته، از هفته دوم کاهش معناداری نشان می‌دهد ($n=8$ ، $#P<0.05$ ، $##P<0.001$).



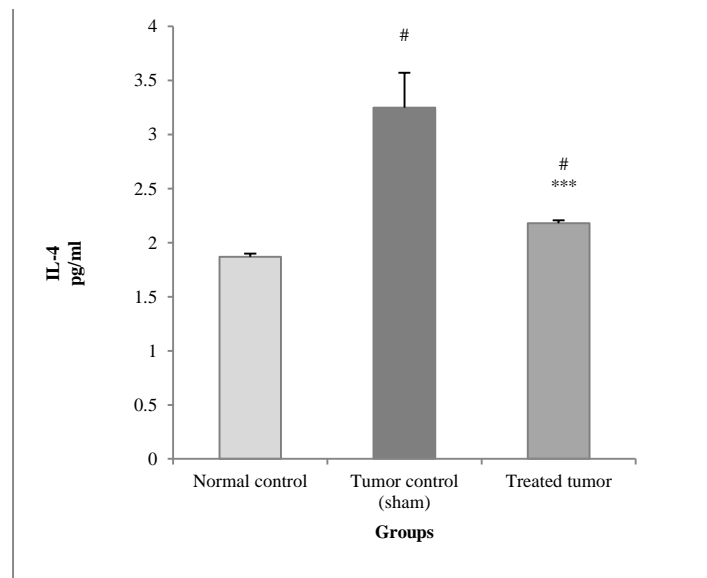
شکل ۳. کاهش معنادار میانگین وزن تومور در گروه تجربی تحت درمان در مقایسه با گروه بیمار (شم) ($n=8$ ، $*** P<0/0001$)



شکل ۴. نمودار مقادیر IFN- γ پس از القای بیماری با رده سلولی 4T1. میانگین مقدار IFN- γ در گروه تحت درمان در مقایسه با گروه بیمار بدون درمان (شم) افزایش معناداری یافت ($* P<0/05$). همچنین، مقادیر سایتوکاین IFN- γ در دو گروه تجربی تحت درمان و گروه بیمار (شم) نسبت به گروه کنترل سالم کاهش معناداری یافت ($### P<0/0001$ ، $# P<0/05$).

همچنین، بین گروه تجربی تحت درمان و کنترل سالم اختلاف معناداری مشاهده می‌شود ($P<0/05$) و نشان‌دهنده این موضوع است که سطح اینترلوکین ۴ (IL-4) اگر نسبت به سطوح آن در گروه بیمار (شم) کاهش نشان می‌دهد، با مقادیر اولیه در گروه کنترل نرمال تفاوت معناداری دارد (شکل ۵).

سنجش اینترلوکین ۴ (IL-4). سطح اینترلوکین ۴ (IL-4) در گروه تجربی تحت درمان در مقایسه با گروه بیمار (شم) کاهش معناداری یافت ($P<0/0001$)، در صورتی که میزان این سایتوکاین در گروه بیمار بدون درمان (شم) در مقایسه با گروه کنترل سالم افزایش معناداری یافت ($P<0/05$).



شکل ۵. نمودار مقادیر IL-4 پس از القای بیماری توسط رده سلولی 4T1. در نمودار کاهش مقادیر اینترلوکین ۴ (IL-4) در گروه تحت درمان در مقایسه با گروه بیمار (شم) مشاهده می‌شود ($P < 0.001$). همچنین، اینترلوکین ۴ (IL-4) در هر دو گروه بیمار (شم) و تجربی تحت درمان نسبت به گروه کنترل سالم افزایش معنادار مشاهده می‌شود ($P < 0.05$).

بحث

امروزه، گسترش علوم سلولی و مولکولی در دنیای پزشکی سبب شده است که هم عملکرد سرطان و هم راه‌های معالجه متعددی برای بیماران فراهم شود. بیومارکرهای خاص که شاخص نوع خاصی از سرطان است در تشخیص و معالجه سرطان نقش کلیدی دارد و از اهمیت خاصی برخوردار است. از طرفی، روش‌ها و داروهایی که هزینه معالجه را کاهش می‌دهند مطالعه و پیشنهاد شده است. یکی از مباحث مهم در تشخیص و مطالعه روند رشد و درمان سرطان، سلول‌های لنفوسیتی T موجود در محیط تومور است.

در این زمینه توجه زیادی به انواع سلول‌های T کمکی (T helper type)، به خصوص سایتوکاین‌های تولیدشده با TCD4+ معطوف شده است. سلول‌های T کمکی عبارت است از انواع سلول‌های T تنظیمی (Th reg)، سلول‌های T التهابی (Th inflammatory)، سلول‌های T ضدالتهابی (Th anti-inflammatory) و انواعی دیگر که روزبه‌روز بیشتر مطالعه می‌شود. سایتوکاین‌های مترشحه از سلول‌های Th1 و Th2 و حفظ تعادل آن‌ها، بر عملکرد و تنظیم سیستم ایمنی مداخله می‌کند، به طوری که در حذف و سرکوب یا گسترش سلول‌های سرطانی نقش به‌سزایی دارد [۱۸]. به همین دلیل، مارکری مهم ارزیابی می‌شود.

مطالعات نشان داده است کاهش پاسخ‌های ایمنی، کاهش

تکثیر سلول‌های ایمنی در محیط تومور به دنبال تغییر ترشح بعضی سایتوکاین‌ها رخ داده است [۱۹]. ابل دا و همکاران [۲۰] مشاهده کردند که کاهش سایتوکاین‌های Th1 مانند IFN- γ باعث افزایش رشد تومورهای آدنوکارسینوما در حیوانات مدل آزمایشگاهی می‌شود. سلول‌های Th1 باعث فعال شدن ایمنی سلولی در محیط پیرامون تومور و سبب مهار رشد تومور می‌شود. سازوکار عمل از بین بردن سلول‌های توموری با لنفوسیت‌های T سیتوتوکسیک (cytotoxic T lymphocyte) است. سایتوکاین‌های Th1 باعث هم تحریک و هم تقویت فعالیت لنفوسیت‌های T سیتوتوکسیک CTL می‌شود که مرگ برنامه‌ریزی شده ایجاد می‌کند. در واقع، سایتوکاین‌های Th1 مانند IFN- γ ، به واسطه سلول‌های فعال لنفوسیت‌های T سیتوتوکسیک CTL خاصیت ضدسرطانی را تقویت و پشتیبانی می‌کند [۲۱].

کونتیسلسی و همکاران [۱۸] در سرطان پستان، سرطان مجاری ادرار و کلیه و مثانه و پروستات کاهش نسبت سلول‌های Th1/Th2 را در محیط تومور مشاهده کردند. بر همین اساس پیشنهاد شده است که تغییر مقادیر سایتوکاین‌های Th1 به سمت Th2 و کاهش نسبت Th1/Th2 سبب پیشرفت تومور می‌شود.

سلول‌های Th1 که ترشح‌کننده سایتوکاین IFN- γ است در توقف رشد سلول‌های تومور نقش مهمی دارد، به طوری که

هفته، نشان داد وزن و حجم تومور از هفته سوم نسبت به گروه بیمار بدون درمان (شیم) کاهش معناداری داشت. همچنین، سبب افزایش IFN- γ شد. از طرفی دیگر، مقادیر سایتوکاین IL-4 که سبب پیشرفت و متاستاز سرطان پستان می‌شود به‌طور معناداری کاهش یافت. سازوکار اصلی ایمنی در برابر تومورها از بین بردن سلول‌های توموری با لنفوسیت‌های T سیتوتوکسیک (CTL) و لنفوسیت‌های T یاریگر Th با تولید سایتوکاین است که باعث فعال شدن CTL و ماکروفاژها و افزایش بروز MHC-I در سلول‌های توموری می‌شود [۲۱].

در بحث فرار تومورها از سیستم ایمنی، نقش سلول‌های T تنظیمی مانند IL-4 اساسی است، به طوری که باعث سرکوب پاسخ ایمنی به تومورها می‌شود [۲۹]. همان‌طور که در نتایج مشاهده شد *Allium cepa* باعث کاهش IL-4 شده است که متعاقب آن افزایش تولید IFN- γ از سلول‌های Th1 و کاهش وزن و حجم تومور نسبت به گروه بیمار بدون درمان (شیم) مشاهده شد. در واقع، *Allium cepa* شیفت سلول‌های Th1 به سمت Th2 را مهار می‌کند که در بروز و گسترش تومور نقش اساسی دارد، به طوری که نسبت Th1/Th2 افزایش می‌یابد.

همان‌طور که اشاره کردیم، *Allium cepa* حاوی فلاونوئیدها و ترکیبات فنلی مهمی است که هر کدام پتانسیل بالایی در کاهش رادیکال‌های آزاد مخرب و کاهش استرس اکسایشی دارد. از طرفی دیگر، اثر سینرژیستی ناشی از فلاونوئیدهای موجود در *Allium cepa* پیشنهاد مناسب‌تری نسبت به ترکیب فلاونوئید خاصی مانند فقط کوئرستین یا کامفرول موجود در *Allium cepa* در درمان و معالجه سرطان پستان است.

تقدیر و تشکر

این مقاله حاصل بخشی از طرح پژوهشی مصوب دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهر قدس است با عنوان «اثر پیاز خوراکی *Allium cepa* بر سطوح سایتوکاین‌های ضدالتهابی در موش ماده BALB/c مبتلا به سرطان سینه» به شماره قرارداد ۹۴/۳۰۵/دپ. بدین وسیله از معاونت محترم پژوهشی و فناوری دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهر قدس، که هزینه‌های طرح را فراهم کردند، قدردانی و سپاسگزاری می‌کنیم.

References

- [1]. Boon H, Olaunde F, Zick SM. Trends in complementary alternative medicine used by breast cancer survivors: comparing survey data from 1998 to 2005. BMC Women's Health. 2007; 7: 4-11.
- [2]. Lv S, Niu Y, Wei L, Liu Q, Wang X, Chen Y. Chromosomal aberrations and genetic relations in benign, borderline and malignant phyllodes tumors of the breast: a comparative

مشاهده شده است در محیط تومور میزان IFN- γ کاهش می‌یابد و تزریق این سایتوکاین از گسترش سلول‌های سرطانی جلوگیری می‌کند [۲۲، ۲۳]. در مقابل، هنگام رشد و گسترش و متاستاز سلول‌های سرطانی، مقادیر IL-4 که سایتوکاینی مترشح از سلول‌های Th2 است رو به ازدیاد می‌رود. تعادل فعالیت این دو سایتوکاین نشان‌دهنده وضعیت سلول‌های تومور است [۲۴، ۲۵]. بنابراین، استفاده از پیاز (*Allium cepa*) به‌منزله مکمل درمانی، از آن‌رو که سرشار از فلاونوئیدهایی است و به‌صورت گلیکوزیدهایی از کوئرستین و کامفرول حضور دارد، قادر است پراکسایش لیپیدها را مهار کند و آنتی‌اکسیدانی است که با جمع‌آوری و مهار اکسیژن فعال و رادیکال‌های آزاد آثار سودمندی در بازدارندگی رشد و گسترش سلول‌های توموری به‌خصوص سرطان پستان دارد [۱۰-۱۲].

در پژوهشی دیگر، الیویرا و همکاران [۲۶] پیشنهاد کردند با توجه به خاصیت ایمونومدولاتوری *Allium cepa* احتمال می‌رود در مهار رشد و گسترش سلول‌های سرطان پستان مؤثر واقع باشد.

گرگ هوگ و همکاران [۲۷] مشاهده کردند خانواده *Allium* با مهار Th1 و سایتوکاین‌های التهابی، سبب تنظیم رو به بالای تولید Th2 می‌شود که به درمان التهاب روده (IBD) Inflammatory Bowel Disease می‌انجامد.

الیویرا و همکاران [۲۶] نیز آثار *Allium cepa* را بر سایتوکاین‌های التهابی و ضدالتهابی در استئوکلاستوزن مشاهده کردند، به طوری که تغییر مقادیر IL-4 بر مسیر سیگنالی NF- κ B تأثیر می‌گذارد و از تخریب سلول‌های استئوسیت تحت حالات التهابی جلوگیری می‌شود.

در پژوهشی احمد همتا و همکاران [۲۸] در بررسی اثر عصاره *Allium ascalonicum* بر رده 4T1 پیشنهاد کردند که عصاره آبی و الکلی موسیر *Allium ascalonicum* اثر سیتوتوکسیسیته بر سلول‌های سرطان پستان موش صحرایی دارد و ترکیب عصاره آبی و الکلی با کربوپلاتین، همچنین ترکیب عصاره الکلی با تاکسول باعث افزایش سیتوتوکسیسیته این داروها می‌شود.

نتایج تحقیق حاضر نیز نشان می‌دهد مصرف *Allium cepa* هم‌زمان با تزریق سلول‌های 4T1 و القای تومور بعد از هفت

genomic hybridization study. Breast Cancer Res Treat. 2008; 112: 411-8.

- [3]. Jehn CF, Flath B, Strux A, Krebs M, Possinger K, Pezzutto A. Influence of age, performance status, cancer activity, and IL-6 on anxiety and depression in patients with metastatic breast cancer. Breast Cancer Res Treat. 2012; 136: 789-94.

- [4]. Abbas AK, Andrew HL, Shiv P. Cellular and molecular immunology. Sixth edition, Saunders Elsevier, Philadelphia. 2007; 588-618.
- [5]. Piperi C, Zisakis A, W. Lea R, Kalofoutis A. Role of cytokines in the regulation of glioma tumour growth and angiogenesis. *Am J Immunol*. 2005; 1: 106-113.
- [6]. Adlercreutz H. Western diet and western diseases: some hormonal and biochemical mechanisms and associations. *Scandinavian J Clin Lab Invest*. 1990; 50(S201): 3-23.
- [7]. Fan TP, Yeh JC, Leung KW, Yue PYK, Wong RNS. Angiogenesis: from plants to blood vessels. *Trends Pharmacol Sci*. 2006; 27(6): 297-309.
- [8]. [8] Bagherloo M, Heidari R, Jamei R, Ghaderpour S. Antioxidant properties and phenolic compounds of two varieties of Iranian onion (*Allium cepa* L.) by High Performance Liquid Chromatography. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*. 2012; 28(3): 455-464.
- [9]. Tepe B, Sokmen M, Akpulat HA and Sokmen A. In vitro antioxidant activities of the methanol extracts of five *Allium* species from Turkey. *Food Chemistry*. 2005; 92: 89-92.
- [10]. Miller HE, Rigelhof F, Marquart L, Prakash A, Kanter M. Antioxidant content of whole grain breakfast cereals, fruits and vegetables. *Journal of the American College of Nutrition*. 2000; 19: 1-8.
- [11]. Brand-Williams W, Cuvelier M, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology*. 1995; 28: 25-30.
- [12]. Spencer JW, Jacobs JJ. Complementary and alternative medicines: an evidence based approach: Mosby, St Levis, Missouri. 1999.
- [13]. Damjanovic I, Linder J. *Anderson Pathology*, 10th ed, New York; Mosby. 1996: 23-65.
- [14]. Biron CA, Nguyen KB, Pien GC, Cousens LP, Salazar-Mather TP. Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. *Annu Rev Immunol*. 1999; 17: 189-220.
- [15]. Fukushima S, Takada N, Hori T. Cancer prevention by organosulfur compounds from garlic and onion. *J Cell Biochem Suppl*. 1997; 27: 100-5.
- [16]. Yang HS, Han DK, Kim JR, Sim JC. Effects of alpha-tocopherol on Cadmium-induced toxicity in rat testis and spermatogenesis. *J. Korean Med. Sci*. 2006; 21(3): 445-51.
- [17]. Jones LW, Viglianti BL, Tashjian JA, Kothadia SM, Keir ST, Freedland SJ, et al. Effect of aerobic exercise on tumor physiology in an animal model of human breast cancer. *Journal of Applied Physiology*. 2010; 108: 343-8.
- [18]. Conticello C, Pedini F, Zeuner A, Patti M, Zerilli M, Stassi G, et al. IL-4 protects tumor cells from anti-CD95 and chemotherapeutic agents via upregulation of antiapoptotic proteins. *J Immunol*. 2004; 172(9): 5467-77.
- [19]. Harirchi I, Karbaksh M, Kashefi A, Momtahan AJ. Breast cancer in Iran: results of a multi-center study. *Asian Pac J Cancer Perv*. 2004; 5(1): 24-7.
- [20]. Oble DA, Loewe R, Yu P, Mihm MC, Jr. Focus on TILs: prognostic significance of tumor infiltrating lymphocytes in human melanoma. *Cancer Immun*. 2009; 9: 3.
- [21]. Otsuki N, Dang NH, Kumagai E, Kondo A, Iwata S, Morimoto C. Aqueous extract of carica papaya leaves exhibits anti-tumor activity and immunomodulatory effects. *Journal of Ethnopharmacology*. 2010; 127: 760-7.
- [22]. Banfi G, Dolci A, Verna R, Corsi MM. Exercise raises serum heatshock protein 70 (Hsp70) levels. *Clin Chem Lab Med*. 2004; 42(12):1445-6.
- [23]. Carpi A, Nicolini A, Antonelli A, Ferrari P, Rossi G. Cytokines in the management of high risk or advanced breast cancer: an update and expectation. *Curr Cancer Drug Targets*. 2009; 9: 888-903.
- [24]. Nagai S, Toi M. Interleukin-4 and breast cancer. *Breast Cancer*. 2000; 7(3): 181-6.
- [25]. Kawakami K, Kawakami M, Husain SR, Puri RK. Effect of interleukin (IL)-4 cytotoxin on breast tumor growth after in vivo gene transfer of IL-4 receptor alpha chain. *Clin Cancer Res*. 2003 May; 9(5): 1826-36.
- [26]. Oliveira T, Figueiredo Camila A, Brito C, Stavroullakis A, Ferreira AC, Nogueira-Filho G, Prakki A. *Allium cepa* L. and Quercetin Inhibit RANKL/ Porphyromonas gingivalis LPS-Induced Osteoclastogenesis by Downregulating NF- κ B Signaling Pathway. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2015; Article ID 704781, 11 p.
- [27]. Hodge G, Sandy Hodge and Ping Han. *Allium sativum* (Garlic) Suppresses Leukocyte Inflammatory Cytokine Production In Vitro: Potential Therapeutic Use in the Treatment of Inflammatory Bowel Disease. *Cytometry*. 2002; 48: 209-215.
- [28]. Hamta A, Shariatzadeh SMA, Soleimani M, Tajali Ardakani M. Cytotoxicity effect of aqueous and alcoholic total extract of shallot (*Allium ascalonicum*) on cancer cells derived from mammary tumors in rat and cell line (4T1) in mouse, and comparison with taxol and carboplatin chemotherapy drugs. *Journal of Cell & Tissue (JCT)*. Autumn 2014; 5(3): 253-261.
- [29]. Zielinski MR, Muenchow M, Wallig MA, Horn PL, Woods JA. Exercise delays allogeneic tumor growth and reduces intratumoral inflammation and vascularization. *J Appl Physiol*. 2004; 96(6): 2249-56.

Study of *Allium cepa* effect to inhibit the growth of tumor cells in BALB/c mice breast cancer model

Parisa Karishchi Khiyabani*, Sayeh Bidaran

Department of Biology, Shahr-e-Qods Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Abstract

Study of Factors affecting regulation and modulation cytokine balance is particularly important in order to inhibit the growth and spread of breast cancer cells in women. In this study, the effect of *Allium cepa* to inhibit the growth of breast cancer cells in female BALB/c mice who have been patient by induction of cell line 4T1 were investigated.

In this study have been used of the mice, BALB /c female with breast cancer by injection of mouse cell line 4T1. In each group: normal control, morbid without treatment (sham) and the experimental group (at the same time induction, were receiving onion root extract food rations) were randomly 8 mice. Daily after washing, dewatering roots red onion (*Allium cepa*) and fed oral for once a day each of the mouse in the experimental group .1 ml/100gBW/day. The mice are placed under deep anesthesia 7 weeks after induced cell line 4T1. During the seven weeks the mice were weighed every other day. Tumor volume was measured by caliper following the formation of the tumor until the end of the seventh week. The tumor weighed after removal from the body. Spleen removed and was placed in RPMI-1640 medium containing 10%, FBS and ELISA tests were performed to measure the IFN- γ and IL-4 levels. Data analysis was performed using SPSS software (version 18). Analysis of variance (ANOVA) was used to assess differences between groups and Tukey's test was used in order to determine the significance of differences between groups. As well as for studying hypotheses and decide on the acceptance or rejection of the hypothesis, level of significance was set at $p < 0.05$.

The weight of animals increased in all three groups. The tumor weight and tumor volume was significantly lower in the experimental group treated compared to the patient group (sham) ($p < 0.0001$, $p < 0.05$ respectively). IFN- γ and IL-4 levels were measured by ELISA tests were significantly increased ($p < 0.05$) and decreased ($p < 0.0001$) respectively in the experimental group compared to the patient group (sham).

Based on the results of this research *Allium cepa* could have an inhibitory effect on tumor growth in mice with breast cancer.

Received: 2017/01/31

Accepted: 2017/06/25

Keywords: *Allium cepa*, BALB/c mice, breast cancer, interferon-gamma (IFN- γ), interleukin-4 (IL-4).