Journal of Oceanography

ORIGINAL RESEARCH PAPER

The effect of Sargassum tenerrimum seaweed extracts on WT1 gene expression in K562 leukemia cancer cell line

Amaneh Noshadi [1],**Hoda *Khaledi*** [2*],**Ali *Khodadadi*** [3], ***Seyedeh MaryamMousavi*** [4], ***Rezvan Attari*** [5]

1. Department of Biology, Faculty of Marine Science and Oceanography, Khorramshahr University of Marine Science and Technology, Khorramshahr, Iran

2. Institute of Marine Sciences, Iranian National Institute for Oceanography and Atmospheric Science, Tehran, Iran

3. Department of Immunology, Faculty of Medicine, Jondishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran

4. Department of Biology, Faculty of Sciences, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

5. Department of Biology, Faculty of Sciences, Guilan University, Rasht, Iran

ARTICLE INFO

Article History:
Received: 2022/10/26
Revised: 2023/11/12
Accepted: 2023/09/6

Keywords:
Sargassum tenerrimum
WT1
Real Time PCR
Cell line K562
Anti-cancer effect

*Corresponding author:

✉ *hodakhaledi@inio.ac.ir*

orcid: 0000-0001-6177-6054

doi: **10.52547/joc.14.54.9**

dor:20,1001,1,15621057.1402,14,54,9,5

ABSTRACT

Background and Objectives: Chronic myeloid leukemia is one of the most common types of blood cancer that, despite recent advances in cancer treatment, still results in high patient mortality. Due to the side effects of anti-tumor drugs, natural products such as seaweed extract can be more convenient and safer in treating cancer. In this study, the anticancer activity of *Sargassum tenerrimum* extract was investigated by assessing the rate of apoptosis and expression of the WT1 gene of the K562 chronic myeloid leukemia cell line.

Methods: In this study, 250, 500, and 750 mg/mL of methanolic, chloroform, and hydroalcoholic extracts were prepared. After the cultivation, the K562 cells were incubated with the extract for 24 hours, followed by observation under an inverted microscope to check the degree of apoptosis. After RNA extraction and cDNA synthesis, expression of WT1 gene was determined by real-time PCR. Results showed that all extracts were concentration-dependent and contributed to the induction of the apoptotic cell line K562. Depending on the concentration and type of various extracts from Sargassum tenerrimum, inhibition of gene expression of the WT1 gene was also observed.

Findings: The expression of the WT1 gene in K-562 cells was affected by different treatments of Sargassum tenremus extract. The hydroalcoholic extract had the greatest effect on WT1 expression, with the lowest expression observed at the highest concentration (750 µg/ml). Chloroform and methanolic extracts also showed effects, but to a lesser extent. In general, the expression of WT1 decreased in high concentrations of extracts. The hydroalcoholic extract was effective even in lower concentrations.

Conclusion: These results indicate the anti-cancer potential of *Sargassum tenerrimum* extract on K562 cells by inducing apoptosis as well as inhibiting WT1 gene expression.

NUMBER OF TABLES	NUMBER OF FIGURES	NUMBER OF REFERENCES
0	2	33

مقالهٔ پژوهشی

بررسی بیان ژن WT1 تحت تأثیر عصارهٔ جلبک Sargassum tenerrimum در ردهٔ سلولی K562 لوسمی

آمنه نوشادی[۱]، هدی خالدی[۲*]، علی خدادادی[۳]، سیده‌مریم موسوی[۴]، رضوان عطاری[۵]

۱. گروه زیست‌شناسی، دانشکدهٔ علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، خرمشهر، ایران

۲. پژوهشکدهٔ علوم دریایی، پژوهشگاه ملی اقیانوس‌شناسی و علوم جوّی، تهران، ایران

۳. گروه ایمونولوژی، دانشکدهٔ پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور، اهواز، ایران

۴. گروه زیست‌شناسی، دانشکدهٔ علوم، دانشگاه شهید چمران، اهواز، ایران

۵. گروه زیست‌شناسی، دانشکدهٔ علوم، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

اطلاعات مقاله

تاریخ دریافت:۱۴۰۱/۸/۴
تاریخ بازبینی: ۱۴۰۲/۸/۲۱
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۶/۱۵

واژگان کلیدی:
WT1 *Sargassum tenerrimum*
Real Time PCR
ردهٔ سلولی K562
اثر ضدّسرطان

*نویسندهٔ مسئول
hodakhaledi@inio.ac.ir
orcid: 0000-0001-6177-6054
doi: 10.52547/joc.14.54.9
dor:20,1001,1,15621057.1402,14,54,9,5

چکیده

پیشینه و اهداف: لوسمی میلوئید مزمن از انواع رایج سرطان خون است که، به‌رغم پیشرفت‌های اخیر در درمان سرطان، هنوز منجر به مرگ‌ومیر بالایی در بیماران می‌شود. به‌دلیل عوارض جانبی داروهای ضدّتومور، محصولات طبیعی، مانند عصارهٔ جلبک قهوه‌ای، برای درمان سرطان مناسب‌تر و ایمن‌تر هستند. در مطالعهٔ حاضر، فعالیت ضدّسرطانی عصارهٔ جلبک *Sargassum tenerrimum*، ازطریقِ ارزیابی میزان آپوپتوز و بیان ژن WT1، در ردهٔ سلولی K562 لوسمی میلوئید مزمن بررسی شد.

روش‌ها: در تحقیق حاضر، غلظت‌های ۲۵۰، ۵۰۰، ۷۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره‌های متانولی، کلروفرمی و هیدروالکلی جلبک *Sargassum tenerrimum* تهیه شد. سلول‌های K562، پس از کشت، به‌مدت ۲۴ ساعت با عصاره انکوبه شدند. سپس، زیر میکروسکوپ اینورت برای بررسی میزان آپوپتوز مشاهده شدند. پس از استخراج RNA و سنتز cDNA، بیان ژن WT1 توسط Real time PCR تعیین شد.

یافته‌ها: نتایج تحلیل بیان WT1 در سلول‌های K-562 با تیمار مختلف عصارهٔ *Sargassum tenerrimum* نشان داد که این عصاره‌ها بر بیان این ژن تأثیرگذار هستند. عصارهٔ هیدروالکلی *Sargassum tenerrimum* با تأثیر بیشتری بر بیان WT1 مواجه شد درحالی‌که کمترین بیان در بالاترین غلظت (۷۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) مشاهده شد. عصاره‌های کلروفرمی و متانولی نیز تأثیراتی از خود نشان دادند. بیان WT1 در غلظت‌های بالای عصاره‌ها کاهش یافت. عصارهٔ هیدروالکلی نشان داد که با کمترین بیان، حتی در غلظت‌های پایین‌تر نیز، مؤثر است.

نتیجه‌گیری: نتایج تحقیق حاضر نشان می‌دهد که عصارهٔ *Sargassum tenerrimum*، ازطریق القای آپوپتوز و همچنین مهار بیان ژن WT1، دارای پتانسیل ضدّسرطانی علیه سلول‌های K562 است.

مقدمه

لوسمی میلوئید مزمن (CML= Chronic myeloid leukemia [1]) اختلال بدخیم سلول‌های بنیادی خون‌ساز (HSCs= hematopoietic stem cells [2]) است که ۱۵ تا ۲۰ درصد از کل موارد لوسمی در بزرگسالان را تشکیل می‌دهد[۱، ۲].

لوسمی میلوئید مزمن (CML) نوعی سرطان خون است که از ناهنجاری‌ای ژنتیکی در سلول‌های بنیادی مغز استخوان ناشی می شود. این ناهنجاری منجر به تولید بیش‌ازحد گلبول‌های سفید خون می‌شود که در عملکرد طبیعی سایر سلول‌ها و اندام‌های خونی اختلال ایجاد می‌کند. CML تقریباً ۱۵ درصد از لوسمی‌های بزرگسالان را تشکیل می‌دهد و مردان و زنان را به‌طور مساوی تحت تأثیر قرار می‌دهد. این بیماری به‌تدریج شروع می‌شود و طی چند ماه تا سال پیشرفت می‌کند. در سال‌های اخیر، با توسعهٔ درمان‌های هدفمند، مانند مهارکننده‌های تیروزین کیناز، گزینه‌های درمانی برای CML به‌طور درخور توجهی بهبود یافته است. بااین‌حال، مدیریت این بیماری در درازمدت به‌صورت چالش باقی مانده است. درک بیولوژی و درمان CML یک حوزهٔ فعال تحقیقاتی در انکولوژی است.

مطالعات اخیر نشان داده است که تغییر در عملکرد فاکتورهای رونویسی سبب تغییر در مکانیسم مولکولی انکوژن‌ها می‌شود. یک نمونه از این تغییرات جداسازی و مشخص کردن ویژگی‌های ژن مهارکنندهٔ تومور ویلمز ۱ (WT1) است[۳]. ارزیابی کمّی بیان ژن WT1 پارامتری مؤثر و کارآمد برای بررسی لوسمی‌ها و همچنین ارزیابی تأثیر درمان و پیش‌بینی عود در مبتلایان به لوسمی حاد میلوئیدی و لوسمی حاد لنفوسیتی است[۴].

به‌طورِکلی، جلبک‌های دریایی مصارف گوناگونی، ازجمله به عنوان غذای دام، طیور و آبزیان؛ مصارف انسانی، و استفاده به‌عنوان کود و ترکیبات فعال زیستی، دارند. ترکیبات زیست‌فعال آنها، مانند ترکیبات پلی‌ساکاریدهای سولفاته، فلوروتانین‌ها و دیترین‌ها، به‌خصوص در جلبک‌های قهوه‌ای، به‌دلیل ویژگی‌های ضدّباکتریایی، ضدّویروسی و ضدّسرطانی، در صنایع گوناگون کاربرد دارند[۵ـ۸]. ترکیبات فنلی، به‌مثابهٔ پاداکسایندهای مؤثر در جلبک‌های قهوه‌ای، بین ۲۰ تا ۳۰ درصد از وزن خشک این جلبک‌ها را به خود اختصاص داده‌اند. ترکیبات زیست‌فعال، نقش پاداکساینده را در پیشگیری و درمان بسیاری از بیماری‌ها، ازجمله گرفتگی عروق خونی، التهاب مزمن، بی‌نظمی‌های قلبی‌ـعروقی، سرطان و فرایندهای پیر شدن، ایفا می‌کنند[۹، ۱۰]. در بین جلبک‌های قهوه‌ای، جنس سارگاسوم از پتانسیل بالایی در محتوای پاداکساینده برخوردار است و مطالعات متعددی روی آن انجام شده است. مطالعات اخیر نشان داده‌اند که عصاره‌های برگرفته از این جلبک، به علت دارا بودن فوکوئیدان، منجر به مهار تکثیر سلول سرطانی و القای آپوپتوز می‌شوند[۱۱]. بااین‌حال، خصوصیات ضدّسرطانی سارگاسوم تنریموم (Sargassum tenerrimum) خلیج‌فارس تا حد زیادی ناشناخته مانده است.

هدف از تحقیق حاضر بررسی فعالیت بالقوهٔ القای آپوپتوز جلبک *Sargassum tenerrimum* در برابر ردهٔ سلولی K562، ارزیابی تأثیر آن بر بیان ژن WT1 در این سلول‌ها و کمک به درک فعالیت بیولوژیکی *Sargassum tenerrimum* و پتانسیل آن، به‌مثابهٔ منبعی از عوامل درمانی جدید برای لوسمی میلوئیدی مزمن، است.

روش پژوهش

۱. نمونه‌برداری

در فصل بهار (خردادماه)، در ساحل استان بوشهر (در 28°54’23.8"N 50°48’59.9"E)، نمونه در زمان جزر جمع‌آوری شد. نمونه‌ها با آب دریا تمیز شدند و، برای اطمینان از حفظ ساختار سلولی نمونه‌ها و جلوگیری از آسیب، در کیسه‌های پلی‌اتیلن استریل قرار داده و با حفظ زنجیرهٔ سرد به آزمایشگاه منتقل شدند[۱۲، ۱۳]. برای تأیید گونهٔ جلبک، خصوصیات ریخت‌شناسی آنها (رنگ، اندازه، پهنک‌ها و...) در آزمایشگاه ثبت و سپس مشخصات مذکور، به‌کمک کلیدهای شناسایی معتبر سواحل خلیج‌فارس و دریای عمان در این زمینه تطبیق داده شد و، درنهایت، نمونه‌های جلبکی شناسایی شدند.

۲. عصاره‌گیری از جلبک

در آزمایشگاه، نمونه‌های سارگاسوم به‌طور کامل شسته شدند تا شن، اپی‌فیت و ارگانیسم‌های چسبیده به سطح حذف شوند. برای نمک زدایی جلبک‌ها، نمونه‌ها در چندین تغییر آب مقطر ۳ مرتبه خیسانده شدند و آب هر ۲ ساعت یک بار تعویض شد. جلبک‌ها، پس از خیساندن نهایی، سه بار با آب مقطر تازه شسته شدند. سپس، روی پارچهٔ نخی تمیز پخش شدند تا در هوا خشک شوند. سینی‌های خشک‌کن در محیط گلخانه‌ای سایه‌دار با دمای محیط بین ۳۰ تا ۳۵ درجهٔ سانتیگراد نگهداری شدند. جلبک‌ها بعد از ۴ روز به وزن ثابت رسیدند. نمونه‌های جلبک خشک‌شده، با استفاده از مخلوط‌کن تجاری، به پودر تبدیل شدند. پودر از یک الک ۱۰۰ مش

1 . leukemia
2 . HSCs= hematopoietic stem cells

عبور داده شد تا اندازهٔ ذرات یکنواخت به دست آید. جلبک‌های پودری تا زمان استخراج در ظروف پلاستیکی دربسته، در دمای ۲۰- درجهٔ سانتی‌گراد، نگهداری شدند[۱۸ـ۱۴].

با استفاده از سه حلّال متانول، کلروفرم و هیدروالکل (متانول ۷۰ درصد)، ترکیبات فعال زیستی از *Sargassum tenerrimum* استخراج شدند. بدین‌منظور، ۱۰ گرم پودر جلبک با هریک از حلّال‌ها به‌طور جداگانه مخلوط شد (۲۰۰ میلی‌لیتر حلّال). ارلن‌هایی حاوی پودر جلبک و حلّال به‌مدت ۴۸ ساعت در دمای اتاق و با سرعت ۱۰۰ دور در دقیقه روی شیکر قرار داده شدند. پس از گذشت زمان مشخص‌شده، نمونه‌ها دو بار، ازطریقِ کاغذ صافی واتمن شمارهٔ ۱، فیلتر شدند. سپس، عصارهٔ به‌دست‌آمده، با استفاده از روتاری اواپراتور (تقطیر در خلأ)، در دمای ۴۰ درجهٔ سانتی‌گراد تغلیظ و، درنهایت، برای اطمینان از حذف کامل حلّال باقی‌مانده در عصاره، با دستگاه فریزدرایر خشک شد.

۳. تهیه و تیمار سلول‌های ردهٔ K562

سلول‌های ردهٔ K562 (لوسمی میلوئید مزمن) با کد C122 از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران خریداری شدند. سلول‌ها در محیط کشت RPMI با ۱۰ درصد FBS و ۱ درصد پنی سیلین/استرپتومایسین کشت داده شدند و در انکوباتور (NAPCO- آمریکا) با ۵ درصد CO_2، رطوبت ۹۵ درصد و دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد انکوبه، هر ۴۸ ساعت یک بار، بعد از رسیدن به تراکم ۷۰ درصد فلاسک پاساژ داده شدند. عصاره‌های به‌دست‌آمده در محیط کشت RPMI و دی‌متیل سولفوکسید (DMSO) برای تهیهٔ محلول های استوک حل شدند و، سپس، غلظت‌های متفاوت (۲۵۰، ۵۰۰ و ۷۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) [۱۹ـ۲۱] از هر عصاره در سه تکرار به سلول‌ها اضافه شد و سلول‌ها به‌مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. گروه کنترل تنها با محیط کشت تیمار شدند. پس از ۲۴ ساعت، از Real- time PCR برای ارزیابی بیان WT1 در سلول‌های K562 استفاده شد و، در ادامه، آپوپتوزیس سلول‌های K562 تحت تأثیر عصارهٔ جلبک نیز بررسی شد.

بررسی آپوپتوز سلول‌های K۵۶۲ تحت تأثیر عصارهٔ جلبک سلول‌های K۵۶۲ در محیط کشت کامل کشت داده شد و تعداد ۳×۱۰^{۴} سلول در هر چاهک ۹۶خانه‌ای کشت شدند و، پس از ۱۸ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد، رطوبت ۸۰ درصد و ۵ درصد CO_2، برای بررسی چسبندگی به کف پلیت، با میکروسکوپ اینورت مشاهده شدند. سپس، مایع رویی خارج شد و با غلظت‌های مختلف عصارهٔ *Sargassumtenerrimum* تیمار شد. میزان آپوپتوز القاشده توسط عصاره‌ها پس از مدت ۲۴ ساعت با میکروسکوپ اینورت (OLYmpus- ژاپن) بررسی و نتایج هر چاهک ثبت شد.

۴. بررسی بیان ژن WT1 تحت تأثیر عصارهٔ جلبک

از کیت Thermo Scientific GeneJET RNA Purification برای استخراج RNA از سلول‌های K562 استفاده شد. به‌صورت خلاصه، سلول‌های کشت‌شده سانتریفیوژ شدند. مایع رویی دور ریخته شد و توده‌های سلولی در بافر با β-مرکاپتواتانول لیز شدند. اتانول قبل از بارگذاری نمونهٔ لیزشده روی ستون‌های اسپین سیلیس اضافه شد. ستون‌ها با بافرهای ۱ و ۲ برای حذف آلاینده‌ها شسته شدند. درنهایت، RNA در آب بدون نوکلئاز شسته شد. نمونه‌های خالص سازی‌شده به میکروتیوب منتقل و در دمای ۸۰- درجهٔ سانتی‌گراد نگهدار شدند. تمام مراحل در دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد، برای حفظ یکپارچگی RNA، اجرا شد. برای سنتز cDNA نیز، از کیت RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit-Thermo Fisher و پرایمر OligodT استفاده شد. به‌طور خلاصه، RNA سلولی استخراج‌شده در مرحلهٔ قبل تعیین غلظت شد و مقادیر مساوی RNA (۴ میکروگرم) در میکروتیوب‌ها توزیع و با ۱ میکرولیتر پرایمر Random hexamer و ۴ میکرولیتر آب بدون نوکلئاز ترکیب شدند. نمونه‌ها، برای تسهیل annealing، به‌مدت ۵ دقیقه در ۷۰ درجهٔ سانتی‌گراد گرم و سپس روی یخ سرد شدند. یک مسترمیکس حاوی رونویسی معکوس، dNTPها و بافر واکنش تهیه شد. ۱۰ میکرولیتر از مسترمیکس به هر نمونهٔ RNA annealed اضافه شد. واکنش‌ها در یک سیکل دمایی (۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد به‌مدت ۵ دقیقه، ۴۲ درجهٔ سانتی‌گراد به‌مدت ۶۰ دقیقه و ۷۰ درجهٔ سانتی گراد به‌مدت ۱۵ دقیقه)، برای سنتز cDNA تک‌رشته‌ای، قرار گرفتند. cDNA حاصل در ۲۰- درجهٔ سانتی‌گراد، قبل از استفاده به‌مثابهٔ الگوی real-time PCR، ذخیره شد. از Real time PCR برای ارزیابی بیان WT1 در سلول‌های K562 استفاده شد. پرایمرهای استفاده‌شده در این مطالعه [۲۲، ۲۳]، طبق دستورالعمل شرکت سازنده، سنتز شدند. درنهایت، واکنش Real time PCR با استفاده از ۲ میکرولیتر نمونهٔ cDNA، ۱ میکرولیتر از هر پرایمر (با توالی AGGGTACGAGAGCGATAACCACAC و TCAGATGCCGACCGTACAAGA به‌عنوان پرایمر رفت و برگشت) با غلظت ۱۰ پیکومول، ۱۲/۵ میکرولیتر سایبرگرین (Amplicon Bio, Korea) و ۸/۵ میکرولیتر آب عاری از نوکلئاز،

با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر، انجام شد. پروفایل دمایی مورد استفاده، شامل یک سیکل ۱۰دقیقه‌ای، در دمای ۹۵ درجهٔ سانتی گراد که با ۴۰ سیکل، شامل ۱۵ ثانیهٔ ۹۵ درجهٔ سانتی‌گراد، ۳۰ ثانیهٔ ۵۴ درجهٔ سانتی‌گراد و ۳۰ ثانیهٔ ۷۲ درجهٔ سانتی‌گراد، ادامه پیدا می‌کرد واکنش Real Time PCR انجام شد[۲۴].

روش comparative Ct ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) برای مطالعهٔ تغییرات نسبی میزان بیان ژن استفاده شد. از ژن خانه‌دار GAPDH با پرایمر رفت GCAAGAGCACACAAGAGGAAGA و برگشت ACTGTGAGGAGGGGAGATTC به‌مثابهٔ ژن کنترل استفاده شد[۲۲، ۲۵، ۲۶].

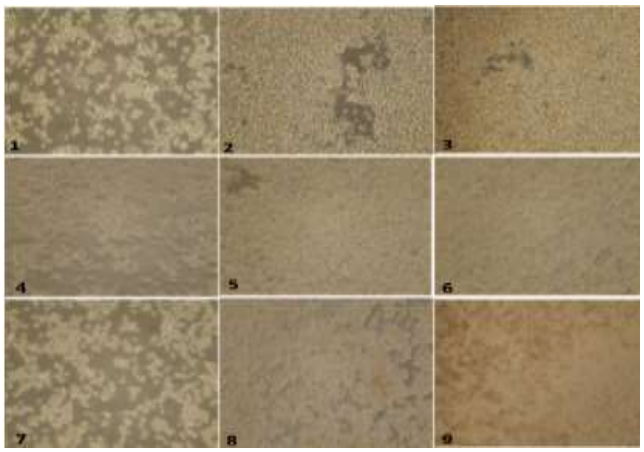
۵. تحلیل داده‌ها

بیان نسبی ژن WT1 با استفاده از روش $^{-\Delta\Delta CT}$-۲محاسبه شد که در آن $\Delta Ct = Ct_WT1 - Ct_GAPDH$، و $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_treatment - \Delta Ct_control$ بود. تحلیل آماری با استفاده از تحلیل واریانس یک طرفه (ANOVA) و، به‌دنبال آن، آزمون تعقیبی توکی برای مقایسه های چندگانه انجام شد. مقدار p کمتر از ۰،۰۵ ازنظرِ آماری معنی دار در نظر گرفته شد. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار Graphpad Prism ورژن ۹ تحلیل شدند.

شرح و بحث

۱. ارزیابی القای آپوپتوز توسط عصارهٔ جلبک

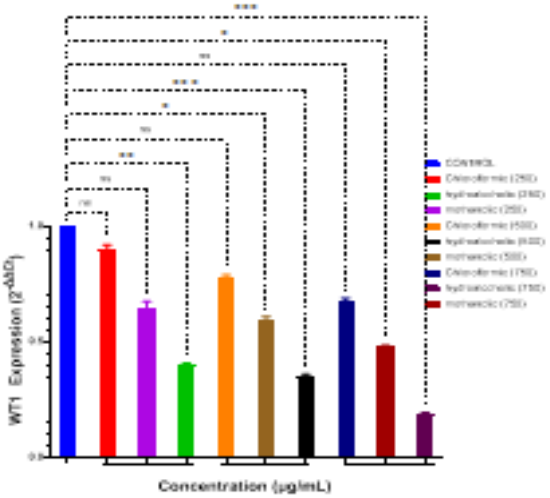
نتایج ارزیابی القای آپوپتوز توسط عصارهٔ Sargassum tenerrimus در سلول‌های K562 نشان داد که هر سه عصارهٔ کلروفرمی، متانولی و هیدروالکلی موجب آپوپتوز این سلول‌ها می‌شوند. همان‌طورکه در شکل ۱ مشاهده می‌کنید، تعداد سلول‌های آپوپتوزی تحت تأثیر غلظت‌های بالاتر عصاره‌ها افزایش یافته است. همچنین بیشترین میزان آپوپتوز تحت تأثیر عصارهٔ هیدروالکلی و کمترین میزان آپوپتوز تحت تأثیر عصارهٔ کلروفرمی مشاهده شد.



شکل ۱ بررسی آپوپتوز القاشده در سلول‌های K562 توسط عصارهٔ Sargassum tenerrimus (نواحی قهوه‌ای تیره سلول‌های مرده و نواحی روشن و برّاق سلول‌های زنده را نشان می‌دهند). ۱. تیمار با عصارهٔ هیدروالکلی ۲۵۰، ۲. تیمار با عصارهٔ هیدروالکلی ۵۰۰، ۳. تیمار با عصارهٔ هیدروالکلی ۷۵۰، ۴. تیمار با عصارهٔ متانولی ۲۵۰، ۵. تیمار با عصارهٔ متانولی ۵۰۰، ۶. تیمار با عصارهٔ متانولی ۷۵۰، ۷. تیمار با عصارهٔ کلروفرمی ۲۵۰، ۸. تیمار با عصارهٔ کلروفرمی ۵۰۰، ۹. تیمار با عصارهٔ کلروفرمی ۷۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر (بزرگ‌نمایی X ۴۰).

۶. ارزیابی بیان ژن تحت تأثیر عصارهٔ جلبک

بیان ژن WT1 در سلول‌های K562 لوسمی میلوئید مزمن تحت تیمار با غلظت‌های عصاره‌های Sargassum tenerrimus با استفاده از روش Real-time PCR بررسی شد (شکل ۲).



شکل ۲ بررسی بیان ژن WT1 در سلول‌های K562 تیمارشده با غلظت های متفاوت (۲۵۰، ۵۰۰ و ۷۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) جلبک Sargassum tenerrimus ، در مقایسه با گروه کنترل منفی عصاره (*: تفاوت معنادار با گروه کنترل با حد معناداری $p<0.05$، **: تفاوت معنادار با گروه کنترل با حد معناداری $p<0.01$ ، *: تفاوت معنادار با گروه کنترل با حد معناداری $p<0.001$ و ns بدون تفاوت معنادار با گروه کنترل).**

نتایج تحلیل بیان WT1 در سلول‌های K-562 تیمارشده با غلظت‌های متفاوت عصارهٔ *Sargassum tenerrimum* نشان می دهد که عصاره‌ها به‌طور درخور توجهی بر بیان این ژن تأثیر می‌گذارند. تحلیل با استفاده از آزمون واریانس یک‌طرفه (ANOVA) و پس از آن آزمون تعقیبی توکی، برای مقایسه‌های چندگانه با سطح معنی‌داری $p>0/05$، انجام شد.

درمجموع، نتایج نشان می‌دهد عصارهٔ هیدروالکلی Sargassum tenerrimus بیشترین تأثیر را بر بیان WT1 دارد و کمترین میزان بیان در بالاترین غلظت (۷۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) مشاهده شده است. عصاره‌های کلروفرمی و متانولی نیز تأثیرات درخور توجهی بر بیان WT1 نشان دادند که کمترین بیان در غلظت‌های بالا (۵۰۰ و ۷۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) مشاهده شد.

شایان ذکر است که عصارهٔ هیدروالکلی قوی‌ترین اثر را نشان داد، با کمترین بیان، حتی در غلظت‌های پایین‌تر (۲۵۰ و ۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر). این نشان می‌دهد که عصارهٔ هیدروالکلی ممکن است به‌ویژه در کاهش بیان WT1 در سلول های K-562 مؤثر باشد.

بحث

مطالعات نشان داده است که بیان بیش‌ازحد WT1 در بیشتر موارد مربوط به لوسمی میلوئید حاد، لوسمی لنفوبلاستیک حاد، لوسمی میلوئید مزمن و سندرم میلودیسپلاستیک رخ می‌دهد. بیان بافتی محدود WT1 در بزرگسالان نشان می‌دهد که WT1 می‌تواند هدفی برای درمان سرطان خون باشد[۳]. با توجه به خواص درمانی جلبک‌های سارگاسوم، در مطالعهٔ حاضر، پتانسیل عصارهٔ جلبک *Sargassum tenerrimus* در کاهش بیان WT1 در سلول‌های ردهٔ K562 ارزیابی شد. نتایج نشان داد که هر سه عصارهٔ کلروفرمی، هیدروالکلی و متانولی جلبک *Sargassum tenerrimus* در غلظت‌های ۲۵۰، ۵۰۰ و ۷۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر موجب کاهش بیان WT1 می‌شوند. عصارهٔ هیدروالکلی بیشترین تأثیر را بر کاهش بیان این ژن داشت. همچنین کاهش بیان ژن WT1 با افزایش غلظت عصاره های استفاده‌شده رابطه‌ای معنی‌داری را نشان داده است ($p<0.05$). این نتایج با نتایج ارزیابی آپوپتوز نیز همخوانی داشت. نتایج ما نشان داد که هر سه عصارهٔ مورد مطالعه موجب القای آپوپتوز، به‌صورت وابسته به غلظت، در سلول‌های K562 می‌شوند.

سازوکار دقیقی که بیان بالای WT1 (تومور ویلمز ۱) به رشد و گسترش سرطان‌های خونی کمک می‌کند به‌طور کامل شناخته نشده است اما سازوکارهایی بر اساس مطالعات بالینی و بالینی پیشنهاد شده‌اند. یک سازوکار پیشنهادی این است که WT1 ممکن است با مهار آپوپتوز (مرگ برنامه‌ریزی‌شدهٔ سلولی) بقا و تکثیر سلول‌های سرطانی را تقویت کند. مطالعات نشان داده‌اند که بیان بالای WT1 در سرطان‌های خونی با کاهش ژن‌های پرو آپوپتوز، مانند BAX و کاسپاز-۳، و تنظیم مثبت ژن‌های ضدّآپوپتوز، مانند BCL-2 و MCL-1، مرتبط است. این نشان می‌دهد که WT1 ممکن است بقای سلول سرطانی را با مهار آپوپتوز افزایش دهد. سازوکار پیشنهادی دیگر این است که WT1 ممکن است با تنظیم بیان ژن‌های دخیل در تنظیم چرخهٔ سلولی و ترمیم DNA به توسعه و پیشرفت سرطان کمک کند. مطالعات نشان داده‌اند که WT1 با انواع پروتئین‌های درگیر در این فرایندها، ازجمله p53، BRCA1 و RAD51، تعامل دارد که نشان می‌دهد ممکن است در حفظ ثبات ژنومی و جلوگیری از آسیب DNA نقش داشته باشد. علاوه‌براین، نشان داده شده است که WT1 با سایر فاکتورهای رونویسی، مانند GATA-1 و C/EBPα که در تنظیم خون‌سازی و تمایز نقش دارند، تعامل دارد. بی‌نظمی این مسیرها ممکن است با ترویج تکثیر سلول‌های تمایزنیافته به ایجاد سرطان‌های خونی کمک کند. به‌طورِکلی، به نظر می‌رسد بیان بالای WT1 در سرطان‌های هماتولوژیک با اختلال در تنظیم انواع فرایندهای سلولی درگیر در بقا، تکثیر و تمایز سلولی مرتبط باشد. تحقیقات بیشتری برای درک کامل سازوکارهایی که WT1 به پیشرفت سرطان کمک می‌کنند و نیز توسعهٔ درمان‌های مؤثری که این فاکتور رونویسی را هدف قرار می‌دهند مورد نیاز است. درنهایت، بیان بالای WT1 ازطریقِ اختلال در تنظیم انواع فرایندهای سلولی که در بقا، تکثیر و تمایز سلولی نقش دارند در رشد و گسترش سرطان‌های خونی تأثیر دارد[۳۰ـ۲۷]. با توجه به نتایج تحقیق حاضر مبنی بر کاهش بیان ژن WT1 تحت تأثیر عصارهٔ *Sargassum tenerrimus* در سلول‌های K562، می‌توان نتیجه گرفت که ممکن است یکی از مکانیسم‌های تأثیرات ضدّسرطانی عصارهٔ *Sargassum tenerrimum* مهار WT1 باشد.

خواص ضدّسرطانی جلبک سارگاسوم علیه انواع رده‌های سلولی سرطانی در مطالعات قبلی نیز گزارش شده است. Khanavi و همکاران در سال ۲۰۱۲، در سواحل خلیج‌فارس، عملکرد جلبک‌های *Sargassum angustifolium* را علیه ردهٔ

سلول‌های سرطان روده (HT-29)، کولورکتال (Caco-2)، سرطان پستان (T47D) و فیبروبلاست جنین موش سوئیسی (NIH3T3)، با استفاده از سنجش MTT، آزمایش کردند. نتایج نشان داد که فرکشن هگزان Sargassum angustifolium دارای سمیت سلولی علیه ردهٔ سلولی T47D و HT-29 بود[۳۱]. در سال ۲۰۱۶، Somasundaram و همکاران اثر فکوئیدان استخراج‌شده از Sargassum cinereum را روی ردهٔ سلولی HCT-15 سرطان کولون آزمایش و گزارش کردند که عصارهٔ فکوئیدان با غلظت ۷۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر موجب شد بعد از ۲۴ ساعت حدود ۵۰ درصد ردهٔ سلولی HCT سرطان کولون دچار آپوپتوز شود[۳۲]. فکوئیدان که به‌مثابهٔ آنتی‌اکسیدان، ضد انعقاد خون، ضدّسرطان، ضدّویروس و ایمنی‌ساز بدن شناخته شده است از گونه‌های جلبک قهوه‌ای جداسازی می شود. در مطالعهٔ Namvar و همکاران در سال ۲۰۱۴، اثر عصارهٔ الکلی جلبک قهوه‌ای Sargassum ilicifolium علیه پنج رده سلول مهم سرطانی انسان (MCF-7، MDA-MB-231، HeLa، HepG2 و HT-29)، با هدف ارزیابی آپوپتوز و توقف چرخهٔ سلولی، بررسی شد. این عصاره دارای خاصیت مهارکنندگی رشد علیه سلول‌های سرطانی به‌صورت وابسته به دوز بود. با استفاده از این عصاره، درصد آپوپتوز از ۱۸ به ۷۸ درصد افزایش پیدا کرد[۳۳].

نتیجه‌گیری

تأثیر عصارهٔ *Sargassum tenerrimum* بر بیان ژن WT1 در سلول‌های K562 تاکنون بررسی نشده و تحقیق حاضر برای اولین بار به آن پرداخته است. نتایج پژوهش حاضر نشان داد که عصاره‌های جلبک *Sargassum tenerrimum* خلیج‌فارس، به خصوص نوع هیدروالکلی آن، موجب مرگ سلول‌های K562 می‌شوند، به‌مثابهٔ نوعی مهارکنندهٔ اختصاصی WT1 عمل می‌کنند و به‌طور مؤثری بیان این ژن را کاهش می‌دهند. به نظر می‌رسد، با نتایجی که در این پژوهش از تأثیر عصاره‌های جلبک *Sargassum tenerrimum* خلیج‌فارس بر مهار سرطان خون با تأثیر بر WT1 و القای آپوپتوز به دست آمد، می‌توان آن را ترکیبی بالقوه برای ورود به چرخهٔ صنایع غذایی و داروسازی و پیشگیری و درمان سرطان‌های خونی و حتی سایر تومورها دانست.

مشارکت نویسندگان

نویسندهٔ اول (آمنه نوشادی) مسئول عملیات آزمایشگاهی، آنالیز داده‌ها و تهیهٔ مقدمه؛ نویسندهٔ دوم (هدی خالدی)، نویسندهٔ مسئول مقاله، مسئول راهنمایی طرح پژوهشی، نوشتن مقاله و گردآوری اطلاعات؛ نویسندهٔ سوم (علی خدادادی) مسئول بخش مواد و روش‌ها، و نویسندهٔ چهارم (سیده‌مریم موسوی) مسئول بخش آنالیز داده‌ها بوده است. نویسندهٔ پنجم (رضوان عطاری) به جمع‌آوری و سامان‌دهی اطلاعات کمک کرده است.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌کنند که هیچ‌گونه تضاد منافع وجود ندارد.

منابع

[1] . Soverini S, De Benedittis C, Mancini M, Martinelli G. Best practices in chronic myeloid leukemia monitoring and management. The Oncologist. 2016;21(5):626-33. https://doi.org/10.1634/theoncologist.2015-0337

[2] . Goldman JM, editor Chronic myeloid leukemia: a historical perspective. Seminars in hematology; 2010: Elsevier. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20875546/

[3] . Rosenfeld C, Cheever M, Gaiger A. WT1 in acute leukemia, chronic myelogenous leukemia and myelodysplastic syndrome: therapeutic potential of WT1 targeted therapies. Leukemia (08876924). 2003;17(7). https://www.nature.com/articles/2402988

[4] . Niktoreh N, Walter C, Zimmermann M, von Neuhoff C, von Neuhoff N, Rasche M, et al. Mutated WT1, FLT3-ITD, and NUP98-NSD1 fusion in various combinations define a poor prognostic group in pediatric acute myeloid leukemia. Journal of oncology. 2019. https://www.hindawi.com/journals/jo/2019/1609128/

[5] . Yende SR, Harle UN, Chaugule BB. Therapeutic potential and health benefits of Sargassum species. Pharmacognosy reviews. 2014;8(15):1. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3931196/

https://www.koreascience.or.kr/article/JAKO201510534323721.page

[12] .Khaledi, Mostafa, et al. "Antiproliferative and proapoptotic activities of Sea Cucumber H. Leucospilota extract on breast carcinoma cell line (SK-BR-3)." Molecular Biology Reports 49.2 (2022): 1191-1200.

[13] . Golfakhrabadi, Fereshteh, et al. "Isolation, identification, and HPTLC quantification of dehydrodeoxycholic acid from Persian gulf sponges." Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 197 (2021): 113962.

Wang, W., et al. "Preparation, anti-inflammatory and anticancer activities of sulfated polysaccharides from seaweed." International journal of biological macromolecules 105 (2017): 1387-1394.

[14] .Lim, S.-J., et al. "Preparation, antioxidant and anti-inflammatory activities of sulfated polysaccharide from marine red algae." Food Science and Biotechnology 21.4 (2012): 1169-1175.

[15] . Plaza, M., et al. "Screening for bioactive compounds from algae." In Advanced Biofuels and Bioproducts (pp. 833-872). Springer, New York, NY, 2013.

[16] .Peng, Z., et al. "An efficient and economical method of preparing seaweed powder using flash vacuum expansion technology." Journal of Food Process Engineering 40.1 (2017): e12338.

[17] . Heo, S.-J., et al. "Evaluation of anti-inflammatory effect of fucoxanthin isolated from brown algae in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages." Food and chemical toxicology 47.8 (2009): 2045-2051.

[18] .Zakaria, Nurul Aili, et al. "Assessment of antioxidant activity, total phenolic content and in-vitro toxicity of Malaysian red seaweed, Acanthophora spicifera." J. Chem. Pharm. Res 3.3 (2011): 182-191.

[19] . Kasmiati, Kasmiati, et al. "Antibacterial activity and toxicity of Halymenia durvillei red seaweed from Kayangan island, South Sulawesi, Indonesia." Fisheries and Aquatic Sciences 25.8 (2022): 417-428.

[6] . Liu J, Luthuli S, Yang Y, Cheng Y, Zhang Y, Wu M, et al. Therapeutic and nutraceutical potentials of a brown seaweed Sargassum fusiforme. Food Science & Nutrition. 2020;8(10):5195-205. https://doi.org/10.1002/fsn3.1835

[7] . Liu J, Luthuli S, Wu Q, Wu M, Choi J-i, Tong H. Pharmaceutical and nutraceutical potential applications of Sargassum fulvellum. BioMed Research International. 2020. https://scholar.google.com/scholar_url?url=https://www.hindawi.com/journals/bmri/2020/2417410/&hl=en&sa=T&oi=gsb-gga&ct=res&cd=0&d=7144860478376079710&ei=6RpXY8qxIoqUy9YPxpG9QA&scisig=AAGBfm2qIGsxFpFV_3A3dOT5iccDeK9MaQ

[8] . Iraninasab S, Archangi B, Amini F, Sakhai N. Morphological and Molecular Investigation of Sargassum vulgare and Sargassum fallax (Fucales, Sargassaceae) from the Coasts of Bushehr Nuclear Power Plant, Persian Gulf. Journal of Oceanography. 2017 Oct 15;8(31):19-26. URL: http://joc.inio.ac.ir/article-1-1199-en.html

[9] . Ashayerizadeh O, Dastar B, Pourashouri P. Study of antioxidant and antibacterial activities of depolymerized fucoidans extracted from Sargassum tenerrimum. International journal of biological macromolecules. 2020;151:1259-66. https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0141813019358854

[10] .Ziyaadini M. Optimizing Extraction of total phenolic Compounds in Sargassum sp. and sea lettuce (Ulva sp.) in Chabahar coastal waters using ultrasonic method. Journal of Oceanography. 2019; 10 (38) :1-10. URL: http://joc.inio.ac.ir/article-1-1508-fa.html

[11] .Patra S, Muthuraman MS, Prabhu A, Priyadharshini RR, Parthiban S. Evaluation of antitumor and antioxidant activity of *Sargassum tenerrimum* against Ehrlich ascites carcinoma in mice. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention. 2015;16(3):915-21.

intermediate and poor-risk acute myeloid leukemia. Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia. 2020;20(12):e998-e1009. https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S215226502030375X

[29] . Cho B-S, Min G-J, Park S-S, Shin S-H, Yahng S-A, Jeon Y-W, et al. WT1 measurable residual disease assay in patients with acute myeloid leukemia who underwent allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: optimal time points, thresholds, and candidates. Biology of Blood and Marrow Transplantation. 2019;25(10):1925-32. https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1083879119303581

[30] . Giudice V, Gorrese M, Vitolo R, Bertolini A, Marcucci R, Serio B, et al. WT1 expression levels combined with flow cytometry blast counts for risk stratification of acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes. Biomedicines. 2021;9(4):387. https://www.mdpi.com/2227-9059/9/4/387

[31] . Khanavi M, Gheidarloo R, Sadati N, Ardekani MRS, Nabavi SMB, Tavajohi S, et al. Cytotoxicity of fucosterol containing fraction of marine algae against breast and colon carcinoma cell line. Pharmacognosy magazine. 2012;8(29):60. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3307205/

[32] . Somasundaram SN, Shanmugam S, Subramanian B, Jaganathan R. Cytotoxic effect of fucoidan extracted from Sargassum cinereum on colon cancer cell line HCT-15. International journal of biological macromolecules. 2016;91:1215-23. https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0141813016306432

[33] . Namvar F, Baharara J, Mahdi A. Antioxidant and anticancer activities of selected persian gulf algae. Indian Journal of Clinical Biochemistry. 2014;29(1):13-20. https://link.springer.com/article/10.1007/s12291-013-0313-4.

[20] . Masoudi, Mehrnoush, et al. "The effect of *Sargassum tenerrimum* seaweed extracts on VEGF gene expression in SW742 colorectal cancer cell line." Daneshvar Medicine 30.3 (2022): 52-61.

[21] . Rezai, Omran, et al. "Assessment of relationship between Wilms' Tumor Gene (WT1) expression in peripheral blood of acute leukemia patients and serum IL-12 and C3 levels." Asian Pacific Journal of Cancer Prevention 16.16 (2015): 7303-7307.

[22] . Iranparast, Sara, et al. "Wilms' tumor gene (WT1) expression correlates with vascular epithelial growth factor (VEGF) in newly acute leukemia patients undergoing chemotherapy." Asian Pacific Journal of Cancer Prevention 15.21 (2014): 9217-9223.

[23] . Wang X, Zhao J, Zhang Y, Liu Y, Wang J, Shi R, Yuan J, Meng K. Molecular mechanism of Wilms' tumor (Wt1) (+/-KTS) variants promoting proliferation and migration of ovarian epithelial cells by bioinformatics analysis. J Ovarian Res. 2023 Feb 24;16(1):46. doi: 10.1186/s13048-023-01124-2. PMID: 36829196; PMCID: PMC9951437.

[24] . Rao X, Huang X, Zhou Z, Lin X. An improvement of the 2ˆ(-delta delta CT) method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. Biostat Bioinforma Biomath. 2013 Aug;3(3):71-85. PMID: 25558171; PMCID: PMC4280562.

[25] . Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods. 2001 Dec;25(4):402-8. doi: 10.1006/meth.2001.1262. PMID: 11846609.

[26] . Lazzarotto D, Candoni A. The Role of Wilms’ Tumor Gene (WT1) Expression as a Marker of Minimal

[27] . Residual Disease in Acute Myeloid Leukemia. Journal of Clinical Medicine. 2022;11(12):3306. https://www.mdpi.com/2077-0383/11/12/3306

[28] . álek C, Vydra J, Cerovská E, Šestáková Š, Ransdorfová Š, Válková V, et al. WT1 expression in peripheral blood at diagnosis and during the course of early consolidation treatment correlates with survival in patients with

AUTHOR(S) BIOSKETCHES

Noshadi, A., *Department of Biology, Faculty of Marine Science and Oceanography, Khorramshahr University of Marine Science and Technology, Khorramshahr, Iran*

✉ ameneh.noshadi@yahoo.com

Khaledi, H Institute of Marine Sciences, Iranian National Institute for Oceanography and Atmospheric Science, Tehran, Iran

✉ hodakhaledi@yahoo.com **0000-0001-6177-6054**

Khodadadi A., *Department of Immunology, Faculty of Medicine, Jondishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran*

✉ alikhodadadi@yahoo.com

Mousavi , S.M., *Department of Biology, Faculty of Sciences, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran*

✉ maryam.musavy@yahoo.com 0000-0003-2719-8566

Attari, R.*, Department of Biology, Faculty of Sciences, Guilan University, Rasht, Iran*

✉ rezvan-attari@webmail.guilan.ac.ir 0000-0002-4820-872X

این قسمت توسط نشریه تکمیل می‌گردد:

HOW TO CITE THIS ARTICLE

http://doi.org/10.52547/joc.14.54.9

http://joc.inio.ac.ir/ article-1-1740-fa.html

https://orcid.org/0000-0001-6177-6054

COPYRIGHTS

©2021 The author(s). This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution (CC BY 4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, as long as the original authors and source are cited. No permission is required from the authors or the publishers.