مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و پنجم/شماره‌ی ۴۳۰/هفته‌ی دوم تیر ماه ۱۳۹۶

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۲/۸
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۳/۲۷

بهینه‌سازی تخلیص اسپورامین سیب‌زمینی شیرین [Ipomoea Batatas (L.) Lam] و بررسی اثر ضد تکثیری آن بر سلول‌های سرطان پستان، رده‌ی MCF-7

مرضیه قیومیان[۱]، عادله علی هاشمی[۱]، مریم امیدی اسکویی[۲]، ایرج نیکوکار[۳]، آزاده کبیری[۴]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: از گذشته تا به امروز، یافتن درمان‌هایی با منشأ گیاهی و روش استخراج راحت و ارزان برای بیماری‌هایی نظیر سرطان مورد توجه بوده است. با توجه به این که پروتئازها در روند ایجاد و گسترش سلول‌های سرطانی دخیل هستند، مهار کنندگان پروتئازی را می‌توان به عنوان گزینه‌ای برای درمان در نظر گرفت. اسپورامین، از جمله مهار کنندگان تریپسینی است که در ریشه‌ی سیب‌زمینی شیرین وجود دارد. در این مطالعه، روش استخراج اسپورامین بهینه شد و برای اولین بار، اثر آن بر تکثیر سلول‌های سرطان پستان رده‌ی Michigan cancer foundation-7 (MCF-7) بررسی گردید.

روش‌ها: عصاره‌ی آبی از سیب‌زمینی‌های شیرین استخراج شده، محلول شفاف شده وارد ستون کروماتوگرافی Diethylaminoethanol-Sepharose (DEAE-Sepharose) گردید. پس از شستشو با شیب نمکی پیوسته، بخش‌های خالص شده جداسازی شدند. برای تأیید خلوص پروتئین استخراج شده از روش Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) استفاده گردید. فعالیت مهاری اسپورامین خالص شده، با استفاده از روش Laskowaski-Takanara اندازه‌گیری گردید و در انتها از روش 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)، برای بررسی اثر ضد تکثیری اسپورامین استفاده گردید.

یافته‌ها: تک باند ۲۵ کیلودالتونی پس از انجام SDS-PAGE، نمایانگر اسپورامین بود. فعالیت مهاری آن نیز ۸۰۰ واحد مهاری در میلی‌گرم در دقیقه به دست آمد. نتایج روش MTT، میزان IC_{50} Inhibitory concentration$_{50}$ برای ۲۴ و ۴۸ ساعت دارای تفاوت معنی‌داری بود ($P < ۰/۰۱۰$).

نتیجه‌گیری: روش تک ستونی تعویض یونی و شیب نمکی پیوسته برای خالص‌سازی اسپورامین موفقیت‌آمیز بود و با توجه به اثر ضد تکثیری آن بر روی سلول‌های MCF-7، امید است بتوان در آینده از این روش برای تخلیص و استفاده در درمان بهره برد.

واژگان کلیدی: Ipomoea batatas، خالص‌سازی، کروماتوگرافی، الکتروفورز پلی‌اکریل آمید، سرطان پستان

ارجاع: قیومیان مرضیه، علی هاشمی عادله، امیدی اسکویی مریم، نیکوکار ایرج، کبیری آزاده. **بهینه‌سازی تخلیص اسپورامین سیب‌زمینی شیرین [Ipomoea Batatas (L.) Lam] و بررسی اثر ضد تکثیری آن بر سلول‌های سرطان پستان، رده‌ی MCF-7.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۶؛ ۳۵ (۴۳۰): ۵۷۰-۵۶۵

مقدمه

پروتئازها در ایجاد فرایندهای متفاوتی از جمله آغاز و پیشرفت بیماری‌هایی مانند سرطان دخالت دارند. پروتئازهای متفاوتی نظیر سرین، سیستئین و متالوپروتئینازها، در متاستاز سرطان نقش کلیدی ایفا می‌کنند و به همین دلیل، باید به شدت کنترل گردند (۱). تعادل میان میزان پروتئاز و مهار کننده‌ی آن، در هموستاز سلول نقش حیاتی دارد (۲).

سرطان پستان از جمله شایع‌ترین سرطان‌ها در خانم‌ها می‌باشد که روش‌های متداول درمان، مانند استفاده از شیمی‌درمانی با دز بالا، پس از برداشت توده علاوه بر هزینه‌های هنگفتی که به دنبال دارد، به طور معمول دارای عوارض مختلف و ناخوشایندی همچون مقاومت به دارو است. از این رو، محققان به دنبال یافتن راه حل‌های ساده و ارزان‌تر و اغلب با منشأ گیاهی هستند (۳).

۱- مرکز تحقیقات زیست فن‌آوری پزشکی، دانشکده‌ی پرستاری، مامایی و پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، رشت، ایران
۲- مربی، مرکز تحقیقات زیست فن‌آوری پزشکی، دانشکده‌ی پرستاری، مامایی و پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، رشت، ایران
۳- دانشیار، مرکز تحقیقات زیست فن‌آوری پزشکی، دانشکده‌ی پرستاری، مامایی و پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، رشت، ایران
۴- استادیار، مرکز تحقیقات زیست فن‌آوری پزشکی، دانشکده‌ی پرستاری، مامایی و پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، رشت، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: آزاده کبیری
Email: kabiri@gums.ac.ir

گیاهان برای دفاع از خود در برابر آفات (حشرات) به سرعت شروع به ساخت انواعی از مهار کنندگان پروتئازی می‌کنند(۴). مهار کنندگان پروتئازی، گروه بزرگی از پروتئین‌ها هستند که می‌توانند با شکستن رشته‌های پلی‌پپتیدی آنزیم‌ها، در برابر آن‌ها مقاومت کنند. مهار کننده‌های پروتئازی را می‌توان از منابع مختلفی از جمله بخش‌های مختلف گیاهان جداسازی کرد (۵-۴).

سیب‌زمینی شیرین با نام علمی [Ipomoea batatas (L.Lam)] گیاهی دولپه‌ای است که به صورت گسترده در نواحی آسیای جنوب شرقی (مناطق استوایی) کشت می‌شود (۶) و به عنوان غذای انسان، خوراک دام و مصارف صنعتی کاربرد دارد (۷). تحقیقات نشان داده‌اند که ۸۰-۶۰ درصد پروتئین محلول در بخش ریشه‌ی سیب‌زمینی شیرین را مهار کننده‌ی تریپسین (اسپورامین) تشکیل می‌دهد (۸). اسپورامین، خاصیت ضد تکثیری و القا کنندگی آپوپتوز را در در چند نوع رده‌ی سلولی سرطانی (زبان، کولون و ...) از خود نشان داده است (۱۰-۹).

روش‌های مختلفی برای جداسازی اسپورامین سیب‌زمینی شیرین و تعیین فعالیت مهار کنندگی تریپسین مورد استفاده قرار گرفته است. برای مثال، روش‌های دو ستونی کروماتوگرافی تعویض یونی و سپس ژل کروماتوگرافی (۱۱-۱۰) و یا کروماتوگرافی تمایلی (۱۲) از جمله‌ی روش‌های چند مرحله‌ای هستند و سبب افزایش هزینه‌ی استخراج می‌گردند. در مطالعه‌ی حاضر، از روش تک ستونی کروماتوگرافی تعویض یونی برای خالص‌سازی اسپورامین از ریشه‌ی سیب‌زمینی شیرین استفاده شد و فعالیت مهار کنندگی آن به روش Laskowaski-Takanara اندازه‌گیری گردید. در پایان، اثر ضد تکثیری اسپورامین برای اولین بار بر سلول‌های سرطانی پستان بررسی شد.

روش‌ها

خالص‌سازی اسپورامین از سیب‌زمینی شیرین: تعدادی سیب‌زمینی شیرین از فروشگاه محلی در تهران خریداری گردید. از ریشه های سیب‌زمینی شیرین پس از شستشو، گرفتن پوست و خرد کردن با دستگاه آب‌میوه‌گیری، عصاره‌ی آبی تهیه گردید. عصاره ی آبی خام، بلافاصله با ۴ حجم بافر ۵۰ میلی‌مولار (Tris-HCL) Trisaminomethane- Hydrogen chloride (pH = ۷/۶) که حاوی ۱ میلی‌مولار Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)، ۰/۱ مولار Sodium chloride (NaCl) و ۰/۱درصد (W/V یا Weight/Volume) آسکوربیک اسید مخلوط گردید (از این جا به بعد در بخش خالص‌سازی ترکیب بافر همین موارد به جز آسکوربیک اسید ذکر شده است). مخلوط حاصل، از کاغذ صافی واتمن عبور داده شد. سپس، در دمای ۴۰ درجه‌ی سانتی‌گراد با شتاب ۳۰۰۰x g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. هم حجم محلول رویی، سولفات آمونیوم ۶۰ درصد اضافه گردید. سپس، با شتاب ۳۰۰۰ x g به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. رسوب حاصل در برابر بافر دیالیز گردید. سپس، با سرعت ۲۰۰ میکرولیتر بر دقیقه، وارد ستون Diethylaminoethanol-Sepharose (DEAE-Sepharose) (GE Healthcare) (۱۵ × ۱۰۰ میلی‌متر مربع) شد که از قبل با بافر متعادل شده بود. آن گاه، ستون با شیب نمکی پیوسته‌ی NaCl ۰/۵-۰/۱ مولار شستشو داده شد. فراکشن‌های خارج شده از ستون جمع‌آوری گردید و با استفاده از دستگاه اسپکترومتری در طول موج ۲۸۰ نانومتر خوانده و کروماتوگرام رسم شد.

تعیین خلوص پروتئین استخراج شده به روش SDS-PAGE

برای بررسی و تعیین درجه‌ی خلوص پروتئین در نمونه‌های مختلف حاصل از کروماتوگرافی تعویض یون، از روش SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) استفاده گردید. بعد از آماده‌سازی و نصب قطعات دستگاه الکتروفورز (BioRad)، مواد ژل پایین (تفکیک کننده) طبق دستورالعمل کیت (سیتومتین ژن) با غلظت ۱۲/۵ درصد با یکدیگر مخلوط و در صفحه‌ی مخصوص الکتروفورز ریخته شد. بعد از بسته شدن کامل ژل پایین، ژل بالا (ردیف کننده) نیز با غلظت ۵ درصد و طبق دستورالعمل کیت ساخته و روی ژل پایین ریخته شد. بعد از ریختن ژل بالا، شانه‌ی مربوط به چاهک نیز در ژل فرو برده وزمان داده شد تا ژل ببندد. میزان لازم از هر نمونه‌ی پروتئینی و نشانگر پروتئینی، درون چاهک‌ها ریخته شد و سپس، الکتروفورز با اختلاف پتانسیل ۱۰۰ وات انجام گردید. سپس، ژل در محلول رنگ که حاوی Coomassie Blue R-250 و متانول بود، قرار داده شد.

ژل با آب مقطر شستشو و در محلول رنگ‌بر قرار داده شد. جهت رنگ‌زدایی کامل ژل و هویدا شدن باندهای پروتئینی مجزا، در طیف زمانی ۴۸ ساعته، چندین مرتبه محلول رنگ‌بر تعویض شد.

اندازه‌گیری میزان فعالیت مهار کنندگی تریپسین اسپورامین

خالص سازی شده: میزان فعالیت مهاری اسپورامین استخراج شده مطابق روش Laskowaski-Takanara اندازه‌گیری شد. این روش مبتنی بر ممانعت از افزایش رنگ حاصل از عمل تریپسین بر محلول Nα-Benzoyl-L-arginine ethyl ester (BAEE) است. اثر استرازی تریپسین بر سوبسترای BAEE با افزایش جذب همراه است. در صورت اضافه کردن مهار کننده‌ی تریپسین، از افزایش جذب به علت مهار شدن فعالیت استرازی تریپسین ممانعت به عمل می‌آید (۱۳). در این روش، هر واحد مهاری برابر با کاهش جذب به اندازه‌ی ۰/۰۰۱ در هر دقیقه در طول موج ۲۵۳ نانومتر می‌باشد.

فعالیت مهاری آنزیم مهار کننده در یک میلی‌گرم پروتئین خالص

شده با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد.

$$TIU = \frac{\Delta OD_{253\ nm} / min \times d.f}{0.001 \times total\ protein}$$

[UI/mg/min]

d.f= dilution factor

کشت سلول: سلول‌های سرطانی رده‌ی MCF-7 Michigan cancer foundation-7 (اهدایی از پژوهشکده‌ی ابن‌سینا، تهران) جزء رده‌ی سلولی سرطان پستان از نوع ER^+ Estrogen receptor$^+$ و متاستاز دهنده می‌باشند. سلول‌ها در محیط کشت RPMI-1640 Roswell Park Memorial Institute-1640 (ایده‌زیست نوترکیب) حاوی ۱۰ درصد FBS Fetal bovine serum (Gibco)، ۱ درصد آنتی‌بیوتیک Pen-Strep (Gibco)، در شرایط رطوبت ۹۵ درصد، فشار CO_2 Carbon dioxide برابر ۵ و دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد کشت داده و پس از رسیدن به تراکم ۸۰ درصد، سلول‌ها برای پاساژ آماده شدند.

بررسی وضعیت رشد سلول‌ها در حضور اسپورامین به روش MTT: برای بررسی اثر ضد تکثیری اسپورامین و تعیین غلظت مهار کنندگی IC_{50} Inhibitory concentration$_{50}$ از روش 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) استفاده گردید (۱۴، ۱۲).

مراحل انجام به نحوی بود که مطابق دستورالعمل کیت (ایده‌زیست نوترکیب)، پودر MTT در محیط RPMI-1640 حل گردید. به منظور انجام روش MTT، سوسپانسیونی حاوی ۷۰۰۰ سلول در محیط کامل به هر چاهک پلیت ۹۶ خانه افزوده شد. پس از گذشت یک شب، سلول‌ها گروه‌بندی شدند.

برای گروه شاهد، انکوباسیون تنها با محیط کشت بدون سرم RPMI-1640 در شرایط زمانی ومکانی یکسان با گروه مورد انجام شد و در گروه مورد، انکوباسیون با اسپورامین با غلظت‌های ۲۰۰۰-۲۰ میکروگرم/میلی‌لیتر محلول در محیط کشت بدون سرم RPMI-1640 انجام شد. بعد از اتمام زمان انکوباسیون (۲۴ یا ۴۸ ساعت) چاهک‌ها برای انجام روش MTT آماده شدند.

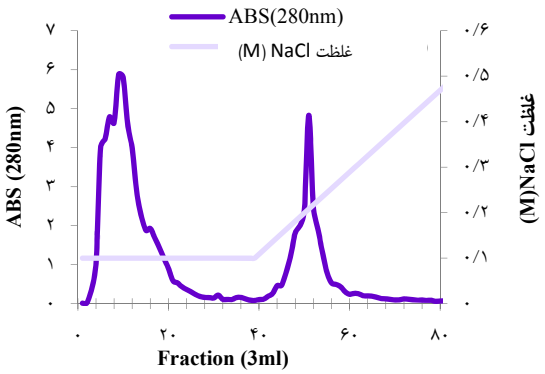
در نهایت، پلیت ۹۶ خانه حاوی سلول با استفاده از دستگاه Enzyme-linked immunosorbent assay reader (ELISA reader) در طول موج ۴۹۰ نانومتر و طول موج رفرنس ۶۳۰ نانومتر در مقابل بلانک خوانش شد. پس از جمع‌آوری اطلاعات، IC_{50} مربوط به گروه‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت طبق فرمول زیر به دست آمد.

$$\%\ cell\ viability = ۱۰۰ \times \frac{OD\ of\ treatment}{OD\ of\ control}$$

آنالیز آماری: برای آنالیز و مقایسه‌ی داده‌ها از آزمون t استفاده گردید. آنالیز داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۱۹ (version 19, SPSS Inc., Chicago, IL) صورت گرفت و $P < ۰/۰۵۰$ به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد. اطلاعات به صورت میانگین ± انحراف معیار ارایه شده است.

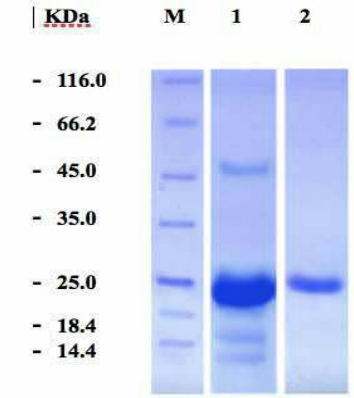
یافته‌ها

استخراج و خالص‌سازی اسپورامین از ریشه‌ی سیب‌زمینی شیرین: محلول‌های به دست آمده از ستون کروماتوگرافی در لوله‌های ۳ میلی‌لیتری روی یخ جمع‌آوری گردید و با اسپکتروفتومتر خوانده شدند. کروماتوگرام رسم گردید (شکل ۱). در کروماتوگرام، ابتدا یک قله‌ی بزرگ قرار دارد که ناخالصی‌ها هستند و به تدریج، با اضافه کردن بافر شستشو و جدا می‌شوند. پس از آن، با استفاده از گرادیان نمکی خطی، قله‌ی دوم مربوط به اسپورامین نمایش داده می‌شود.



شکل ۱. کروماتوگرام حاصل از عبور عصاره‌ی خام سیب‌زمینی شیرین، از ستون کروماتوگرافی Diethylaminoethanol-Sepharose (DEAE-Sepharose)، دو قله مشاهده می‌گردد. قله‌ی اول مربوط به ناخالصی‌ها می‌باشد. قله‌ی دوم که پس از شستشوی ستون با شیب نمکی خطی مشاهده می‌گردد، مربوط به اسپورامین است.

تأیید خلوص اسپورامین استخراج شده با روش SDS-PAGE: برای بررسی و مقایسه‌ی میزان خلوص اسپورامین تخلیص شده، اسپورامین با حجم برابر از بافر، مخلوط و در حضور سدیم دودسیل سولفات در شرایط احیایی الکتروفورز گردید. طبق شکل ۲، ستون M، معرف نشانگر پروتئینی و ستون ۱، معرف نمونه‌ای از عصاره‌ی خام اولیه‌ی استخراج شده از سیب‌زمینی شیرین است. وجود باندهای مختلف بر روی ژل، نشان از وجود ناخالصی در نمونه‌ی ستون ۱ است و ستون ۲، بیانگر اسپورامین خروجی از ستون کروماتوگرافی می‌باشد. تک باند ۲۵ کیلودالتونی در ستون ۲، بیانگر دستیابی به پروتئین خالص اسپورامین است (۱۵).



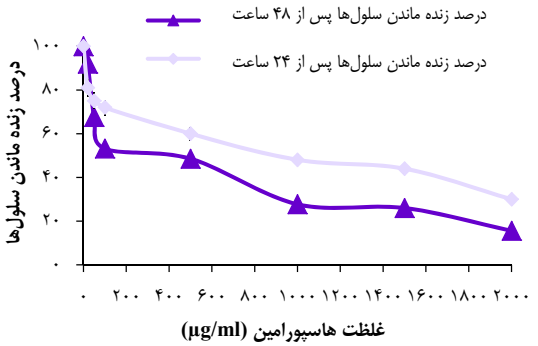
شکل ۲. تأیید خلوص اسپورامین استخراج شده از طریق الکتروفورز بر روی ژل Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). ستون M، مربوط به نشانگر پروتئینی، ستون ۱ مربوط به عصاره‌ی خام (پیش از بردن روی ستون کروماتوگرافی) است. وجود باندهای مختلف، نمایانگر ناخالصی است. ستون ۲، خروجی ستون کروماتوگرافی پس از افزودن شیب نمکی خطی به ستون است که حاصل تک باند ۲۵ کیلودالتونی است.

تعیین فعالیت مهار کنندگی تریپسین و اسپورامین خالص شده:

سنجش فعالیت مهاری اسپورامین خالص شده به روش کینتیک انجام شد. اسپورامین، دارای ۸۰۰ واحد مهاری تریپسین در میلی‌گرم در دقیقه بود.

تعیین IC_{50} اسپورامین ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از تیمار با سلول‌های MCF-77:

پس از خواندن Optical density (OD) سلول‌های گروه‌های شاهد و مورد در ۲۴ و ۴۸ ساعت و قرار دادن آن در فرمول، مقادیر IC_{50} به ترتیب ۰/۵ ± ۹۵۰/۰ و ۰/۷ ± ۲۵۰/۰ میکروگرم/میلی‌متر به دست آمد (شکل ۳). آنالیز آماری بیانگر اختلاف معنی‌دار میان این دو عدد می‌باشد ($P < ۰/۰۱۰$).



شکل ۳. درصد زنده ماندن سلول‌های Michigan cancer foundation-7 (MCF-7)، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از تیمار با غلظت‌های متفاوت اسپورامین

بحث

امروزه، یافتن روش‌های بهینه و کارآمد در خالص‌سازی ترکیبات گیاهی دارای خواص درمانی، اهمیت زیادی پیدا کرده است. در سال ۱۹۸۵، اسپورامین برای اولین بار از عصاره‌ی محلول ریشه‌ی سیب‌زمینی شیرین تخلیص گردید و روی SDS-PAGE، به صورت تک باند ۲۵ کیلودالتونی مشاهده شد (۱۵) که با نتایج مطالعه‌ی حاضر هم‌خوانی دارد.

در مطالعات قبلی، از روش‌های دو ستون پی در پی همانند استفاده از کروماتوگرافی تعویض یونی DEAE-Cellulose و سپس، فیلتراسیون ژلی با Sephadex-G75 (۱۵، ۱۱-۱۰) و یا روش کروماتوگرافی تمایلی (۱۲) برای استخراج اسپورامین استفاده شده است. روش کروماتوگرافی تمایلی نسبت به کروماتوگرافی تعویض یونی، گران‌تر و نیازمند طراحی نشانگر خاص برای خالص‌سازی است (۱۶). از مزایای روش کروماتوگرافی تعویض یونی، می‌توان به مدت زمان کوتاه آنالیز، حساسیت زیاد نسبت به ماده در حد میکروگرم در لیتر، استفاده از مواد شیمیایی ارزان و سالم برای محیط زیست و ... اشاره کرد (۱۷). استخراج اسپورامین از ریشه‌ی سیب‌زمینی شیرین، با تک ستون کروماتوگرافی تعویض یونی با لیگاند DEAE-Sepharose، برای اولین بار در مطالعه‌ی حاضر صورت گرفت. دلیل موفقیت روش تک ستونی در مطالعه‌ی حاضر، استفاده از شیب نمکی پیوسته (۰/۵-۰/۱ مولار NaCl) بود؛ در حالی که در مطالعه‌ی دیگری، از یک غلظت نمکی مشخص مانند ۰/۲ مولار NaCl (۱۰) و یا در مطالعه‌ی دیگری، از غلظت ۲/۰ مولار Potassium chloride (KCL) استفاده (۱۵) و سپس، روش ژل فیلتراسیون به کار گرفته شده بود. استفاده از شیب نمکی، سبب اثر جداسازی کننده‌ی پروتئین از رزین در کروماتوگرافی تعویض یونی می‌گردد (۱۸). استفاده از NaCl، به دلیل خاصیت ضعیف جداسازی کننده به سایر محلول‌ها ترجیح داده می‌شود (۱۶).

نتایج میزان فعالیت مهاری اندازه‌گیری شده در مطالعه‌ی حاضر، با هیچ مطالعه‌ی دیگری قابل مقایسه نمی‌باشد؛ چرا که بر اساس جستجوهای انجام شده، مشخص گردید که سایر مطالعات از روش کیفی زیموگرافی (Zymography) استفاده کرده‌اند (۱۲، ۱۰-۹). تنها در مطالعه‌ی Sun و همکاران، فعالیت مهاری ویژه‌ی اسپورامین به صورت درصدی گزارش شده است (۱۱)، اما در تحقیق حاضر، از روش معتبر و کمی Laskowaski-Takanara استفاده گردید. در روش زیموگرافی، تنها می‌توان نشان داد که اسپورامین خاصیت مهار تریپسین را دارد، اما عددی را به آن نسبت نمی‌دهد.

در نتایج روش MTT، مشخص شد که اثر سمیت اسپورامین بر سلول‌های سرطان پستان وابسته به دز و زمان می‌باشد؛ به گونه‌ای که

با گذر زمان از ۲۴ به ۴۸ ساعت، IC_{50} کاهش می‌یابد که مطابق با نتایج سایر مطالعات انجام شده تاکنون است (۱۲، ۹) و در خصوص مکانیسم اثر اسپورامین، تأکید مطالعات قبلی بر مسیر میتوکندریایی آپوپتوز بوده است (۱۲، ۱۰-۹). بر اساس مطالعات انجام گرفته بر روی سلول‌های سرطان زبان، تیمار با اسپورامین، سبب افزایش بیان Bax، کاهش بیان B-cell lymphoma-2 (BCL-2) و تنظیم منفی مسیر Protein kinase B/Glycogen synthase kinase 3 (Akt/GSK3) فسفریلاسیون می‌گردد (۱۰).

با توجه به کارایی روش پیشنهادی خالص‌سازی اسپورامین از ریشه‌ی سیب‌زمینی شیرین، می‌توان امیدوار بود که در آینده، اسپورامین راحت‌تر و ارزان‌تر تهیه شود و با توجه به مؤثر بودن اسپورامین در کاهش رشد سلول‌های سرطان پستان، می‌توان مطالعات بیشتری بر روی آن انجام داد.

تشکر و قدردانی

مقاله‌ی حاضر، بخشی از طرح پژوهشی مصوب در معاونت تحقیقات و فن‌آوری دانشگاه علوم پزشکی گیلان با شماره‌ی ثبت IR.GUMS.REC.1394.32 می‌باشد. از جناب آقای فرح‌بخش کارشناس محترم آزمایشگاه بیوشیمی، به دلیل حمایت‌های فنی و معنوی، سپاسگزاری می‌گردد.

References

1. Koblinski JE, Ahram M, Sloane BF. Unraveling the role of proteases in cancer. Clin Chim Acta 2000; 291(2): 113-35.
2. Farady CJ, Craik CS. Mechanisms of macromolecular protease inhibitors. Chembiochem 2010; 11(17): 2341-6.
3. Levitsky DO, Dembitsky VM. Anti-breast cancer agents derived from plants. Nat Prod Bioprospect 2014.
4. van der Hoorn RA, Jones JD. The plant proteolytic machinery and its role in defence. Curr Opin Plant Biol 2004; 7(4): 400-7.
5. Meuriot F, Avice JC, Simon JC, Laine P, Decau ML, Ourry A. Influence of initial organic N reserves and residual leaf area on growth, N uptake, N partitioning and N storage in alfalfa (Medicago sativa) during post-cutting regrowth. Ann Bot 2004; 94(2): 311-21.
6. Chen TE, Huang DJ, Lin YH. Isolation and characterization of a serine protease from the storage roots of sweet potato (Ipomoea batatas [L.] Lam). Plant Sci 2004; 166(4): 1019-26.
7. Mu TH, Tan SS, Xue YL. The amino acid composition, solubility and emulsifying properties of sweet potato protein. Food Chem 2009; 112(4): 1002-5.
8. Chen HJ, Wang SJ, Chen CC, Yeh KW. New gene construction strategy in T-DNA vector to enhance expression level of sweet potato sporamin and insect resistance in transgenic Brassica oleracea. Plant Sci 2006; 171(3): 367-74.
9. Li PG, Mu TH, Deng L. Anticancer effects of sweet potato protein on human colorectal cancer cells. World J Gastroenterol 2013; 19(21): 3300-8.
10. Yao J, Qian C. Sporamin induce apoptosis in human tongue carcinoma cells by down-regulating Akt/GSK-3 signaling. Fundam Clin Pharmacol 2011; 25(2): 229-36.
11. Sun YL, Sun JM, Li QP. Purification and trypsin inhibitor activity of a sporamin B from sweet potato (Ipomoea batatas Lam. 55-2). Agr Sci China 2009; 8(7): 808-20.
12. Huang GJ, Sheu MJ, Chen HJ, Chang YS, Lin YH. Growth inhibition and induction of apoptosis in NB4 promyelocytic leukemia cells by trypsin inhibitor from sweet potato storage roots. J Agric Food Chem 2007; 55(7): 2548-53.
13. Laskowski M. Trypsinogen and trypsin. Methods Enzymol 1955; 2: 26-36.
14. Wong-Riley MT. Cytochrome oxidase: an endogenous metabolic marker for neuronal activity. Trends Neurosci 1989; 12(3): 94-101.
15. Maeshima M, Sasaki T, Asahi T. Characterization of major proteins in sweet potato tuberous roots. Phytochemistry 1985; 24(9): 1899-902.
16. Saraswat M, Musante L, Ravida A, Shortt B, Byrne B, Holthofer H. Preparative purification of recombinant proteins: current status and future trends. Biomed Res Int 2013; 2013: 312709.
17. Michalski R. Industrial applications of ion chromatography. Chemik 2014; 68(5): 478-85.
18. Tugcu N, Song M, Breneman CM, Sukumar N, Bennett KP, Cramer SM. Prediction of the effect of mobile-phase salt type on protein retention and selectivity in anion exchange systems. Anal Chem 2003; 75(14): 3563-72.

Journal of Isfahan Medical School
Received: 28.04.2017
Vol. 35, No. 430, 2nd Week, July 2017
Accepted: 17.06.2017

Optimization Sweet Potato [Ipomoea Batats (L.) Lam] Sporamin Extraction and Analyzing its Antiproliferative Effect on Breast Cancer Cells, MCF-7 Cell Line

Marzyeh Ghayoumian[1], Adeleh Alihashemi[1], Maryam Omidioskuie[2], Iraj Nikokar[3], Azadeh Kabiri[4]

Original Article

Abstract

Background: Finding cures with herbal origins with an easy and cost-effective way of extraction for treatment of diseases such as cancer is highly appreciated. Considering that proteases are involved in initiation and spreading of cancer cells, proteases inhibitors can be take into account as an option for treatment. Sporamin is belonging to trypsine inhibitors group which exists in sweet potato tuber. In this study, the method of sporamin extracting was optimized, and for the first time, its effect on proliferation of breast cancer, MCF-7 cell line, was examined.

Methods: Aqueous extraction was obtained from sweet potato. Transparent extraction was inserted into chromatography diethylaminoethanol-Sepharose (DEAE-Sepharose) column. After washing with a linear salt gradient, fractions were separated. To determine protein purity, sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was performed. Sporamin inhibitory activity was measured using Laskowaski method, and eventually 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT method) was used to assess the antiproliferative effect of sporamin.

Findings: A single band of 25 kDa sporamin was obtained via SDS-PAGE. Its inhibitory effect was measured 800 units in mg/minute. According to the results of MTT method, the amounts of inhibitory concentration 50 (IC_{50}) for 24 and 48 hours were significantly different ($P < 0.01$).

Conclusion: Using single-column ion exchange and linear salt gradient for sporamin purification was successful; and due to its antiproliferative effect on MCF-7 cells, there is hope that this technique could be used for the purification of drug and treatment of disease in future.

Keywords: Ipomoea batatas, Purification, Chromatography, Electrophoresis, Polyacrylamide gel, Breast neoplasms

Citation: Ghayoumian M, Alihashemi A, Omidioskuie M, Nikokar I, Kabiri A. **Optimization Sweet Potato [Ipomoea Batats (L.) Lam] Sporamin Extraction and Analyzing its Antiproliferative Effect on Breast Cancer Cells, MCF-7 Cell Line.** J Isfahan Med Sch 2017; 35(430): 565-70.

1- Medical Biotechnology Research Center, School of Nursing, Midwifery and Paramedicine, Guilan University of Medical Sciences, Rasht, Iran
2- Instructor, Medical Biotechnology Research Center, School of Nursing, Midwifery and Paramedicine, Guilan University of Medical Sciences, Rasht, Iran
3- Associate Professor, Medical Biotechnology Research Center, School of Nursing, Midwifery and Paramedicine, Guilan University of Medical Sciences, Rasht, Iran
4- Assistant Professor, Medical Biotechnology Research Center, School of Nursing, Midwifery and Paramedicine, Guilan University of Medical Sciences, Rasht, Iran
Corresponding Author: Azadeh Kabiri, Email: kabiri@gums.ac.ir