بررسی خواص ضد سرطانی و آپاپتوزی عصاره‌ی آبی و هیدروالکلی لارو *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) بر سلول‌های سرطان سینه

مریم درب امامیه[1]*، لیلا سلطانی[2]

تاریخ دریافت ۱۳۹۹/۰۱/۱۶ تاریخ پذیرش ۱۳۹۹/۰۴/۱۱

چکیده

پیش‌زمینه و هدف: اثرات ضد سرطانی لارو حشرات در طب سنتی بر سلول‌های سرطانی به اثبات رسیده است. شناسایی و استخراج ترکیبات ضد سرطان از لارو حشرات می‌تواند به کاهش مشکلات بیماران سرطانی کمک کند. هدف این مطالعه بررسی خواص ضد تکثیری و آپاپتوزی غلظت‌های مختلف عصاره‌ی آبی و اتانولی لارو حشره‌ی *Tenebrio molitor* بر سلول‌های سرطانی سینه (Mcf-7) است.

مواد و روش کار: لاروهای مورداستفاده در مزرعه تحقیقاتی دانشگاه رازی، پرورش داده شدند. عصاره‌ی آبی و اتانولی آن‌ها استخراج شد. غلظت‌های µg/ml ۲۰،۴۰، ۸۰ و ۱۶۰ از این عصاره‌ها به محیط کشت سلول‌های سرطان سینه (MCF-7) اضافه شدند. گروه بدون عصاره به‌عنوان شاهد انتخاب شد. بعد از گذشت ۲۴ ساعت، خاصیت ضد تکثیری با کمک آزمون MTT و آپاپتوز به‌وسیله رنگ‌آمیزی آکریدین نارنجی-اتیدیوم بروماید ارزیابی شد. داده‌های به‌دست‌آمده در نرم‌افزار SPSS آنالیز شدند. از مقایسه میانگین دانکن جهت مقایسات گروه‌های تیماری استفاده شد. سطح معنی‌داری ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: افزودن غلظت‌های پایین (µg/ml ۲۰ و ۴۰) عصاره‌ی اتانولی به محیط کشت بیشترین سمیت را در مقایسه با عصاره‌ی آبی همین غلظت‌ها برجای گذاشته بود ($p<0.05$). بعلاوه غلظت µg/ml ۴۰ در مقایسه با غلظت µg/ml ۲۰ تأثیر معنی‌دار بیشتری داشت($p<0.05$). درحالی‌که غلظت‌های بالا، خصوصاً µg/ml ۱۶۰، عصاره‌ی آبی و اتانولی سبب افزایش معنی‌دار تکثیر در مقایسه با گروه شاهد شد ($p>0.05$). اثر مشابهی در بررسی آپاپتوز نیز مشاهده شد.

بحث و نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد که عصاره‌ی اتانولی لارو در غلظت‌های پایین، تأثیر بهتری بر سمیت سلولی و آپاپتوز داشته و با افزایش غلظت بعد از µg/ml ۴۰ این اثر از حالت خطی خارج‌شده و کاهش می‌یابد. بررسی خواص ضد سرطانی ترکیبات مختلف حاصل از حشرات، می‌تواند منجر به ساخته‌شدن داروهای جدید با عوارض جانبی کم‌تر گردد.

کلمات کلیدی: لاروسوسک زرد آرد، آپاپتوز، سمیت سلولی، سلول‌های سرطان سینه

مجله مطالعات علوم پزشکی، دوره سی و یکم، شماره پنجم، ص ۳۶۳-۳۵۴ ، مرداد ۱۳۹۹

آدرس مکاتبه: کرمانشاه، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه رازی، تلفن: ۰۹۱۳۳۲۹۹۱۳۲

Email: m.darbemamieh@razi.ac.ir

مقدمه

سرطان یکی از عوامل اصلی مرگ‌ومیر در سطح دنیا است (۱، ۲). به‌ویژه سرطان سینه که عامل مرگ‌ومیر مهمی در میان زنان است. مقاومت سلول‌های سرطانی نسبت به درمان‌های معمول سرطان زیاد مشاهده می‌شود. به نظر می‌رسد که نیاز به شناخت داروهای ضدتوموری با منشأ طبیعی و سالم، ضروری است. اخیراً، برای درمان بیماری سرطان توجهات به سمت ترکیبات طبیعی جلب شده است (۳، ۴). بر طبق آمار سازمان بهداشت جهانی سرطان سینه یکی از شایع‌ترین انواع سرطان‌ها در میان زنان بوده که بر زندگی بیش از دو میلیون و صد هزار زن سالانه تأثیر می‌گذارد علاوه‌براین دومین نوع سرطان ازنظر میزان فراوانی در میان انواع سرطان‌ها است و عامل بیشترین تعداد مرگ‌ومیر ناشی از سرطان در میان زنان است. در سال ۲۰۱۸، حدود ۶۲۷ هزار زن در اثر این نوع از سرطان جان خود را از دست دادند که تقریباً ۱۵درصد مرگ‌های ناشی از سرطان در میان زنان بود (۵). حشرات با بیش از یک‌میلیون گونه‌ی توصیف‌شده، متنوع‌ترین کلاس در قلمرو حیوانات هستند (۶). در میان کل حشرات، تعداد کمی به سبب آسیب به گیاهان، حیوانات و انسان‌ها، جزو گونه‌های به نسبت مضر برای انسان

[1] استادیار، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران (نویسنده مسئول)

[2] استادیار،گروه علوم دامی، دانشکده علوم و مهندسی کشاورزی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران

به‌حساب می‌آیند. بااین‌وجود، همین موجودات به‌ظاهر مضر ممکن است حاوی مقدار زیادی ترکیبات مفید ازجمله اسیدهای آمینه، آنتی‌اکسیدان‌ها، ضدالتهاب‌ها، ضد سرطان‌ها و ترکیبات با فعالیت بیولوژیکی متنوع باشند (۷). به‌خوبی مشخص‌شده که ترکیبات مشتق شده از منابع طبیعی می‌توانند سبب سرکوب سلول‌های سرطانی شوند (۸، ۹). در طب سنتی، بسیاری از حشرات و لاروهای آن‌ها برای اهداف متعدد درمانی ازجمله درمان سرطان مورداستفاده قرار می‌گیرند (۱۰-۱۲). حشرات در طول دگردیسی، ترکیبات فعال زیستی متعددی برای بازسازی و توسعه‌ی میزبان تولید می‌کند. به‌ویژه، این مواد فعال زیستی در دوره‌ی لاروی افزایش پیدا می‌کند. به همین دلیل محققان بسیاری سعی در یافتن ترکیبات فعال زیستی از حشرات و لارو آن‌ها دارند (۱۲، ۱۳).

سوسک زرد آرد *Tenebrio molitor* L. (Col.: Tenebrionidae) یکی از مهم‌ترین حشرات آفت انباری بومی اروپا است که امروزه پراکنش جهانی دارد (۱۴). این حشره با تغذیه از دانه‌های غلات باعث ایجاد خسارت در انبارها و خانه‌ها می‌گردد(۱۵). لارو این‌گونه که تحت عنوان mealworm شناخته می‌شود (۱۶)، آفت معمولی است که محصولات غذایی ذخیره‌شده در سراسر دنیا را آلوده می‌کند (۱۴). این لارو به‌صورت صنعتی، از دهه ۱۹۵۰ میلادی، در کشورهای مختلف جهان برای مقاصدی مانند استفاده در خوراک دام، طیور و آبزیان، استفاده در فرآورده‌های مورداستفاده انسان، مواد دارویی و آرایشی، حتی بازیافت ضایعات کشاورزی و تبدیل آن‌ها به مواد با ارزش تغذیه‌ای بالا پرورش می‌یابد. تولید انبوه لارو سوسک زرد آرد در ایران نیز اخیراً برای استفاده در خوراک دام آغاز گردیده است (۱۷). پرورش آن‌ها به‌وسیله‌ی انسان برای تولید غذای انسان و حیوانات اهلی به دلیل ارزش تغذیه‌ایی بالا و منابع بیولوژیکی فعالی که در درون خود دارند، بسیار موردتوجه است (۱۸، ۱۹). برخی مطالعات قبلی اثرات ضدسرطانی mealworm را نشان داده‌اند (۲۰، ۲۱). این لاروها در طب سنتی آسیا برای درمان بیماری‌های کبدی و سرطان‌های مرتبط با دستگاه گوارش استفاده می‌شوند (۲۰).

در یک مطالعه در سال ۲۰۱۵، اثرات سیتوتوکسیک عصاره‌ی اتانولی و بخش‌های جداسازی شده (بخش هگزان و اتیل استات) لارو سوسک آرد، *T. molitor* ، بر زنده‌مانی سلول‌های سرطان پروستات، سرویکس، کبد، کولون، شش، سینه و تخمدان مورد ارزیابی قرار گرفت که سبب القای آپاپتوز و نکروز شده بود. بخش هگزان عصاره در آن مطالعه که به داخل صفاق موش‌های فاقد سیستم ایمنی مبتلا به سرطان کبد تزریق شد، سبب مهار رشد تومور در شرایط درون‌تنی این حیوانات گردید (۲۰). ترکیبات دفاعی *Ulomoides dermestoides* (سوسک‌های شب‌رو) از همین خانواده، سبب کاهش زنده‌مانی و القای آسیب به DNA می‌شود. درواقع بنزوکوئین‌های حشرات در ابتدا مسئول القای ژنوتوکسیسیتی و سیتوتوکسیستی هستند (۲۲). بخش‌های استخراجی دی‌کلرومتان از لارو *Protaetia brevitarsis* Lewis, 1879 (Col.: Scarabaeidae) فعالیت ضد سرطانی نشان داده که مربوط به فالیت سه اسیدچرب (پالمیتیک‌اسید، (Z)-۹اکتادکونوئیک‌اسید و اکتادکونوئیک‌اسید) است. این ترکیبات، فعالیت ضدآپاپتوزی را از طریق فعال‌سازی آبشار کاسپاز ۳ در سلول‌های توموری کولون هدایت می‌کردند (۲۳). پژوهشی دیگر درباره بازدارندگی رشد مستقل از استرس در سلول‌های سرطان پانکراس و مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلولی تحت تأثیر کانتاریدین حاصل از سوسک‌های Meloidae صورت گرفته است (۲۴). همچنین، در مطالعه دیگری فعالیت‌های ضد سرطانی کانتاریدین در بسیاری از سلول‌های سرطانی موردبررسی قرار گرفته است. این مطالعه برای روشن شدن اینکه آیا میتوکندری و کاسپازها در تعدیل آپوپتوز و بازداشت چرخه سلولی توسط کانتاریدین در سلول‌های سرطانی مثانه انسان نقش دارند، انجام گرفته است (۲۵).

با توجه به اینکه هیچ‌گونه مطالعه‌ایی راجع به اثر سمیت و مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلولی لارو حشرات پرورشی در ایران (تحت شرایط تغذیه‌ایی و محیطی کنترل‌شده) وجود ندارد و حشرات کمی به این منظور موردمطالعه قرار گرفته‌اند و اطلاعاتی راجع به مقایسه‌ی خواص ضد سرطانی عصاره‌های آبی و اتانولی آن‌ها وجود ندارد. با توجه به مقاومت بسیاری از سلول‌های سرطانی به درمان‌های رایج، لزوم یافتن ترکیبات مؤثر جدید برای درمان این بیماری، بیش‌ازپیش موردتوجه قرارگرفته است. برای این منظور، هدف از این مطالعه بررسی اثرات سمی غلظت‌های مختلف (۲۰، ۴۰، ۸۰ و ۱۶۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) از عصاره‌ی هیدروالکلی و آبی لارو *Tenebrio molitor* بر سلول‌های سرطان سینه انسانی Mcf-7 است. یافته‌های حاصل می‌تواند روزنه جدیدی به دنیای استفاده از حشرات در درمان سرطان بگشاید.

مواد و روش‌ها

مواد: مواد موردنیاز در این مطالعه از شرکت سیگما خریداری شد به‌جز مواردی که در داخل متن ذکر می‌گردد.

پرورش حشرات: پس از جفت‌گیری حشرات بالغ، تخم‌ها در داخل جعبه‌های پلاستیکی به ابعاد ۴۰× ۲۷× ۱۱ سانتیمتر در اتاقی به ابعاد ۷×۵×۳ مترمکعب تا رسیدن به لارو کامل، پرورش یافتند. برای تغذیه آن‌ها از سبوس گندم استفاده شد. تکه‌هایی از سبزیجاتی مانند هویج و سیب‌زمینی به‌عنوان منبع آب در داخل ظروف پرورش قرار داده شد. دمای ۲۵ °C و رطوبت نسبی ۵ ± ۵۰ درصد در طول

رشد حشرات استفاده شد. فضولات لاروی به‌وسیله الک به‌صورت هفتگی از محیط تغذیه خارج می‌شدند ولی مقدار کمی از آن‌ها در محیط جهت کمک به پروسه هضم لاروها، نگه‌داشته می‌شد. به دلیل جلوگیری از اثر بر آزمایشات موردنظر، از مخمر که به‌طور معمول در پرورش این حشره به میزان کم (۱۰ درصد) به محیط کشت اضافه می‌گردد، استفاده نشد (شکل ۱). لاروهای سن آخر به‌وسیله الک جدا شده و به‌وسیله فریز کردن، کشته شدند. سپس در آون با دمای°C ۶۰ تا زمانی که ماده خشک آن‌ها به درصد۹۵ برسد، خشک گردیدند. این لاروهای خشک جهت انجام آزمایش، به‌وسیله آسیاب، پودر شدند.

عصاره‌گیری:

۱) **تهیه عصاره‌ی آبی:** برای این منظور لارو خشک‌شده حشره، با کمک آسیاب پودر شد. سپس ۱۵ گرم از پودر لارو *T. molitor* با ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر برای مدت ۵ دقیقه جوشانده شد. پس از سانتریفیوژ، محلول رویی از کاغذ صافی واتمن شماره ۱ عبود داده شد. عصاره به‌دست آمده، در آون خشک و تا زمان استفاده در یخچال نگهداری شد.

۱- **تهیه‌ی عصاره‌ی اتانولی:** برای این منظور ۱۵ گرم پودر خشک لارو به ۱۰۰ میلی‌لیتر اتانول ۶۰درصد اضافه شد و بر روی دستگاه استایرر برای مدت زمان ۷۲ ساعت همزده شد. در ادامه مخلوط مورد نظر، سانتریفیوژ شد و محلول رویی از کاغذ واتمن شماره ۱ عبور داده شد. سپس در جهت جداسازی الکل با کمک دستگاه روتاری (Heidolph Rotary Evaporator 4011) نمونه عصاره به بالن تقطیر دستگاه اضافه شد در خلأ در ۴۵ درجه سانتی گراد، با دور ۱۲۰ و زمان ۱۵ دقیقه جداسازی صورت گرفت. فاز آبی در آون (Memmert) در ۴۵ درجه‌ی سانتی‌گراد برای مدت ۴۸ ساعت خشک شده، نهایتاً پودر شد و تا زمان استفاده در فریزر ۲۰- سانتی‌گراد نگهداری شد سپس برای اجرای آزمایش‌ها در آب حل شد (شکل ۲).

کشت سلول: سلول‌های سرطان سینه رده‌ی MCF7 از مرکز انیستیتو پاستور ایران خریداری شدند. این سلول‌ها در محیط DMEM (Gibco)مکمل شده با سرم گوساله‌ی جنینی (Gibco) و ۱درصد آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین و استرپتومایسین (Sigma) و شرایط ۵درصد دی‌اکسیدکربن، هوای اتمسفری مرطوب و دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد در انکوباتور (Binder) کشت شدند. پس از اینکه حدود ۸۰درصد کف فلاسک از سلول‌های سرطان سینه پر شدند، با کمک آنزیم تریپسین/EDTA از کف فلاسک جداسازی شدند و در ادامه برای خنثی‌سازی عملکرد آنزیم به فلاسک محیط مکمل شده با سرم اضافه شد. سلول‌ها در ۲۰۰۰ دور برای مدت زمان ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. بخشی از آن‌ها فریز شد (برای فریز سلولی از ۹۰درصد سرم گوساله‌ی جنینی و ۱۰درصد DMSO استفاده شد) و بخشی نیز مجدداً برای کشت مورداستفاده قرار گرفت.

بررسی سمیت سلولی: اثرات ضد سرطانی عصاره‌ی آبی و هیدروالکلی لارو *T. molitor* با کمک آزمون MTT (Sigma) مورد ارزیابی قرار گرفت. برای این منظور سلول‌های سرطانی در پلیت ۹۶ خانه با تراکم سلولی یکسان (۱۰۰۰۰ سلول؛ سلول‌های مورد مطالعه با استفاده از لام هموسایتومتر با کمک رنگ‌آمیزی تریپان بلو مورد شمارش و استفاده قرار گرفتند) کشت شدند. پس از گذشت ۲۴ ساعت از کشت سلول‌ها، غلظت‌های متفاوت عصاره‌های آبی و هیدروالکلی لارو (۲۰، ۴۰، ۸۰ و ۱۶۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) به محیط کشت سلول‌ها اضافه شد. گروه بدون عصاره، به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شد. پس از گذشت ۲۴ ساعت از تیمار سلول‌ها با غلظت‌های مختلف عصاره‌های آبی و هیدروالکلی لارو، به هر کدام از چاهک‌های گروه‌های مختلف تیماری ۲۰ میکرولیتر محلول MTT (۵ میلی‌گرم پودر MTT در یک میلی‌لیتر بافر DPBS حل شده و سپس جهت استریل شدن و حذف باقیمانده‌های حل نشده، فیلتر شد و تا زمان استفاده در فریزر نگهداری شد) اضافه، و پلیت در انکوباتور برای مدت زمان ۴ ساعت تیمار شد. در ادامه پس از گذشت زمان انکوباسیون محیط رویی حذف شد و به آن ۱۰۰ میکرولیتر محلول DMSO (Sigma) اضافه شد. سپس با کمک دستگاه الایزا ریدر (BioTek (Power Wave XS2 در طول موج ۵۷۰ نانومتر خوانش انجام گرفت. سپس جذب چاهک‌های حاوی سلول‌های تیمار شده با جذب چاهک‌های حاوی سلول‌های شاهد مقایسه و درصد سلول‌های زنده به روش زیر محاسبه گردید:

درصد میزان سلول‌های زنده = (میانگین جذب نوری سلول‌ها تیمار شده با عصاره در هر غلظت/میانگین جذب نوری چاهک‌های حاوی سلول‌های کنترل)× ۱۰۰

آزمون آپاپتوز با کمک رنگ‌آمیزی فلوروسنت آکریدین نارنجی/اتیدیوم بروماید: پس از گذشت ۲۴ ساعت از تیمار سلول‌های سرطانی با غلظت‌های مختلف (۲۰ و ۴۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) عصاره‌ی آبی و اتانولی لارو *T. molitor* محیط رویی سلول‌ها حذف شدند و سلول‌ها با کمک پارافرم‌آلدهید ۴درصد برای مدت ۱۵ الی ۲۰ دقیقه در تاریکی ثابت شدند. سپس پارافرم‌آلدهید از چاهک‌ها حذف شد و چاهک‌ها با کمک بافر DPBS شستشو داده شدند. در ادامه مخلوط رنگ آکریدین نارنجی-اتیدیوم‌بروماتید (با نسبت ۱:۱) و غلظت ۱ میکرولیتر به ۲۵ میکرولیتر DPBS به هر

چاهک اضافه شد و در زیر میکروسکوپ فلوروسنت سلول‌ها ارزیابی، شمارش و عکس‌برداری انجام گرفت.

آزمون آماری: داده‌های به دست آمده به‌وسیله‌ی نرم‌افزار SPSS با به کارگیری آزمون ANOVA آنالیز شدند و مقایسه میانگین به روش دانکن انجام گرفت. داده‌ها برمبنای میانگین ±انحراف استاندارد گزارش شدند. سطح معنی‌داری P <۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

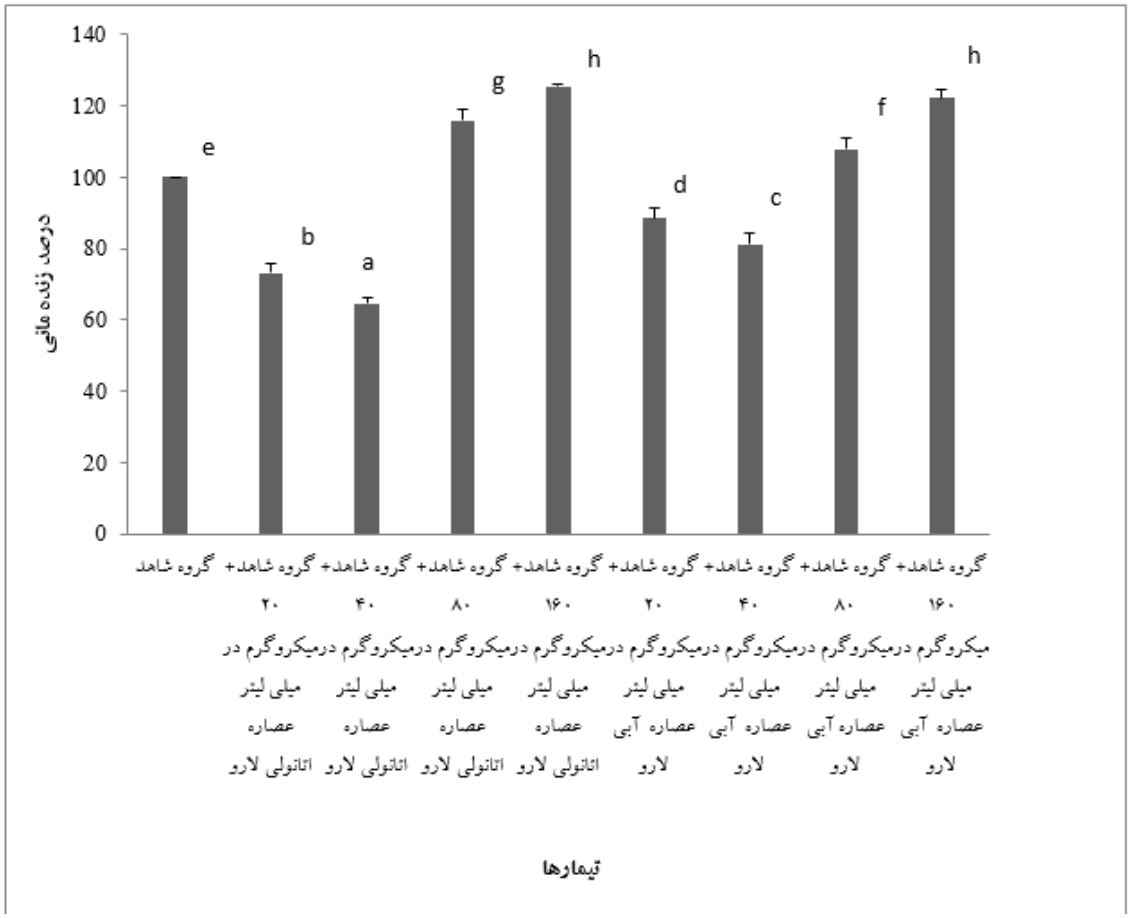
یافته‌ها

نتایج حاصل از بررسی میزان سمیت غلظت‌های مختلف عصاره-های آبی و اتانولی لارو سوسک زرد آرد به‌وسیله آزمون MTT (شکل ۳) حاکی از اثر معنی‌دار عصاره هیدرو الکلی با غلظت ۴۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بر سلول‌های سرطانی سینه در مقایسه با سایر غلظت‌های مورداستفاده (۲۰، ۸۰ و ۱۶۰ میکروگرم در میلی‌لیتر عصاره‌ی اتانولی، ۲۰، ۴۰، ۸۰ و ۱۶۰ میکروگرم در میلی‌لیتر و گروه شاهد) در آزمایش است ($p<0.05$). همچنین، این اثر مثبت با میزان کم‌تر برای غلظت ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر عصاره‌ی اتانولی در مقایسه با تمامی غلظت‌های عصاره‌ی آبی، غلظت‌های بالای عصاره‌ی اتانولی (۸۰ و ۱۶۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) و گروه شاهد نیز قابل مشاهده است ($p<0.05$). علاوه‌براین، در این آزمایش مشخص شد که غلظت (۴۰میکروگرم در میلی‌لیتر) عصاره‌ی آبی در مقایسه با غلظت حدقل همین نوع عصاره ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر و غلظت‌های بالاتر همین عصاره‌ی آبی (۸۰ و ۱۶۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) اثر بهتری بر کشندگی سلول‌ها بر جای گذاشته است ($p<0.05$). این درحالی بود که غلظت‌های بالای مورداستفاده در این مطالعه، ۸۰ و ۱۶۰ میکروگرم در میلی‌لیتر، هر دو نوع عصاره‌ی آبی و الکلی، نه تنها اثرات کشندگی نداشت بلکه سبب افزایش میزان تکثیر سلول‌های سرطان سینه در مقایسه با گروه شاهد شده بود ($p>0.05$). افزایش تکثیر بیشتر تا حدود ۲۵ و ۲۲درصد نسبت به گروه شاهد به‌ترتیب برای ۱۶۰ میکروگرم در میلی‌لیتر عصاره‌ی اتانولی و آبی لارو مورد مطالعه مشاهده شد.

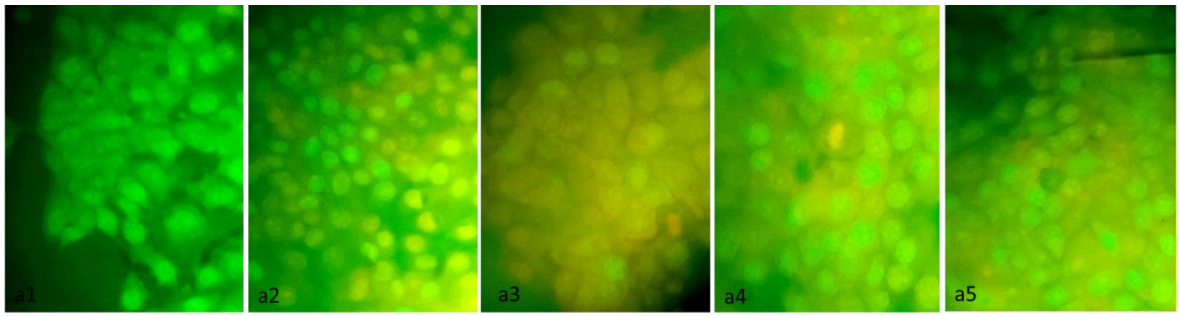
در این مطالعه اثرات آپاپتوز غلظت‌های ۲۰ و ۴۰ عصاره‌ی آبی و اتانولی لارو که طی آزمون سیتوتوکسیستی سمیت نسبی آن‌ها تأیید شد به‌وسیله‌ی رنگ‌آمیزی دوگانه فلوروسنت آکریدین نارنجی-اتیدیوم بروماید مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۴ و جدول ۱). نتایج به‌دست آمده برای رنگ‌آمیزی فلوروسنت نشان داد که سلول‌های تیمار شده با مقادیر مختلف عصاره اتانولی لارو*T. molitor* در مقایسه با عصاره‌ی آبی لارو، حاکی از تأثیر معنی‌دار غلظت‌های (۲۰ و ۴۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) عصاره‌ی هیدروالکلی خصوصاً در غلظت ۴۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بر آپاپتوز سلول‌های مورد مطالعه در زیر میروسکوپ فلورسنت داشت ($p<0.05$).

شکل (۱): پرورش انبوه لارو T. molitor در مزرعه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه رازی

شکل (۲): مراحل مختلف تهیه عصاره هیدروالکلی لارو T. molitor (۱- لارو T.molitor؛ ۲- پودر لارو؛ ۳- ترکیب پودر لارو و الکل ۷۰درصد؛ ۴- نمونه عصاره لارو پس از سانتریفیوژ؛ ۵- نمونه‌ی عصاره‌ی اتانولی پس از جداسازی در دستگاه روتاری؛ ۶- پودر عصاره اتانولی)



شکل (۳): بررسی میزان سیتوتوکسیسیتی غلظت‌های مختلف عصاره‌ی آبی و هیدروالکلی لارو T. molitor با کمک آزمون MTT



شکل (۴): رنگ‌آمیزی همزمان اتیدیوم بروماید-آکریدین نارنجی سلول‌های سرطانی تیمار شده با غلظت‌های مختلف عصاره‌ی آبی و هیدروالکلی لارو T. molitor (a1: شاهد، a2: غلظت ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر عصاره هیدروالکلی، a3: غلظت ۴۰ میکروگرم در میلی‌لیتر عصاره هیدروالکلی، a4: غلظت ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر عصاره آبی، a5: غلظت ۴۰ میکروگرم در میلی‌لیتر آبی).

جدول (۱): درصد زنده‌مانی و مرگ و میر سلول‌های سرطانی سینه تیمار شده با غلظت‌های مختلف عصاره آبی و هیدروالکلی لارو T. molitor پس از بررسی مرگ برنامه ریزی شده سلولی

Treatment	Vitality percentage after apoptosis	Mortality percentage after apoptosis
Control	99.55±0.44^{e}	0.44± 0.44^{e}
Control+ 20 µg/ml of hydroethanolic extract	63.81±0.91^{b}	36.18± 0.52^{b}
Control + 40 µg/ml of hydroethanolic extract	57.79±1.64^{a}	42.21± 1.06^{a}
Control + 20 µg/ml of aqueous extract	82.16±0.73^{d}	16.87± 0.42^{d}
Control + 40 µg/ml of aqueous extract	76.96±2.13^{c}	23.03±1.23^{c}

بحث

سرطان یکی از بیماری‌های ویرانگر است که سلامت انسان را در سراسر دنیا به مخاطره انداخته‌است. درمان‌های کنونی می‌تواند سبب سمیت سلولی و حتی مقاومت سلول‌های سرطانی نسبت به درمان شود. شناسایی داروهای جدید با منشأ طبیعی بسیار با اهمیت است و تقاضا برای این قبیل داروها به دلیل خاصیت تهاجمی کم‌تر، در حال افزایش است. این نوع از داروهای طبیعی جایگزین امیدبخشی برای مدیریت و درمان سرطان هستند. تاکنون مطالعات کمی به بررسی اثرات سودمند و ترکیبات استخراجی از لارو حشرات بر درمان نسبی سرطان پرداخته‌اند.

در مطالعه‌ی حاضر به بررسی اثر سیتوتوکسیسیتی و مرگ برنامه‌ریزی‌شده‌ی سلولی غلظت‌های مختلف دو عصاره‌ی آبی و الکلی حاصل از لارو *T. molitor* بر سلول‌های سرطان سینه Mcf-7 پرداخته شد. در این بررسی، بیشترین اثر کشندگی مربوط به غلظت ۴۰ میکروگرم در میلی‌لیتر عصاره‌ی اتانولی استفاده شده بود هرچند این روند با اثر کم‌تر، نیز در مورد عصاره‌ی آبی نیز مشاهده شد. همچنین غلظت‌های ۲۰ و ۴۰ میکروگرم در میلی‌لیتر عصاره‌ی الکلی نسبت به عصاره‌ی آبی بهتر عمل کردند و تأثیر معنی‌داری بیشتری از خود بر جای گذاشتند. در مطالعه‌ی Wu و همکاران (۲۶) که از روغن استخراجی لارو *T. molitor* بر سلول‌های کارسینومای کبدی (HepG2) و آدنوکارسینومای کلورکتال (Caco-2) استفاده کردند، مشاهده شد که روغن سبب مهار رشد سلول‌های سرطانی در هر دو رده شده بود. علاوه‌براین، میزان آپاپتوز در این سلول‌ها افزایش یافته بود. آن‌ها مشاهده کرده بودند که مکانیسم آپاپتوز با چرخه‌ی گیرنده مرگ و فعال‌سازی کاسپازهای ۸، ۹ و ۳ ارتباط دارد.

همچنین در مطالعه‌ای دیگر اثرات ضدسرطانی بخش‌های هگزانی و اتیل‌استاتی، عصاره‌ی الکلی لارو *T. molitor* بر سلول‌های سرطانی رده‌های مختلف پروستات، سرویکس، کبد، کلون، شش، سینه و تخمدان مورد بررسی قرار گرفت که سمیت بخش‌های هگزانی و اتیل استاتی بر سلول‌های مختلف سرطانی توسط این عصاره‌ها مشاهده شد (۲۰). علاوه‌براین، بخش هگزانی عصاره به صفاق موش‌های فاقد سیستم ایمنی مبتلا به کارسینومای

هپاتوسلولار تزریق شد که سبب مهار رشد تومور در شرایط درون تنی شد. در مطالعه‌ی دیگر (۲۷) مشاهده شد که روغن حاصله از لاروهای *T. molitor* بر سلول‌های سرطانی کولورکتال رده‌ی Caco-2 بعد از ۲۴ ساعت تیمار، نسبت به تأثیر آن بر رده‌ی سلول‌های سرطان پروستات به مراتب بیشتر بود.

دانشمندان بسیار امیدوارند که بتوانند ترکیباتی با اثرات ضد سرطانی از حشرات استخراج کنند. در طی آنالیز سلول‌های مورد بررسی با کمک رنگ‌آمیزی با آکریدین نارنجی-اتیدیوم بروماید، سلول‌های زنده هسته‌ی سبز دارند. در مراحل آغازین آپاپتوز سلول‌ها به رنگ زرد و در مراحل پایانی آپاپتوز سلول‌ها به رنگ نارنجی مشاهده می‌شوند (۲۸). در مطالعه‌ی حاضر به صورت نسبی آپاپتوز در سلول‌های سرطانی در غلظت‌های پایین (۲۰ و ۴۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) عصاره‌ها خصوصاً عصاره‌ی اتانولی مشاهده شده است که مشابه با مطالعات Yoo و همکاران (۲۳) Lee و همکاران (۲۰) و Wu و همکاران (۲۶) بر رده‌های مختلف سلول‌های سرطانی و عصاره‌های مختلف بوده است. به نظر می‌رسد که ترکیبات مورد مطالعه اثر مثبتی بر مهار تکثیر و مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی سلول‌های سرطانی سینه داشته‌اند.

در ارتباط با غلظت‌های بالای مورداستفاده در این مطالعه، نه تنها هیچ گونه اثر کشندگی مشاهده نشد بلکه سبب افزایش تکثیر سلول‌های سرطانی رده‌ی Mcf-7 نیز شده بود. در مطالعاتی که بر روی لارو mealworm در سیبری صورت گرفته مشخص شده حدود ۵۵/۸۳ درصد از پودر این لارو را پروتئین خام تشکیل می‌دهد علاوه براین میزان چربی خام ۲۵/۱۹ و فیبر خام نیز حدود ۷ درصد بود. علاوه‌براین، در آن مطالعه مشخص شد که پودر لارو حاوی طیفی از عناصر معدنی پرنیاز و کم نیاز است و همچنین ازنظر اسیدهای آمینه‌ی ترئونین، میتونین و لیزین نیز غنی است (۲۹). در مطالعه‌ی دیگر، محتوی پروتئینی خام لارو *T. molitor* با منبع چینی و کره‌ایی حدود ۵۰ تا ۵۲درصد تعیین شد، میزان اسیدهای چرب غیراشباع ضروری بین ۷۶ تا ۸۰ درصد از مجموع اسیدهای چرب بود، و محتوی لینولئیک اسید در بین ۲۰ تا ۳۴درصد متغیر بود (۳۰). در این مطالعه، ترکیبات مؤثر بدن لارو به‌صورت کلی مورد آنالیز قرار گرفت و حاوی ۵۳/۸۱ در صد پروتئین و ۲۸/۰۳ چربی بود. باتوجه به کیفیت بسیار بالای پروتئین و اسیدهای چرب موجود در بدن این لارو (۱۷)، به نظر می‌رسد که با افزایش غلظت عصاره‌های آبی و اتانولی لارو، ترکیبات مغذی بیشتر، و احتمالاً فاکتورهای رشد بیشتری در اختیار سلول‌ها قرار گرفته است.

نتایج حاصل از این مطالعه با مطالعات قبلی مبنی براثر مثبت ترکیبات مختلف عصاره‌های آبی و الکلی (خصوصاً در غلظت‌های پایین) لارو سوسک زرد آرد بر کاهش و مرگ سلول‌های سرطانی مختلف منطبق است. در پایان به نظر می‌رسد که عصاره‌ی اتانولی لارو *T. molitor* (غلظت ۴۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) در مقایسه با سایر غلظت‌های همین عصاره و عصاره‌ی آبی اثرات معنی‌دار بیشتری در ارتباط با سمیت سلولی و همچنین آپاپتوز سلول‌های سرطان سینه برجای گذاشته است. مطالعات بیشتر با غلظت‌های متنوع می‌تواند زوایای بیشتری از اثر این ترکیبات بر سلول‌های سرطانی مختلف را آشکار سازد. همچنین با توجه به تأثیر مثبت غلظت‌های بالای عصاره‌های آبی و اتانولی لارو بر تکثیر سلول‌های سرطانی، خصوصاً در غلظت ۱۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر، به نظر می‌رسد که می‌تواند جایگزین نسبی ترکیبات مغذی، مانند سرم گوساله‌ی جنینی که به‌منظور تکثیر سلول‌ها در محیط کشت از آن‌ها استفاده می‌شود، باشد. بااین‌حال مطالعات مولکولی بیشتری جهت آشکار شدن نقش دقیق فاکتورهای (مغذی، فاکتورهای رشد و ...) مؤثر، مانند ژن‌ها و پروتئین‌های دخیل در مسیرهای تکثیر سلولی، در تکثیر سلول‌های مختلف ازجمله سلول‌های سرطانی و غیر سرطانی لازم است. علاوه‌براین، مطالعات بیشتری جهت تعیین بهترین غلظت که سبب مهار و یا افزایش تکثیر سلول‌های سرطانی می‌شود، لازم به نظر می‌رسد.

References:

1. Chalamaiah M, Yu W, Wu J. Immunomodulatory and anticancer protein hydrolysates (peptides) from food proteins: A review. Food Chem 2018; 245: 205–22.
2. Sulaiman G M. In vitro study of molecular structure and cytotoxicity effect of luteolin in the human colon carcinoma cellsEuropean Food Res Tech 2015;241: 83–90.
3. Zhang J, Wen C, Duan Y, Zhang H, Ma H. Advance in Cordyceps militaris (Linn) Link polysaccharides: Isolation, structure, and bioactivities: A review. Int J Biol Macromol 2019;132: 906–14.
4. Yang XM, Wang YF, Li YY, Ma H L. Thermal stability of ginkgolic acids from Ginkgo biloba and the effects of ginkgol C17:1 on the apoptosis and migration of SMMC7721 cells. Fitoterapia 2014; 98: 66–76.

5. WHO. 2020. https://www.who.int/cancer/prevention/diagnosis-screening/breast-cancer/en/
6. Engel MS, Grimaldi DA. New light shed on the oldest insect. Nature 2004;427:627-30.
7. Feng Y, Chen X M, Zhao M, He Z, Sun L, Wang C Y, et al. Edible insects in China: utilization and prospects. Insect Sci 2017; 25(2): 184-98.
8. Farkya S, Bisaria V S, Srivastava A K. Biotechnological aspects of the production of the anticancer drug podophyllotoxin. Appl Microbiol Biotechnol 2004;65:504-19.
9. Kostova I. Synthetic and natural coumarins as cytotoxic agents. Curr Med Chem Anticancer Agents 2005; 5:29-46.
10. Xu CQ, Brone B, Wicher D, Bozkurt O, Lu WY, Huys I, et al.. BmBKTxl, a novel Ca2+-activated K § channel blocker purified from the Asian scorpion Buthus martensi Karsch. J Biol Chem 2004; 279 (33): 34562-9.
11. Park CW, Kim J H, Kim KM, Hwang J S, Kang SW, Kang HS, et al. Evidence for brain-derived neurotrophic factor-like neuropeptide in brain of the silk moth Bombyx mori during postembryonic periods. Peptides 2004; 25: 1891-7.
12. Fu YJ, Chai BF, Wang W, Zhi H, Yin LT, Liang AH. Expression and purification of the BmK Mm2 neurotoxin from the scorpion Buthus martensii Karsch and its biological activity test. Protein Expr Purif 2004; 38: 45-50.
13. Vergote D, Sautiere PE, Vandenbulcke F, Vieau D, Mitta G, Macagno ER, et al. Up-regulation of neurohemerythrin expression in the central nervous system of the medicinal leech, Hirudo medicinalis, following septic injury. J Biol Chem 2004;279: 43828-37.
14. Gao Y, Wang D, Xu M, Shi S, Xiong J. Toxicological characteristics of edible insects in China: A historical review. Food Chem Toxicol 2018; 119: 237–51.
15. Watt JC. A revised subfamily classification of Tenebrionidae (Coleoptera). New Zealand journal of zoology 1974;1 (4): 381-452.
16. Han SR, Yun EY, Kim JY, Hwang JS, Jeong EJ, Moon KS. Evaluation of genotoxicity and 28-day oral dose toxicity on freeze-dried powder of Tenebrio molitor larvae (Yellow Mealworm). Toxicol Res 2014;30: 121–30.
17. Arbab A. Industrial insects: Yellow mealworm, Introduction, rearing, processing, usages. Islamic Azad University publication center. 2018; 206pp. (Persian)
18. Paul A, Frederich M, Caparros R, Alabi T, Malik P, Uyttenbroeck R, et al. Insect fatty acids: A comparison of lipids from three Orthopterans and Tenebrio molitor L. larvae. J Asia-Pac Entomol 2017;20: 337–40.
19. Seo M, Kim J, Moon S, Hwang J, Kim M. Intraventricular administration of Tenebrio molitor larvae extract regulates food intake and body weight in mice with high-fat diet – induced obesity. Nutr Res 2017; 44: 18–26.
20. Lee JE, Lee AJ, Jo DE, Cho JH, Youn K, Yun EY, et al. Cytotoxic Effects of Tenebrio molitor Larval Extracts against Hepatocellular Carcinoma. J Korean Soc Food Sci Nutr 2015;44(2): 200-7.
21. Liu Y, Cheng J, Zhao R, Fan H. Isolation and purification of antibacterial peptides with anti - K562 activity from the Tenebrio molitor Linnaeus larvae. Chinese J Vector Biol Cont 2009; 20: 565–8.
22. Crespoa R, Villaverdea ML, Girotti JR, Güerci A, Juárez MP, de Bravo MG. Cytotoxic and genotoxic effects of defence secretion of Ulomoides dermestoides on A549 cells. J Ethnopharmacol 2011 14;136(1):204-9.
23. Yoo YC, Shin BH, Hong JH, Lee J, Chee HY, Song KS, et al. Isolation of fatty acids with anticancer activity from Protaetia brevitarsis larva. Arch Pharm Res 2007; 30(3):361-5.

24. Li W, Xie L, Chen Zh, Zhu Y, Sun Y, Miao Y, et al. Cantharidin, a potent and selective PP2A inhibitor, induces an oxidative stress-independent growth inhibition of pancreatic cancer cells through G2/M cell-cycle arrest and apoptosis. Cancer Sci 2010;101: 1226–33.
25. Kuo J, Chu Y, Yang J, Lin J, Lai K, Kuo H, et al. Cantharidin induces apoptosis in human bladder cancer TSGH8301 cells through mitochondria-dependent signal pathways, Int J Oncol 2010; 37(5):1243-50.
26. Wu RA, Ding Q, Lu H, Tan H, Sun N, Wang K, et al. Caspase 3-mediated cytotoxicity of mealworm larvae (Tenebrio molitor) oil extract against human hepatocellular carcinoma and colorectal adenocarcinoma. J Ethnopharmacol 2020;250:112438.
27. Huang F, Yang Z, Yu D, Wang J, Li R, Ding G. Sepia Ink Oligopeptide Induces Apoptosis in Prostate Cancer Cell Lines via Caspase-3 Activation and Elevation of Bax/Bcl-2 Ratio. Mar Drugs 2012;10: 2153-65.
28. Ribble D, Goldstein NB, Norris DA, Shellman YG. A simple technique for quantifying apoptosis in 96-well plates. BMC Biotechnol 2005; 10:5-12.
29. Jajić I, Popović A, Urošević M, Krstović S, Petrović M, Guljaš D. Chemical Composition of Mealworm Larvae (Tenebrio molitor) Reared in Serbia. Contemp Agric 2019; 68(1-2): 23-7.
30. Yoo J, Hwang JS, Goo TW, Yun EY. Comparative analysis of nutritional and harmful components in the Korean and Chinese mealworms (Tenebrio molitor). J Kor Soc Food Sci Nutr 2013;42(2): 249-54.

Original Article

EVALUATION OF ANTICANCER AND APOPTOTIC PROPERTIES OF AQUEOUS AND ETHANOLIC EXTRACTS OF *TENEBRIO MOLITOR* (COLEOPTERA: TENEBRIONIDAE) LARVAE ON BREAST CANCER CELLS

***Maryam Darbemamieh*[*1], *Leila Soltani*[2]**

Received: 04 April, 2020; Accepted: 01 July, 2020

Abstract

Background & Aims: The anti-cancer effects of insect larvae were demonstrated in cancer cells in traditional medicine. Identification and extraction of anticancer compounds from insects can reduce the problems of cancer patients. The aim of this study is to investigate the anti-proliferative and apoptotic properties of different concentrations of aqueous and ethanolic extracts of *Tenebrio molitor* larvae on breast cancer cells (Mcf-7).

Material & Methods: The larvae used in this study were reared at the research insect farm of Razi University. Larvae were frozen and then dried before starting pupation. Their aqueous and ethanolic extracts were derived. Concentrations of 20, 40, 80, and 160 µg/ml of each extract were added to the cell culture. The group without extract was considered as control. Anti-proliferative activity was evaluated by MTT assay and apoptosis by acridine orange-ethidium bromide staining.

Results: Application of ethanolic extract in low concentrations (20, 40 µg/ml) to the culture had the greatest cell cytotoxicity effect compared to aqueous extract with same concentration ($p<0.05$). In addition, the 40 µg/ml concentration of aqueous extract had a significant effect on cell cytotoxicity in comparison to the 20 µg/ml concentration ($p<0.05$). However, high concentrations, 120 µgr/ml of aqueous and ethanolic extracts, significantly increased the proliferation compared to the control ($p>0.05$). Similar results were observed in apoptosis assay.

Conclusion: In conclusion, larval ethanolic extract appeared to have a better effect on cytotoxicity and apoptosis of breast cancer cells in comparison to the aqueous extracts. Investigations for finding new and efficient natural anti-cancer extracts can improve our knowledge about natural-based medicines with fewer side effects.

***Keywords*:** yellow mealworm, apoptosis, cytotoxicity, breast cancer cells

Address: Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Razi University, Kermanshah, Iran
Tel: +989133299132
Email: m.darbemamieh@razi.ac.ir

SOURCE: STUD MED SCI 2020: 31(5): 363 ISSN: 2717-008X

[1] Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Razi University, Kermanshah, Iran (Corresponding Author)
[2] Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture, Razi University, Kermanshah, Iran