

اثر عصاره جلبک دونالیلا سالینا بر میزان بیان ژن *Bax* در رده سلولی سرطان گلیوبلاستوما

مهسا کاوسی^{۱*}، سید شمین سید حسینی^۲

۱. گروه زیست‌شناسی، واحد تهران شرق، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲. گروه ژنتیک، واحد تهران شرق، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

چکیده

زمینه و هدف: عصاره‌های گیاهان می‌توانند میزان بیان ژن‌ها را در سلول‌های سرطانی تغییر دهند. تا به حال، مطالعه‌ای در رابطه با اثر عصاره جلبک‌ها انجام نشده است. این مطالعه با هدف بررسی میزان تغییر بیان ژن *Bax* و تعیین مقدار زنده‌مانی سلول‌های سرطان مغز تیمار شده با عصاره جلبک دونالیلا سالینا انجام شد.

روش‌ها: رده سلولی U87 از مرکز ذخایر زیستی و ژنتیکی ایران تهیه و کشت داده شد. سلول‌ها به دو گروه تیمار و کنترل تقسیم شدند. عصاره جلبک دونالیلا روی گروه تیمار با غلظت‌های ۰/۵، ۱، ۲، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تأثیر داده شد و سمیت آن با استفاده از MTT assay سنجیده شد. بیان *Bax* با روش Real Time PCR بررسی شد. RNA از سلول‌های گروه تیمار و کنترل استخراج و cDNA ساخته شد. میزان بیان ژن‌ها با استفاده از Real-time PCR و $\Delta\Delta Ct$ مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج: نتیجه MTT نشان داد که IC_{50} در ۴۸ ساعت تیمار، ۱۰/۰۱ mg/ml می‌باشد. با انجام Real Time PCR مشخص شد که در این سلول‌ها، میزان بیان ژن آپوپتوزی *Bax* به میزان ۴ برابر افزایش یافت ($P < 0.001$).

نتیجه‌گیری: تیمار با عصاره جلبک توانست میزان بیان ژن را افزایش داده و سلول‌های سرطانی را از بین ببرد. پیشنهاد می‌شود که میزان تأثیر عصاره‌های سایر جلبک‌ها در تغییرات میزان بیان دیگر ژن‌های موثر در آپوپتوز بررسی شود.

کلیدواژه‌ها:

جلبک دونالیلا سالینا، رده سلولی U87، MTT assay، Real Time PCR، *Bax*، *GAPDH*، IC_{50}

تمامی حقوق نشر برای دانشگاه علوم پزشکی تربت حیدریه محفوظ است.

مقدمه

می‌شوند، اما به دلیل عوارض شدید، متاستاز زیاد و نبود روش درمانی اهمیت زیادی دارند (۸-۶).

مطالعات مختلف نشان داده‌اند که آمار مبتلایان در ایران رو به افزایش است (۹، ۱۰). در بزرگسالان معمولاً مننژیوم (اغلب خوش‌خیم) و آستروساتیوما مانند گلیوبلاستوما دیده می‌شود (۱۱-۱۳). مطالعات نشان داده‌اند که ۱۵٪ از انواع تومورهای مغزی از نوع گلیوبلاستوما است (۱۲) و تنها راه درمان بیماران

گلیوبلاستوما از شایع‌ترین و حادترین تومورهای مغزی با منشأ بافت مغزی است. میانگین زمان بقا بیماران حدود ۱۳ تا ۱۴ ماه است. در حدود ۳٪ از بیماران بیش از چهار سال عمر می‌کنند (۴-۱). یکی از معروف‌ترین رده‌های سرطان مغز انسانی U87 است (۵). بر مبنای نتایج تحقیقات قبلی سرطان مغز از مهم‌ترین نوع تومورهای انسانی است. هرچند که این نوع از تومورها در مقایسه با سرطان‌های دیگر انسانی کمتر دیده

*آدرس نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شرق، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی

آدرس پست الکترونیک: mkavoosi@iauet.ac.ir

در برابر رادیکال‌های آسیب‌زننده اکسیژن محافظت می‌کنند (۲۵). خصوصیات ضد سرطانی برخی کاروتنوئیدها به اثر آنتی‌اکسیدانی آن‌ها نسبت داده می‌شود که از اتصال رادیکال‌های آزاد اکسیژن به سلول‌ها ممانعت می‌کنند (۲۶). امروزه در مطالعات مختلفی اثر ترکیبات طبیعی گیاهان و جلبک‌ها بر روی تغییرات میزان بیان ژن‌ها بررسی می‌شود.

جلبک‌های آب‌های شور به دلیل داشتن رنگدانه‌های فتوسنتزی، می‌توانند حتی در اعماق دریا که نور بسیار کمی برای فتوسنتز وجود دارد زندگی کنند (۲۷). برخی مطالعات در زمینه استفاده‌های طبی و صنعتی از جلبک‌ها توسط محققان در شرق آسیا صورت گرفته و اثرات ضد توموری آن‌ها بررسی شده - است (۲۸). *Dunaliella salina* L. دونا لیا سالینا یکی از ریزجلبک‌های تک سلولی متعلق به شاخه کلروفیتا است. محققان با استفاده از روش HPLC نشان داده‌اند که در عصاره اتانولی جلبک بتاکاروتن، آلفاکاروتن، لیکوپن، لوتئین، گزانتین و کریپتوزانتین وجود دارد (۲۹، ۳۰). اگر این جلبک در معرض انواع تنش‌های محیطی قرار گیرد، تا حدود ۱۵٪ وزن خشک، بتاکاروتن را بیوسنتز و انباشته می‌کند. بنابراین به عنوان کاندید مناسبی جهت تولید بتاکاروتن طبیعی در مقیاس صنعتی معرفی شده است (۳۱).

ریزجلبک دونا لیا سالینا با داشتن ترکیبات آنتی‌اکسیدانی، ضد توموری و تولید محصولات استراتژیک کاروتنوئیدی به ویژه بتاکاروتن می‌تواند به عنوان داروی ضد سرطان طبیعی مورد توجه قرار گیرد. امروزه استفاده از ترکیبات طبیعی به جای داروهای شیمیایی پر عوارض در درمان بیماری‌ها رو به افزایش است. این مطالعه با هدف بررسی میزان تغییر بیان ژن *Bax* و تعیین مقدار زنده‌مانی سلول‌های سرطان مغز تیمار شده با عصاره جلبک دونا لیا سالینا انجام شد.

روش‌ها

این پژوهش یک مطالعه آزمایشگاهی و از نوع نیمه تجربی است که هدف از آن بررسی میزان تأثیر عصاره جلبک در مرگ سلول‌های سرطانی و تغییرات نسبی میزان بیان ژن آپوپتوزی

جراحی، شیمی‌درمانی و رادیوتراپی است (۱۲). تحقیقات مختلف سن شروع تومورهای مغزی را در ۶۴ سالگی و اغلب در مردان اعلان کرده‌اند (۱۲، ۱۴) و در صورت عدم وجود درمان مناسب میزان بقا تنها سه ماه است (۱۵). با توجه به این که هنوز مکانیسم سلولی و مولکولی این نوع از تومورها کشف نشده است، اما تلاش‌های زیادی در این زمینه در حال انجام است (۱۶، ۱۷).

ژن *Bax* از جمله ژن‌های دخیل در مسیر میتوکندریایی آپوپتوز است که بیان آن باعث آغاز آپوپتوز می‌شود. تحقیقات نشان داده است که در بسیاری از سرطان‌ها میزان بیان آن کاهش یافته است (۱۸، ۱۹). ژن *Bax* به لحاظ ساختاری شبیه به سایر اعضای خانواده است و دارای دو آلفا هلیکر آبدوست مرکزی و هفت آلفا هلیوم دوگانه‌دوست و سه حوزة BH2، BH1 و BH3 می‌باشد (۱۹، ۲۰). ژن‌های Bin، Bad، Bak، Bax، Bcl-x1، P53، Bcl-2، Mcl-1 نقش مهمی در آپوپتوز ایفا می‌کنند. از آنجا که در سلول‌های سرطانی تعادل بین تکثیر و آپوپتوز به هم خورده و سلول‌ها برای رشد و تکثیر بی‌رویه خود نیاز به مهار آپوپتوز دارند، ارتباط مستقیمی میان بیان این ژن‌ها و فرآیند سرطانی شدن وجود دارد. بنابراین بررسی تغییرات بیانی این ژن‌ها می‌تواند از جمله هدف‌های درمانی و یا تشخیص مطالعات سرطان به شمار رود (۲۱).

در مطالعه‌ای با انجام آنالیزهای جامع در مورد تنظیم میزان بیان ژن‌های آپوپتوزی تأیید شد که ژن‌های خانواده *Bcl-2* و *Bax* در فرآیند آپوپتوز نقش دارند (۲۲). در یک مطالعه مشخص گردید که *Bax* در سیتوپلاسم سلول‌های طبیعی وجود دارد و به هنگام تحریک آپوپتوز به میتوکندری منتقل شده و به عنوان یک آغازگر مسیر آپوپتوز شناخته می‌شود (۲۳). نتیجه پژوهش دیگری نشان داد که رابطه بین *Bax* و *Bcl-2* از عوامل مهم این فرآیند است و با وجود بیان ژن *Bax*، *Bcl-2* از انتقال *Bax* به میتوکندری ممانعت می‌کند (۲۴).

امروزه توجه به ترکیبات طبیعی برای درمان بیماری‌ها افزایش یافته است. یکی از این ترکیبات کاروتنوئیدها هستند که از سلول

بررسی بیان ژن مورد نظر، باید IC_{50} را بدست آورد. سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای $37^{\circ}C$ و $5\% CO_2$ انکوبه شدند. حجم مورد نیاز از غلظت‌های $10, 20, 50, 100, 200, 500$ و 1000 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، با ۳ تکرار به چاهک‌ها اضافه شدند. انکوباسیون به مدت ۴۸ ساعت ادامه یافت. $20 \mu l$ از محلول رنگ MTT به هر چاهک اضافه و پلیت به مدت ۴ ساعت انکوبه شد. سپس مایع رویی حذف و $100 \mu l$ DMSO به هر چاهک اضافه شد. بعد از پیتاژ، جذب در طول موج $570 nm$ با استفاده از دستگاه الیزا ریدر (Awareness Technology Stat Fax 2100 Microplate Reader) خوانده شد. سپس با توجه به انجام سه بار تکرار برای هر غلظت و همچنین برای گروه کنترل، از سه جذب حاصل میانگین گرفته شد و به کمک فرمول زیر درصد تأثیر عصاره جلبک روی مرگ سلولی در هر غلظت تعیین گردید.

$$\left(\frac{OD_{treated}}{OD_{untreated}} \right) \times 100 = \text{the \% inhibition}$$

در نهایت با رسم منحنی نقطه‌ای در نرم افزار Excel و تعیین بهترین خط ممکن و با کمک فرمول خط، میزان غلظت IC_{50} از عصاره جلبک در زمان ۴۸ ساعت بدست آمد.

استخراج RNA و cDNA

با استفاده از کیت استخراج RNXTm-Plus و بر اساس پروتکل شرکت Sina. Colon، RNA سلول‌های گروه کنترل و تیمار استخراج شد. خلوص و غلظت RNA استخراج شده توسط نانودارپ اسپکتروفتومتر (Wilmington, DE, USA)، Nano (Drop ۲۰۰۰) بررسی شد. کیفیت RNA توسط ژل آگارز $1/5\%$ مورد مطالعه قرار گرفت. برای سنتز cDNA از کیت Revert Aid First Stand cDNA Synthesis Kit شرکت Thermo Scientific استفاده شد. مواد لازم برای سنتز cDNA، RandomHexamer $40 \mu g$ میکرومولار به حجم $1 \mu l$ ، Oligo dt $1 \mu l$ میکرومولار به حجم $1 \mu l$ و dNTP 10 میلی مولار به حجم $1 \mu l$ می‌باشد که با هم مخلوط شدند. $50 ng/\mu l$ از RNA به هر لوله افزوده و ۵ دقیقه در $65^{\circ}C$ و بعد بلافاصله در یخ قرار داده

است. در این مطالعه سلول‌های رده سلولی سرطانی به دو گروه کنترل و تیمار با سه تکرار تقسیم شدند. در گروه کنترل هیچ تیماری استفاده نشد. در گروه تیمار سلول‌ها به مدت ۴۸ ساعت با غلظت‌های مختلفی از عصاره جلبک به عنوان متغیر مستقل تیمار شدند. پس از تعیین غلظت IC_{50} ، استخراج RNA از سلول‌های گروه کنترل و تیمار که با این غلظت به مدت ۴۸ ساعت تیمار شده بودند، انجام شد. پس از مطمئن شدن از صحت آن، cDNA ساخته شد و با انجام RealTime PCR میزان تغییر بیان ژن به عنوان متغیر وابسته سنجیده شد. از محدودیت‌های مطالعه می‌توان به عدم امکان استفاده از تعداد بیشتری از رده‌های سلولی و عصاره‌های جلبکی اشاره کرد.

آماده‌سازی غلظت‌های مورد نیاز از جلبک دونالیلا

عصاره جلبک از مرکز ذخایر زیستی و ژنتیکی ایران تهیه شد. پس از تعیین غلظت عصاره $1000 \mu g/ml$ از وزن خشک عصاره توزین و با رقت‌سازی متوالی غلظت‌های تعیین شده $200, 100, 50, 20, 10, 5$ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تهیه شدند.

کشت رده سلول سرطانی U87

این مطالعه بر روی رده سلولی U87 در محیط آزمایشگاه انجام شد. رده سلولی مورد نظر از بانک سلولی مرکز ملی ذخایر زیستی و ژنتیکی ایران تهیه شد. سلول‌های این رده سلولی در محیط کشت DMEM حاوی $4/5 g/l$ از D-گلوکز، $10\% FBS$ ، پنی‌سیلین به مقدار $100 \mu g/ml$ و استرپتوماسیون به میزان $100 \mu g/ml$ (خریداری شده از کمپانی Bioidea ایران) در دمای $37^{\circ}C$ درجه سانتیگراد و فشار 5% از CO_2 کشت داده شد. سلول‌ها به دو گروه کنترل و تیمار تقسیم شدند. ابتدا تعداد بهینه سلول‌ها در هر چاهک محاسبه شد. لذا با در نظر گرفتن سه بار تکرار برای گروه کنترل و هر غلظت از عصاره جلبک برای گروه تیمار، $100 \mu l$ از سلول‌ها در ظرف کشت ۹۶ خانه در محیط کشت، حاوی 10% سرم کشت داده شدند.

انجام MTT Assay

برای بررسی تأثیر عصاره جلبک بر روی بقای رده سلولی U87 از روش MTT Assay استفاده شد. به منظور تیمار سلول‌ها و

پرایمرهای مورد استفاده و انجام Real time PCR

توالی ژن *Bax* از پایگاه اطلاعاتی NCBI بدست آمد. به عبارت دیگر اتصال صحیح پرایمرها به توالی مربوطه بررسی و توسط برنامه BLAST در NCBI اتصال پرایمرها به توالی‌های دیگر مورد بررسی قرار گرفت و سپس به شرکت ماکروژن سفارش داده شد (جدول ۱).

شد. پس از حدود دو دقیقه مخلوط واکنش با مقادیر Nuclease free water به حجم $10 \mu\text{l}$ ، $1 \times$ M-MuLV buffer به حجم $1 \mu\text{l}$ ، $2 \times$ M-MuLV واحد در میکرولیتر به حجم $0.5 \mu\text{l}$ تهیه و به هر لوله به مقدار $7 \mu\text{l}$ از این مخلوط اضافه گردید، به طوری که حجم نهایی واکنش در نهایت $20 \mu\text{l}$ شد. واکنش به مدت ۶۰ دقیقه در 42°C قرار داده شد. برای غیر فعال کردن آنزیم MMULV، محلول به مدت ۱۰ دقیقه در دمای 72°C درجه سانتی‌گراد قرار داده شد.

جدول ۱. توالی پرایمرهای مورد استفاده در تحقیق

شماره ثبت شده	توالی پرایمر	دما ($^\circ\text{C}$)	طول قطعه	درصد گوانین و سیتوزین	نام ژن
NM128764	3-GCGTGAAATGGCGTGATCTG-5	75/71	65	62/5	<i>Bax</i> (F)
NM128764	3-TGAGGCAGGTGAATCGCTTG-5	79/18	65	57/14	<i>Bax</i> (R)
0012897 NM 45/2	3-GAAGGTGAAGGTTCGGAGTC-5	57/18	226	57/82	<i>GAPDH</i> (F)
0012897 NM 45/2	3-GAAGATGGTGATGGGATTTTC-5	52/72	226	45	<i>GAPDH</i> (R)

هر کدام از پرایمرها به صورت جداگانه، انجام شد. در پایان، منحنی استاندارد برای هر پرایمر، بر اساس مقادیر Ct به دست آمده در مقابل رقت‌های مورد استفاده رسم گردید. درون هر میکروتیوپ مواد لازم در مقادیر ارائه شده اضافه شد. تکثیر ژن‌ها صورت گرفته و تعیین کمیت نسبی در آن به وسیله اندازه‌گیری میزان افزایش نور فلوروسانس در اثر اتصال سایبر گرین توسط دستگاه ترموسایکلر (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, USA) انجام شد.

محاسبه آماری این مطالعه با استفاده از نرم‌افزار SPSS 16 انجام شد و نتایج با آنالیز واریانس یک طرفه (One way ANOVA) مورد بررسی قرار گرفت. تفاوت بین ژن‌های هدف مورد نظر، بین نمونه‌های کنترل و تیمار شده با روش آماری Real time PCR بر اساس مقایسه چرخه آستانه انجام شد. در این

پرایمرها با آب مقطر استریل به حجم مورد نظر ($100 \text{ pmol}/\mu\text{l}$) رسید و رقت یک دهم از هر پرایمر تهیه و در دمای 20°C نگهداری شد. تست PCR برای هر تکرار در نمونه‌های تیمار و کنترل به طور جداگانه برای بررسی ژن‌های *Bax* و *GAPDH* انجام شد. با استفاده از شیب خط منحنی به دست آمده و رابطه زیر بازده واکنش برای هر پرایمر محاسبه شد.

شیب خط منحنی = Slope، بازده واکنش $E = 10^{(-1/\text{slope})} - 1$ ، ترکیب فوق به آرامی مخلوط و Spin شد. واکنش Real time PCR توسط دستگاه Thermocycler convergent-GreatBratin انجام شد. قبل از انجام واکنش Real time PCR، نیاز است تا کارایی پرایمرها بررسی شده و منحنی استاندارد رسم شود. ابتدا از cDNAهای هر گروه رقت‌های ۱، ۱، ۵، ۱، ۵، ۱، ۵ و ۲۵ و ۱ به ۱۲۵ تهیه شد ($10, 15, 30, 45 \text{ ng}/\mu\text{l}$). سپس واکنش Real time PCR به صورت دو بار تکرار، برای این رقت‌ها همراه با

ها با کیفیت عالی، حداقل اسمیر را در بالا، بین و پایین باندهای مذکور داشته و شدت باند $28S$ تقریباً دو برابر شدت باند $18S$ بود. فقدان باندهای واضح $18S$ و $28S$ نشان‌دهنده تجزیه‌ی نمونه RNA توسط آنزیم RNase بود، بخصوص اینکه حالت اسمیر محدود به بخش تحتانی ژل باشد. در کل این نتیجه حاکی از آن است که RNA استخراجی می‌تواند با اطمینان در مراحل بعدی تحقیق استفاده شود.

نتیجه بررسی کارایی پرایمرهای مورد مطالعه

از اختصاصی بودن پرایمرهای مورد استفاده با بررسی NCBI Primer BLAST اطمینان حاصل شد. پس از تهیه یک سری رقت (serial dilution) و انجام واکنش برای تمامی رقت‌ها با استفاده از پرایمرهای *GAPDH* و *Bax* از روی نمودار تکثیر، Ct نمونه‌ها مشخص شد و سپس منحنی آن‌ها براساس Ct در محور y ها و \log تعداد کپی در محور x ها رسم شد. این منحنی خطی است با شیب منفی که دارای یک معادله است (نمودار ۲). پس از رسم منحنی استاندارد بازده واکنش برای ژن *GAPDH* و *Bax* محاسبه گردید. بازده واکنش برابر با یک و میزان R^2 به ترتیب، برابر با 0.9967 و 0.9904 به دست آمد.

نتایج مربوط به Real Time PCR

بررسی منحنی ذوب ژن‌ها نشان می‌دهد که هیچ گونه آلودگی در نمونه‌های تکثیر یافته وجود نداشته است. برای اطمینان از عملکرد صحیح پرایمرها و محصول PCR، از آنالیز منحنی ذوب استفاده شد (نمودار ۳). منحنی‌های مربوط به ژن‌های *GAPDH* و *Bax* به صورت جداگانه و تک بودند که نشان می‌دهد باند غیراختصاصی ایجاد نشده است (نمودار ۳) و دمای نشان داده شده در این منحنی معادل دمای محاسبه شده در نرم‌افزار است (نمودار ۴).

مطالعه، اختلاف چرخه‌های آستانه به دست آمده از نمونه‌های مورد آزمایش (سلول‌های تیمار شده با عصاره) و نمونه‌های کنترل (سلول‌های تیمار نشده با عصاره) محاسبه و با استفاده از فرمول $\Delta\Delta Ct$ ، نسبت ژن هدف به ژن مرجع از طریق $2^{-\Delta\Delta Ct}$ محاسبه شد که فرمول محاسبه آن به شرح زیر است:

$$\Delta Ct = Ct_{\text{target}} - Ct_{\text{reference}}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{test sample}} - \Delta Ct_{\text{control sample}}$$

$$\text{Relative expression: } 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

پس از انجام واکنش Ct به دست آمده با استفاده از نرم افزار $\Delta\Delta Ct$ ، Rest هر یک از نمونه‌ها محاسبه شد و سپس با نرم افزار Graphpad prism میزان تغییر بیان هر یک از نمونه‌ها محاسبه شد.

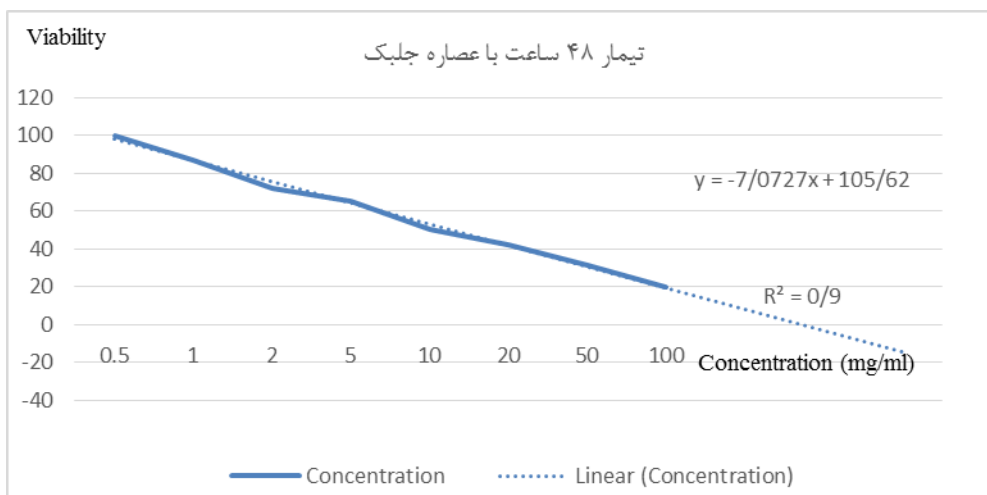
نتایج

نتیجه انجام MTT Assay

تیمار رده سلولی U_{87} با غلظت‌های $0.5, 1, 2, 5, 10, 20, 40, 80$ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از عصاره جلبک طی مدت ۴۸ ساعت انجام و سپس میزان زنده‌مانی آن‌ها در مقایسه با گروه کنترل که تحت تأثیر عصاره قرار نگرفته بودند، با تست MTT انجام شد. بر اساس نتایج MTT غلظتی از عصاره جلبکی که $50 \mu\text{g/ml}$ U_{87} را می‌کشد (IC_{50}) برابر $10/01$ محاسبه گردید (نمودار ۱).

نتیجه بررسی کمیت و کیفیت RNA/استخراج شده

بررسی کمیت RNA استخراج شده در تمام نمونه‌ها، نشان داد که نسبت جذب در طول موج 260 به 280 نانومتر بین $1/9 - 1/7$ و غلظت RNA $280 \text{ ng}/\mu\text{l}$ است. این نتایج نشان‌دهنده درجه خلوص بالای RNA و نیز آغستگی کم آن با پروتئین و DNA ژنومی می‌باشد. کیفیت RNA توسط ژل آگارز $1/5\%$ مورد مطالعه قرار گرفت. حضور باندهای RNA ریبوزومی $18S$ و $28S$ نشان‌دهنده سالم و دست نخورده بودن RNA بود. نمونه-

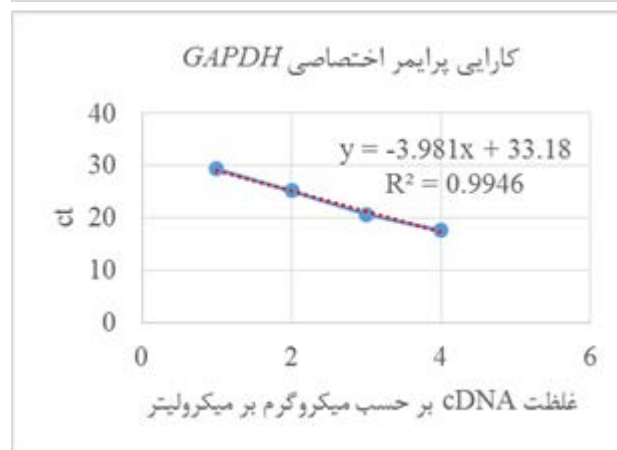
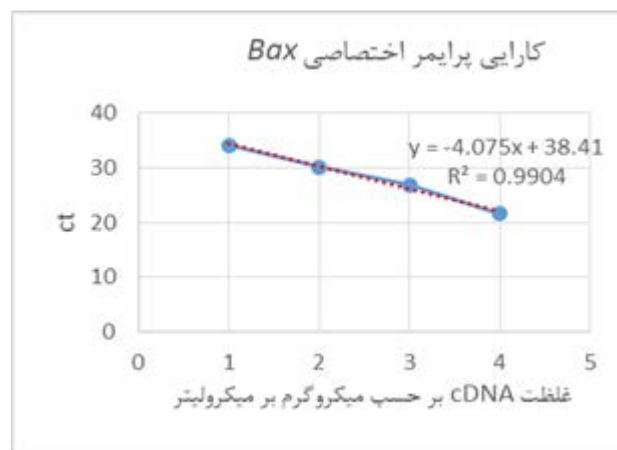


نمودار ۱. نمودار IC_{50} در تیمار ۴۸ ساعت با عصاره جلبک $IC_{50} = 10.01 \text{ mg/ml}$

سلولی U_{87} نسبت به سلول‌هایی که با عصاره جلبک دونالیلا تیمار نشده بودند به طور معنی‌داری ($p < 0.001$) افزایش یافت. تغییرات میزان بیان ژن در نمونه‌ها، توسط دستگاه محاسبه و نمودار نتایج بدست آمده توسط نرم‌افزار Graph Pad رسم شده است (نمودار ۵). تغییرات میزان بیان ژن هدف به نسبت میزان بیان ژن رفرنس محاسبه شد. با توجه به این که مقدار $p < 0.001$ است نتیجه به دست آمده معنی‌دار است. بنابراین می‌توان با اطمینان گفت که میزان بیان نسبی ژن *Bax* به مقدار چهار برابر افزایش یافته است.

با توجه به نتایج تحقیق حاضر، تیمار ۴۸ ساعته با عصاره جلبک در غلظت IC_{50} (یعنی 10.01 mg/ml) توانسته است که میزان بیان نسبی ژن *Bax* را به طور معنی‌داری افزایش دهد. بنابراین پیشنهاد می‌شود که تأثیر تیمار با عصاره جلبک دونالیلا و سایر جلبک‌ها بر روی رده سلولی حاضر و سایر رده‌های سلولی بررسی شود و تغییرات میزان بیان ژن‌های آپوپتوزی مورد مطالعه قرار گیرد. در صورت موفقیت‌آمیز بودن نتایج می‌توان از عصاره جلبک‌ها برای تهیه داروهای ضد سرطان استفاده کرد.

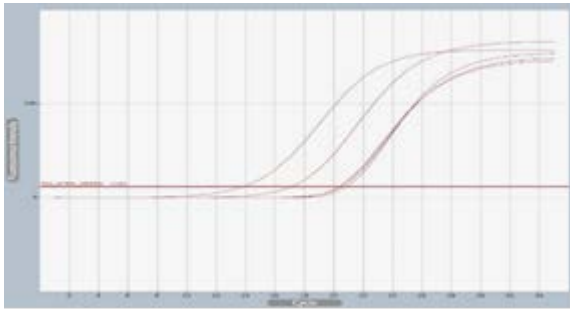
در نهایت، نتایج با استفاده از نرم‌افزار $2009 \text{ V. } \frac{2}{0/13}$ REST آنالیز گردید.



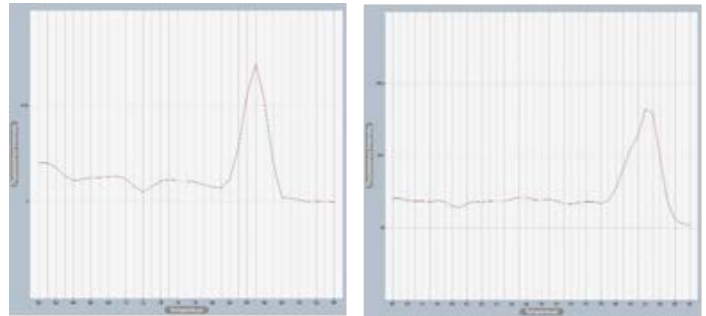
نمودار ۲. منحنی استاندارد ژن *Bax* (سمت راست) و ژن

GAPDH (سمت چپ)

میزان تغییر نسبی بیان ژن *Bax* در سلول‌هایی از رده سلولی گلیوبلاستوما بررسی شد، که به مدت ۴۸ ساعت با غلظت IC_{50} ، یعنی 10.01 mg/ml از عصاره جلبک دونالیلا سالینا تیمار شده بودند. میزان بیان ژن *Bax* در سلول‌های گلیوما در رده



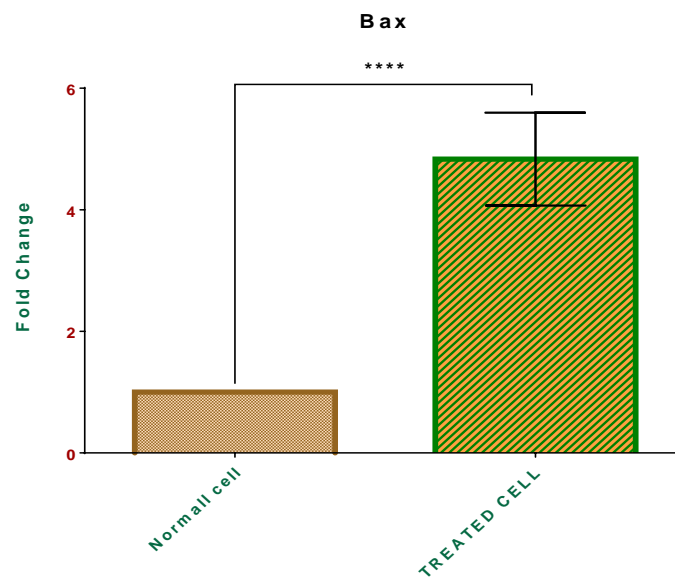
نمودار ۴. منحنی تکثیر ژن *Bax* (منحنی‌های راست) و ژن *GAPDH* (منحنی‌های چپ)



نمودار ۳. منحنی ذوب محصول PCR ژن *Bax* (سمت راست) و ژن *GAPDH* (سمت چپ)

جدول ۲. نتیجه مربوط به تغییرات بیان ژن *Bax* در مواجهه با عصاره جلبک

Gene	Type	Reaction Efficiency	Expression	خطای عیار	فاصله اطمینان	سطح معنی داری	Result
<i>GAPDH</i>	REF	۱/۰	۰/۶۶۶	۰/۵۵۶ – ۰/۷۷۱	۰/۵۳۴ – ۰/۸۹۰	۰/۰۵۸	
<i>Bax</i>	TRG	۱/۰	۰/۱۴۵	۰/۱۰۵ – ۰/۱۸۱	۰/۰۹۷ – ۰/۱۹۹	۰/۰۰۰	Up



نمودار ۵. تغییر میزان بیان ژن *Bax* در سلول‌های U_{87} تیمار شده با عصاره جلبک دونالیلا در غلظت $IC_{50} = 10/01 \text{ mg/ml}$

بحث

بررسی میزان کشندگی عصاره جلبک در سلول‌های رده سلولی سرطان مغز در تحقیقی، Chidambara و همکاران، میزان تأثیر عصاره جلبک دونالیلا سالینا را در از بین بردن سلول‌های سرطان پوست بررسی کرده و نشان دادند که عصاره جلبک فعالیت سیستم ایمنی مانند ماکروفاژها را افزایش می‌دهد و باعث شناسایی و سرکوب سلول‌های سرطانی می‌شود (۳۲).

هدف از انجام مطالعه حاضر، بررسی تغییرات میزان بیان ژن آپوپتوزی *Bax* در رده سلولی گلیوبلاستوما، تحت تیمار با عصاره جلبک دونالیلا سالینا بود. تا به حال تحقیقات زیادی بر روی تغییرات میزان بیان ژن‌ها تحت تأثیر عصاره‌های گیاهی انجام شده است، اما در بررسی متون مطالعه‌ای درباره میزان تأثیر عصاره جلبکی در تغییرات بیان ژن *Bax* بدست نیامد. در

داده شد که عصاره جلبک دونالیلا سالیئا می‌تواند سلول‌های سرطانی مغز را از بین ببرد و هر قدر غلظت عصاره بیشتر باشد میزان مرگ سلول‌های سرطانی گلیوبلاستوما افزایش می‌یابد.

در پژوهشی Raja و همکاران، نشان دادند که عصاره جلبک دونالیلا، جلبک اسپیرولینا و ترکیباتی مثل بتاکاروتن، آلفاتوکوفرول و کانتازانتین می‌تواند باعث القای فاکتور نکروز تومور (α - TNF) شده و در نتیجه خطر سرطان اپیدرموئید کیسه دهانی در موش کاهش دهد (۳۷). نتایج این تحقیق با مطالعه Raja و همکاران، همخوانی دارد.

در مطالعه Widjaja و همکاران اثر عصاره جلبک سبز کلرا و لگاریس (*Cholora vulgaris*) بر روی سلول‌های سرطانی بررسی و مشخص گردید که عصاره جلبک سبز کلرا به دلیل داشتن ترکیبات گلیکوپروتئین محلول در آب، دارای اثرات ضد توموری می‌باشد. همچنین نشان داده شد که نوع دیگری از بتاکاروتن جداسازی شده از جلبک بنام beta-CDS، خاصیت ضد سرطانی موثری دارد (۳۸). نتایج به دست آمده از این مطالعه با تحقیق Widjaja و همکاران، انطباق دارد. زیرا پژوهش حاضر نشان داد که عصاره جلبک دونالیلا سالیئا دارای خواص ضد سرطانی مؤثری است که باعث مرگ سلول‌های سرطانی می‌شود. مطالعه Bradassi و همکاران، با هدف بررسی اثرات سیتوتوکسیتی عصاره جلبک سبز دریایی هلیمدا دیسکوئیدا (*Helimeda discoidea*) و کلادوفوروپسیس (*Cladophoropsis*) به صورت پاسخ وابسته به دوز انجام شد. بیشترین اثر سیتوتوکسیک در غلظت معادل ۵۰ mg/ml از عصاره آبی کلادوفوروپسیس علیه سلول‌های L₁₂₁₀ در لوکمی موش‌ها گزارش شد (۳۹). نتیجه مطالعه موجود با تحقیق Bradassi و همکاران، همخوانی دارد. در تحقیق حاضر نشان داده شد که عصاره جلبک دونالیلا سالیئا می‌تواند سلول‌های سرطانی را از بین ببرد و غلظت IC_{50} ۱۰/۰۱ mg/ml تعیین شد.

در مطالعه Vaseghi و همکاران، در مورد میزان کشندگی عصاره جلبک قهوه‌ای سارگاسوم (*Sargassum*) در سلول‌های سرطان

نتیجه تحقیق حاضر با پژوهش Chidambara و همکاران، همخوانی دارد. نتایج تحقیق دیگری که توسط Styker و همکاران در مورد اثر بتاکاروتن موجود در عصاره جلبک دونالیلا بر روی سرطان پوست انجام شده است، نشان می‌دهد که بتاکاروتن با از بین بردن رادیکال‌های آزاد، از پیشرفت سرطان پوست ممانعت می‌کند (۳۳). نتایج به دست آمده از تحقیق حاضر با مطالعه Styker و همکاران، منطبق هستند. در مطالعه موجود نشان داده شد که عصاره جلبک دونالیلا باعث مرگ سلول‌های سرطانی گلیوبلاستوما شده و از ادامه رشد آن‌ها ممانعت می‌نماید.

Blot و همکاران، اثر عصاره جلبک دونالیلا را بر روی سرطان معده بررسی کرده و نشان دادند که بتاکاروتن می‌تواند خطر سرطان معده را کاهش دهد (۳۴). نتایج مطالعه حاضر با مطالعه انجام شده توسط Blot و همکاران، همخوانی دارند. براین اساس عصاره جلبک دونالیلا سالیئا می‌تواند با از بین بردن سلول‌های سرطانی، خطر سرطان مغز را کاهش دهد.

در مطالعه‌ای که Sharif و همکاران، در ارتباط با میزان تأثیر بتاکاروتن موجود در عصاره جلبک بر روی سلول‌های سرطان ریه انجام داده‌اند، مشخص گردید که این ماده می‌تواند مورفولوژی سلول‌های سرطان ریه NCI-H₆₉ را تغییر داده و باعث کاهش رشد و تقسیم سلولی در آن‌ها گردد (۳۵). نتایج تحقیق حاضر با مطالعه Sharif و همکاران انطباق دارد. زیرا در پژوهش حاضر نشان داده شد که عصاره جلبک دونالیلا باعث مرگ سلول‌های سرطانی U₈₇ می‌شود. نتیجه مطالعه Wang و همکاران، نشان داد که عصاره اتانولی دونالیلا باعث مرگ سلولی در سلول‌های رده اپی‌تلیوم سرطان ریه در انسان می‌شود. بنظر می‌رسد این حالت در نتیجه تغییر در میزان بیان پروتئین‌های تنظیم‌کننده چرخه سلولی و پس از توقف چرخه سلولی انجام می‌شود. بنابراین، با افزایش غلظت عصاره و افزایش زمان تیمار، میزان درصد مرگ و میر سلول‌های سرطانی نیز افزایش پیدا می‌کند (۳۶). نتیجه تحقیق حاضر منطبق بر مطالعه Wang و همکاران است. در این تحقیق نشان

مطالعات بعدی اثرات مشابه را در بدن موش نشان دادند (۴۳). نتایج مطالعه حاضر با تحقیق Harada و همکاران منطبق است. در تحقیق موجود اثر سیتوتوکسیک بتاکاروتن موجود در عصاره جلبک دونالیلا سالینا بررسی و نشان داده شد که غلظت $10/01$ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از عصاره به عنوان غلظت IC_{50} می‌تواند نیمی از سلول‌های سرطانی $U87$ را از بین ببرد.

نتیجه‌گیری

در این پژوهش، سلول‌های گروه تیمار با غلظت‌های ۱، ۲، ۵، ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از عصاره جلبکی به مدت ۴۸ ساعت تیمار شدند. نتایج نشان داد که میزان بیان ژن Bax در سلول‌های مذکور، افزایش معنی‌دار داشته است. پیشنهاد می‌شود که با تیمار رده‌های سلولی سرطانی با عصاره‌های جلبکی، تغییرات میزان بیان سایر ژن‌های آپوپتوزی بررسی شود.

تشکر و قدردانی

مقاله حاضر از پایان‌نامه کارشناسی ارشد با کد شناسایی ۲۸۳۳۰۵۳۹۵۲۰۰۷ تهیه شده است. بدین وسیله نگارندگان مقاله از تمامی افرادی که پژوهش حاضر را یاری کردند سپاسگزاری می‌کنند.

تضاد منافع

در این پژوهش هیچ گونه تعارض منافی توسط نویسندگان گزارش نشده است.

مشارکت نویسندگان:

- (۱) مفهوم پردازی و طراحی مطالعه، یا جمع آوری داده‌ها، یا تجزیه و تحلیل و تفسیر داده‌ها: مهسا کاوسی، سید شمین سید حسینی
- (۲) تهیه پیش نویس مقاله یا بازبینی آن جهت تدوین محتوای اندیشمندانه: مهسا کاوسی
- (۳) تایید نهایی دستنوشته پیش از ارسال به مجله: مهسا کاوسی، سید شمین سید حسینی

پستان و دهانه رحم، اثرات سیتوتوکسیک در غلظت IC_{50} عصاره سارگاسوم یعنی در ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بدست آمد (۴۰). نتیجه پژوهش حاضر با تحقیق Vaseghi و همکاران، منطبق است. در پژوهش حاضر، نشان داده شد که در تیمار ۴۸ ساعته، اثرات سیتوتوکسیک عصاره جلبک دونالیلا در غلظت IC_{50} ، یعنی در $10/01$ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر وجود دارد که مشابه غلظت IC_{50} به دست آمده برای عصاره سارگاسوم است. همچنین Van و همکاران، در مورد میزان سیتوتوکسیک بودن عصاره هفت گونه از جلبک سارگاسوم نشان دادند که عصاره جلبک سارگاسوم دارای اثرات سیتوتوکسیک متوسطی علیه آدنوکارسینوما، هیاتوما و سرطان‌های معده و کولون با غلظت مشخص و IC_{50} است (۴۱). نتایج مطالعه موجود با تحقیق Van و همکاران، همخوانی دارد. مطالعه حاضر نشان داد که عصاره جلبک دونالیلا سالینا همانند عصاره گونه‌های سارگاسوم، اثرات سیتوتوکسیک بر روی سلول‌های سرطانی دارد.

Fernandes و همکاران اثرات مهاری عصاره جلبک قهوه‌ای برزیلی بر روی ویروس لنفوتروپ انسانی (HTLV-L) T-cell را در محیط آزمایشگاهی مطالعه و نشان دادند که عصاره جلبک سارگاسوم و لگاریس در غلظت IC_{50} دارای ۷۸٪ اثر مهاری است (۴۲). نتایج مطالعه حاضر با تحقیق Fernandes و همکاران انطباق دارد. در مطالعه حاضر هم مشخص گردید که عصاره جلبک از رشد سلول سرطانی گلیوبلاستوما ممانعت کرده و مرگ سلولی را القا می‌کند.

در مطالعه ای Harada و همکاران، با هدف بررسی میزان تأثیر پالمیتیک اسید بر روی رده سلولی سرطانی لوکمی و رده سلولی سالم فیبروبلاست نشان دادند که پالمیتیک اسید استخراج شده از جلبک قرمز به عنوان ماده سیتوتوکسیک، باعث مرگ سلول‌های لوکمی می‌شود. در حالی که سلول‌های رده کنترل زنده باقی مانده‌اند. پالمیتیک اسید در غلظت $50-12/5$ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اثر سیتوتوکسیک بر روی سلول‌های لوکمی دارد. پالمیتیک اسید در غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر باعث القا آپوپتوز در سلول‌های لوکمی انسانی MOLT-4 می‌شود. نتایج

References

1. Haque A, Banik NL, Ray SK. Molecular alterations in glioblastoma: potential targets for immunotherapy. *Progress in Molecular Biology and Translation Science*. 2011; 98:187-234.
2. Robins HI, Chang S, Butowski N, Mehta M. Therapeutic advances for glioblastoma multiforme: current status and future prospects. *Current Oncology Reports*. 2007; 9:66-70.
3. Khasraw M, Lassman AB. Advances in the treatment of malignant gliomas. *Current Oncology Reports*. 2010; 12:26-33.
4. Galan-Moya EM, Le Guelte A, Lima Fernandes E, Thirant C, Dwyer J, Bidere N, et al. Secreted factors from brain endothelial cells maintain glioblastoma stem-like cell expansion through the mTOR pathway. *EMBO Reports*. 2011; 12(5):470-476.
5. Li S, Hu Y, Zhao J, Zhao Y, Sun J, Yang Y, et al. MicroRNA-34a induces apoptosis in the human glioma cell line, A172, through enhanced ROS production and NOX2 expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2014; 444(1):6-12.
6. Thomas L, Honnorat J. Brain metastases epidemiology, diagnosis and imagery. *Rev Prat*. 2014; 64(5):668-73.
7. Dawe D, Greenspoon J, Ellis P. Brain metastases in non-small-cell lung cancer. *Clin Lung Cancer*. 2014; 15(4):249-257.
8. Robinson GA. *Brain Tumors in Older Adults*. Singapore. Springer. 2016.
9. Akhavan A, Binesh F, Heidari S. Survival of brain metastatic patients in Yazd, Iran. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2014; 15(8):3571-3574.
10. Jazayeri S, Rahimi-Movaghar V, Shokraneh F, Saadat S, Ramezani R. Epidemiology of primary CNS tumors in Iran: a systematic review. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2013; 14(6):3979-3985.
11. Geoffrey S, Young MD. Advanced MRI of Adult Brain Tumors. *Neurologic Clinics*. 2007; 25(4): 947-973.
12. Young RM, Jamshidi A, Davis G, Sherman JH. Current trends in the surgical management and treatment of adult glioblastoma. *Ann Trans Med*. 2015; 3(9):121.
13. Bleeker F, Fonneer E, Molenaar Remco J, Leenstra S. Recent advances in the molecular understanding of glioblastoma. *J Neurooncol*. 2012; 108(1):11-27.
14. Gallego, O. Nonsurgical treatment of recurrent glioblastoma. *Current oncology*. 2015; 22(4):273-281.
15. Schapira A. *Neurology and clinical neuroscience*. Philadelphia. Elsevier. 2006.
16. Friesen C, Hormann I, Roscher M, Fichtner I, Alt A, Hilger R, et al. Opioid receptor activation triggering downregulation of cAMP improves effectiveness of anti-cancer drugs in treatment of glioblastoma. *Cell Cycle*. 2014; 13(10):1560-1570.
17. Wick W, Weller M, Weiler M, Batchelor T, Yung AW, Platten M. Pathway inhibition: emerging molecular targets for treating glioblastoma. *Neuro Oncol*. 2011; 13(6):566-579.
18. Jurisicova A., Antenos M, Varmuza S, Tilly JL, Casper RF. Expression of Apoptosis-Related Genes During Human Preimplantation Embryo Development: Potential Roles for the Harakiri Gene Product and Caspase-3 in Blastomere Fragmentation. *MHR: Basic science of reproductive medicine*. 2003; 9(3):133-141.
19. Hung-Ching L, Zhi-Ying H, Carol-Ann M, Lucinda LV, Owen D, Zev R. Expression of Apoptosis-Related Genes in Human oocytes and

- Embryos. Journal of assisted reproduction and genetics. 2000; 17(9):521-533.
20. Vandaele L, Karen G, Luc P, Ann VS. Mrna Expression of Bcl-2, Bax, Caspase-3 and-7 Cannot Be Used as a Marker for Apoptosis in Bovine blastocysts. Animal reproduction science. 2008; 106(1):168-173.
21. Husain MA, Mubarak Ishqi H, Sarwar T, Rehman SU, Tabish M. Identification and Expression Analysis of Alternatively Spliced New Transcript Isoform of bax Gene in Mouse. Gene. 2017; 621:21-31.
22. Gustavsson M, Wilson MA, Mallard C, Rousset C, Johnston MV, Hagberg H. Global gene expression in the developing rat brain after hypoxic preconditioning: involvement of apoptotic mechanisms. Pediatric Res. 2007; 61(4): 444-450.
23. Cheng G, Wei L, Zhi-Dan S, Hi-Guang Z, Xiang-Zhen L. Atorvastatin ameliorates cerebralasospasm and early brain injury after subarachnoid hemorrhage and inhibits caspase-dependent apoptosis pathway. BMC Neurosis. 2009; 10(1): 1-17.
24. Endo H, Kamada H, Nito C, Nishi T, Chan PH. Mitochondrial translocation of p53 mediates release of cytochrome c and hippocampal CA1 neuronal death after transient global cerebral ischemia in rats. J Neurosci. 2006; 26(30): 7974-7983.
25. Tian B, Hua Y. Carotenoid biosynthesis in extremophilic Deinococcus-Thermus bacteria. Thermusbacteria. 2010; 18(11): 512-520.
26. Asker D, Beppu T, Ueda K. Unique diversity of carotenoid-producing bacteria isolated from Miassa. A radioactive site in Japan. 2007; 77(2): 383-392.
27. Burki F, Shalchian-Tabrizi K. Marianne Minge, Åsmund Skjæveland, Sergey I. Nikolaev, Kjetill S. jakobsen and Jan Pawlowski. Phylogenomics Reshuffles the Eukaryotic Supergroups. PLoS ONE. 2007; 2(8):e790.
28. Milkovic L, Siems W, Siems R, Zarkovic N. Oxidative stress and antioxidants in carcinogenesis and integrative therapy of cancer. Current Pharm Des. 2014; 20(42):6529-6542.
29. Ibañez E, Herrero M, Mendiola JA, Castro-Puyana M. Extraction and Characterization of Bioactive Compounds with Health Benefits from Marine Resources: Macro and Micro Algae, Cyanobacteria, and Invertebrates. In Marine Bioactive Compounds. Springer. 2012; 55-98.
30. Narváez-Zapata JA, Rojas-Herrera R, López-Uc Y, Sánchez-Estudillo L. Different Physiological Responses Influenced by Salinity in Genetically Related Dunaliella Salina Isolates. Biotechnology letters. 2011; 33(5):1021-1026.
31. Lx X. Experimental study on extract of Dunaliella salina in preventing NSAR-induced cancer of proventriculus in mice. Zhonghua yu fang yi xue za zhi. 1993; 27(6):350-353.
32. Chidambara M, Vanitha A. In vivo antioxidant activity of carotenoids from dunaliella salina a green microalga. Life sciences. 2005; 76(12):1381-1390.
33. Stryker WS, Stampfer MJ, Stein EA, Kaplan L, Louis TA, Sober A, Willett WC. Diet, plasma levels of beta-carotene and alpha tocopherol, and risk of malignant melanoma. American Journal of Epidemiology. 1990; 131(4):597-611.
34. Blot WJ, Li JY, Taylor PR, Guo W, Dawsey S, Wang GQ, et al. Nutrition intervention trials in Linxian, China: Supplementation with specified vitamin/mineral combinations, cancer incidence, and disease-specific mortality in the

- general population. Natl Cancer Inst., 1993; 85(18):1483-1492
35. Sharif N , Neelma Saleem M, Aslam F, Naz F, Shagufta A. Prolific Anticancer Bioactivity of Algal Extracts. J cell 3, 2014; 8(4):60-72.
36. Wang YJ, Huchien Y, Hugpan. CH. Effects of dietary supplementation of carotenoids on survival ,growth,pigmentation and antioxidant capacity of characins, *Hyphessobry callistus*. Aquaculture. 2006; 261(2): 641-648.
37. Raja R, Hemaiswarya S, Balasubramanyam D, Rengasamy R. Protective effect of *Dunaliella salina* (Volvocales, Chlorophyta) against experimentally induced fibrosarcoma on wistar rats. Microbiological research. 2007; 162(2):177-184.
38. Widjaja A; Chien CC; Ju YH. Study of increasing lipid production from fresh water microalgae *Chlorella vulgaris*. Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers. 2009; 40:13–20.
39. Bradassi F, Cumani F. Determining a threshold in effect of ocean acidification on crustose coralline algae. 1st. Roma. Università degli studi di Trieste. 2011.
40. Vaseghi G, Sharifi M, Dana N, Ghasemi A, Yegdane A. Cytotoxicity of *Sargassum angustifolium* Partitions against Breast and Cervical Cancer Cell Lines. Advanced Biomedical Research. 2018; 7:43.
41. Van Duyn MA, Pivonka E. Overview of the health benefits of fruit and vegetable consumption for the dietetics professional: selected literature. Journal of the American Dietetic Association. 2000; 100(12): 1511-1521.
42. Fernandes DRP, Vinícius PDO, Valentin YY. Seaweed biotechnology in Brazil: Six decades of studies on natural products and their antibiotic and other biological activities. Journal of Applied Phycology. 2014; 26: 1923-1937.
43. Harada H, Yamashita U, Kurihara H, Fukushi E, Kawabata J, Kamei Y. Antitumor activity of palmitic acid found as a selective cytotoxic substance in a marine red alga. Anticancer Res. 2002; 22(5): 2587-2590.

The effect of extract of *Dunaliella salina* L. on the expression of *Bax* in glioblastoma cancer cell Line

Mahsa Kavousi*¹, Seyed Shamin Seyed- Hosseini²

1. Department of Biology, East Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

2. Department of Biology, East Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Corresponding author: mkavoosi@iauet.ac.ir

Abstract

Background & Aim: Plant extracts can change the expression of genes in cancer cells. Up to now, no study has been performed on the effect of algae extract. The aim of this research was to investigate the changes in *Bax* apoptotic gene expression in glioblastoma cell line and to determine the rate of cell death in cancer cells treated with *Dunaliella salina* extract. U₈₇ cell line contains glioblastoma cancer cells as the most acute type of human brain tumor. Several genes, including *Bax*, play important roles in initiating apoptosis and the expression of *Bax* decreases during cancer. Today, because of the side effects of chemical drugs, the tendency to use algae and medicinal plants in the treatment of diseases has increased.

Methods: The U₈₇ cell line was prepared from Iranian Biological Resources Center and cultivated. Cells were divided into two treatment and control groups. *Dunaliella* extract was affected on the treatment group with concentrations of 0.5, 1, 2, 5, 10, 15, 20, 50 and 100 mg/ml and its toxicity was measured using MTT assay. *Bax* expression was examined by Real time PCR. RNA was extracted from the cells of the treatment and control group and the cDNA was made. The expression of genes was evaluated using Real time PCR and $\Delta\Delta C_t$.

Results: The result of MTT indicated that IC₅₀ was 10.01 mg/ml for 48 hours of treatment. By using Real Time PCR, it was found that in these cells, the expression level of *Bax* apoptotic gene increased 4-fold (p-value <0.001).

Conclusion: Treatment with algae extract increased gene expression and destroyed cancer cells. It is suggested to investigate the effect of other algae extracts on the expression of other genes involved in apoptosis.

Keywords:

Dunaliella salina,
Cell Line U₈₇,
MTT assay,
Real time PCR,
Bax, *GAPDH*,
IC₅₀

How to Cite this Article: Kavousi M, Seyed- Hosseini SH. The effect of extract of *Dunaliella salina* L. on the expression of *Bax* in glioblastoma cancer cell Line. Journal of Torbat Heydariyeh University of Medical Sciences. 2020;8(3):37-49.