مقـاله پژوهشی
سلامت جامعه
دوره دهم، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۵

مطالعه اثر غلظت‌های مختلف عصاره زعفران بر الگوی بیانی برخی از ژن‌های کنترل کننده مسیر خود بازآفرینی(Self-Renewal) سلول در رده سلول سرطانی AGS (آدنوکارسینومای معده)

وجیهه اکبرپور[۱]، فهمیده بگرضایی[۲]، مهدی محمودی[۳]، محمدرضا حاجی‌زاده[۴]، محمود شیخ‌فتح‌الهی[۵]، محمدرضا میرزایی[۶*]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۴/۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۷/۲۰

خلاصه

مقدمه: استفاده از ترکیبات گیاهی به‌عنوان سرکوب‌کننده سرطان، امروزه اهمیت زیادی پیدا کرده است. هدف از مطالعه حاضر بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف عصاره زعفران (Crocus sativus) بر بیان ژن‌های OCT4، KLF، SOX2، NANOG و Nucleostemin در رده سلولی AGS (Gastric Adenocarcinoma) بود.

مواد و روش‌ها: رده سلول سرطانی آدنوکارسینوم معده (AGS) از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه و در محیط کشت RPMI 1640 کشت داده شد. پس از چند پاساژ، اطمینان از صحت سلول‌ها، سلول‌ها در دو گروه تست و کنترل با شرایط یکسان کشت شدند. پس از رسیدن تراکم سلولی به ۷۰-۶۰ درصد، گروه آزمایش در معرض غلظت‌های ۲۰، ۴۰ و ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر عصاره زعفران قرار گرفته و پس از گذشت بازه‌های زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، سلول‌ها جدا شده، پس از تخلیص Total RNA و سنتز cDNA، میزان بیان ژن‌های مورد نظر و میزان تغییرات بیانی این ژن‌ها در دو گروه تست و کنترل تعیین گردید.

یافته‌ها: نتایج نشان داد عصاره زعفران باعث کاهش بیان ژن‌های OCT4، KLF4، SOX2، NANOG و Nucleostemin می‌شود.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان داد که عصاره زعفران می‌تواند به عنوان یک عامل مهارکننده تقسیمات سلولی، در پیشگیری از سرطان که به‌واسطه تقسیمات کنترل نشده سلولی ایجاد می‌شود، مورد توجه قرار گیرد. همچنین این مطالعه می‌تواند بستری برای مطالعات گسترده‌تر در خصوص تأثیر ضد سرطانی این ترکیب گیاهی باشد.

واژه‌های کلیدی: زعفران، رده سلول سرطانی، آدنوکارسینومای معده (AGS)

۱ - کارشناس ارشد، گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان، رفسنجان، ایران.
۲- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان، رفسنجان، ایران.
۳- استاد، گروه بیوشیمی بالینی و مرکز تحقیقاتی پزشکی ملکولی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان، رفسنجان، ایران.
۴- استادیار، گروه بیوشیمی بالینی و مرکز تحقیقاتی پزشکی ملکولی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان، رفسنجان، ایران.
۵- استادیار، گروه پزشکی اجتماعی و مرکز تحقیقات محیط کار، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان، رفسنجان، ایران.
۶- استادیار، گروه بیوشیمی بالینی و مرکز تحقیقاتی پزشکی ملکولی ، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان، رفسنجان، ایران. (نویسنده مسئول)
پست الکترونیکی: mirzaeemr@gmail.com تلفن: ۰۳۴۳۴۲۸۰۰۸۶

مقدمه

سرطان در نتیجه تقسیم غیرقابل کنترل سلول‌ها که ناشی از تأثیر عوامل محیطی و ژنتیکی است به وجود می‌آید. چهار دسته از ژن‌های کلیدی که در هدایت سلول‌های سرطانی نقش دارند شامل آنکوژن‌ها، ژن‌های مهارکننده توموری، ژن‌های ترمیم کننده DNA و ژن‌های مرگ برنامه‌ریزی شده هستند. چنانچه در یک سلول جهش‌های ژنتیکی به نحوی رخ دهند که ژن‌های یاد شده از حالت طبیعی خارج شوند، آنگاه آن سلول از مسیر طبیعی خود خارج شده و به سوی سرطانی شدن پیشرفت می‌کنند[۱].

بسیاری از محققین اعتقاد دارند تمامی سلول‌های بافت، توانایی سرطانی شدن را ندارند بلکه سلول خاصی که به نام سلول بنیادی سرطان (cancer stem cell) شناخته می‌شود عامل پیدایش سرطان در هر بافتی است. سلول اخیر در واقع سلول بنیادی بافتی (Adult stem cell) خاصی است که دچار تغییر در بیان ژن‌ها شده است یا به عبارتی الگوی بیانی ژن‌هایش دستخوش تغییر شده است[۲]. این سلول سرطانی که توانایی خود بازآفرینی (Self-renewal)، تقسیمات سلولی همسان و ناهمسان و در نتیجه، ایجاد توده سرطانی را داراست با تقسیمات کنترل نشده منشأ ایجاد بافت سرطانی خواهد بود[۳]. سلول‌های اخیر (CSCs) از توده‌های سرطانی مربوط به سرطان‌های پستان[۴]، مغز[۵]، ملانوما[۶]، پروستات[۷]، استئوسارکوما[۸] و بسیاری از تومورهای دیگر جدا شده‌اند. این مشاهدات منجر به ارائه نظریه "سلول بنیادی سرطانی" شده است[۹]. طبق این نظریه، درون یک بافت سرطانی، تعداد کمی از سلول‌ها، توانایی تقسیم نامحدود دارند (CSCs) که رشد بافت سرطانی را موجب می‌شوند. این نظریه، با این یافته که اکثر سرطان‌ها متشکل از جمعیت ناهمگونی از سلول ها با درجات متفاوتی از تمایز هستند، مطابقت می‌کند. همچنین شاید بتوان گفت دلیل این که درمان‌های رایج سرطان توده بافت سرطانی را کاهش می‌دهند اما مانع رشد مجدد سرطان نمی‌شوند این است که این شیوه درمانی، سلول های بنیادی سرطانی را تخریب نمی‌کند[۱۰]. امروزه ژن‌هایی که تنظیم‌کننده مسیر خود بازآفرینی سلول‌های بنیادی هستند، به‌عنوان دسته جدیدی از مارکرهای مولکولی سرطان معرفی شده‌اند که بیان کنترل نشده آن‌ها از اهمیت زیادی در فرایند سرطانی شدن برخوردار است[۱۱]. ژن‌های مهم کنترل‌کننده مسیر خود بازآفرینی (Self-Renewal)، شامل OTC4، SOX2، NANOG، KLF4 و NUCLEOSTEMIN می‌باشند. OTC4 به همراه ژن‌هایی مثل NANOG، KLF4 و SOX2 لازمه بقاء و تکثیر سلول‌های زایشی جنینی (Embryonic Stem Cell) هستند[۱۲]. این ژن به صورت اورتولوگ بین پستانداران حفاظت شده و به عنوان یک عامل کپی‌برداری، بیان ژن‌های متعددی کنترل می‌کند. این ژن در سلول‌های جنینی سرطانی (ECSC) و سلول‌های پیش ساز گامت‌ها، بیان شده و غیرفعال کردن آن در مراحل اولیه لانه گزینی در موش باعث عدم شکل‌گیری جنین می شود[۱۳]. این ژن با فرآیند پردازش افتراقی (Alternative splicing) سه واریانت مختلف (OCT4A، OCT4B وOCT4B1) تولید می‌کند که از لحاظ سازمان‌بندی ژنی مشابه اما از لحاظ ساختمان پروتئینی و عملکرد متفاوتند[۱۴]. نانوگ (NANOG) یک عامل رونویسی دارای هومودامین (Homeodomain) است که به سلول‌های بنیادی توانایی خود بازآفرینی می‌دهد. نانوگ یکی از چندین فاکتوری است که در سلول‌های بنیادی پرتوان (pluripotent) بیان می شود و در شروع تمایز، کاهش بیان پیدا می‌کند[۱۵]. نوکلئوستمین (Nucleostemin) ژنی است متعلق به خانواده پروتئین‌های متصل شونده به GTP و پروتئین تک زیر واحدی سنتز شده از این ژن، به‌طور عمده در داخل هسته حضور دارد. این ژن نقش مهمی در تنظیم پروتئین P53 دارد بنابراین، باعث تنظیم چرخه سلولی می‌شود[۱۶]. SOX2 به همراه NANOGو OTC4 عامل خود بازآفرینی سلول‌های بنیادی هستند[۱۷].

به جهت اهمیت سرطان، امروزه استفاده از ترکیبات گیاهی که باعث پیشگیری از سرطان شود مورد اقبال قرار گرفته است. زعفران با نام علمی (Crocus sativus L) گیاهی پیازی و پایا از خانواده زنبق (Iridaceae) می‌باشد[۱۷] . زعفران در طب عامیانه به‌عنوان درمان‌کننده تب مخملکی، آبله، سرماخوردگی، آسم، بیماری‌های چشم و قلب و سرطان استفاده شده است[۱۷]. کلاله سه‌شاخه زعفران مهم‌ترین

بخش تجاری آن است که حاوی مواد چرب، املاح معدنی و مواد معطر است. عطر و بوی زعفران به علت وجود اسانس بی‌رنگ تروپن‌دار و یک ترکیب اکسیژن‌دار همراه با سینئول به نام سافرانال می‌باشد. عمده‌ترین ترکیب ایجاد کننده رنگ در زعفران کاروتنوییدی به نام کروسین(Crocin) است. کروسین و کروستین موجود در زعفران، مهم‌ترین کاروتنوییدهای آن هستند. کروسین در بدن متابولیزه شده، به کروستین تبدیل می‌شود . کروستین چندین ویژگی درمانی دارد از جمله این که یک آنتی‌اکسیدان قوی و عامل ضدالتهاب است. مطالعات بسیاری نشان داده است زعفران در ممانعت از رشد سلول‌های سرطانی مؤثر است[۱۸]. اما در خصوص مکانیسم ملکولی این تأثیر و اینکه کدام گروه از ژن‌ها تحت تأثیر زعفران قرار می گیرند اطلاع کمی در دست است. هدف از انجام این مطالعه تعیین تأثیر غلظت‌های مختلف عصاره زعفران بر الگوی بیانی ژن‌های کنترل‌کننده مسیر خود بازآفرینی در رده سلولی آدنوکارسینوم معده (AGS) به‌عنوان نماینده‌ای از رده‌های سلول سرطانی بود.

مواد و روش‌ها

تهیه رده‌های سلولی و کشت سلول: رده سلولی AGS از انستیتو پاستور ایران خریداری شد. سلول‌ها در محیط کشت RPMI1640 (Gibco)، حاوی ۱۰درصد سرم جنین گوساله (FBS)، آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین (۱۰۰u/ml) و استرپتومایسین (۱۰۰ mgr/ml) کشت شده و در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد با ۵ درصد CO2 و رطوبت ۹۰ درصد انکوبه شدند.

تهیه غلظت های عصاره زعفران: بر اساس مطالعات قبلی[۱۹]، ابتدا پنج گرم از کلاله زعفران را کوبیده و در آب مقطر توسط دستگاه شیکر در دمای ۳۰ درجه و در طی ۲۴ ساعت به صورت محلول درآمد. سپس محلول حاصل فیلتر و در آون ۴۰ درجه خشک شد. از عصاره خشک شده، غلظت‌های ۲۰،۴۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در آب مقطر تهیه گردید و پس از اتوکلاو در ۲۰- درجه نگهداری شد.

آماده سازی سلول‌ها برای انجام مطالعه: برای بررسی تأثیر زعفران بر رده سلولی مورد مطالعه، پس از کشت و چندین بار پاساژ (جهت اطمینان از صحت سلول‌ها و وضعیت تکثیر آن‌ها)، سلول‌ها در دو گروه تست و کنترل و با تکرارهای سه‌گانه برای هر غلظت کشت داده شدند. به هر چاهک پلیت ۶ خانه‌ای مخصوص کشت سلول ۲۰۰ میکرو لیتر محیط کشت کامل حاوی سلول (۴۰/۰۰۰ سلول)، افزوده شد. پلیت‌ها به انکوباتور منتقل و پس از ۲۴ ساعت غلظت‌های سه‌گانه مورد نظر به چاهک‌های حاوی سلول در پلیت های اختصاص داده شده به گروه‌های تست، اضافه گردید. به گروه کنترل آب مقطر استریل (به‌عنوان بافر)، افزوده شد.

برداشت سلول‌ها، تخلیص RNA و سنتز cDNA: پس از گذشت زمان‌های سه‌گانه ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، سلول‌های دو گروه تست و کنترل، با سانتریفیوژ کردن محیط کشت جدا شده و پس از شستشو با بافر فسفات (PBS)، Total RNA سلولی با استفاده از کیت تخلیص (IRAN RNX RNA) Plus, Sinagen استخراج گردید. پس از بررسی کیفی (الکتروفورز در ژل آگاروز یک درصد) و کمی (مقایسه میزان جذب نوری در ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر) RNA استخراج شده، با استفاده از کیت سنتز cDNA (Sinagene, iran) مولکول‌های mRNA به cDNA تبدیل و به فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد منتقل شدند.

طراحی پرایمر: توالی پرایمرهای پیشرو (Forward) و پسرو (Reverse) ژن‌های OCT4، KLF، SOX2، NANOG، NUCLEOSTEMIN و بتا اکتین با استفاده از نرم‌افزار Primer design version 3 طراحی و سپس با چک کردن (Blast نمودن) آن‌ها در بانک ژنومی (NBCI) از صحیح بودن آن‌ها اطمینان حاصل شد. (جدول ۱)

جدول ۱- مشخصات پرایمر ژن‌های مورد مطالعه

OCT4A	F	CGCAAGCCCTCATTTCAC	۱۱۱
	R	CATCACCTCCACCACCTG	
SOX2	F	AGCCTAGTTGCAATGCCATG	۱۴۲
	R	GAACTTGATTGCCATGACTT	
KLF4	F	GAATTCAGTAGGCATGACTTGA	۱۳۲
	R	ATTGCATGGACCAGTAGCAAG	
NANOG	F	CCTATGCCTGTGATTTGTGG	۱۶۵
	R	AGTGGGTTGTTTGCCTTTG	
Nucleostemin	F	CAGAGATCCTCTTGGTTGCAG	۱۷۴
	R	AATGAGGCACCTGTCCACTC	
ß-actin	F	CACACCTTCTACAATGAGC	۱۶۰
	R	ATAGCACAGCCTGGATAG	

تکثیر ژن‌های مورد نظر: بدین منظور ابتدا آماده‌سازی پرایمرها انجام شد و سپس به منظور تکثیرcDNA (mRNA) ژن‌های هدف از دستگاه Real-Time PCR استفاده گردید. ۴ میکرو لیتر پرایمرهای اختصاصی پیش رو و پس رو، ۳ میکرو لیتر cDNA، ۱۰ میکرو لیتر مسترمیکس سایبرگرین و ۳ میکرو لیتر آب DNase free (حجم نهایی ۲۰ میکرو لیتر) به هر چاهک پلیت مخصوص PCR اضافه گردید و روی پلیت با چسب مخصوص پوشانده شد تا از تبخیر جلوگیری شود.

سیکل با شرایط ۹۵°C به مدت ۱۰ ثانیه، ۶۲-۵۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه) و تکرارهای سه‌گانه تکثیر انجام شد. نمودارها و داده‌های دستگاه (اعداد ct) مورد ارزیابی و آنالیز قرا گرفت. از ژن بتا اکتین به عنوان کنترل داخلی استفاده شد و داده‌ها با استفاده از فرمول $2^{-\Delta\Delta ct}$ مورد آنالیز و تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

یافته‌ها

ژن OCT4 در غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر زعفران در بازه زمانی ۴۸ ساعته نسبت به دیگر غلظت‌ها و زمان‌های مورد مطالعه بیشترین کاهش بیان را نشان داد (نمودار ۱) ژن SOX2 در غلظت ۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره زعفران در بازه زمانی ۷۲ ساعته نسبت به دیگر غلظت‌های مورد مطالعه بیشترین کاهش بیان را نشان داد (نمودار ۲).

ژن NANOG در غلظت ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره زعفران در بازه زمانی ۴۸ ساعته نسبت به دیگر غلظت‌های مورد مطالعه بیشترین میزان کاهش بیان را نشان داد (نمودار ۳).

همان‌طور که نمودار ۴ نشان می‌دهد، بیشترین کاهش بیان ژن Nucleostemin در غلظت ۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره زعفران و در بازه زمانی ۷۲ ساعته نسبت به دیگر غلظت های مورد مطالعه اتفاق می‌افتد.

بیان ژن KLF4 در غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره زعفران و در بازه زمانی ۷۲ ساعته نسبت به دیگر غلظت‌های مورد مطالعه بیشترین کاهش را نشان داد (نمودار ۵).

پلیت را داخل دستگاه Real-Time PCR (Bio-RAD) گذاشته و با برنامه پیشنهادی شرکت سازنده پرایمرها (یک سیکل ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و ۴۵ سیکل با شرایط ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ ثانیه ، ۶۲-۵۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه) تکثیر انجام شد. نمودارها و داده های دستگاه (اعداد ct) مورد ارزیابی و آنالیز قرار گرفت و از ژن بتا اکتین به عنوان کنترل داخلی استفاده شد.

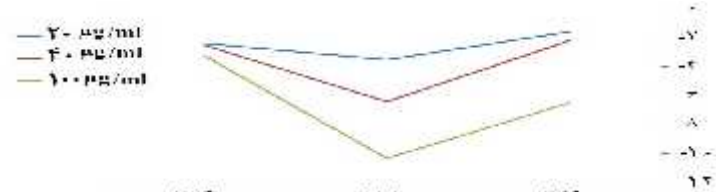
زمانی ۷۲ ساعته نسبت به دیگر غلظت‌های مورد مطالعه بیشترین میزان کاهش بیان را نشان داد (نمودار ۲).

ژن NANOG در غلظت ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره زعفران در بازه زمانی ۴۸ ساعته نسبت به دیگر غلظت‌های مورد مطالعه بیشترین میزان کاهش بیان را نشان داد (نمودار ۳).

همان‌طور که نمودار ۴ نشان می‌دهد، بیشترین کاهش بیان ژن Nucleostemin در غلظت ۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره زعفران و در بازه زمانی ۷۲ ساعته نسبت به دیگر غلظت های مورد مطالعه اتفاق می‌افتد.

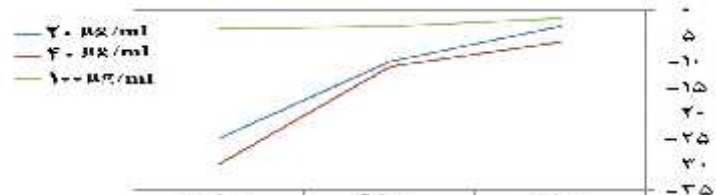
بیان ژن KLF4 در غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره زعفران و در بازه زمانی ۷۲ ساعته نسبت به دیگر غلظت‌های مورد مطالعه بیشترین کاهش را نشان داد (نمودار ۵).

نمودار ۱- الگوی بیانی ژن OCT4 پس از تأثیر غلظت‌های ۲۰، ۴۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر زعفران در بازه‌های زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در رده سلولی آدنوکارسینوما معده (AGS) نسبت به گروه کنترل



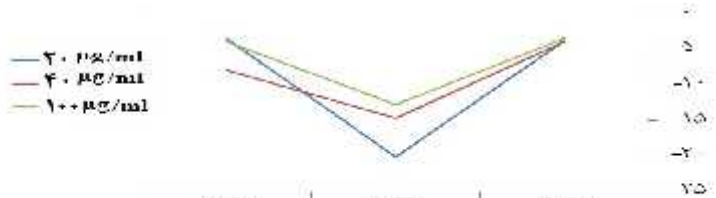
	۷۲ h	۴۸ h	۲۴ h
۲۰ µg/ml	۳/۴	۳/۵	-۱/۶
۴۰ µg/ml	-۳/۵	۶/۴	۳/۳
۱۰۰ µg/ml	-۳/۲۵	-۱۰/۳	-۶/۵

نمودار ۲- الگوی بیانی ژن SOX2 پس از تأثیر غلظت‌های ۲۰، ۴۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره زعفران در بازه‌های زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در رده سلولی آدنوکارسینوما معده (AGS) نسبت به گروه کنترل



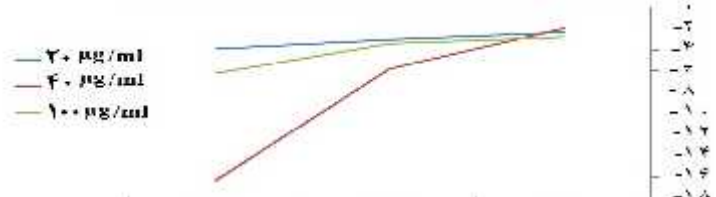
	۷۲ h	۴۸ h	۲۴ h
۲۰ µg/ml	۲۵	۱-	۳/۳
۴۰ µg/ml	۳-	۱۱	۶/۳
۱۰۰ µg/ml	-۳/۷	-۳/۲	-۱/۶

نمودار ۳- الگوی بیانی ژن NANOG پس از تأثیر غلظت‌های ۲۰، ۴۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره زعفران در بازه‌های زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در رده سلولی آدنوکارسینوما معده (AGS) نسبت به گروه کنترل



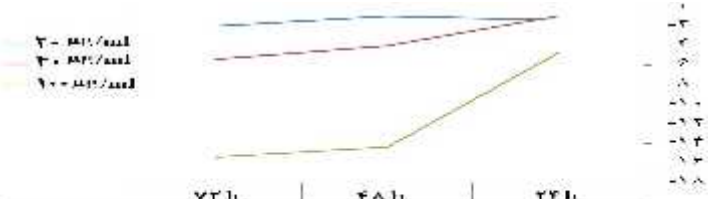
	۷۲ h	۴۸ h	۲۴ h
۲۰ µg/ml	-۳/۵	۳-/۲	-۳/۷
۴۰ µg/ml	-۷/۹	-۱۳/۷	-۲/۹
۱۰۰ µg/ml	-۳/۹	۱۳/۸	-۳/۴

نمودار ۴- الگوی بیانی ژن Nucleostemin پس از تأثیر غلظت‌های ۲۰، ۴۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره زعفران در بازه‌های زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در رده سلولی آدنوکارسینوما معده (AGS) نسبت به گروه کنترل



	۷۲ h	۴۸ h	۲۴ h
۲۰ µg/ml	۳/۹	-۳	-۲/۳
۴۰ µg/ml	-۱۶/۳	-۵/۸	-۱/۹۸
۱۰۰ µg/ml	-۶/۲	-۳/۴	۲/۸

نمودار ۵- الگوی بیانی ژن KLF4 پس از تأثیر غلظت‌های ۲۰، ۴۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره زعفران در بازه‌های زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در رده سلولی آدنوکارسینوما معده (AGS) نسبت به گروه کنترل



	۷۲ h	۴۸ h	۲۴ h
۲۰ µg/ml	۳	-۱	۱/۲
۴۰ µg/ml	-۵/۴	۳	-۱
۱۰۰ µg/ml	۱۵/۳	۱۲/۲	-۴/۸

بحث

نتایج این پژوهش به این دلیل که برای اولین بار بیان ژن‌های OTC4، SOX2، NANOG، KLF4 و Nucleostemin را در رده سلولی AGS نشان داد، حائز اهمیت است. امروزه ژن‌هایی که در کنترل خود بازآفرینی سلول‌های بنیادی نقش دارند به عنوان دسته جدیدی از مارکرهای مولکولی سرطان معرفی شده‌اند، که بیان کنترل نشده آن‌ها از اهمیت زیادی در فرایند سرطانی شدن برخوردار است[۲۱-۲۰].

مطالعات گوناگونی اثر سیتوتوکسی‌سیتی عصاره زعفران را بر روی سلول‌های سرطانی به صورت in vitro نشان داده است. قرار دادن سلول‌های سرطانی در معرض عصاره زعفران باعث مهار تقسیم سلولی می‌شود[۲۲]. بر طبق مطالعات، یکی از فعالیت‌های بیولوژیک زعفران که بزرگ‌ترین کاربرد پزشکی آن محسوب می‌شود، توانایی آن در مهار سرطان‌زایی است [۲۳] .

نتایج مطالعه Aung و همکاران نشان داد که عصاره زعفران به طور معنی‌داری رشد سلول‌های سرطان کولورکتال را مهار می‌کند بدون این که بر سلول‌های نرمال تأثیری داشته باشد[۲۴]. بر اساس مطالعه Abdullaev و همکاران در سال ۲۰۰۴، عصاره زعفران دارای خواص ضد سرطانی در برابر لوسمی، استئوسارکوما، فیبروسارکوما و سلول‌های سرطانی تخمدان می‌باشد[۲۲]. مطالعه Venook A بر روی سلول های سرطان کولورکتال نشان داد که عصاره زعفران تخریب DNA و وقوع آپوپتوز را القا می‌کند[۲۵]. بررسی اثر زعفران بر سرطان کبد نشان داد که اثر مهاری زعفران بر سرطان کبد از طریق مهار تکثیر سلول و القاء آپوپتوز می‌باشد[۲۶]. هم‌چنین نشان داده شده است که زعفران می‌تواند سبب آپوپتوز در رده سلولی A549 شده و در نتیجه به عنوان یک فاکتور شیمی‌درمانی در سرطان ریه به کار گرفته شود[۲۲].

یافته‌ها هم‌چنین نشان می‌دهند که Crocetin (از متابولیت-های زعفران) تهاجم سلول‌های MDA-MB-231 را از طریق کاهش بیان MMP (Matrix metaloproteunase) مهار می‌کند[۲۷]. در مطالعه Chiou و همکاران مشخص شد سلول‌های بنیادی سرطان، جدا شده از کارسینومای سنگفرشی دهانی، بیان بالایی از SOX2 را نشان می‌دهند. افزایش بیان این ژن در تومورهای مختلف سلول‌های جنسی و تومورهای استخوانی سارکوما نیز گزارش شده است[۲۸].

تصور بر این است که ژن‌های SOX2، NANOG و OTC4 به صورت یک شبکه مرکزی در تنظیم خود بازسازی سلول‌های بنیادی نقش دارند به طوری که هر کدام از این سه ژن در تنظیم دو ژن دیگر دخیل‌اند و مجموع این سه ژن نیز به طور هم زمان، هم به عنوان فعال کننده رونویسی سایر ژن‌های دخیل در خود بازسازی و هم به عنوان مهارکننده ژن‌های دخیل در تمایز عمل می‌کنند[۲۹]. KLF4 نقش مهمی در مسیرهای مختلف سیگنالینگ سلولی و تنظیم چرخه سلولی ایفا می‌کند. این پروتئین با واسطه P53 سیکل سلولی را مهار و باعث توقف سیکل سلولی در فاز G1 می‌شود[۳۰]. KLF4 در سرطان دارای نقشی دوگانه است، شواهد نشان می‌دهند این پروتئین هم به صورت انکوژن و هم به شکل پروتئین مهارکننده تومور ایفای نقش می‌کند. در سرطان‌های دستگاه گوارش به عنوان مهارکننده تومور و در سرطان پستان دارای نقش انکوژنی است. میزان بیان این ژن در سرطان‌هایی مثل سرطان پستان افزایش می‌یابد و این افزایش رابطه مستقیم با میزان پیشرفت سرطان دارد. با مشخص شدن نقش این ژن در تبدیل سلول‌های فیبروبلاست به سلول‌هایی شبیه سلول‌های بنیادی، این ژن را یکی از عوامل القاء قدرت تقسیم نامحدود (Self-Renewal) به سلول می‌دانند[۳۱].

Nucleostemin یکی از ژن‌های دخیل در مسیر خود بازآفرینی سلول است[۳۲]

مشخص شده است که بیشتر بیماری‌ها از جمله سرطان در نتیجه اختلال در عملکرد ژن‌های مختلف ایجاد می‌شوند[۱]. در خصوص ایجاد سرطان دو نظریه عمده مطرح است. نظریه اول، تمامی سلول‌های بافت را مستعد ایجاد سرطان می‌داند و نظریه دوم دلالت بر این دارد که در بافت‌ها، سلول‌هایی وجود دارند بنام سلول‌های بنیادی بالغین (Adult Stem Cells) و این سلول‌ها به علل ناشناخته‌ای (تغییر در بیان ژن‌های خاص) تبدیل به سلول‌های بنیادی سرطان (Stem Cell Cancer) شده و عامل شکل‌گیری سرطان خواهند بود[۳۳]. بر اساس نظریه جدید، (Stem Cell Origin of Cancer)، بسیاری از تومورها از سلول‌های بنیادی موجود در بافت‌ها منشأ می‌گیرند.

بر اساس این تئوری، عواملی که به مهار فرایند تمایز و یا به تکثیر کنترل نشده سلول‌های بنیادی بافتی منجر می‌شوند، از مهم‌ترین فاکتورهای دخیل در فرایند سرطان‌زایی به شمار می‌روند[۳]. از شواهد دیگر تأییدکننده این تئوری شباهت جمعیت اندکی از سلول‌های بافت‌های سرطانی به سلول‌های بنیادی می‌باشد، این جمعیت اندک سلولی دارای توانایی مقاومت در برابر عوامل القاکننده آپوپتوز و شیمی‌درمانی است که یکی از عوامل بازگشت سرطان پس از انهدام تومورهای اولیه است[۲].

ژن‌های OCT4، NANOG و Nucleostemin ژن‌های مهمی جهت ایجاد توانایی خود بازآفرینی می‌باشند به‌طوری‌که سلول‌های بنیادی را فعال و ژن‌های شروع‌کننده تمایز را مهار می‌کنند و بدین ترتیب قابلیت خود تجدیدی سلول‌های بنیادی را حفظ می‌کنند[۱۱]. OCT4 شامل سه واریانت (A،B و B1) می‌باشد، واریانت OCT4B1 که اخیراً شناسایی شده است در سلول‌های سرطانی بیان بالایی دارد. این افزایش با توجه به درجه بدخیمی تغییر می‌کند که می‌تواند در تشخیص سرطان و تعیین درجه بدخیمی آن مؤثر باشد[۱۴-۱۳].

در مطالعه حاضر تأثیر غلظت‌های مختلف عصاره زعفران بر بیان ژن‌های OTC4، SOX2، NANOG، KLF4 و Nucleostemin در رده سلولی آدنوکارسینومای معده برای اولین بار بررسی شد. در این تحقیق سلول‌ها تحت تأثیر غلظت های متفاوت زعفران (۲۰،۴۰ و ۱۰۰میکروگرم در میلی‌لیتر) به مدت ۲۴ ، ۴۸ و ۷۲ ساعت کشت داده شدند و مشخص شد زعفران بر بیان ژن‌های مورد اشاره تأثیر داشته و تقریباً در تمامی موارد باعث کاهش بیان می‌شود. این مطالعه نشان داد غلظت و زمان اثر زعفران، دو عامل تأثیرگذار بر بیان ژن‌های مورداشاره‌اند، به طوری که میزان بیان ژن OCT4 در غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر و زمان انکوباسیون ۴۸ ساعت، Nucleostemin و SOX2 در غلظت ۴۰ میکروگرم در میلی لیتر زعفران و زمان انکوباسیون ۷۲ ساعت، بیان ژن KLF4 و در غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر و زمان انکوباسیون۷۲ ساعت و ژن NANOG در غلظت ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و زمان انکوباسیون ۴۸ ساعت به‌طور چشمگیری بیشتر از بقیه غلظت‌ها در زمان‌های انکوباسیون، کاهش بیان را نشان می‌دهند.

اولین گزارشات مکتوب، مربوط به اثرات ضد سرطان زعفران، توسط دانشمند برجسته آذربایجان Abdullaev و همکارانش، گزارش شده است[۲۲]. از آن زمان تحقیقات بر روی زعفران نشان داد که این گیاه منبعی جهت ترکیبات فعال زیستی با اثر سمیت سلولی، ضد تومور، مهارکننده شیمیایی، ضد جهش‌زایی و دارای خواص محرک سیستم ایمنی می‌باشد. کروسین، جزء اصلی کاروتنوئید کلاله زعفران است که فعالیت ضد توموری، مهار تسهیل رشد تومور و افزایش بقا در حیوانات دارای تومور را دارا می‌باشد[۳۴].

نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد زعفران باعث کاهش بیان ژن‌های اصلی کنترل‌کننده مسیر خود بازآفرینی (OCT4، NANOG، NUCLEOSTEMIN KLF4 و SOX2) در رده سلول سرطانی آدنوکارسینوم معده شده و از این طریق به مهار تقسیمات سلول‌های سرطانی کمک می‌کند. نتایج این تحقیق می‌تواند به‌عنوان الگویی از کاربرد داروهای گیاهی در مطالعات مربوط به مکانیسم‌های ملکولی مسیرهای مختلف سرطان، کاربرد داشته باشد همچنین این مطالعه می‌تواند بستری باشد برای مطالعات آینده در خصوص چگونگی تأثیر ترکیبات گیاهی بر مسیرهای سلولی ملکولی کنترل‌کننده تقسیمات سلولی.

تعارض منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان بیان نشده است.

سهم نویسندگان

محمدرضا میرزایی طراحی تحقیق، نظارت بر انجام طرح و تألیف مقاله پایانی، وجیهه اکبرپور انجام تست‌های آزمایشگاهی و کمک در تألیف مقاله، فهمیده بگرضایی، کمک در انجام آزمایشات، محمود شیخ فتح الهی مشاور آماری و آنالیز نتایج و مهدی محمودی و محمدرضا حاجی‌زاده، مشاورین علمی و کمک در ویرایش نهایی مقاله

تشکر و قدردانی

این مقاله قسمتی از پایان‌نامه دانشجویی است و لازم می‌دانیم از همکاران حوزه پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی

رفسنجان و مخصوصاً کارشناسان محترم مراکز تحقیقاتی سلولی ملکولی و فیزیولوژی – فارماکولوژی این دانشگاه که ما را در انجام این تحقیق یاری دادند، تقدیر و تشکر نماییم.

References

1. Sonnenschein C, Soto AM. Theories of carcinogenesis: an emerging perspective. Seminars in cancer biology 2008;18(5): 372-7.
2. Gostjeva EV, Thilly WG. Stem cell stages and the origins of colon cancer. Stem Cell Reviews and Reports 2005;1(3):243-51.
3. Guo W, Lasky JL, Wu H. Cancer stem cells. Pediatric research 2006;59(4):59R-64R.
4. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. PNAS 2003;100(7):3983-8.
5. Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T, et al. Identification of human brain tumour initiating cells. nature 2004;432(7015):396-401.
6. Fang D, Nguyen TK, Leishear K, Finko R, Kulp AN, Hotz S, et al. A tumorigenic subpopulation with stem cell properties in melanomas. Cancer research 2005;65(20):9328-37.
7. Collins AT, Berry PA, Hyde C, Stower MJ, Maitland NJ. Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. Cancer research 2005;65(23):10946-51.
8. Gibbs CP, Kukekov VG, Reith JD, Tchigrinova O, Suslov ON, Scott EW, et al. Stem-like cells in bone sarcomas: implications for tumorigenesis. Neoplasia 2005;7:967-76.
9. Jordan CT, Guzman ML, Noble M. Cancer stem cells. NEJM 2006;355(12):1253-61.
10. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. nature 2001;414(6859):105-11.
11. Avery S, Inniss K, Moore H. The regulation of self-renewal in human embryonic stem cells. Stem cells and development 2006;15(5):729-40.
12. Atlasi Y, Mowla SJ, Ziaee SA, Bahrami AR. OCT-4, an embryonic stem cell marker, is highly expressed in bladder cancer. IJC 2007;120(7):1598-602.
13. Niwa H, Miyazaki J-i, Smith AG. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. Nature genetics 2000;24(4):372-6.
14. Yazd EF, Rafiee MR, Soleimani M, Tavallaei M, Salmani MK, Mowla SJ. OCT4B1, a novel spliced variant of OCT4, generates a stable truncated protein with a potential role in stress response. Cancer letters 2011;309(2):170-5.
15. Kern MJ, Argao EA, Potter SS. Homeobox genes and heart development. Trends in cardiovascular medicine 1995;5(2):47-54.
16. Masui S, Nakatake Y, Toyooka Y, Shimosato D, Yagi R, Takahashi K, et al. Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells. Nature cell biology 2007;9(6):625-35.
17. Mak V, Siu M, Wong O, Chan K, Ngan H, Cheung A. Dysregulated stemness-related genes in gynecological malignancies. Histology and histopathology 2012;27(9):1121-30.
18. Winterhalter P, Straubinger M. Saffron—renewed interest in an ancient spice. FRI 2000;16(1):39-59.
19. Abdullaev FI. Biological effects of saffron. BioFactors (Oxford, England) 1993;4(2):83-6.
20. Zhang M, Rosen JM. Stem cells in the etiology and treatment of cancer. COGD 2006;16(1):60-4.
21. Thomas RK, Baker AC, DeBiasi RM, Winckler W, LaFramboise T, Lin WM, et al. High-throughput oncogene mutation profiling in human cancer. Nature genetics 2007;39(3):347-51.
22. Abdullaev F, Espinosa-Aguirre J. Biomedical properties of saffron and its potential use in cancer therapy and chemoprevention trials. CDP 2004;28(6):426-32.
23. El Daly ES. Protective effect of cysteine and vitamin E, Crocus sativus and Nigella sativa extracts on cisplatin-induced toxicity in rats. JDPDB 1998;53(2):87-93.
24. Aung H, Wang C, Ni M, Fishbein A, Mehendale S, Xie J, et al. Crocin from Crocus sativus possesses significant anti-proliferation effects on human colorectal cancer cells. Experimental oncology 2007;29(3):175-80.
25. Venook A. Critical evaluation of current treatments in metastatic colorectal cancer. The Oncologist 2005;10(4):250-61.
26. Garodia P, Ichikawa H, Malani N, Sethi G, Aggarwal BB. From ancient medicine to modern medicine: ayurvedic concepts of health and their role in inflammation and cancer. J Soc Integr Oncol 2007;5(1):25-37.
27. Chryssanthi DG, Dedes PG, Karamanos NK, Cordopatis P, Lamari FN. Crocetin Inhibits Invasiveness of MDA-MB-231 Breast Cancer Cells via Downregulation of Matrix Metalloproteinases. Planta medica 2011;77(02):146-51.
28. Chiou S-H, Wang M-L, Chou Y-T, Chen C-J, Hong C-F, Hsieh W-J, et al. Coexpression of Oct4 and Nanog enhances malignancy in lung adenocarcinoma by inducing cancer stem cell–like properties and epithelial–mesenchymal transdifferentiation. Cancer research 2010;70(24):10433-44.
29. Gharibi B, Ghuman MS, Hughes FJ. Akt-and Erk-mediated regulation of proliferation and differentiation during PDGFRβ-induced MSC self-renewal. JCMM 2012;16(11):2789-801.

30. Yamamoto K, Ishii H, Moon J-H, Haraguchi N, Doki Y, Mori M. Genetic alteration of stemness factors and p53 in mouse forestomach by chemical carcinogen-induced carcinogenesis. Oncology letters 2012;3(6):1216-20.
31. Li Q, Ramírez-Bergeron DL, Dunwoodie SL, Yang Y-C. Cited2 gene controls pluripotency and cardiomyocyte differentiation of murine embryonic stem cells through Oct4 gene. JBC 2012;287(34):29088-100.
32. Shugo H, Ooshio T, Naito M, Naka K, Hoshii T, Tadokoro Y, et al. Nucleostemin in injury-induced liver regeneration. Stem cells and development 2012;21(16):3044-54.
33. Sell S. Stem cell origin of cancer and differentiation therapy. Critical reviews in oncology/hematology 2004;51(1):1-28.
34. Schmidt M, Betti G, Hensel A. Saffron in phytotherapy: pharmacology and clinical uses. WMW Wiener Medizinische Wochenschrift 2007;157(13):315-9.

The Survey of Saffron Extract Effects on Expressional Pattern of Some Self-renewal genes in AGS (gastric adenocarcinoma) Tumor Cell Line

Akbarpoor V[1], Bagrezaei F[2], Mahmoodi M[3], Hajizadeh MR[4], Sheikh Fathollahi M[5], Mirzaei MR[6]

1- MSc, Faculty of Medicine, Rafsanjan University of Medical Sciences, Rafsanjan, Iran.
2-MSc. Dept. of Clinical Biochemistry, Faculty of Medicine, Rafsanjan University of Medical Sciences, Rafsanjan, Iran.
3-Professor, Dept. of Clinical Biochemistry and Molecular Medicine Research Center, Faculty of Medicine, Rafsanjan University of Medical Sciences, Rafsanjan, Iran.
4-Assistant Professor, Dept. of Clinical Biochemistry and Molecular Medicine Research Center, Faculty of Medicine, Rafsanjan University of Medical Sciences, Rafsanjan, Iran.
5-Assistant Professor, Dept. of Social Medicine and Occupational Environment Research Center, Faculty of Medicine, Rafsanjan University of Medical Sciences, Rafsanjan, Iran.
6- Assistant Professor, Dept of clinical Biochemistry and Molecular Medicine Research Center, Faculty of Medicine, Rafsanjan University of Medical Sciences, Rafsanjan, Iran. (Corresponding Author)
Email :mirzaeemr@gmail.com, Tel: 03434280086

Received: 28 June 2016 Accepted:12 October 2017

Introduction: The aim of the present study was to investigate the effect of different concentrations of saffron (Crocus sativus) on the expression of OCT4, KLF, SOX2, NANOG and Nucleostemin genes in AGS (gastric cancer) cell line.

Materials and Methods: Gastric adenocarcinoma cell line (AGS) was prepared from the cell bank of Iran Pasteur Institute and were cultured in RPMI 1640 medium. The cells were then cultured in both test and control groups under similar conditions. At confluency of 60-70%, the test group was treated with saffron essence at concentrations of 20, 40 and 100 µg/ml for 24, 48 and 72 hours. Total RNA was extracted prior to cDNA preparation. The expression of target genes in both test and control groups were determined.

Results: The results showed that the saffron extract decreased expression of OCT4, KLF, SOX2, NANOG and Nucleostemin genes.

Conclusion: The results suggested that saffron can be considered as an anti-cancer agent due to its role in inhibition of cell division. This study could be the basis for further studies on the anti-cancer property of herbal products.

Key Words: Saffron, Adenocarcinoma cancer cell line (AGS), Gene expression

Please cite this article as follows:

Akbarpoor V, Bagrezaei F, Mahmoodi M, Hajizadeh MR, Sheikh Fathollahi M, Mirzaei MR. The Survey of Saffron Extract Effects on Expressional Pattern of Some Self-renewal genes in AGS (gastric adenocarcinoma) Tumor Cell Line. Community Health journal 2017;10 (4): 66-75.

Funding: This research was supported by Rafsanjan University of Medical Sciences.
Conflict of interest: None declared.
Ethical approval: Code of Ethics Committee: IR.RUMS.REC.1394.75.