

Original Article

Evaluating the cytotoxic effect of crocin on MDA-MB-468 cell line based on apoptosis induction, ER stress, and autophagy markers

**Hamid Heidarzadeh¹, S. Zahra Bathaie^{2*}, Saeid Abroun³,
Mohammad Ali Mohagheghi^{4**}**

- 1- Ph.D. Candidate, Department of Clinical Biochemistry, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
- 2- Professor, Department of Clinical Biochemistry, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
- 3- Associate Professor, Department of Hematology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
- 4- Professor, Cancer Institute, Imam Khomeini Hospital, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

*Corresponding Address: Postal Code: 1411713116, Department of Clinical Biochemistry, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
Email: bathai_z@modares.ac.ir

**Corresponding Address: Postal Code: 1419733141, Cancer Institute, Imam Khomeini Hospital, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
Email: mamohagheghi@yahoo.com

Received: 22/Aug/2017, Accepted: 16/Sep/2017

Abstract

Objective: Crocin, an important saffron ingredient, showed anticancer activity in a variety of cancer types, particularly breast cancer. However, little information is available on the mechanism of its action. Previous studies indicate apoptosis induction by crocin in some cancer cells. This study aims to investigate the effect of crocin on the MDA-MB-468 breast cancer cell line in order to investigate its effect on caspase 9 (Cas9) and cleaved-Cas9, expression and splicing of XBP1, and accumulation of LC3-II.

Methods: We used the MTT assay to investigate the cytotoxic effect of crocin on MDA-MB-468 breast cancer cells. Next, Cas9 and cleaved-Cas9 levels were evaluated by Western blot analysis. Splicing of XBP1 mRNA and expression of the spliced protein (XBP1s) was investigated by RT-PCR and Western blot, respectively. The accumulation of LC3-II was also evaluated by Western blot. The obtained results were analyzed and reported by Image J software.

Results: The results showed a time and dose-dependent cytotoxic effect of crocin in MDA-MB-468 cells. The expression of Cas9 and its cleavage, therefore, the ratio of cleaved-Cas9/Cas9 significantly increased. Crocin treatment led to a noticeable increase in splicing of XBP1 mRNA, expression of XBP1s, accumulation of LC3-II, and increased the LC3-II/LC3-I ratio in these cells.

Conclusion: The data have shown induction of apoptosis in these breast cancer cell lines after crocin treatment. Because of the observed changes in UPR markers and autophagy, it seems that these pathways are possibly involved in this process and in intracellular regulations.

Keywords: Breast cancer, Cleaved-Cas9, UPR, XBP1 splicing, LC3-II accumulation

Pathobiology Research, Vol. 20 (2017-2018), No.4, Pages: 37-51

بررسی اثر سمی کروسین بر رده سلولی MDA-MB-468 بر اساس القای آپوپتوز، و تغییرات نشانگرهای تنفس شبکه اندوپلاسمی و اتوفازی

حمید حیدرزاده^۱، سیده زهرا بطحایی^{۲*}، سعید آبرون^۳، محمد علی محققی^۴

۱- دانشجوی دکتری تخصصی، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۲- استاد، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۳- دانشیار، گروه هماتولوژی، دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۴- استاد، مرکز تحقیقات سرطان بیمارستان امام خمینی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

*آدرس نویسنده مسئول: ایران، تهران، کدپستی: ۱۴۱۱۷۱۳۱۶، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه بیوشیمی بالینی

Email: bathai_z@modares.ac.ir

**آدرس نویسنده مسئول: ایران، تهران، کدپستی: ۱۴۱۹۷۳۳۱۴۱، دانشگاه علوم پزشکی تهران، مرکز تحقیقات سرطان بیمارستان امام خمینی،

Email: mamohagheghi@yahoo.com

پذیرش مقاله: ۹۶/۰۶/۲۵

دریافت مقاله: ۹۶/۰۵/۳۱

چکیده

هدف: کروسین از ترکیبات عصاره زعفران است که خواص ضد سرطانی آن روی انواعی از سرطان‌ها به‌ویژه سرطان پستان در مطالعات اخیر نشان داده شده است. با این حال، اطلاعات بسیار کمی از مکانیسم اثر این ترکیب موجود است. مطالعات قبلی، القای آپوپتوز در سایر سلول‌های سرطانی تحت درمان با زعفران یا کروسین را نشان داده است. در این پژوهش با هدف بررسی اثر کروسین بر رده سلولی MDA-MB-468 سرطان پستان، در نظر است تا بیان و شکستن کاسپاز^۹، پیرایش و بیان پروتئین XBP1 و تجمع پروتئین LC3-II در تیمار شده با این ترکیب، بررسی شود.

مواد و روش‌ها: سنجش MTT برای اثر سمی کروسین بر رده سلولی نامبرده استفاده شد. سپس پیرایش ژن XBP1 در سطح mRNA و بیان پروتئین پیرایش شده (XBP1s) به ترتیب با RT-PCR و وسترن بلات بررسی شد. بیان کاسپاز^۹، کاسپاز شکسته شده و تجمع LC3-II نیز با روش وسترن بلات بررسی شدند. میزان بیان این پارامترها با استفاده از نرم‌افزار Image J به صورت کمی گزارش شد.

نتایج: کروسین به صورت وابسته به دوز و زمان، موجب مرگ رده سلولی MDA-MB-468 شد. تیمار با کروسین، تغییر قابل توجهی در فعال شدن کاسپاز^۹ و شکستن آن، در نتیجه افزایش نسبت Cleaved-Cas9/Cas9 داشت. پیرایش ژن XBP1 نیز پس از تیمار افزایش یافت. همچنین افزایش معنی‌دار بیان پروتئین پیرایش شده XBP1s (XBP1) و تجمع پروتئین LC3-II و افزایش نسبت LC3-II/LC3-I در این سلول‌ها مشاهده شد.

نتیجه گیری: نتایج نشان داد که این رده از سلول‌های سرطان پستان پس از تیمار با کروسین دچار آپوپتوز شد. با توجه به تغییرات نشانگرهای مسیرهای UPR و اتوفازی، احتمالاً این دو مسیر نیز در پیشبرد سلول به سمت مرگ سلولی و تنظیمات درون سلولی، نقش دارند.

کلیدواژگان: سرطان پستان، کاسپاز^۹ شکسته شده، تنفس شبکه اندوپلاسمی، پیرایش XBP1، تجمع LC3-II

پژوهش‌های آسیب شناسی زیستی، دوره ۲۰، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۶، صفحات: ۵۱-۷۷

مقدمه

خاصیت مهم ضد افسردگی و ضد سرطانی عصاره زعفران در متون علمی از فرهنگ‌ها و کشورهای مختلف و همچنین در پژوهش‌های علمی چند دهه اخیر شناخته شده است [۵]. یکی از شایع‌ترین سرطان‌ها در میان زنان، سرطان پستان است که یک بیماری ناهمگون است و شناخت زیر گروه‌های آن روز به روز در حال بیشتر شدن است و پیش‌آگاهی و سبب شناسی این بیماری به‌دلیل تأثیرپذیری آن از عوامل بسیار زیادی مانند سن و نژاد موجب پیچیدگی بیشتر این بیماری می‌شود. بهمین دلیل تلاش‌های فراوانی در راستای مهار رشد و شناخت نشانگرهای عمدۀ بالینی، یافتن رابطه بین آن‌ها و کشف اطلاعات جدید در مورد آن‌ها در حال انجام است. هدف همه این تحقیقات استفاده بهتر از داروهای در دسترس برای درمان و ایجاد یا تولید داروها یا روش‌های درمانی جدید بر اساس مدل‌های جدید ارایه شده برای سرطان و مکانیسم‌های دخیل در آن است [۶]. سرطان پستان شایع‌ترین بدخیمی در بین زنان ایرانی است و پس از سرطان ریه، دومین عامل مرگ و میر ناشی از بدخیمی در بین زنان ایرانی است. سن شیوع این سرطان در ایران، بعد از چهل سال و ۱۰ سال پایین‌تر از آن چه است که در جهان گزارش شده است [۷، ۸].

شبکه اندوپلاسمی جایگاه ساخت، ذخیره و بلوغ پروتئین‌های ترشحی است. شرایط فیزیولوژیک و پاتولوژیکی که تا خودگی صحیح پروتئین‌ها را مختلط می‌کند، منجر به فعال شدن مسیرهای سلولی به نام پاسخ پروتئین‌های باز شده (Unfolded Protein Response: UPR) می‌شود. این پاسخ هم در بقا و هم در مرگ سلولی تأثیر دارد و این دو گانگی در مکانیسم اثر به خوبی شناخته شده نیست. این پاسخ هماهنگ و پیچیده سلولی به‌وسیله پروتئین‌های درون غشایی در شبکه اندوپلاسمی شروع می‌شود که با انتقال پیام‌های درون سلولی به هسته و ایجاد عوامل رونویسی و اتصال به عناصر موجود در DNA منجر به بیان پروتئین‌هایی می‌شود که به دو صورت در شرایط مختلف، سلول را به سمت بقا یا مرگ هدایت می‌کند.

رشد سلول، تکثیر، بقا، مهاجرت و حفظ سطح مناسب انرژی درون سلول فرآیندهای با ارتباط بسیار نزدیک به هم هستند. بسیاری از پیام‌های خارجی مانند دسترسی سلول به مواد غذایی، عوامل رشد یا میانجی‌های التهابی به‌وسیله دیدهبان‌های درون سلولی رمزگشایی شده و از طریق مسیرهای درخور سلولی، فیزیولوژی سلول را تغییر می‌دهند. همچنین سلول‌ها در پاسخ به محرك‌های رشدی؛ مسیرهای آنابولیسمی - ساخت ماکرومولکول‌ها و مهار واکنش‌های تجزیه‌ای خود را فعال می‌کنند. بسیاری از فرآیندهای سلولی از قبیل آپوپتوز، اتوفازی، ترجمه، سوخت و ساز انرژی و التهاب به‌وسیله مسیر (Endoplasmic reticulum stress) تنش شبکه اندوپلاسمی کنترل می‌شود [۱]. در سرطان این فرآیندهای سلولی به نفع تکثیر بی‌رویه سلول‌های سرطانی پیش می‌رود به‌همین منظور اهداف درمانی در درمان سرطان استفاده از راهکارهایی است که این رشد بی‌رویه را متوقف می‌سازد.

زعفران کلاله‌های خشک شده گیاه زعفران (Crocus sativus L.) و ترکیبات موجود در آن به‌دلیل دارا بودن خواص زیستی فراوان مورد توجه بسیاری از پژوهشگران در دهه‌های اخیر بوده است [۲]. یکی از خواص بسیار مهم ترکیبات زعفران که مورد مطالعه قرار گرفته است آثار درمانی و پیشگیری کننده روی سرطان است [۳]. از لحاظ تاریخی سابقه استفاده از زعفران به صورت ترکیب برای درمان بدخیمی به قرن دوم بعد از میلاد بر می‌گردد [۴]. خواص زیستی زعفران به متابولیت‌های ثانویه مهم آن به‌ویژه کاروتونویدهای آن شامل کروسین (Crocin)، کروستین (Crocetin) و پیکرکروسین (Picrocrocin) ارتباط دارد و امروزه مطالعه روی این ترکیبات مورد توجه بسیاری از پژوهشگران قرار گرفته است [۲]. از نقطه نظر فیتوشیمیابی عصاره زعفران محلول‌تر از مجموعه ترکیبات ثانویه طبیعی است. رنگ زعفران که در محلول‌های بسیار رقیق هم قابل مشاهده است، ناشی از ترکیب کروسین است که یکی از کاروتونویدهای نادر محلول در آب است. دو

در مسیرهای UPR و اتوفازی در رده سلولی-MDA-MB-468 که به دلیل متاستازی بودن اهمیت دارد، بررسی شد. بنابراین، فعال شدن کاسپاز ۹ و نسبت کاسپاز ۹ شکسته شده به کاسپاز ۹ (Cleaved-Cas9/Cas9) به عنوان نشانگرهای آپوپتوز، بیان ژن XBP1 در دو سطح رونویسی (تولید mRNA) و بیان ژن (تولید پروتئین XBP1s) به عنوان نشانگرهای UPR، تجمع LC3-II و افزایش نسبت LC3-II/LC3-I به عنوان نشانگر مسیر اتوفازی در سلول‌های تیمار شده با کروسین بررسی شد.

مواد و روش‌ها

استخراج ترکیبات مهم زعفران و تخلیص کروسین

جدا و خالص‌سازی کروسین از سایر اجزای زعفران به روشنی که قبلاً راه‌اندازی و شرح داده شده بود انجام شد [۱۹]. به طور مختصر عصاره آبی زعفران پس از شستشو روی ستون کروماتوگرافی آلومینیوم ۹-۶ فعال برده شد و جذب نوری محصولات خارج شده از ستون، با استفاده از طیف‌سنج نوری در طول موج ۴۴۰ نانومتر خوانده شد. بخش دارای جذب در طول موج ۴۴۰ نانومتر (کروسین‌ها) بعد از تبیخ تحت خانه توسط دستگاه لیوفیلیزکننده به پودر تبدیل شد. کروسین استخراج شده با روش‌های طیف‌سنجی IR (Infrared Spectroscopy) و تجزیه و تحلیل عنصری بررسی و تأیید شد. در نهایت پودر حاصل در محیط کشت فاقد سرم حل شد و طی تحقیق، استفاده شد.

کشت سلول MDA-MB-468

رده سلولی MDA-MB-468 از بانک سلولی مرکز ذخایر زیستی و زنتیکی ایران خریداری شد و در محیط کشت Dulbecco's Modified Eagle Medium: (DEMEM-F12

[۹]. یکی از این پروتئین‌ها (IRE1 enzyme ۱) است که با فعالیت ریبونوکلئازی mRNA ویرایش نشده *XBP1u* را به نوع ویرایش شده *XBP1s* (X-box binding protein 1) تبدیل می‌کند. پروتئین XBP1s به عنوان یک عامل رونویسی بیان ژن‌هایی را فعال می‌کند که در تاخوردگی، فرآیند حذف پروتئین‌های معیوب و مسیر اتوفازی سلول نقش دارد [۱۰].

یکی از مکانیسم‌های سلولی که در هنگام تنش شبکه اندوپلاسمی تنظیم می‌شود اتوفازی (Autophagy) است که به طور جالب توجه این فرآیند نیز می‌تواند یک مکانیسم برای بقا یا مرگ سلول شود. اتوفازی یک فرآیند نوسازی پایدار بدون توقف در شرایط طبیعی است که در شرایط آسیب سلولی تشدید می‌شود، در این فرآیند بخش‌هایی از سیتوپلاسم یا اندامک‌ها را دو غشا در برگرفته و واکوئلی به نام اتوفاگوزوم (Autophagosome) تشکیل می‌شود و در نهایت با ممزوج شدن اتوفاگوزوم با لیزوژوم ترکیبات درون آن هضم می‌شود [۱۱، ۱۲]. نقش اصلی در آغاز فرآیند اتوفازی برای ایجاد غشای جداکننده به وسیله دو پروتئین ULK1 و Beclin1 انجام می‌شود و در مرحله طویل‌سازی به وسیله یک فرآیند شبه بویکوئیتینه شدن پروتئین LC3-I با اتصال به فسفاتیدیل اتانول آمن و تبدیل شدن به LC3-II به عنوان یک پروتئین ساختاری و انتقالی فسفولیپیدها برای امتداد پیدا کردن غشا در قسمت درونی و بیرونی اتوفاگوزوم قرار می‌گیرد، تجمع این پروتئین در سلول به عنوان نشانگری برای جریان اتوفازی است [۱۳].

مطالعات نشان داده‌است که بسیاری از داروها و ترکیبات ضد سرطان از طریق تغییر در بیان ژن‌ها و فعال کردن مسیرهای مرگ سلولی از طریق آپوپتوز (Apoptosis) و اتوفازی آثار ضد توموری دارند. زعفران و مواد مؤثره آن نیز از جمله ترکیباتی هستند که با داشتن خواص ضدسرطانی، بر بیان ژن‌های مختلف اثر می‌گذارند [۱۴-۱۸].

در این مطالعه، احتمال دخیل بودن کروسین به عنوان یکی از متابولیت‌های ضد سرطان زعفران در القای آپوپتوز، همچنین

محاسبه شد.

تیمار رده سلولی MDA-MB-468 با ترکیب

کروسین به منظور بررسی‌های مولکولی

به منظور بررسی اثر کروسین بر بیان پروتئین‌های XBPIs در سطح RNA و پروتئینی، کاسپاز ۹ و تجمع پروتئین-*LC3*-II، سلول‌های MDA-MB-468 در پلیت‌های ۶ سانتی‌متری حاوی محیط کشت کامل DMEM-F12 کشت داده شدند. با مشاهده تراکم ۷۰ درصدی، سلول‌ها با حل نمودن کروسین در محیط کشت با غلظت ۳ میلی گرم در میلی‌لیتر (IC50) تیمار شد. در زمان‌های ۶، ۱۲ و ۲۴ ساعت پس از تیمار، سلول‌ها با شد و بعد از سانتریفیوژ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه، محلول رویی به عنوان عصاره سلولی برای انجام تحلیل وسترن بلات استفاده شد.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز - نسخه‌برداری معکوس (RT-PCR)

برای ایجاد cDNA از RNA، بعد از جمع آوری سلول‌های تیمار شده توسط تریپسین - Trypsin- EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid)، شستشوی سلول‌ها با PBS و تهیه رسوب سلول، استخراج RNA به ترتیب مراحل یاد شده در کیت GeneAll Biotechonolgy Co. Ltd. با ۱ میلی لیتر ترازیول (Trizol) لیز و با استفاده از محلول‌ها و ستون موجود در کیت، RNA‌ها در ۵۰ میکرولیتر آب حاوی DEPC (Diethyl pyrocarbonate) بررسی کیفیت RNA و آزمایش‌های بعدی به سرعت به فریزر -۸۰ درجه سانتی‌گراد منتقل شد. همچنین کیفیت RNA استخراج شده با استفاده از ژل آگارز ۸٪ درصد برای

درصد سرمه در فلاسک کشت سلول T25 کشت و به انکوباتور با هوای مرطوب و غلظت ۵ درصد CO_2 منتقل شد.

سنجهش MTT؛ بررسی سمیت و تعیین IC50 کروسین

به منظور بررسی میزان سمیت کروسین و تعیین IC50 از آزمون MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-] diphenyltetrazolium bromide شد. ابتدا سلول‌های MDA-MB-468 در پلیت ۹۶ خانه به صورتی که در هر چاهک ۱۵۰۰۰-۱۲۰۰۰ سلول قرار گیرد، در محیط کامل کشت داده شدند. بعد از چسبیدن و رشد سلول‌ها و تراکم سلولی حدود ۷۵-۷۰ درصد (۴۸ تا ۴۸ ساعت)، سلول‌ها به مدت ۱۲، ۲۴ و ۷۲ ساعت، در معرض ترکیب کروسین با غلظت‌های بین ۵-۱ میلی گرم در میلی‌لیتر تیمار شدند. در این آزمایش سلول‌های تیمار نشده به عنوان کنترل استفاده شدند. پس از گذشت زمان تیمار حدود ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت حاوی MTT (۵ میلی گرم/میلی‌لیتر) به هر چاهک اضافه شد و مجدداً به مدت ۴ ساعت به انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد انتقال داده شدند. پس از گذشت ۴ ساعت، محیط کشت روی سلول‌ها تخلیه و ۱۰۰ میکرولیتر Dimethyl sulfoxide (DMSO) به هر چاهک اضافه شد. پلیت به مدت ۱۰ دقیقه در لرزانده (Shaker) قرار داده شد تا فورمازان (Formazan) ایجاد شده به طور کامل حل شود. سپس به کمک دستگاه خوانش الیزا جذب محلول‌های هر چاهک در ۵۷۰ نانومتر ثبت شد. در این آزمایش میزان بقای سلول‌های کنترل تیمار نشده ۱۰۰ درصد در نظر گرفته شد. در ادامه میزان بقای سلول‌ها در هر حالت تیمار، به صورت درصد سلول‌های زنده در آن حالت تیمار به سلول‌های تیمار نشده (با بقای ۱۰۰ درصد) محاسبه شد. دوز IC50 برای تعیین میزان سمیت کروسین بر اساس نمودار وابسته به زمان و وابسته به دوز در این آزمایش

شد و با استفاده از کیت HyperscriptTM RT Mastermix شرکت GeneAll کره جنوبی واکنش RT-PCR انجام و cDNA مورد نظر ساخته شد.

واکنش PCR

آغازگرهای (Primers) استفاده شده واکنش PCR برای بررسی بیان ژن‌های *XBPI* با استفاده از cDNA به عنوان الگو و آغازگرهای زیر انجام گرفت (جدول ۱).

آشکارسازی 18sRNA و 28sRNA بررسی شد. در ادامه به وسیله دستگاه نانودرایپ، نسبت جذب نوری RNA در طول موج‌های ۲۶۰ نانومتر به ۲۸۰ نانومتر و ۲۶۰ نانومتر سنجش شد. از نمونه‌هایی که نسبت جذب نوری ۲۶۰/۲۸۰ میان ۱/۷ تا ۱/۹ داشتند برای ساخته سدن cDNA استفاده شد. برای انجام واکنش RT-PCR، نمونه RNA به دست آمده در مرحله قبل به عنوان الگو در نظر گرفته

جدول ۱ لیست آغازگرهای مورد استفاده و مشخصات آن‌ها

نام	توالی آغازگر	اندازه محصول (جفت باز)	دما (درجه سانتی‌گراد)	درصد گوانین-سیتوزین
۴۵/۴۵	جلویی: TTACGAGAGAAA برگشتی: XBP1	۲۸۳:UXBP1	۵۸/۴	
۵۴/۵۵		۲۵۷:sXBP1	۶۱/۷۲	

رادیوگرافی ظاهر شد. در این آزمایش از بیان بتا اکتین (β-actin) (ab189073-1:4000) به عنوان کنترل داخلی و سترن بلاط استفاده شد.

تحلیل آماری

آزمون‌های مربوط به هر نمونه به صورت دوتایی انجام شد. داده‌ها به صورت mean±SD نمایش داده شده است و تحلیل One Way ANOVA با استفاده از نرم‌افزار SPSS 19.0 و آزمون HSD (Post Hoc-Tukey HSD) انجام شد. سطح معنی دار داده‌ها، کمتر از ۰/۰۵ ($P < 0/05$) در نظر گرفته شد. داده‌هایی که اختلاف آن‌ها از نظر آماری معنی دار بوده با علامت ستاره (*، ** و ***) مشخص شده است.

نتایج تخلیص کروسین

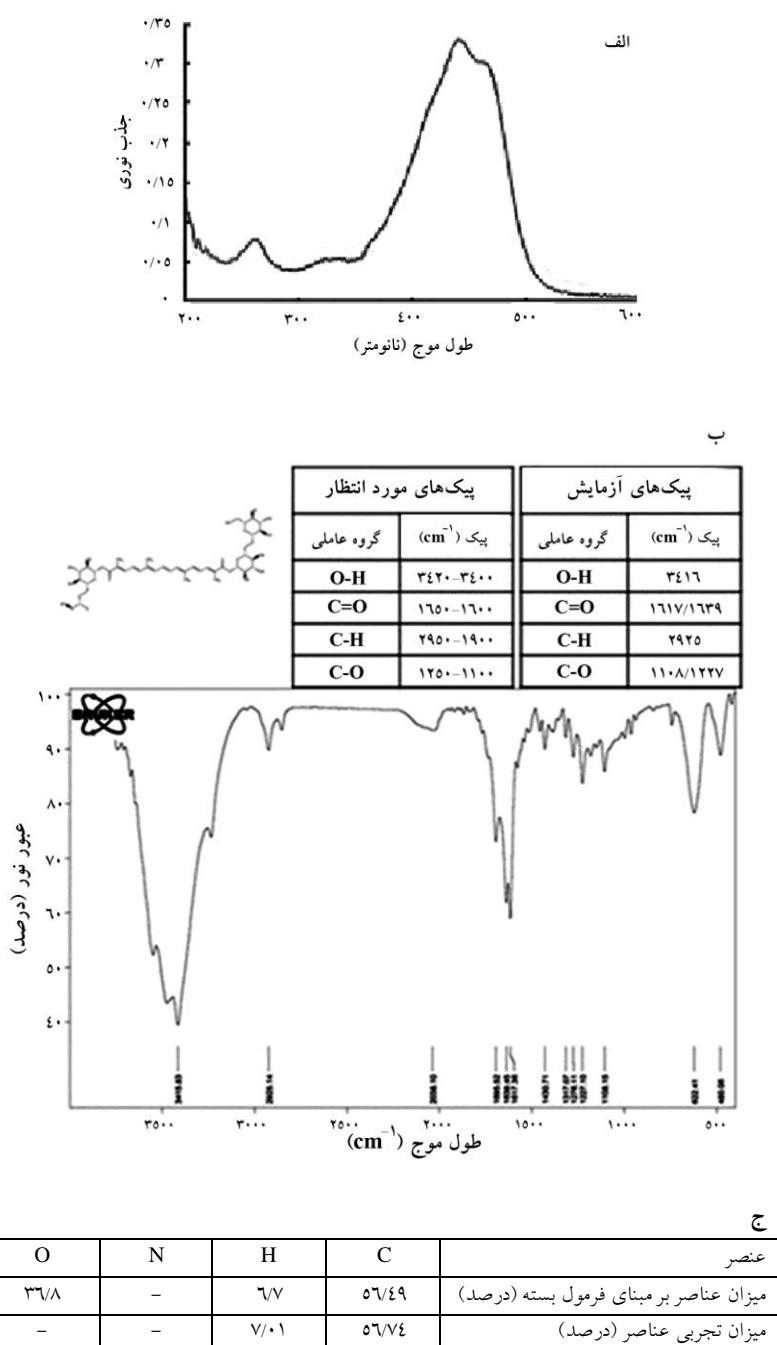
برای جداسازی کروسین از سایر اجزای زعفران از روش‌هایی که قبلاً راه اندازی شده بود استفاده شد [۱۹].

و سترن بلاط در این بخش از مطالعه، در هر چاهک از ژل-SDS Sodium dodecyl sulfate- Polyacrylamide (PAGE) ۲۰ درصد (gel electrophoresis) عصاره سلولی حاوی میکروگرم پروتئین که به روش براوفورد (Bradford) اندازه گیری شده بود، بارگذاری شد و پس از انجام الکتروفورز (۱۱۰ ولت، یک تا یک و نیم ساعت)، عمل انتقال پروتئین از ژل به روی غشا PVDF (Polyvinylidene fluoride) برای انجام سترن بلاط (۴۰۰ میلی آمپر به مدت یک تا یک و نیم ساعت)، انجام گرفت. پس از اطمینان از انتقال پروتئین، غشا PVDF در بافر مسدود کننده (شیر خشک بدن چربی ۵ sc-) در آن محلول آنتی‌بادی اولیه XBP1 (ab48394-1:2000) درصد) و پس از آن درون محلول آنتی‌بادی Cas9 (LC3-II (7160-1:1000)، (C3465-1:500)، (9502S-1:1000) Cleaved-Cas9 قرار داده شد. پس از شستشو و اتصال به آنتی‌بادی ثانویه متصل به Razi Biotech (HRP، ایران، 1:10000)، شستشوی نهایی انجام گرفت. در نهایت غشا PVDF با استفاده از کیت Amersham ECL AdvancedTM X-Ray فیلم

القای آپوپتوز، تنش شبکه اندوپلاسمی و اتوفازی توسط کروسین در رده سلولی MDA-MB-468

نشان دهنده خلوص بالای کروسین و همچنین ساختار مورد انتظار در روش مورد استفاده بود (شکل ۱).

به منظور بررسی خلوص و تعیین ساختار کروسین از روش های طیف سنجی IR و تجزیه و تحلیل عنصری استفاده شد. نتایج

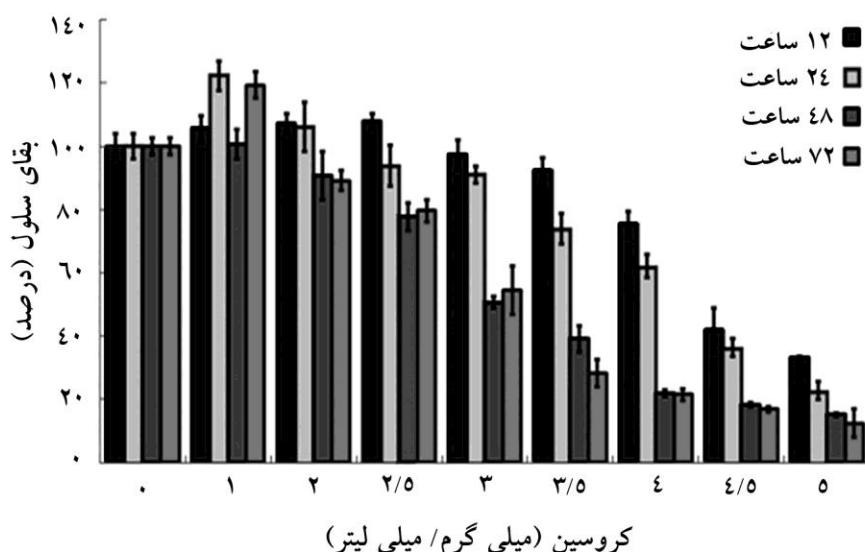


شکل ۱ آزمایش های تأییدی برای شناسایی زعفران (الف) طیف جذبی کروسین استخراج شده؛ (ب) نتایج طیف سنجی IR برای تعیین گروه های عاملی در کروسین؛ (ج) نتایج تجزیه و تحلیل عنصری

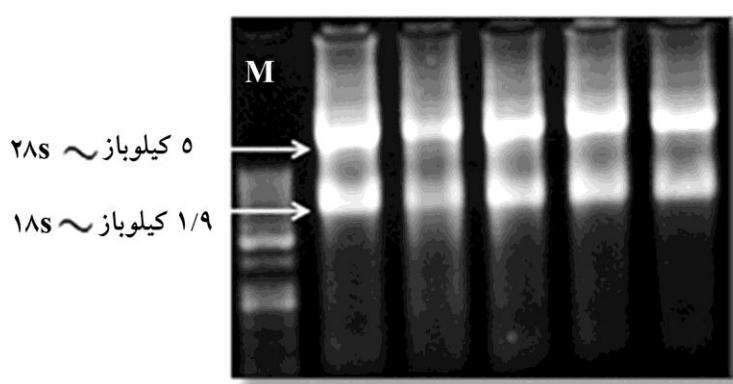
کروسین بین ۱-۵ میلی گرم در میلی لیتر و همچنین در زمان های متفاوت ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تیمار شد. به این ترتیب، آزمایش MTT با تیمار سلول ها به صورت وابسته به زمان و دز کروسین روی سلول MDA-MB-468 انجام گرفت و سلول های تیمار نشده به عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شد.

سمیت سلولی غلظت های مختلف کروسین بر سلول های MDA-MB-468

برای بررسی غلظت مؤثری از کروسین که موجب مرگ سلولی در نیمی از سلول ها (IC50) می شود از آزمون MTT استفاده شد (شکل ۲). در این آزمایش سلول های سرطان پستان MDA-MB-468 با کروسین در دوز های متفاوت



شکل ۲ نمودار میزان زنده بودن سلول MDA-MB-468 در غلظت های مختلف کروسین و زمان های متفاوت (۱۲، ۲۴، ۴۸، ۷۲ ساعت) برای تعیین دوز مؤثر هر یک از این ترکیبات نشان داده است. غلظت IC50 کروسین در زمان ۴۸ ساعت، برابر ۳ میلی گرم در میلی لیتر بود.



شکل ۳ ژل آگارز نمونه های RNA استخراج شده از سلول های MDA-MB-468 تیمار شده با کروسین

بررسی بیان پروتئین های *XBPIs*، کاسپاز ۹، کاسپاز شکسته شده و تجمع پروتئین *LC3-II* در سلول های MDA-MB-468 تیمار شده با کروسین

برای تعیین اثر کروسین بر شکسته شدن پروتئین کاسپاز ۹ به عنوان نشانگر مسیر داخلی آپوپتوز، بیان پروتئین *XBPIs* به عنوان نشانگر تنش شبکه اندوپلاسمی و تجمع پروتئین *LC3-II* به عنوان نشانگر اتوفازی در سلول های سرطان پستان MDA-MB-468، بعد از تیمار سلول ها با کروسین در زمان های ۶، ۱۲ و ۲۴ ساعت با وسترن بلاست بررسی شد. سلول های تیمار نشده (زمان صفر) به عنوان کنترل در نظر گرفته شد.

نتایج حاصل از تحقیق (شکل ۵ الف) نشان می دهد که کروسین در زمان های ۶، ۱۲ و ۲۴ به طور معنی داری بیان پروتئین *XBPIs* در سلول MDA-MB-468 را افزایش داد. همچنین نتایج حاصل از بررسی پروتئین کاسپاز ۹ در زمان های تیمار، نشان دهنده افزایش معنی دار نسبت کاسپاز ۹/کاسپاز ۹ شکسته شده (Cleaved Caspase9/Caspase9) در زمان های ۱۲ و ۲۴ ساعت نسبت به زمان های صفر و ۶ ساعت بود، (شکل ۵ ب). در نهایت نتایج حاصل از بررسی تجمع پروتئین *LC3-II* از یک طرف و نسبت *LC3-II/LC3-I* از طرف دیگر نشانگر افزایش معنی دار این نسبت در زمان های ۶، ۱۲ و ۲۴ نسبت به زمان صفر بود. در این آزمایش، سلول تیمار نشده (زمان صفر) به عنوان کنترل در نظر گرفته شد. از بیان پروتئین بتا-اکتین به عنوان کنترل داخلی در وسترن بلاست استفاده شد (شکل ۵ ج).

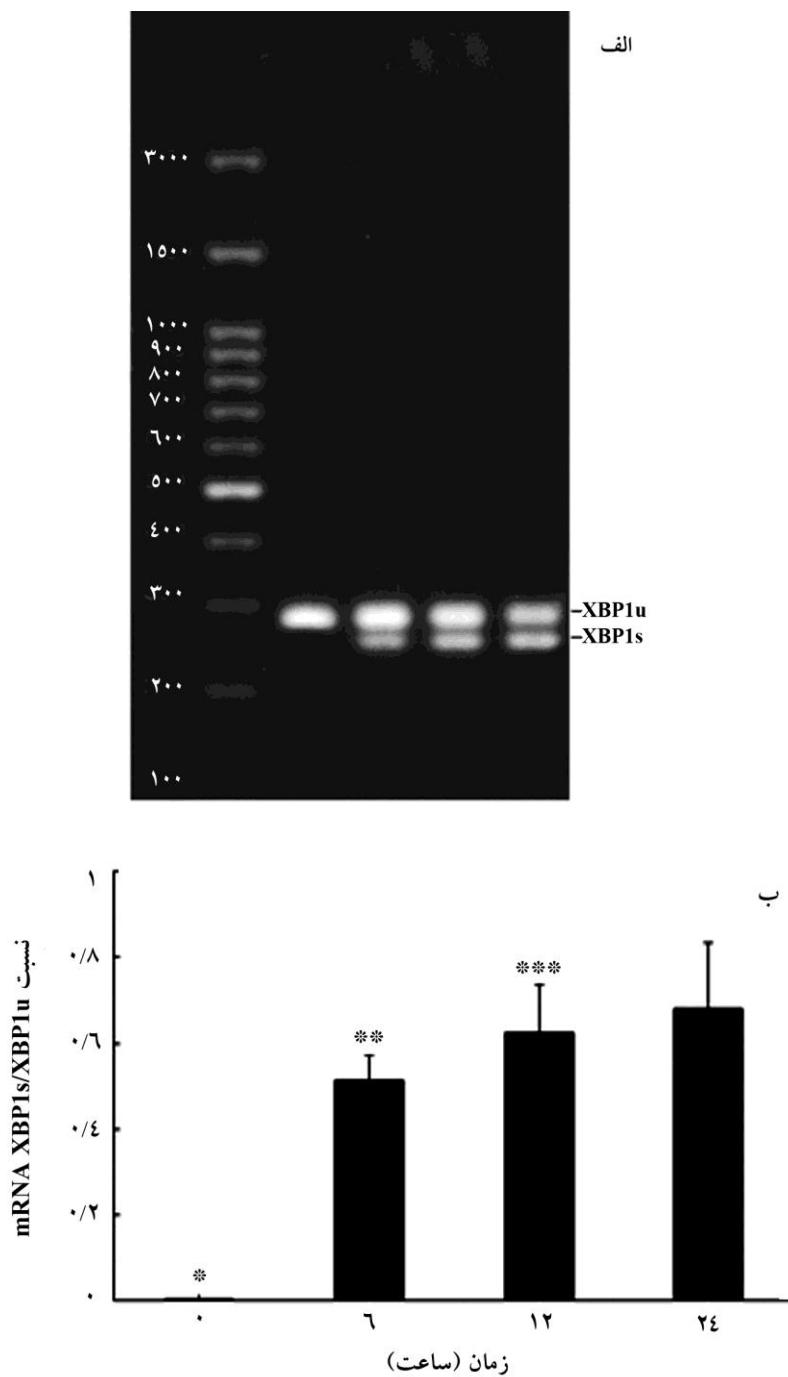
بیان ژن *XBPI* در سطح RNA در سلول های MDA-MB-468 تیمار شده با کروسین

در ادامه برای تعیین عملکرد کروسین بر ویراش ژن *XBPIs* به عنوان نشانگر تنش شبکه اندوپلاسمی در سلول های سرطان پستان MDA-MB-468، سلول ها بعد از تیمار با ۳ میلی گرم بر میلی لیتر کروسین، در فواصل زمان های ۶، ۱۲ و ۲۴ ساعت جمع آوری شده و RNA آنها استخراج شد. بررسی کمی و کیفی RNA حاصل انجام شد. وجود باندهای RNA های ریبوزومی 18s و 28s نشان دهنده سالم بودن RNA است. نمونه ها از نظر شیمیابی دست نخورده (تجزیه نشده) و از نظر زیستی کیفیت لازم را دارا بودند (شکل ۳).

به منظور تعیین غلظت RNA های استخراج شده و همچنین حصول اطمینان از عدم آلودگی پروتئینی نمونه ها، جذب تمامی نمونه ها در طول موج های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر خوانده شد. غلظت RNA های استخراج شده قبل و بعد از تیمار ترکیبات زعفران اندازه گیری شد. نسبت ۲۶۰/۲۸۰ برای تمامی نمونه ها تقریباً بین ۱/۸ تا ۲ بود که نشان دهنده عدم وجود آلودگی پروتئینی است.

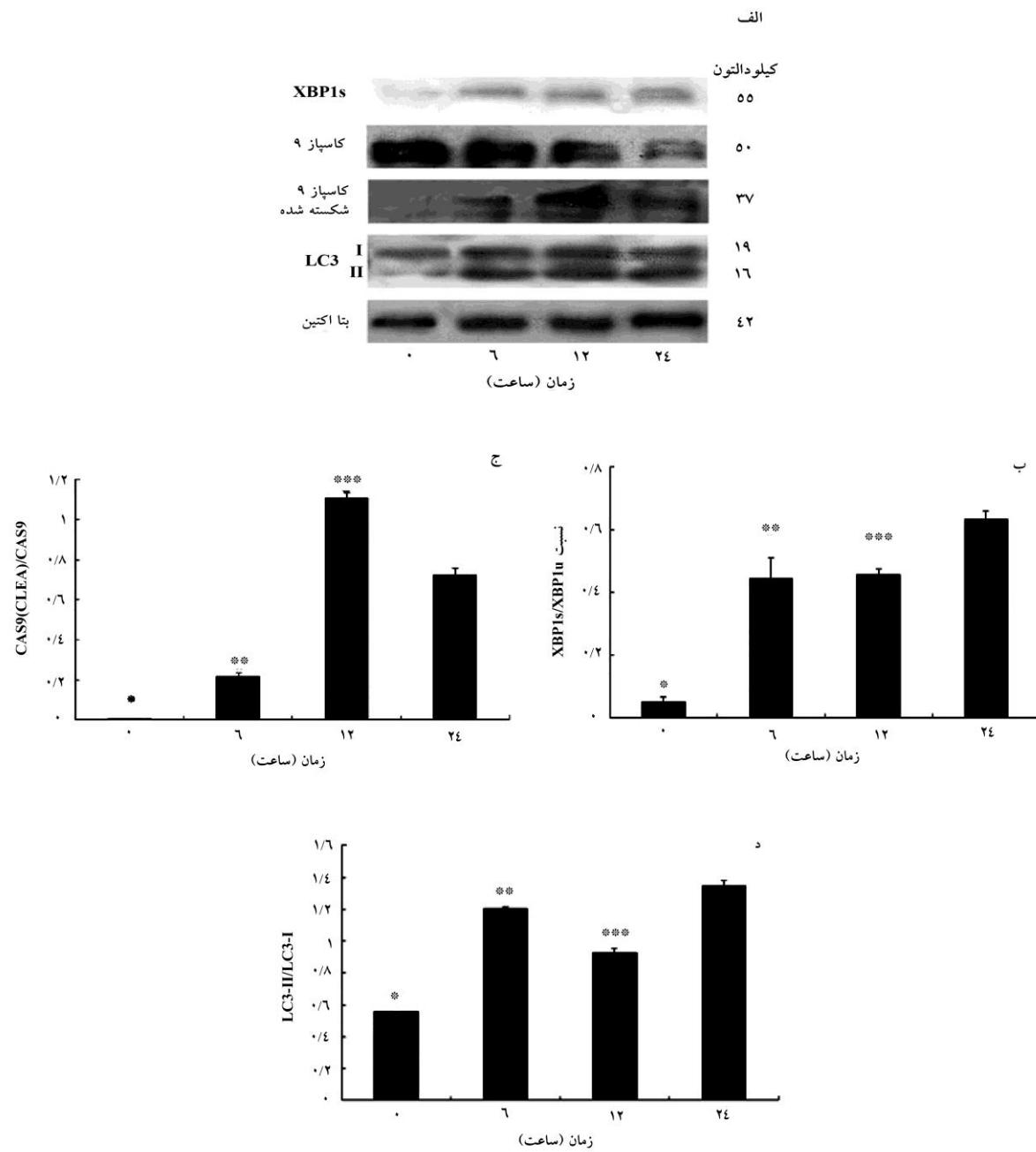
در ادامه به وسیله روش RT-PCR با قراردادن RNA استخراج شده به عنوان الگو و ساخت cDNA ویراش ژن *XBPI* بررسی شد. سلول های تیمار نشده (زمان صفر) به عنوان کنترل در نظر گرفته شدند.

نتایج حاصل (شکل ۴)، نشان داد که کروسین در سلول MDA-MB-468 در زمان های ۶، ۱۲ و ۲۴ ویرایش *XBPI* و تولید فرم *XBPIs* در سطح RNA را القا کرد و روند افزایش فرم ویرایش شده در طول زمان مشاهده شد.



شکل ۴ الای پیرايش mRNA ژن *XBPI* توسط کروسین در سلول MDA-MB-468 در زمان‌های مختلف؛ (الف) ژل آگارز اثر کروسین بر پیرايش و تبدیل شدن *XBPI* پیرايش نشده (*XBPIu*) به پیرايش شده (*XBPIs*) در سطح mRNA به صورت وابسته به زمان؛ (ب) نمودار نسبت mRNA پیرايش شده به پیرايش نشده (S/U) ژن *XBPI* به دست آمده به وسیله نرم افزار Image J: *: تغییرات بین زمان صفر با بقیه زمان ها ($P=0.000$)، **: تغییرات بین زمان ۶ با ۱۲ ($P=0.065$) و ۶ با ۲۴ ($P=0.245$)، ***: تغییرات بین زمان ۱۲ با ۲۴ ($P=0.088$)

القای آپوپتوز، تنش شبکه اندوپلاسمی و اتوفازی توسط کروسین در رده سلولی MDA-MB-468



شکل ۵ بررسی پروتئین های نشانگر در UPR، اتوفازی و آپوپتوز در سلول MDA-MB-468 تیمار شده با کروسین؛ (الف) بیان پروتئین های Cas9، XBP1s، LC3-I و LC3-II، Cleaved-Cas9 تعییرات بین زمان (۰، ۶، ۱۲ و ۲۴ ساعت) نسبت به بتا اکتین (کنترل داخلی) [*: تغییرات معنی دار بین زمان ۰ و ۶ ساعت (P=۰/۰۰۵)، **: تغییرات معنی دار بین زمان ۰ و ۱۲ ساعت (P=۰/۰۰۲)، ***: تغییرات معنی دار بین زمان ۰ و ۲۴ ساعت (P=۰/۰۰۰۱)]، (ب) نسبت کمی کاسپاز ۹ شکسته به کاسپاز ۹ تعییرات بین زمان ۰ و ۱۲ ساعت (P=۰/۹۸۲) و ۰ و ۲۴ ساعت (P=۰/۰۰۵) بود، (ج) نسبت کمی اتوفازی (LC3-II/I) و فعال شدن کاسپاز آپوپتوز [*: تغییرات معنی دار بین زمان ۰ و ۶ ساعت (P=۰/۰۰۰۰۵)، **: تغییرات معنی دار بین زمان ۰ و ۱۲ ساعت (P=۰/۰۰۰۲)، ***: تغییرات معنی دار بین زمان ۰ و ۲۴ ساعت (P=۰/۰۰۰۰۰۵)]؛ (د) نسبت کمی اتوفازی (LC3-II/I) و فعال شدن کاسپاز آپوپتوز [*: تغییرات معنی دار بین زمان ۰ و ۶ ساعت (P=۰/۰۰۰۵)، **: تغییرات معنی دار بین زمان ۰ و ۱۲ ساعت (P=۰/۰۰۰۲)، ***: تغییرات معنی دار بین زمان ۰ و ۲۴ ساعت (P=۰/۰۰۰۰۵)]؛ لازم به ذکر است که نتایج ارایه شده در نمودارهای ب تا ج میانگین حداقل سه بار تکرار آزمایش هاست.

بحث

نشان داده است.

مطالعات پیشین نقش کاسپازها در القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی تحت تیمار با کروسین را نشان داده است [۲۱، ۲۴]. نتایج حاصل از این بررسی نیز در تأیید نتایج قبلی در سایر سلول‌های سرطانی، نشان داد که در سلول‌های MDA-MB-468 تحت تیمار با کروسین فعال شدن پروتئین کاسپاز ۹ و افزایش نسبت کاسپاز ۹/کاسپاز ۹ شکسته شده به ترتیب در ۱۲ و ۲۴ ساعت بعد از تیمار اتفاق افتاد. به این ترتیب، با فعال شدن پروتئین کاسپاز ۹ به عنوان عامل مرکزی و اصلی در مسیر آپوپتوز داخلی، القای آپوپتوز توسط کروسین در این سلول‌ها به عنوان عامل مرگ سلولی تأیید شد.

عموماً در سلول‌های تحت تنش، وقوع فرآیند ویرایش

XBP1 به عنوان نشانگر مسیر UPR و تجمع پروتئین LC3II به عنوان نشانگر فرآیند اتوفاژی به طور وسیعی گزارش شده است [۲۵-۲۷]. به همین دلیل طی این بررسی، اثر کروسین بر فرآیند ویرایش XBP1 در هر دو سطح mRNA و پروتئین از LC3-II/LC3-I یک طرف و تجمع پروتئین LC3-II و نسبت LC3-II/LC3-I از طرف دیگر در سلول‌های تحت تیمار بررسی شد. برای اولین بار بر اساس یافته‌های این تحقیق، به نظر می‌رسد که کروسین به طور مؤثری در تنظیم ویرایش mRNA متعلق به XBP1 در شرایط وابسته به زمان نقش دارد. به این ترتیب که نسبت فرم‌های ویرایش شده به فرم ویرایش نشده در سطح mRNA به تدریج در ساعت‌های ۶، ۱۲ و ۲۴ ساعت بعد از تیمار افزایش قابل ملاحظه‌ای داشت. نتایج وسترن بلات با تأیید نتایج مرحله قبل نشانگر افزایش فرم ویرایش شده پروتئین XBP1s در زمان‌های تیمار بود.

از طرف دیگر؛ نتایج به دست آمده نشان داد که نسبت LC3-II/LC3-I در زمان ۶ ساعت بعد از تیمار افزایش یافت و این افزایش تا ۲۴ ساعت بعد از تیمار همچنان ادامه یافت. این یافته‌ها نقش کروسین در القای فرآیند اتوفاژی را نشان داد و نتایج مطالعات پیشین در سلول‌های سرطانی روده بزرگ را تأیید کرد [۲۴].

طی این پژوهش، اثر سمیت سلولی کروسین بر رده سلول سرطانی MDA-MB-468 که برای مطالعه متاستاز و مهاجرت مفید هستند، نشان داده شد. سنجش MTT و فعال شدن کاسپاز ۹، همچنین افزایش نسبت کاسپاز ۹/کاسپاز ۹ شکسته شده نشان‌دهنده القای آپوپتوز در این سلول‌ها بود. نتایج نشانگر آن است که کروسین به صورت وابسته به دوز و زمان به طور قابل توجهی بقای سلول‌های MDA-MB-468 را کاهش داد. در عین حال، برای اولین بار تغییرات نشانگرهای دو مسیر UPR و اتوفاژی در این سلول‌ها گزارش می‌شود که نشان می‌دهد احتمالاً این دو مسیر در فرآیند آپوپتوز در این رده از سلول‌های سرطان پستان دخیل هستند.

در دو دهه اخیر، بسیاری از ویژگی‌های درمانی زعفران به ویژه آثار ضد سرطانی آن بسیار مورد توجه محققان قرار گرفته است [۱۴-۱۸]. مکانیسم‌های متعددی برای اثر مهاری کروسین بر رشد تومورها پیشهاد شده است که بخشی از آن شامل القای آپوپتوز و مرگ سلولی [۲۰-۲۳]، مهار رشد سلول با مهار نقاط کلیدی در چرخه سلولی [۱۵، ۲۰]، مهار فعالیت تلومرازها [۱۸] و تنظیم پایین دستی متابولپروتئینازها (Metalloproteinases) است که فرآیند متاستاز را تحت تأثیر قرار می‌دهد [۱۷]. همان‌طور که طی این تحقیق نشان داده شد، میزان بقای رده سلولی MDA-MB-468 به طور قابل توجهی در غلاظت‌های بالاتر از ۳ میلی‌گرم در میلی‌لیتر کاهش یافت. در عین حال نتایج سنجش MTT، نشانگر افزایش اندکی در تعداد سلول‌های زنده در غلاظت‌های پایین‌تر کروسین ۱/۵ (۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) است که با نتایج قبلی ارایه شده در رده سلولی HepG2 تشابه دارد [۱۸]. مطالعات قبلی نیز، مکانیسم اصلی برای کروسین را القای مرگ برنامه‌ریزی شده در سایر سلول‌های سرطانی در غلاظت‌های بالاتر از ۳ میلی‌گرم در میلی‌لیتر نشان داده است [۱۴]. در عین حال تمامی مطالعات گذشته اثر غیر سمی کروسین را در انواعی از رده‌های سلولی غیرسرطانی [۱۵، ۲۰، ۲۱]، و حیوانات آزمایشگاهی سالم [۱۵]

بررسی شود.

تشکر و قدردانی

مطالعه حاضر بخشی از رساله دکتری تخصصی رشته بیوشیمی پالینی است که با پشتیبانی مالی دانشگاه تربیت مدرس و طرح تحقیقاتی شماره ۹۴-۰۳-۵۱-۳۰۳۶۲ مصوب مرکز تحقیقات سرطان بیمارستان امام خمینی، دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام شده است. نویسنده‌گان مراتب تشکر و قدردانی خود را از معاونت پژوهشی دانشگاه تربیت مدرس اعلام می‌دارند.

بر اساس یافته‌های به دست آمده طی این تحقیق، به نظر می‌رسد کروسین آثار سمیت سلولی بر سلول‌های MDA-MB-468 را از طریق فعال کردن کاسپاز ۹ و شکستن آن اعمال می‌کند. پیام‌های بالادستی همچون فعال کردن عامل رونویسی XBP1s (در دو سطح mRNA و پروتئین)، احتمالاً در القای آپوپتوز در یک مسیر وابسته به UPR نقش دارد. در عین حال افزایش نسبت LC3-II/LC3-I همراه با افزایش بیان کاسپاز ۹ (تا زمان ۱۲ ساعت) احتمالاً بیانگر فعال شدن مسیر اتوفاژی است. اثبات ارتباط دقیق این دو مسیر با آپوپتوز، در مطالعات بعدی از طریق بررسی سایر عوامل مرتبط‌کننده باید

منابع

- [1] Appenzeller-Herzog C, Hall MN. Bidirectional crosstalk between endoplasmic reticulum stress and mTOR signaling. *Trends Cell Biol* 2012; 22(5): 274-82.
- [2] Bathaie SZ, Mousavi SZ. New applications and mechanisms of action of saffron and its important ingredients. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2010; 50(8): 761-86.
- [3] Abdullaev F. Crocus sativus against cancer. *Arch Med Res* 2003; 34(4): 354.
- [4] Karpozilos A, Pavlidis N. The treatment of cancer in Greek antiquity. *Eur J Cancer* 2004; 40(14): 2033-40.
- [5] Schmidt M, Betti G, Hensel A. Saffron in phytotherapy: pharmacology and clinical uses. *Wien Med Wochenschr* 2007; 157(13-14): 315-9.
- [6] Carey LA, Perou CM, Livasy CA, Dressler LG, Cowan D, Conway K, Karaca G, Troester MA, Tse CK, Edmiston S, Deming SL, Geradts J, Cheang MC, Nielsen TO, Moorman PG, Earp HS, Millikan RC. Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer
- [7] Mousavi SM, Montazeri A, Mohagheghi MA, Jarrahi AM, Harirchi I, Najafi M, Ebrahimi M. Breast cancer in Iran: an epidemiological review. *Breast J* 2007; 13(4): 383-91.
- [8] Movahedi M1, Haghigat S, Khayamzadeh M, Moradi A, Ghanbari-Motlagh A, Mirzaei H, Esmail-Akbari M. Survival rate of breast cancer based on geographical variation in iran, a national study. *Iran Red Crescent Med J* 2012; 14(12): 798-804.
- [9] Ron D, Walter P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8(7): 519-29.
- [10] Samali A, Fitzgerald U, Deegan S, Gupta S. Methods for monitoring endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response. *Int J Cell Biol* 2010; 2010: 830307.
- [11] Mehrpour M, Esclatine A, Beau I, Codogno P. Overview of macroautophagy regulation in mammalian cells. *Cell Res* 2010; 20(7): 748-62.

- [12] Codogno P, Mehrpour M, Proikas-Cezanne T. Canonical and non-canonical autophagy: variations on a common theme of self-eating? *Nat Rev Mol Cell Biol* 2011; 13(1): 7-12.
- [13] Ogata M, Hino S, Saito A, Morikawa K, Kondo S, Kanemoto S, Murakami T, Taniguchi M, Tanii I, Yoshinaga K, Shiosaka S, Hammarback JA, Urano F, Imaizumi K. Autophagy is activated for cell survival after endoplasmic reticulum stress. *Mol Cell Biol* 2006; 26(24): 9220-31.
- [14] Bathaie SZ, Bolhassani A, Tamanoi F. Anticancer Effect and Molecular Targets of Saffron Carotenoids. *Enzymes* 2014; 36: 57-86.
- [15] Ashrafi M, Bathaie SZ, Abroun S, Azizian M. Effect of Crocin on Cell Cycle Regulators in N-Nitroso-N-Methylurea-Induced Breast Cancer in Rats. *DNA Cell Biol* 2015; 34(11): 684-91.
- [16] Sun Y, Yang J, Wang LZ, Sun LR, Dong Q. Crocin attenuates cisplatin-induced liver injury in the mice. *Hum Exp Toxicol* 2014; 33(8): 855-62.
- [17] Festuccia C, Mancini A, Gravina GL, Scarsella L, Llorens S, Alonso GL, Tatone C, Di Cesare E, Jannini EA, Lenzi A, D'Alessandro AM, Carmona M. Antitumor effects of saffron-derived carotenoids in prostate cancer cell models. *Biomed Res Int* 2014; 2014: 135048.
- [18] Noureini SK, Wink M. Antiproliferative effects of crocin in HepG2 cells by telomerase inhibition and hTERT down-regulation. *Asian Pac J Cancer Prev* 2012; 13(5): 2305-9.
- [19] Bolhasani A, Bathaie SZ, Yavari I, Moosavi Movahedi AA, Ghaffari M. Separation and Purification of Some Components of Iranian Saffron. *Asian J Chem* 2005; 17(2): 725-9.
- [20] D'Alessandro AM, Mancini A, Lizzi AR, De Simone A, Marroccella CE, Gravina GL, Tatone C, Festuccia C. Crocus sativus stigma extract and its major constituent crocin possess significant antiproliferative properties against human prostate cancer. *Nutr Cancer* 2013; 65(6): 930-42.
- [21] Hoshyar R, Bathaie SZ, Sadeghizadeh M. Crocin triggers the apoptosis through increasing the Bax/Bcl-2 ratio and caspase activation in human gastric adenocarcinoma, AGS, cells. *DNA Cell Biol* 2013; 32(2): 50-7.
- [22] Luo T, Qin J, Liu M, Luo J, Ding F, Wang M, Zheng L. Astragalus polysaccharide attenuates lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in microglial cells: regulation of protein kinase B and nuclear factor- κ B signaling. *Inflamm Res* 2015; 64(3-4): 205-12.
- [23] Bakshi HA, Hakkim FL, Sam S. Molecular Mechanism of Crocin Induced Caspase Mediated MCF-7 Cell Death: In Vivo Toxicity Profiling and Ex Vivo Macrophage Activation. *Asian Pac J Cancer Prev* 2016; 17(3): 1499-506.
- [24] Bajbouj K, Schulze-Luehrmann J, Diermeier S, Amin A, Schneider-Stock R. The anticancer effect of saffron in two p53 isogenic colorectal cancer cell lines. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 2012; 12: 69.
- [25] Hetz C. The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2012; 13(2): 89-102.
- [26] Penas C, Font-Nieves M, Forés J, Petegnief V, Planas A, Navarro X, Casas C. Autophagy, and

القای آپوپتوز، تنش شبکه اندوپلاسمی و اتوفازی توسط کروسین در رده سلولی MDA-MB-468

BiP level decrease are early key events in retrograde degeneration of motoneurons. Cell Death Differ 2011; 18(10): 1617-27.

[27] Cawley K, Deegan S, Samali A, Gupta S. Assays for detecting the unfolded protein response. Methods Enzymol 2011; 490: 31-51.