

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 تنش شبکه اندوپلاسمی و اتوفازی

حمید حیدرزاده^۱، سیده زهرا بطحایی^{۲*}، سعید آبرون^۳، محمد علی محقی^{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: ۱۴۱۱۷۱۳۱۱۶، 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 بررسی 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) و تجمع پروتئین LC3-II و افزایش نسبت LC3-II/LC3-I در این سلول‌ها مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: 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، تنش شبکه اندوپلاسمی، پیرایش XBP1، تجمع LC3-II

پژوهش‌های آسیب‌شناسی زیستی، دوره ۲۰، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۶، صفحات: ۳۷-۵۱

مقدمه

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 محرک‌های رشدی؛ مسیرهای آنابولسمی - 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 تنش شبکه اندوپلاسمی (Endoplasmic reticulum stress) 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 به دلیل 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 پیشگیری‌کننده روی سرطان است [۳]. از لحاظ تاریخی سابقه استفاده از زعفران به‌صورت ترکیب برای درمان بدخیمی به قرن دوم بعد از میلاد برمی‌گردد [۴]. خواص زیستی زعفران به متابولیت‌های ثانویه مهم آن به‌ویژه کاروتنوئیدهای آن شامل کروسین (Crocetin)، کروستین (Crocin) و پیکروکروسین (Picrocrocin) ارتباط دارد و امروزه مطالعه روی این ترکیبات مورد توجه بسیاری از پژوهشگران قرار گرفته است [۲]. از نقطه نظر فیتوشیمیایی عصاره زعفران مخلوطی 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 کاروتنوئیدهای نادر محلول در آب است. دو

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. به‌همین دلیل تلاش‌های فراوانی در راستای مهار رشد و شناخت نشانگرهای عمده 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 داروهای روش‌های درمانی جدید بر اساس مدل‌های جدید ارائه 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 پاتولوژیک که تا خوردگی صحیح پروتئین‌ها را مختل 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 دوگانگی در مکانیسم اثر به‌خوبی 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

در مسیرهای UPR و اتوفاژی 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 اتوفاژی در سلول های تیمار شده با کروسین بررسی شد.

مواد و روش ها

استخراج ترکیبات مهم زعفران و تخلیص

کروسین

جدا و خالص سازی کروسین از سایر اجزای زعفران به روشی که قبلاً راه اندازی و شرح داده شده بود انجام شد [۱۹]. به طور مختصر عصاره آبی زعفران پس از شستشو روی ستون کروماتوگرافی آلومینیوم ۹- فعال برده شد و جذب نوری محصولات خارج شده از ستون، با استفاده از طیف سنج نوری در طول موج ۴۴۰ نانومتر خوانده شد. بخش دارای جذب در طول موج ۴۴۰ نانومتر (کروسین ها) بعد از تبخیر تحت خلأ، توسط دستگاه لیوفیلیزکننده به پودر تبدیل شد. کروسین استخراج شده با روش های طیف سنجی 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 ژنتیکی ایران خریداری شد و در محیط کشت Dulbecco's Modified Eagle Medium: (DEM-F12)

[۹]. یکی از این پروتئین ها IRE1 (Inositol-requiring enzyme 1) است که با فعالیت ریبونوکلازای mRNA ویرایش نشده *XBP1u* را به نوع ویرایش شده *XBP1s* تبدیل می کند. پروتئین XBP1s (X-box binding protein 1) به عنوان یک عامل رونویسی بیان ژن هایی را فعال می کند که در تا خوردگی، فرآیند حذف پروتئین های معیوب و مسیر اتوفاژی سلول نقش دارد [۱۰].

یکی از مکانیسم های سلولی که در هنگام تنش شبکه اندوپلاسمی تنظیم می شود اتوفاژی (Autophagy) است که به طور جالب توجه این فرآیند نیز می تواند یک مکانیسم برای بقا یا مرگ سلول شود. اتوفاژی یک فرآیند نوسازی پایدار بدون توقف در شرایط طبیعی است که در شرایط آسیب سلولی تشدید می شود، در این فرآیند بخش هایی از سیتوپلاسم یا اندامک ها را دو غشا در بر گرفته و واکوئلی به نام اتوفاگوزوم (Autophagosome) تشکیل می شود و در نهایت با ممزوج شدن اتوفاگوزوم با لیزوزوم ترکیبات درون آن هضم می شود [۱۱، ۱۲]. نقش اصلی در آغاز فرآیند اتوفاژی برای ایجاد غشای جداکننده به وسیله دو پروتئین Beclin1 و ULK1 انجام می شود و در مرحله طویل سازی به وسیله یک فرآیند شبه بویکوئیتینه شدن پروتئین LC3-I با اتصال به فسفاتیدیل اتانول آمین 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 می گیرد، تجمع این پروتئین در سلول به عنوان نشانگری برای جریان اتوفاژی است [۱۳].

مطالعات نشان داده است که بسیاری از داروها و ترکیبات ضد سرطان از طریق تغییر در بیان ژن ها و فعال کردن مسیرهای مرگ سلولی از طریق آپوپتوز (Apoptosis) و اتوفاژی آثار ضد توموری دارند. زعفران و مواد مؤثره آن نیز از جمله ترکیباتی هستند که با داشتن خواص ضدسرطانی، بر بیان ژن های مختلف اثر می گذارند [۲، ۱۴-۱۸].

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

محاسبه شد.

تیمار رده سلولی MDA-MB-468 با ترکیب

کروسین به منظور بررسی های مولکولی

به منظور بررسی اثر کروسین بر بیان پروتئین های XBP1s در سطح RNA و پروتئینی، کاسپاز ۹ و تجمع پروتئین LC3-II سلول های MDA-MB-468 در پلیت های ۶ سانتی متری حاوی محیط کشت کامل DMEM-F12 کشت داده شدند. با مشاهده تراکم ۷۰ درصدی، سلول ها با حل نمودن کروسین در محیط کشت با غلظت ۳ میلی گرم در میلی لیتر (IC50) تیمار شد. در زمان های ۶، ۱۲ و ۲۴ ساعت پس از تیمار، سلول ها با PBS (Phosphate buffered saline) خنک شسته و با استفاده از اسکالپر و ۱۵۰ تا ۲۰۰ میکرولیتر بافر ریپا (Radioimmunoprecipitation assay buffer) جمع آوری شد و بعد از سانتریفوژ در دمای ۴ درجه سانتی گراد و ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه، محلول رویی به عنوان عصاره سلولی برای انجام تحلیل وسترن بلات استفاده شد.

واکنش زنجیره ای پلیمرز - نسخه برداری

معکوس (RT-PCR)

برای ایجاد cDNA از RNA، بعد از جمع آوری سلول های تیمار شده توسط تریپسین - EDTA (Trypsin-) Ethylenediaminetetraacetic acid)، شستشوی سلول ها با PBS و تهیه رسوب سلول، استخراج RNA به ترتیب مراحل یاد شده در کیت GeneAll Biotechnology Co. Ltd. ابتدا با ۱ میلی لیتر تریزول (Trizol) لیز و با استفاده از محلول ها و ستون موجود در کیت، RNAها در ۵۰ میکرولیتر آب حاوی DEPC (Diethyl pyrocarbonate) جمع آوری شد و برای بررسی کیفیت RNA و آزمایش های بعدی به سرعت به فریزر -۸۰ درجه سانتی گراد منتقل شد. همچنین کیفیت RNA استخراج شده با استفاده از ژل آگارز ۰/۸ درصد برای

(Nutrient Mixture F-12 (Gibco، آمریکا)، با غلظت ۱۰ درصد سرم در فلاسک کشت سلول T25 کشت و به انکوباتور با هوای مرطوب و غلظت ۵ درصد CO₂ منتقل شد.

سنجش 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] به صورت زیر استفاده شد. ابتدا سلول های MDA-MB-468 در پلیت ۹۶ خانه به صورتی که در هر چاهک ۱۲۰۰۰-۱۵۰۰۰ سلول قرار گیرد، در محیط کشت کامل کشت داده شدند. بعد از چسبیدن و رشد سلول ها و تراکم سلولی حدود ۷۰-۷۵ درصد (۲۴ تا ۴۸ ساعت)، سلول ها به مدت ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، در معرض ترکیب کروسین با غلظت های بین ۱-۵ میلی گرم در میلی لیتر تیمار شدند. در این آزمایش سلول های تیمار نشده به عنوان کنترل استفاده شدند. پس از گذشت زمان تیمار حدود ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت حاوی MTT (۵ میلی گرم/میلی لیتر) به هر چاهک اضافه شد و مجدداً به مدت ۴ ساعت به انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد انتقال داده شدند. پس از گذشت ۴ ساعت، محیط کشت روی سلول ها تخلیه و ۱۰۰ میکرولیتر DMSO (Dimethyl sulfoxide) به هر چاهک اضافه شد. پلیت به مدت ۱۰ دقیقه در لرزاننده (Shaker) قرار داده شد تا فورمازان (Formazan) ایجاد شده به طور کامل حل شود. سپس به کمک دستگاه خوانش الایزا جذب محلول های هر چاهک در ۵۷۰ نانومتر ثبت شد. در این آزمایش میزان بقای سلول های کنترل تیمار نشده ۱۰۰ درصد در نظر گرفته شد. در ادامه میزان بقای سلول ها در هر حالت تیمار، به صورت درصد سلول های زنده در آن حالت تیمار به سلول های 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 Kit 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 ژن های *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 نانودراپ، نسبت جذب نوری RNA در طول موج های ۲۶۰ نانومتر به ۲۸۰ نانومتر و ۲۶۰ نانومتر به ۲۳۰ نانومتر سنجش شد. از نمونه‌هایی که نسبت جذب نوری ۲۶۰/۲۸۰ نانومتر میان ۱/۸ تا ۲/۲ و نسبت جذب نوری ۲۶۰/۲۳۰ میان ۱/۷ تا ۱/۹ داشتند برای ساخته شدن 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

ژن	توالی آغازگر	اندازه محصول (جفت باز)	دما (درجه سانتی گراد)	درصد گوانین-سیتوزین
XBPI	جلویی: T T A C G A G A G A A A A A C T C A T G G C C	۲۸۳ :UXBP1	۵۸/۴	۴۵/۴۵
	برگشتی: G G G T C C A A G T T G T C C A G A A T G C	۲۵۷ :sXBPI	۶۱/۷۲	۵۴/۵۵

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

تحلیل آماری

آزمون‌های مربوط به هر نمونه به صورت دوتایی انجام شد. داده‌ها به صورت $\text{mean} \pm \text{SD}$ نمایش داده شده است و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS 19.0 و آزمون One Way ANOVA (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 (*، **، ***) مشخص شده است.

نتایج

تخلیص کروسین

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

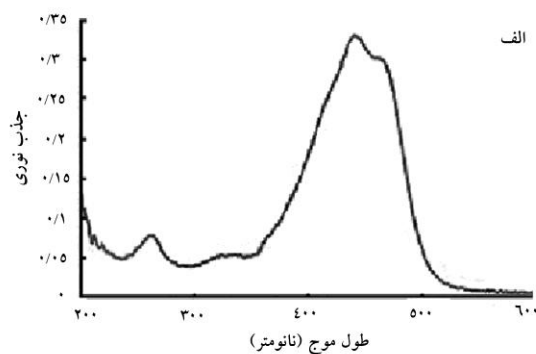
وسترن بلات

در این بخش از مطالعه، در هر چاهک از ژل SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate- Polyacrylamide gel electrophoresis) (۱۲ درصد) عصاره سلولی حاوی ۲۰ میکروگرم پروتئین که به روش برادفورد (Bradford) اندازه‌گیری 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 (Polyvinylidene fluoride) PVDF برای انجام وسترن بلات (۴۰۰ میلی‌آمپر 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 درصد) و پس از آن درون محلول آنتی‌بادی اولیه (XBPI sc-7160-1:1000)، (LC3-II (ab48394-1:2000)، Cas9 (C3465-1:500)، Cleaved-Cas9 (9502S-1:1000) قرار داده شد. پس از شستشو و اتصال به آنتی‌بادی ثانویه متصل به HRP (Razi Biotech، ایران، 1:10000)، شستشوی نهایی انجام گرفت. در نهایت غشا PVDF با استفاده از کیت Amersham ECL AdvancedTM X-Ray فیلم

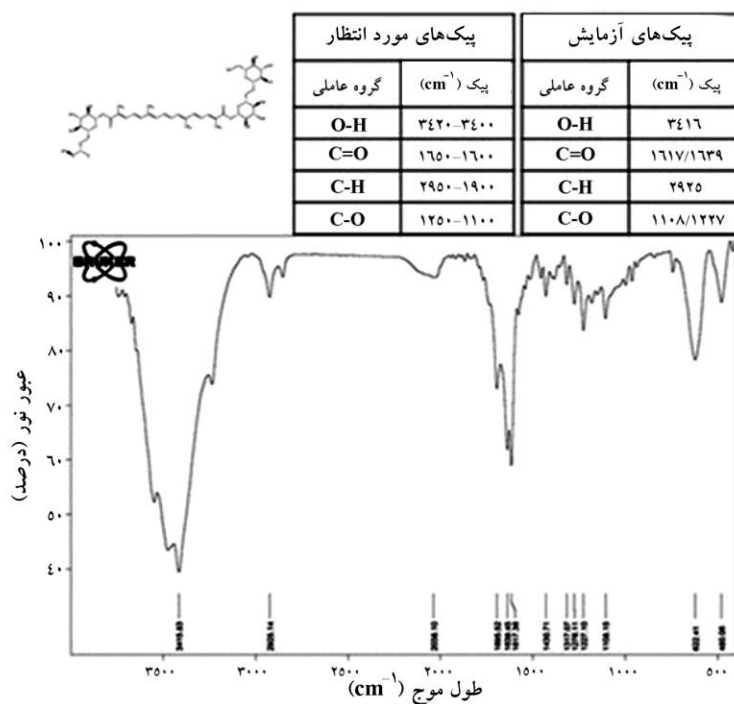
القای آپتوتون، تنش شبکه اندوپلاسمی و اتوفازی توسط کروسین در رده سلولی MDA-MB-468

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



ب



ج

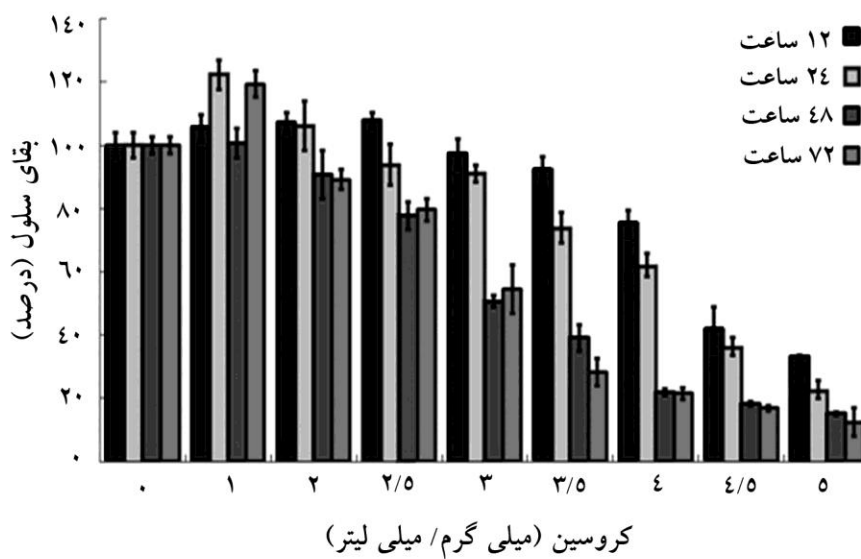
عنصر	C	H	N	O
میزان عناصر بر مبنای فرمول بسته (درصد)	۵۶/۴۹	۶/۷	-	۳۶/۸
میزان تجربی عناصر (درصد)	۵۶/۷۴	۷/۰۱	-	-

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

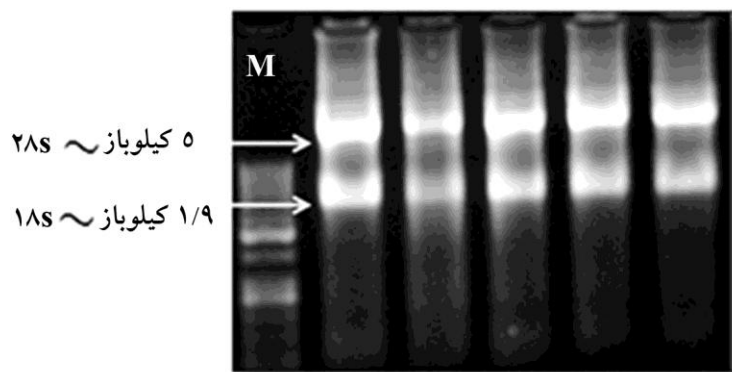
سمیت سلولی غلظت‌های مختلف کروسین بر سلول‌های MDA-MB-468

برای بررسی غلظت مؤثری از کروسین که موجب مرگ سلولی در نیمی از سلول‌ها (IC₅₀) می‌شود از آزمون MTT استفاده شد (شکل ۲). در این آزمایش سلول‌های سرطان پستان MDA-MB-468 با کروسین در دوزهای متفاوت

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



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



شکل ۳ ژل آگارز نمونه‌های RNA استخراج شده از سلول‌های MDA-MB-468 تیمار شده با کروسین

بیان ژن XBP1 در سطح RNA در سلول‌های MDA-MB-468 تیمار شده با کروسین

در ادامه برای تعیین عملکرد کروسین بر ویراش ژن *XBP1s* به‌عنوان نشانگر تنش شبکه اندوپلاسمی در سلول‌های سرطان پستان MDA-MB-468، سلول‌ها بعد از تیمار با ۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر کروسین، در فواصل زمان‌های ۶، ۱۲ و ۲۴ ساعت جمع‌آوری شده و RNA آن‌ها استخراج شد. بررسی کمی و کیفی RNA حاصل انجام شد. وجود باندهای RNAهای ریبوزومی 18s و 28s نشان‌دهنده سالم بودن RNA است. نمونه‌ها از نظر شیمیایی دست‌نخورده (تجزیه نشده) و از نظر زیستی کیفیت لازم را دارا بودند (شکل ۳).

به‌منظور تعیین غلظت RNAهای استخراج شده و همچنین حصول اطمینان از عدم آلودگی پروتئینی نمونه‌ها، جذب تمامی نمونه‌ها در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر خوانده شد. غلظت RNAهای استخراج شده قبل و بعد از تیمار ترکیبات زعفران اندازه‌گیری شد. نسبت ۲۶۰/۲۸۰ برای تمامی نمونه‌ها تقریباً بین ۱/۸ تا ۲ بود که نشان‌دهنده عدم وجود آلودگی پروتئینی است.

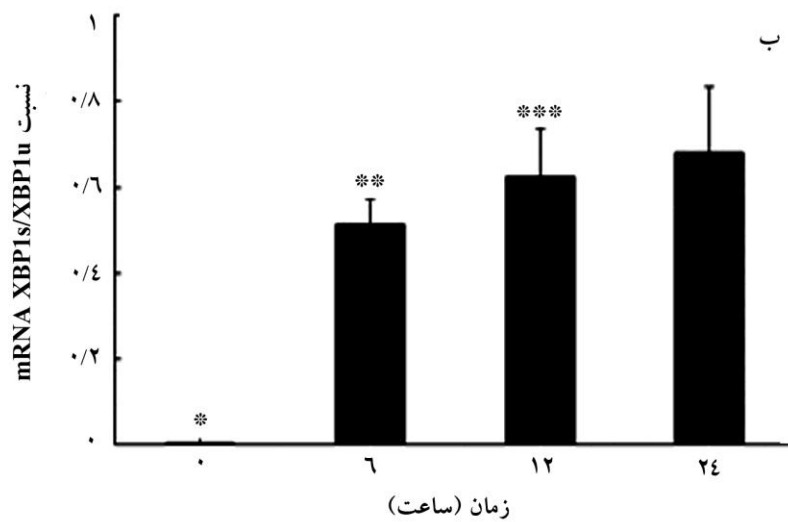
در ادامه به‌وسیله روش RT-PCR با قرار دادن RNA استخراج شده به‌عنوان الگو و ساخت cDNA، ویراش ژن *XBP1* بررسی شد. سلول‌های تیمار نشده (زمان صفر) به‌عنوان کنترل در نظر گرفته شدند.

نتایج حاصل (شکل ۴)، نشان داد که کروسین در سلول MDA-MB-468 در زمان‌های ۶، ۱۲ و ۲۴ ویرایش *XBP1* و تولید فرم *XBP1s* در سطح RNA را القا کرد و روند افزایش فرم ویرایش شده در طول زمان مشاهده شد.

بررسی بیان پروتئین‌های XBP1s، کاسپاز ۹، کاسپاز شکسته شده و تجمع پروتئین LC3-II در سلول‌های MDA-MB-468 تیمار شده با کروسین

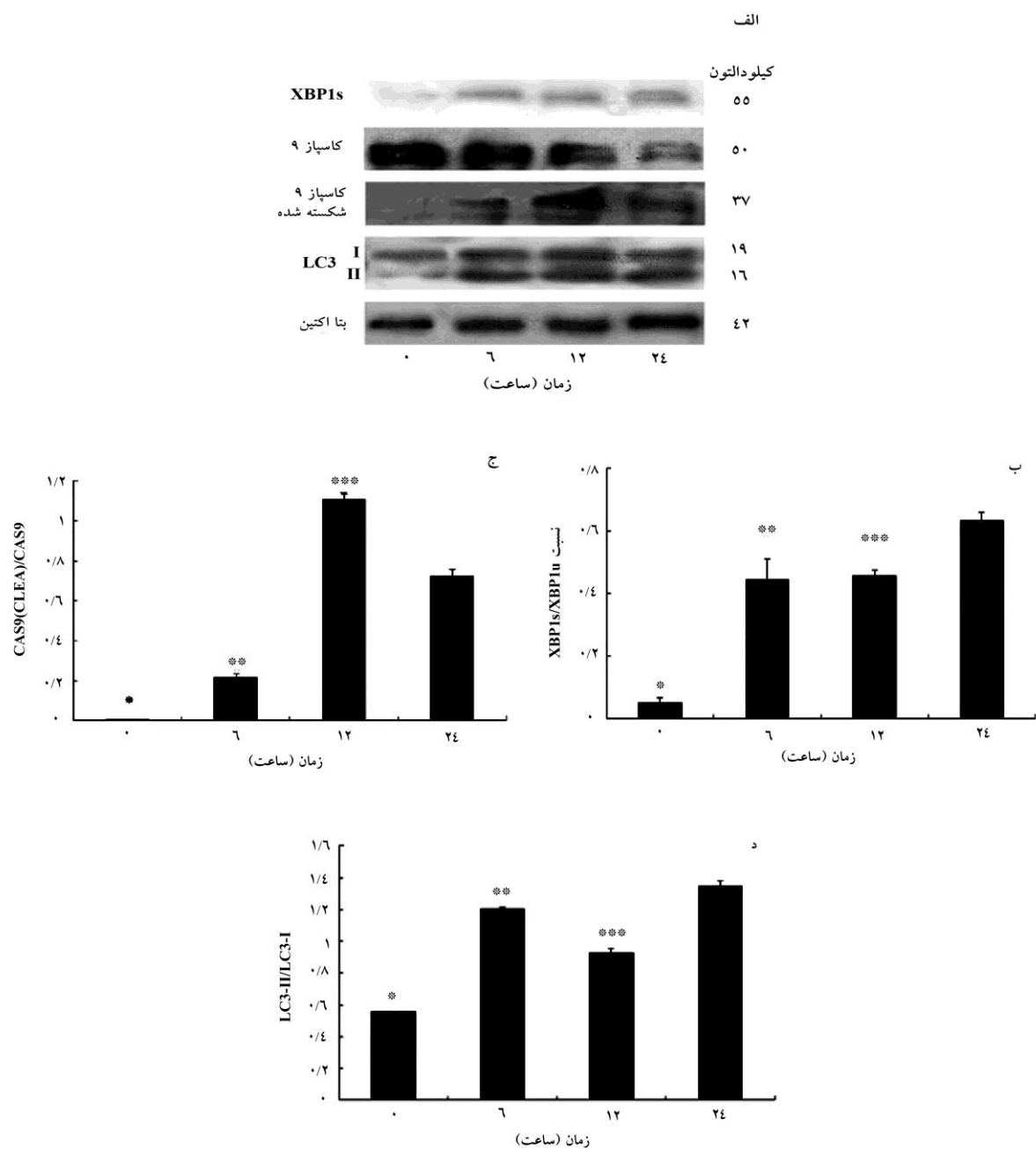
برای تعیین اثر کروسین بر شکسته شدن پروتئین کاسپاز ۹ به‌عنوان نشانگر مسیر داخلی آپوپتوز، بیان پروتئین *XBP1s* به‌عنوان نشانگر تنش شبکه اندوپلاسمی و تجمع پروتئین LC3-II به‌عنوان نشانگر اتوفاژی در سلول‌های سرطان پستان MDA-MB-468، بعد از تیمار سلول‌ها با کروسین در زمان‌های ۶، ۱۲ و ۲۴ ساعت با وسترن بلات بررسی شد. سلول‌های تیمار نشده (زمان صفر) به‌عنوان کنترل در نظر گرفته شد.

نتایج حاصل از تحقیق (شکل ۵ الف) نشان می‌دهد که کروسین در زمان‌های ۶، ۱۲ و ۲۴ به‌طور معنی‌داری بیان پروتئین *XBP1s* در سلول MDA-MB-468 را افزایش داد. همچنین نتایج حاصل از بررسی پروتئین کاسپاز ۹ در زمان‌های تیمار، نشان‌دهنده افزایش معنی‌دار نسبت کاسپاز ۹/کاسپاز ۹ شکسته شده (Cleaved Caspase9/Caspase9) در زمان‌های ۱۲ و ۲۴ ساعت نسبت به زمان‌های 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 معنی‌دار این نسبت در زمان‌های ۶، ۱۲ و ۲۴ نسبت به زمان صفر بود. در این آزمایش، سلول تیمار نشده (زمان صفر) به‌عنوان کنترل در نظر گرفته شد. از بیان پروتئین بتا-آکتین به‌عنوان کنترل داخلی در وسترن بلات استفاده شد (شکل ۵ ج).



شکل ۴ القای پیرایش mRNA ژن *XBP1* توسط کروسین در سلول MDA-MB-468 در زمان‌های مختلف؛ (الف) ژل آگارز اثر کروسین بر پیرایش و تبدیل شدن *XBP1* پیرایش نشده (*XBP1u*) به *XBP1* پیرایش شده (*XBP1s*) در سطح mRNA به صورت وابسته به زمان؛ (ب) نمودار نسبت mRNA پیرایش شده به پیرایش نشده (*SU*) ژن *XBP1* به دست آمده به وسیله نرم‌افزار Image J؛ * تغییرات بین زمان صفر با بقیه زمان‌ها ($P=0/000$)، ** تغییرات بین زمان ۶ با ۱۲ ($P=0/565$) و ۶ با ۲۴ ($P=0/245$)، *** تغییرات بین زمان ۱۲ با ۲۴ ($P=0/888$)

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



شکل ۵ بررسی پروتئین‌های نشانگر در UPR، اتوفازی و آپوپتوز در سلول MDA-MB-468 تیمار شده با کروسین؛ (الف) بیان پروتئین‌های XBP1s، Cas9، Cleaved-Cas9، LC3-I و LC3-II، (ب) بیان کمی پروتئین XBP1s نسبت به بتا-اکتین (کنترل داخلی) [* تغییرات بین زمان صفر با بقیه زمان‌ها (P=۰/۰۰۰)، ** تغییرات بین زمان ۶ با ۱۲ (P=۰/۹۸۲) و ۶ با ۲۴ (P=۰/۰۰۱)، *** تغییرات بین زمان ۱۲ با ۲۴ (P=۰/۰۰۲)]، (ج) نسبت کمی کاسپاز ۹ شکسته به کاسپاز ۹ برای بررسی فعال شدن کاسپاز و آپوپتوز [* تغییرات بین تمام زمان‌ها (P=۰/۰۰۰۰)، *** تغییرات معنی‌دار بین زمان ۶ ساعت با ۱۲ و ۲۴ ساعت؛ به طوری که بین ۶ با ۱۲ ساعت P = ۰/۰۰۱ و بین ۶ و ۲۴ ساعت P = ۰/۰۰۵ بود]، (د) نسبت کمی LC3-II/I و فعال شدن اتوفازی [* تغییرات بین زمان صفر با بقیه زمان‌ها (P=۰/۰۰۰)، ** تغییرات بین زمان ۶ با ۱۲ (P=۰/۰۰۱) و ۶ با ۲۴ (P=۰/۰۰۵)، *** تغییرات بین زمان ۱۲ با ۲۴ (P=۰/۰۰۰)]؛ لازم به ذکر است که نتایج ارائه شده در نمودارهای ب تا ج میانگین حداقل سه بار تکرار آزمایش‌هاست.

بحث

نشان داده است.

مطالعات پیشین نقش کاسپازها در القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی تحت تیمار با کروستین 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 کروستین 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 کروستین 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 اتوفازی به طور وسیعی گزارش شده است [۲۷-۲۵]. به همین دلیل طی این بررسی، اثر کروستین بر فرآیند ویرایش XBP1 در هر دو سطح mRNA و پروتئین از 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 کروستین 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 کروستین در القای فرآیند اتوفازی را نشان داد و نتایج مطالعات پیشین در سلول‌های سرطانی روده بزرگ را تأیید کرد [۲۴].

طی این پژوهش، اثر سمیت سلولی کروستین 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 کروستین 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 اتوفازی 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 [۲، ۱۴-۱۸]. مکانیسم‌های متعددی برای اثر مهارتی کروستین بر رشد تومورها پیشنهاد شده است که بخشی از آن شامل القای آپوپتوز و مرگ سلولی [۳، ۲۰-۲۳]، مهار رشد سلول با مهار نقاط کلیدی در چرخه سلولی [۱۵، ۲۰]، مهار فعالیت تلومرازها [۱۸] و تنظیم پایین دستی متالوپروتئینازها (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 غلظت‌های بالاتر از ۳ میلی‌گرم در میلی‌لیتر کاهش یافت. در عین حال نتایج سنجش MTT، نشانگر افزایش اندکی در تعداد سلول‌های زنده در غلظت‌های پایین‌تر کروستین (۱-۱/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) است که با نتایج قبلی آرایه شده در رده سلولی HepG2 شباهت دارد [۱۸]. مطالعات قبلی نیز، مکانیسم اصلی برای کروستین را القای مرگ برنامه‌ریزی شده در سایر سلول‌های سرطانی در غلظت‌های بالاتر از ۳ میلی‌گرم در میلی‌لیتر نشان داده است [۱۴]. در عین حال تمامی مطالعات گذشته اثر غیر سمی کروستین را در انواعی از رده‌های سلولی غیرسرطانی [۲۰، ۲۱]، و حیوانات آزمایشگاهی سالم [۱۵]

بررسی شود.

تشکر و قدردانی

مطالعه حاضر بخشی از رساله دکتری تخصصی رشته بیوشیمی بالینی است که با پشتیبانی مالی دانشگاه تربیت مدرس و طرح تحقیقاتی شماره ۳۰۳۶۲-۳۱-۰۳-۹۴ مصوب مرکز تحقیقات سرطان بیمارستان امام خمینی، دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام شده است. نویسندگان 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 کروستین 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 اتوفازی 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 Study. *JAMA* 2006; 295(21): 2492-502.
- [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, Haghghat 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 اتوفاژی 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.