اثر عصاره زعفران بر بیان ژن VEGF A در سلول‌های سرطان پستان MCF_7

مرضیه موسوی[۱]؛ جواد بهارآرا[۲]*؛ خدیجه شاهرخ آبادی[۳]؛ سعیده ظفر بالا نژاد[۳]

چکیده

زمینه: مطالعات مختلف بر اثرات ضد سرطانی زعفران تأکید دارد. آنژیوژنز یا تشکیل رگ‌های خونی جدید، که برای تکوین جنین و بسیاری از وقایع فیزیولوژیکی مورد نیاز است در بسیاری از شرایط پاتولوژیک نظیر رشد تومورها ضروری است. یکی از ژن‌های فعال در روند رگ‌زایی VEGF A می‌باشد. در این پژوهش اثرات عصاره آبی زعفران بر میزان بیان این ژن بررسی گردید.

روش‌ها: عصاره آبی زعفران به‌روش سوکسله تهیه و به روش انجماد و خشک کردن در خلأ (lyphilization) با استفاده از دستگاه freeze dryer به شکل پودر تهیه گردید. سلول‌های MCF_7 در محیط کشت RPMI1640 غنی شده با ۱۰٪ FBS کشت داده شد. پس از ۲۴ ساعت، سلول ها توسط عصاره در غلظت‌های ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰ و ۸۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تیمار گردیدند. ۴۸ ساعت پس از تیمار، RNA تام استخراج و cDNA با استفاده از توالی ژن مورد نظر سنتز شد و محصولات سنتزشده توسط دستگاه Real Time PCR جهت بررسی سطح بیان ژن VEGF A مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج بررسی آماری داده‌ها نشان داد که کاهش معنادار (P<۰/۰۵) در میزان بیان ژن VEGF-A تیمارشده با غلظت‌های ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰ و ۸۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره زعفران نسبت به سلول‌های گروه کنترل دیده می‌شود به‌نحوی‌که بیشترین تغییرات کاهشی بیان ژن مربوط به بیشترین غلظت عصاره زعفران بود.

نتیجه‌گیری: نتایج بیانگر کاهش بیان ژن VEGF A، بیومارکر ویژه آنژیوژنز در نمونه‌های تحت تیمار در مقایسه با گروه کنترل است.

کلیدواژه‌ها: زعفران، آنژیوژنز، VEGF A، رده سلولی MCF_7، سرطان

«دریافت: ۱۳۹۲/۵/۲۶ پذیرش: ۱۳۹۲/۱۱/۸»

۱. مرکز تحقیقات تکوین جانوری دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد

۲. گروه زیست‌شناسی و مرکز تحقیقات بیولوژی کاربردی تکوین جانوری دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد

۳. گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد

***عهده دار مکاتبات:** مشهد، خیابان راهنمایی ۲۴، گروه زیست‌شناسی و مرکزتحقیقات بیولوژی کاربردی تکوین جانوری دانشگاه آزاد اسلامی مشهد

تلفن: ۸۴۳۷۰۹۲-۰۵۱۱، فکس: ۸۴۳۷۰۹۲-۰۵۱۱ Email:baharara@yahoo.com

مقدمه

با توجه به اثرات جانبی برخی داروهای شیمیایی، استفاده از گیاهان دارویی با حداقل اثرات جانبی و تداخل دارویی مورد توجه قرار گرفته است (۱). در این میان، زعفران که دارای جایگاه خاصی در الگوی تغذیه مردم است، حایز اهمیت می‌باشد (۲). نتایج بررسی‌های دانشمندان مشخص نموده که مواد مؤثر زعفران شامل کروسین (استرهای گلیکوزیله کروستین بوده و ساختار کارتنوئیدی دارد)، کروستین (یک کارتنوئید طبیعی دی‌کربوکسیلیک اسید که از کروسین به‌دست می‌آید)، پیکروکروسین (این ترکیبات ساختار منوترپنوئیدی داشته و عامل تلخ‌مزه بودن زعفران است) و سافرانال (فرم دهیدراته آگلیکون پیکروکروسین بوده و عامل بوی خاص زعفران است) در جلوگیری از تحلیل نورون‌ها و تقویت

حافظه نقش دارند (۳). همچنین اثرات ضدافسردگی عصاره آبی و اتانولی گلبرگ‌های گل زعفران در موش به اثبات رسیده است (۴). زعفران به‌عنوان محافظ، از وارد شدن آسیب به کروموزوم‌ها جلوگیری کرده و تعدیل‌کننده پراکسیداسیون چربی‌ها بوده و یک آنتی‌اکسیدان قوی و منبع سرشار از ریبوفلاوین است (۵). اثرات ضدسرطانی زعفران همچون مهار تشکیل تومورها، آثار ضد جهش‌زایی و مهار سنتز نوکلئیک‌اسیدها در سلول‌های بدخیم انسان به اثبات رسیده است (۶).

سرطان پستان در زنان شایع‌ترین سرطان است و بیشترین میزان مرگ مربوط به آن در سن ۴۴-۴۰سالگی رخ می‌دهد (۷). این بدخیمی یک بیماری وابسته به هورمون است که تعداد زیادی از عوامل خطر آن شناخته شده است. از جمله این عوامل خطر می‌توان به گوناگو نی جغرافیایی، سن، تاریخچه فامیلی، تاریخچه حاملگی، بارداری، بیماری خوش‌خیم پستان، استروژن های اگزوژن، داروی ضدبارداری خوراکی، چاقی، رژیم غذایی با چربی بالا، مصرف الکل، کشیدن سیگار و پرتوتابی به قفسه سینه اشاره نمود (۸ و ۹). سرطان سینه در زنان ایرانی در مقایسه با زنان کشورهای غربی، حداقل یک دهه زودتر و در مراحل پیشرفته‌تر بروز می‌کند. رخداد آن در بین زنان ایرانی، ۱۲۰ نفر در هر ۱۰۰ هزار زن می‌باشد. اختلال در عملکرد طبیعی حداقل ۶-۴ ژن به‌وسیله ساز و کارهای ژنتیک و اپی‌ژنتیک منجر به بروز سرطان پستان می‌گردد؛ این ژن‌ها در حفظ تعادل میان تکثیر، آپوپتوز و تمایز، تنظیم ظهور گیرنده‌های استروئیدی، اتصال سلول‌ها و رگزایی نقش دارند (۱۰).

اولین رگ‌های خونی طی پدیده‌ای موسوم به واسکولوژنز به شکل نوپدید از سلول‌های پیش‌ساز آندوتلیال با آرایش خاص بوجود می‌آیند و به‌تدریج شروع به انتشار، توسعه و تشکیل شاخه‌های جدید می‌کنند، که به آن آنژیوژنز اطلاق می‌شود (۱۱). در افراد بالغ، تشکیل رگ‌های خونی جدید از رگ‌های قبلی به‌طور دقیقی کنترل می‌شود و رگ‌زایی فقط در شرایط فیزیولوژیکی خاص نظیر بارداری و شرایط پاتولوژیکی ویژه نظیر ترمیم زخم، رتینوپاتی دیابتیک، پزوریازیس، آرتریت روماتویید و یا سرطان‌ها اتفاق می‌افتد. از آن‌جا که آنژیوژنز در پدیده‌های پاتولوژیک نظیر رشد و متاستاز تومورهای سرطانی نقش مهمی ایفا می‌کند، لذا می‌تواند هدف درمان‌های ضدتوموری نیز قرار گیرد (۱۲). این فرآیند به فعل و انفعالات وسیع بین سلول‌ها و ملکول‌های مختلفی وابسته است و توسط پپتیدها و فاکتورهای تعدیل‌کننده متنوعی کنترل می‌شود. فاکتورهای متعددی نظیر VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor)، FGF (Fibroblast Growth Factor)، PTGF (Platelelte-drived Growth Factor)، STAT3 (Singal Transducer and Activitator of Transcription) در این پدیده دخالت دارند (۱۳). یکی از عوامل مؤثر در آنژیوژنز، فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (VEGF) می‌باشد که از فاکتورهای اصلی در روند جوانه زدن عروق خونی جدید از بستر عروقی اولیه و فاکتور کلیدی در سیستم سیگنال‌دهی است، VEGF همودایمری است که به دو رسپتور با تمایل بالا شامل VEGFR1 و VEGFR2 متصل می‌شود و عملکرد وابسته به دوز برای آن شناخته شده است (۱۴). در شرایط درون‌تنی VEGF نفوذپذیری عروق را که برای شروع آنژیوژنز ضروری است، تنظیم می‌کند به‌همین دلیل به آن فاکتور نفوذپذیری عروق (Vascular Permeability Factor) گفته می‌شود و در این مورد چندین برابر قوی‌تر از هیستامین عمل می‌کند (۱۵). در فرایند رگ‌زایی، کاهش فشار اکسیژن (hypoxia) در بافت مورد نظر از اهمیت فوق‌العاده‌ای برخوردار است (۱۶). یکی از کاربردی‌ترین استفاده‌هایReal Time PCR بررسی بیان ژن‌هاست که با استفاده از روش‌هایی همچون کمیت‌سنجی نسبی(Relative Quantitative) انجام می‌شود. این روش در حال حاضر یکی از دقیق‌ترین روش‌های بررسی تغییرات بیان ژن‌هاست. در این روش تعداد مهم نبوده بلکه کاهش یا افزایش بیان ژن اهمیت دارد (۱۷). در مطالعه حاضر اثر عصاره آبی زعفران بر بیان ژن

VEGF A به‌عنوان فاکتور محرک آنژیوژنز بر رده سلول‌های سرطان پستان (MCF_7) بررسی شد.

مواد و روش‌ها

الف- تهیه عصاره آبی زعفران

به‌منظور عصاره‌گیری، ۳ گرم زعفران تجاری در کاغذ صافی قرارداده شد و به‌همراه ۲۵۰ سی‌سی آب مقطر اولتراپیور (به‌عنوان حلال) در دستگاه سوکسله قرار گرفت. عصاره به‌دست‌آمده جهت تغلیظ به دستگاه روتاری منتقل و حلال اضافی حذف گردید. به‌منظور خشک کردن عصاره زعفران از روش انجماد و خشک کردن در خلأ (lyphilization) با استفاده از دستگاه فریز درایر (freeze dryer) استفاده شد.

ب- کشت سلول MCF7 و بررسی میزان زیست‌پذیری سلول‌های تیمارشده به‌وسیله غلظت‌های مختلف عصاره آبی زعفران

رده سلول‌های سرطان پستان انسانی (MCF_7) که سلول‌هایی نامیرا (immortal)، مدل و با منشأ انسانی هستند از بانک سلولی پژوهشکده بوعلی مشهد خریداری و در محیط کشت RPMI1640 (Biosera) Roswell Park Memorial Institute غنی شده با ده درصد Fetal Bovine Serum (Gibco) به‌همراه یک درصد آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین و استرپتومایسین شرکت Sigma و یک سی‌سی ال‌گلوتامین شرکت Sigma در انکوباتور با رطوبت ۹۵ درصد و ۵ درصد CO_2 کشت گردید. پس از دو بار پاساژ سلولی و تکثیر آن‌ها، ۵ میلیون سلول در هر فلاسک فیلتردار T5 کشت گردید.

۲۴ ساعت پس از کشت و اطمینان از چسبندگی سلول‌ها به بستر فلاسک با عصاره آبی زعفران در غلظت‌های ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰ و ۸۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بر اساس غلظت مهاری ۵۰٪ (IC_{50}= Inhibitory Concentration) زعفران تیمار شد. به‌منظور بررسی قابلیت حیات (viability) عکسبرداری برای ۵ روز متوالی به‌وسیله دوربین دیجیتال Dinocaptre متصل به میکروسکوپ اینورت و تهیه تصاویری با بزرگنمایی 200x انجام پذیرفت.

جهت انجام تست تریپان‌بلو محیط کشت تخلیه و سلول‌ها توسط phosphate buffered saline (PBS) شستشو و سپس به‌مدت دو دقیقه تریپسینه شد. سپس سلول‌ها با نسبت یک به یک به‌وسیله تریپان‌بلو رنگ‌آمیزی و شمارش سلولی بر روی لام نئوبار به‌کمک میکروسکوپ نوری انجام شد.

ج- استخراج RNA

استخراج RNA توسط total RNA purification kit شرکت Jena Bioscience ساخت آلمان پس از ۴۸ ساعت از تیمار سلول‌های سرطانی مطابق پروتوکل ۵ مرحله‌ای ضمیمه کیت انجام پذیرفت.

جهت حذف آنزیم RNase که بر سطح پوست و کلیه وسایل موجود می‌باشد از DEPCE water (sigma) در سطح محیط کار، تجهیزات، ابزار و دستکش‌ها استفاده شد. علاوه بر این از نوک سمپلرها و میکروتیوپ‌های RNase free جهت بازدهی مثبت کار در مراحل مختلف استفاده گردید. سلول‌های هر فلاسک توسط تریپسین/ EDTA جداسازی و توسط سانتریفوژ پلیت سلولی تخلیص شده و به ازای هر پنج‌میلیون سلول ۵۰۰ میکرولیتر بافر لیزکننده اضافه گردید. این سلول‌ها به کمک سمپلینگ کاملاً لیز و یکنواخت شده و به یک میکروتیوپ RNase free انتقال یافت. سپس ۳۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول به محلول سلولی لیز شده اضافه و میکروتیوپ ورتکس شد. ستون اسپین از جنس سیلیکاژل در تیوپ جمع‌آوری قرار گرفت و مخلوط ایزوپروپانول به‌همراه سلول‌های لیزشده به آن انتقال پیدا کرد و در ۱۲۰۰۰g به‌مدت ۳۰ ثانیه سانتریفوژ گردید و محلول زیرین حذف شد. در ادامه،۷۰۰ میکرولیتر بافر شستشودهنده اولیه به ستون اسپین اضافه و مجدداً به‌مدت ۳۰ ثانیه سانتریفوژ شده و محلول زیرین خارج گردید. در مرحله بعد به ستون اسپین۷۰۰ میکرولیتر بافر شستشودهنده ثانویه اضافه و سانتریفوژ شد و محلول

زیرین حذف شد. به‌منظور حذف اتانول اضافی یک بار دیگر سانترفوژ در ۱۲۰۰۰g به‌مدت یک دقیقه انجام گردید و اتانول مازاد از ستون اسپین حذف شد و نهایتاً ستون اسپین به میکروتیوپ RNAase free جمع‌آوری RNA منتقل شد و ۵۰ میکرولیتر بافر جمع‌آوری‌کننده به آن اضافه شد. سپس در دمای اتاق به‌مدت یک دقیقه انکوبه گردید و در نهایت در ۱۲۰۰۰g به‌مدت یک دقیقه سانتریفوژ گردید و RNA تام تخلیص شده در منهای ۲۰ درجه سانتیگراد تا زمان سنتز cDNA نگه‌داری گردید.

د- بررسی میزان RNA تام استخراج‌شده

به‌منظور ارزیابی و سنجش میزان RNA استخراج‌شده، ۲ میکرولیتر از بافر تخلیص به‌همراه RNA استخراج‌شده توسط دستگاه نانودراپ در طول موج‌های ۲۶۰، ۲۸۰ و ۳۲۰ نانومتر سنجش و آنالیز گردید. از این داده‌ها که معرف میزان غلظت RNA استخراج‌شده می‌باشد در سنتز cDNA استفاده شد:

غلظت RNA =(OD۲۶۰−OD۳۲۰)×۴۰×۱۰۰

ه- سنتز cDNA

سنتز cDNA توسط کیت Accu Power® Racket ScriptTM RT Pre Mix (Korea) و پروتوکل ضمیمه کیت انجام شد. عملیات سنتز تحت شرایط دمایی مطابق جدول ۱ انجام شد.

و- سنتز پرایمرها

توالی ژن‌های یادشده در سایت NCBI چک شد و توالی پرایمر در GENE BLAST تأیید و توسط شرکت کره‌ای Bioneer طراحی شد. پرایمرها مطابق جدول ۲ طراحی شد.

جدول ۱- برنامه دمایی مورد نیاز برای سنتز cDNA

Step	Temperature	Time
Primer annealing	Tm of specific primer	۱ Min
cDNA synthesis	۴۲-۷۰°C	۱۰-۶۰Min
Heat inactivation	۹۵°C	۵Min

جدول ۲- توالی ژن‌های مورد بررسی

Gene	Forward 5'→3'	Reverse 5'→3'
Vascular Endothelial Growth Factor A	CCT GCC TTG CTG CTC TAC C	CAC ACA GGA TGG CTT GAA G
B.actin	CCC GCC GCC AGC TCA CCA TGG	AAG GTC TCA AAC ATG ATC TGG GTC

ز- بررسی بیان ژن با استفاده از Real Time PCR

مراحل انجام real time PCR به‌منظور بررسی بیان ژن مورد بررسی به‌وسیله کیت Bioneer ساخت کره جنوبی و به نام تجاری Accu Power® 2X Greenstar qPCR Master Mix مطابق پروتوکل ۶ مرحله‌ای ضمیمه توسط دستگاه Applied Biosystems بررسی شد. براساس پروتوکل ابتدا Master Mix مواد تهیه و به میکروتیوپ‌های strip cap مخصوص دستگاه منتقل شد و در نهایت cDNA به آن اضافه گردید. برنامه دمایی براساس Tm پرایمرهای طراحی‌شده و منطبق بر ویژگی‌های مراحل مختلف واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمراز تعیین شد.

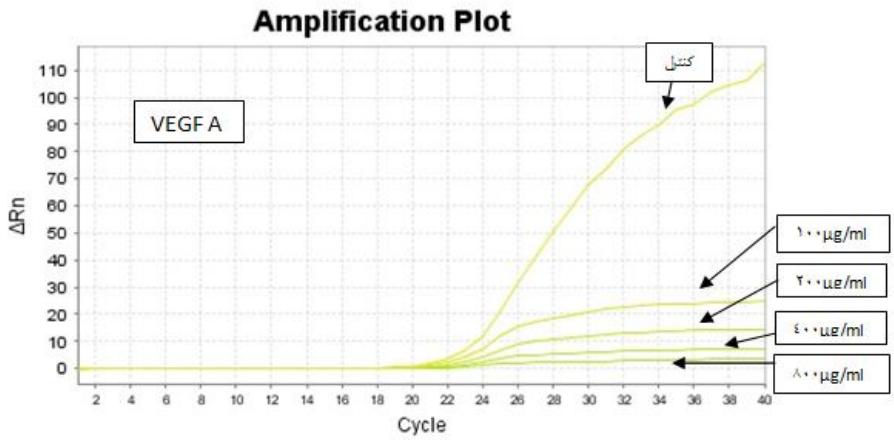
سطح بیان ژن VEGF-A در نمونه‌های تحت تیمار با عصاره آبی کلاله زعفران در مقایسه با نمونه کنترل توسط نرم‌افزار آماری SPSS 16 تحلیل شد. در آزمون فیشر P<۰/۰۵ و فاصله اطمینان ۹۵ درصد(Confidence Interval) به‌عنوان معناداری پذیرفته شد. پس از اتمام PCR خط آستانه توسط نرم‌افزار دستگاه Applied Biosystem تعیین گردید. تحلیل اطلاعات برای تعیین بازدهی ژن هدف پس از تهیه رقت‌های متوالی از ژن خانه‌دار (House Keeping Gene) به‌منظور تهیه نمودار استاندارد Ct انجام پذیرفت. میزان بیان ژن VEGF-A پس از ۴۸ ساعت از انکوباسیون سلول‌ها به‌وسیله غلظت‌های مختلف عصاره آبی زعفران

اندازه‌گیری شد. میزان بیان ژن مورد نظر با نمونه کنترل بدون تأثیر عصاره مذکور مورد مقایسه قرار گرفت.

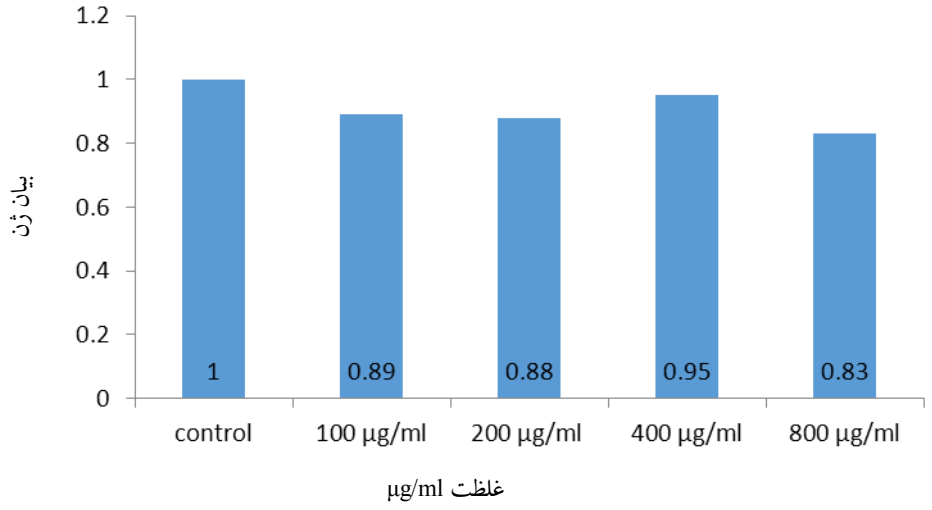
در این پژوهش آزمایشگاهی از کمیت‌سنجی نسبی (Relative Quantitative) که اساس آن بر مبنای نسبت بیان ژن هدف به ژن مرجع استوار است استفاده گردید که از طریق مقایسه کارایی (efficiency) ژن هدف به نمونه کنترل و اختلاف Ct می‌باشد. مقدار پرایمر و دمای مرحله اتصال پرایمر فاکتورهای اساسی در بهینه کردن واکنش Real Time PCR هستند. شرایط بهینه طوری فراهم گردید که بازدهی واکنش در بهترین حالت ممکن بوده و هیچ محصول غیراختصاصی در طول واکنش تولید نشود. این امر با استفاده از منحنی ذوب از طریق یک پیک منفرد و همچنین از طریق الکتروفورز محصولات در ژل آگاروز (با مشاهده یک باند واضح منفرد در اندازه موردنظر) قابل تأیید می‌باشد.

یافته‌ها

نتایج تست تریپان بلو زنده بودن ۹۵ درصد سلول‌های تحت بررسی را مشخص کرد و از این سلول‌ها در بخش‌های مختلف کار استفاده شد. منحنی تکثیر (amplification plot) تحت تیمار مختلف با عصاره آبی زعفران رسم شد (نمودار ۱). نتایج بررسی سلول‌های تیمارشده تحت اثر عصاره زعفران، تفاوت‌های بسیار بارز و وابسته به غلظت را نشان داد به‌طوری‌که به‌تدریج و با افزایش زمان و در دوزهای بالاتر تغییرات ناشی از گرانوله شدن واضح‌تر و مهار رشد سلول‌ها، تحلیل‌رفتگی سلولی و افزایش اندازه واکوئل، کاهش سیتوپلاسم و پیگمانته شدن هسته قابل مشاهده بود. از سوی دیگر با توجه به این‌که بازدهی واکنش PCR بین ژن هدف و ژن خانه‌دار (House Keeping Gene) مورد استفاده یعنی بتا اکتین یکسان بود، از مقایسه چرخه آستانه (CT) استفاده شد. در روش مقایسه چرخه آستانه در Real Time PCR مبتنی بر تغییرات چرخه آستانه نمونه‌های تحت تیمار با نمونه کنترل است که به کمک آن نسبت افزایشی یا کاهشی بیان ژن در مقایسه با نمونه کنترل (فاقد تیمار) مشخص می‌شود. نتایج بررسی‌های بیان ژنی نشان داد که کاهش معنادار در میزان بیان ژن VEGF-A تیمارشده با غلظت‌های ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰ و ۸۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نسبت به سلول‌های گروه کنترل دیده می‌شود به‌نحوی که بیشترین تغییرات کاهشی بیان ژن مربوط به بیشترین غلظت عصاره زعفران بود. کاهش بیان ژنی فاکتور رشد اندوتلیال عروق خونی در گروه‌های تحت تیمار با عصاره زعفران با غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نسبت به یکدیگر تفاوت معناداری نداشت (P>۰/۰۵)



نمودار ۱– منحنی تکثیر Real Time PCR مربوط به بیان ژن VEGF-A در نمونه کنترل در مقایسه با نمونه‌های تحت تیمار با عصاره آبی زعفران



نمودار ۲– بررسی میزان بیان ژن VEGF A پس از نرمالایز کردن نسبت به ژن بتااکتین

درحالی‌که نسبت به گروه کنترل کاهش نشان داد (P<۰/۰۵). از طرف دیگر کاهش بیان ژنی در گروه تیمارشده با عصاره آبی زعفران در بیشترین غلظت مورد استفاده یعنی ۸۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نسبت به گروه کنترل در سطح P<۰/۰۱ معنادار بود (نمودار ۲).

بحث

دستیابی به روش‌های پیش‌گیری و درمان سرطان‌ها و نیز شناسایی مکانیسم های دخیل در روند پیشرفت آن‌ها با توجه به گسترش این دسته از بیماری‌ها در سال‌های اخیر توسعه چشم‌گیری یافته است. نتایج تحقیقات مختلف نشان می‌دهد بازگشت مجدد به فراورده‌های طبیعی همچون گیاهان دارویی، محصولات دریایی و فراورده‌های حاصل از متابولیسم میکروارگانیسم‌ها در کنار استفاده از داروهای سنتتیک می‌تواند رویکرد مثبتی در خصوص کنترل و درمان طیف گسترده‌ای از بیماری‌ها از جمله سرطان‌ها باشد (۱۸). از آن‌جا که استفاده از زعفران و ترکیبات مؤثره آن شامل کروسین، کروستین و سافرانال به‌عنوان یک گیاه دارویی تیپیک با ویژگی‌های ضدسرطانی پیش‌تر به اثبات رسیده است و با توجه به این‌که تاکنون مقاله‌ای در خصوص ویژگی آنتی‌آنژیوژنیک این گیاه دارویی مطرح نشده است نویسندگان مقاله به بررسی مکانیسم‌های احتمالی آن از طریق بررسی میزان بیان ژن VEGF A (به‌عنوان بیومارکر ویژه رگزایی) در نمونه تحت تیمار با عصاره تام آبی زعفران با نمونه کنترل در سلول‌های سرطان پستان انسان به‌عنوان مدل مطالعه پرداختند.

نتایج به‌دست‌آمده در تحقیق حاضر نشان داد که استفاده از عصاره آبی کلاله زعفران در دوزهای یادشده منجر به کاهش بیان ژن VEGF A در نمونه‌های تیمارشده نسبت به نمونه شاهد می‌شود. این کاهش بیان ژن در غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نسبت به گروه کنترل معنادار بود. گرچه کاهش بیان ژن در این دو غلظت نسبت به یکدیگر تفاوت چشمگیری نشان نداد. در غلظت ۸۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر (بالاترین غلظت مورد استفاده) حداکثر کاهش بیان ژن دیده شد.

Das و همکاران وی در سال ۲۰۰۴ مکانیسم‌های پیشنهادی متعددی برای اثرات ضد توموری زعفران و اجزای آن شامل مهار اسید نوکلئیک، واکنش زنجیره‌ای رادیکال آزاد، اثر کارتنوئیدها بر توپوایزومراز ۲ و القای مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلول بیان کردند (۱۹). نتیجه تحقیقات انجام‌شده بیانگر این مطلب است که زعفران در مدل‌های سلولی مختلف بر روی طیف وسیعی از تومورها از جمله لوسمی، کارسینوم تخمدان و پستان،

آدنوکارسینوم روده بزرگ، رابدومیوسارکوما، پاپیلوما و کارسینوم سلول سنگفرشی، اثرات ضدسرطانی داشته است. زعفران در حالی‌که در دوزهای مؤثر در محدوده پایین و در حد میکرومولار بر سلول‌های بدخیم از جمله مجموعه سلول‌های سرطانی انسان اثر سایتوتوکسیک انتخابی داشته معمولاً قابلیت زیست سلول‌های سالم را تحت تأثیر قرار نداده است (۲۰). برخی مطالعات نشان داده است که عصاره تام زعفران دارای فعالیت آنتی‌توموری بر علیه سلول‌های HepG2 می‌باشد و دوز القاکننده مهار رشد در ۵۰ درصد سلول‌های تحت مطالعه ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر اعلام شده است. همچنین فعالیت ضدسرطانی عصاره تام زعفران علیه سرطان‌های القاشده توسط مواد شیمیایی به‌صورت درون‌تنی و نیز اثرات سایتوتوکسیک بر سلول‌های جداشده به‌صورت برون‌تنی گزارش شده است. زعفران ماده‌ای است که فعالیت‌های مهم متابولیکی نظیر ساخت DNA و RNA را در سلول‌های سرطان انسانی متوقف و مهار می‌کند (۲۱).

در خصوص بررسی بیان ژن‌های دخیل در آنژیوزنز به‌ویژه VEGF و مکانیسم عملکرد آن‌ها توسط فرآورده‌های طبیعی، گزارش‌های متنوعی وجود دارد. پژوهش‌های Xiao در سال ۲۰۰۸ نشان می‌دهد که مهار محور سیگنالینگ VEGF-VEGFR2-Akt مکانیسم اصلی اثرات ضد رگزایی گیاه z-guggulsterone است، به‌نظر می‌رسد این گیاه قادر باشد تا از خلال برهمکنش با عوامل رونویسی همچون NFkB، پروتئین ۱ و Sp-1 و مهار آن‌ها بر کاهش بیان ژن VEGF اثر گذارد (۲۲).

همچنین کاهش بیان ژن VEGF و کاهش رونویسی RNA مرتبط با فاکتورهای رونویسی c.fos و c.jun در رده سلول‌های سرطان پستان توسط عصاره چای سبز نشان می‌دهد که مهار پروتئین‌های متصل‌شونده به ناحیه پروموتور این ژن همچون AP-1 می‌تواند با اثرات آنتی‌آنژیوژنزی این گیاه و ترکیبات مؤثره آن مرتبط باشد (۲۳). از سوی دیگر نتایج پژوهش‌های انجام‌شده روی زعفران بیان‌گر این موضوع است که کارتنوئیدها و مونوترپن الدهیدهای زعفران با DNA میان‌کنش می‌دهد و از این طریق منجر به مهار رشد سلول‌های سرطانی روده بزرگ شامل HCT116، SW480 و HT29 می‌گردد در حالی‌که بر روی سلول‌های نرمال تأثیری مشاهده نشد (۲۴). لذا به‌نظر می‌رسد بخشی از پتانسیل آنتی‌آنژیوژنیک زعفران از طریق مسیر کاهش بیان ژن VEGF ناشی از برهمکنش با اسیدهای نوکلئیک و پروتئین‌ها و فاکتورهای رونویسی باشد.

مطالعات Choedon در سال ۲۰۱۱ در این خصوص نشان داد که کمپلکس گیاهی Thapring واجد ویژگی‌های ضدسرطانی است و این عملکرد از کاهش معنادار در بیان ژن VEGF و همچنین از طریق القای آپوپتوز در سلول‌ها و فعال ساختن کاسپاز، تغییر در نفوذپذیری غشای میتوکندری به‌منظور رهاسازی سیتوکروم C و کاهش بیان Bcl2 می‌باشد (۲۵).

این نتایج مشابه نتایج مطالعه حاضردر مورد اثرات زعفران بر رده سلول‌های سرطان پستان شامل گرانوله و واکوئوله شدن سیتوپلاسم و فراگمنته شدن هسته به‌عنوان مارکرهای مورفولوژیک القای مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلول به‌عنوان مکانیسم آنتی‌توموری عصاره زعفران است و می‌تواند مکانیسم احتمالی دخیل در کاهش بیان ژن VEGF را مشخص نماید.

عصاره Grape seed در سلول‌های سرطان پستان MDA-MB-231 و گلیومایی U251 واجد اثرات ضدسرطانی و ضد رگزایی از طریق مهار رونویسی و بیان ژن VEGF به‌وسیله کاهش پروتئین HIF-α از طریق بلوکه کردن فعالیت فسفریلاسیون Akt می‌باشد (۲۶). همچنین چای سبز و ترکیب اپی‌گالوکاتچین گالات از طریق مهار هیپوکسی و پروتئین HIF-1α منجر به کاهش معنادار بیان VEGF شده که این عملکرد از خلال بلوکه کردن فسفاتیدیل اینوزیتول ۳ کیناز/Akt و مسیرهای سیگنال‌دهی کینازی خارج سلولی و نیز فعالیت پروتئوزوم‌ها بر پروتئین HIF-1α می‌باشد (۲۷).

نتایج تحقیقات دیگر نیز مبین این موضوع است که سافرانال، اکسیژن‌رسانی بافتی را افزایش می‌دهد و همچنین دارای اثرات جمع‌کنندگی رادیکال‌های آزاد است و می‌تواند استرس اکسیداتیو ناشی از ترکیبات ژنوتوکسیک را مهار نماید (۲۸). از آن‌جا که میزان رگزایی با اکسیژن‌رسانی بافتی مرتبط است و هیپوکسی یکی از علل آغاز رگزایی به‌شمار می‌رود شاید ازدیاد اکسیژن‌رسانی حاصل از تیمار با زعفران و ماده مؤثره آن یعنی سافرانال و مهار فاکتورهای القاکننده هیپوکسی مرتبط با کاهش بیان ژن VEGF می‌تواند به‌عنوان یک مکانیسم احتمالی برای عملکرد آنتی‌آنژیوژنزی زعفران در سلول‌های تحت تیمار باشد.

همچنین اثر مهارکنندگی عصاره آبی زعفران بر رشد سلول‌های توموری مثانه (TCC) در غلظت‌های ۴۰۰ و ۸۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر گزارش شده است به‌نحوی‌که با گذشت زمان و با افزایش غلظت عصاره، درصد سلول‌های زنده کاهش یافته و پس از ۱۲۰ ساعت از تیمار کم‌تر از ۶۰ درصد سلول‌های L929 در غلظت ۸۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره زعفران زنده ماندند در حالی‌که در این زمان هیچ سلول توموری مثانه بقا نداشته‌اند (۲۹). این نتایج با یافته‌های پژوهش حاضر مبنی بر وجود اثرات ممانعت از تکثیر سلول و اثرات آنتی‌توموری و ضدرگزایی به‌صورت وابسته به زمان و غلظت منطبق است. پتانسیل تأثیرگذاری عصاره زعفران بر القا یا مهار بیان ژن‌ها تاکنون به‌صورت بسیار محدودی مورد بررسی قرار گرفته است. برخی پژوهشگران به مطالعه و ارزیابی سطح پروتئین‌های Bax در سلول‌های سرطان پستان تحت تیمار با عصاره زعفران و القای آپوپتوز پرداخته‌اند و نشان داده‌اند که عصاره زعفران واجد اثرات کاهش قابلیت حیات وابسته به غلظت و زمان در سلول‌های بدخیم بوده و با این حال اثری بر سلول‌های نرمال ندارد (۳۰). از سوی دیگر نتایج آزمایشات بر روی ویژگی القای آپوپتوز عصاره زعفران در سلول‌های هپاتوکارسینوما و سرویکس بیان‌گر اثرات سایتوتوکسیک این گیاه بوده و IC_{50} برای دو رده سلولی HepG2 و HeLa پس از ۴۸ ساعت به‌ترتیب ۹۵۰ و ۸۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر اعلام شده است (۳۱). نتایج در محدوده پژوهش حاضر با نتایج تحقیقات فوق هم‌راستا است و اثرات مهارکنندگی رشد سلول‌های سرطان پستان انسانی MCF_7 به‌صورت وابسته به غلظت و زمان توسط عصاره زعفران مشاهده شد.

از آن‌جا که در تحقیق حاضر عصاره آبی زعفران منجر به کاهش بیان ژن VEGF-A به‌عنوان یکی از مارکرهای مهم مسیر سیگنالینگ آنژیوژنز می‌شد. به‌نظر می‌رسد نتایج هم‌راستا با نتایج تحقیقات متعدد در ارتباط با سایتوتوکسیسیته و آثار ضدسرطانی زعفران است. تیمار سلول‌های سرطان پستان انسان (MCF_7) با زعفران احتمالاً از طریق القای مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلول و نیز مهار سنتز DNA و RNA و به تبع آن کاهش تقسیم سلولی در سلول‌ها از تکثیر سلولی و رگزایی ممانعت نموده و منجر به کاهش بیان ژن‌های دخیل در فرایند رگزایی گردد.

از آن‌جا که سرطان پستان یکی از شایع‌ترین بدخیمی‌ها است و اغلب سرطان‌های انسانی در نتیجه نقص در ارتباطات بیوشیمیایی و بیولوژیکی در سطح ملکولی سلول ایجاد می‌شود و از طرفی اطلاعات بسیار کمی درباره مکانیسم‌های کنترل‌کننده رشد سلول‌ها وجود دارد به‌نظر می‌رسد انجام آزمایشات دقیق با هدف شناسایی مکانیسم‌ها و مسیرهای ملکولی سرطان‌ها ضروری باشد (۷). گروه ژنی خانواده VEGF خانواده بزرگی از ژن‌های وابسته به یکدیگر هستند که در بسیاری از مسیرهای تمایزی همچون رشد و انشعاب آلوئول‌های تنفسی و جوانه‌های میزنایی کلیه اثر دارند. ضمناً اعضای این خانواده به‌ویژه VEGF-A، نقش‌های تحریکی متنوعی را در سلول سرطانی بر عهده دارند؛ پاسخ‌های سلولی نظیر تکثیر، مهاجرت و بیان پروتئین‌های آنتی‌آپوپتوزی از جمله فعالیت‌های ناشی از این ژن‌ها می‌باشد. علاوه بر این، فعالیت این دسته از ژن‌ها منجر به فعالسازی دسته دیگری از ژن‌ها می‌گردد که از طریق آبشار راه‌اندازی‌شده

مذکور، سلول سرطانی را قادر می‌سازد تا رگ‌های عملکردی خون‌رسان را به سوی خود جلب کرده و به تبع آن تغذیه و اکسیژن‌رسانی و رشد و تکثیر سلول‌های توموری امکان‌پذیر می‌گردد (۳۳). بهترین استراتژی مهار رگزایی در تومورها مهار لیگاندهای VEGF است و می‌تواند به‌عنوان هدف درمانی مؤثر برای درمان بسیاری از بدخیمی‌های شایع مورد توجه قرار گیرد (۳۴). کاهش بیان این دسته از ژن‌ها در سلول‌های سرطانی کشت شده در شرایط برون‌تنی تحت تیمار با عصاره آبی زعفران، می‌تواند بخشی از پتانسیل ضدسرطانی این گیاه دارویی را از خلال مسیرهای ضد رگزایی نشان دهد. لذا می‌توان نتیجه گرفت که احتمالاً عملکرد عصاره زعفران در خصوص ویژگی های ضدسرطانی با کاهش آنژیوژنز نیز می‌تواند مرتبط باشد.

نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه حاضر بیانگر اثرات کاهش‌دهنده آنژیوژنزی عصاره آبی زعفران از طریق اثر کاهش بر بیان ژن VEGF-A می‌باشد که می‌تواند کمکی به درک اثرات ضد توموری و آثار ضدسرطانی این گیاه دارویی باشد، هرچند مطالعات بیشتر و پژوهش‌های بالینی برای درک چگونگی عملکرد و شناسایی ترکیبات مؤثر در روند کاهش بیان این ژن ضروری است.

تشکر و قدردانی

از همکاران محترم گروه زیست‌شناسی و مرکز تحقیقات بیولوژی کاربردی تکوین جانوری دانشگاه آزاد اسلامی مشهد که در اجرای این طرح صمیمانه همکاری داشته‌اند سپاسگزاری می‌نماییم.

References

1. Kaefer CM, Milner JA. The role of herbs and spices in cancer prevention. J Nutr Biochem. 2008; 19(6): 347-61.
2. Abdullaev FI, Espinosa-Aguirre JJ. Biomedical properties of saffron and its potential use in cancer therapy and chemoprevention trials. Cancer Detect Prev. 2004; 28(6): 426-32.
3. Takashi O, Shinji S, Shigekazu, O, Hiroyuki T, Yukihiro S and Hiroshi S. Crocin prevent the death of PC-12 cells through sphingo myelinaseceramide signaling by increasing glutathione synthesis. Neurochemistry International. 2004; 44: 321-30.
4. Ochiai T, Shimeno H, Mishima K, Iwasaki K, Fujiwara M, Tanaka H, et al. Protective effects of carotenoids from saffron on neuronal injury invitro and invivo. Biochim Biophys Acta. 2007; 1770(4): 578-84.
5. Hosseinzadeh H, Sadeghnia H. Effect of safranal, a constituent of Crocus sativus (saffron), on methyl methanesulfonate (MMS)-induced DNA damage in mouse organs: An alkaline single-cell gel electrophoresis (comet) assay. DNA and Cell Biol. 2007; 26(12): 841-6.
6. 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.
7. Cristofanilli M, Broglio KR, Guarneri V, Jackson S, Fritsche HA, Islam R, et al. Circulating tumor cells in metastatic breast cancer biology staging beyond tumor burden. Clin Breast Cancer. 2007; 7(6): 471-9.
8. Onsory Kh, Ranapoor S. Breast cancer and the effect of environmental factors involved. New Cell Mol Biotech J. 2011; 1(4): 59-70
9. Kolahdoozan S, Sadjadi A, Radmard AR, Khademi H. Five common cancers in Iran. Arch Iran Med. 2010; 13(2): 143-6.
10. Folkman J. Fundamental concepts of the angiogenic process. Curr Mol Med. 2003; 3(7): 643-51.
11. Wu Y, Hooper AT, Zhong Z, Witte L, Bohlen P, Rafii S, et al. The vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR-1) supports growth and survival of human breast carcinoma. Int J Cancer. 2006; 119(7): 1519-29.
12. Mostafaie A, MohammadiMotlagh H, Mansori K. Angiogenesis and the models to study angiogenesis. J Yakhteh Med. 2009; 11(4): 381-79.
13. Hendrix M, Seftor E, Seftor R. Vasculogenic mimicry: angiogenesis in disguise. New Frontiers in Angiogenesis. 2006; 5: 97-109.
14. Breier G. Vasculogenesis. In: Unsicker K, Kriegistein K. Cell signaling and growth factors in development. Weinheim: Willey & Wang. 2006; 909-17.
15. Hoeben A, Landuyt B, Highley MS, Wildiers H, Van Oosterom AT, De Bruijn EA. Vascular endothelialgrowth factor and angiogenesis. Pharmacol Rev. 2004; 56(4): 549-80.
16. Martinez A. A new family of angiogenic factors. Cancer Lett. 2006; 236: 157-63.

17. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the $2^{\Delta CCT}$ methods. Methods. 2001; 25(4): 402-408.
18. 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.
19. Das I, Chakrabarty RN, Das S. Saffron can prevent chemically induced skin carcinogenesis in Swiss albino mice. Asian Pac J Cancer Prev. 2004; 5(1): 70-6.
20. Melnyk JP, Wang S, Marcone MF. Chemical and biological properties of the world's most expensive spice: saffron. Food Research International. 2010; 43(8): 1981-9.
21. Nejad Shahrokhabadi K, Tavakkol Afshari J, Rakhshandeh H, Barouk A. Study of cytotoxicity effect of total saffron extract on hepatocarcinoma cell line (HepG2). 2009; 19(3): 154-15.
22. Xiao DV, Singh S. z-Guggulsterone, a constituent of Ayurvedic medicinal plant Commiphora mukul, inhibits angiogenesis in vitro and in vivo. Mol Cancer Ther. 2008; 7(1): 171-80.
23. Sartippour MR, Shao ZM, Heber D, Beatty P, Zhang L, Liu C, et al. Green tea inhibits vascular endothelial growth factor (VEGF) induction in human breast cancer cells. J Nutr. 2002;132(8):2307-11.
24. Aung HH, Wang CZ, Ni M, Fishbein A, Mehendale SR, Xie JT, et al. Crocin from crocus sativus possesses significant anti proliferation effects on human colorectal cancer cells. Exp oncol. 2007; 29(3): 175-80.
25. Choedon T, Dolma D, Kumar V. Pro-apoptotic and anticancer properties of Thapring –A Tibetan herbal formulation. Journal of Ethnopharmacology . 2011; 137: 320-6.
26. Lu J, Zhang K, Chen S, Wen W. Grape seed extract inhibits VEGF expression via reducing HIF-1a protein expression. Carcinogenesis. 2009; 30(4): 636-44.
27. Zhang Q, Tang X, Yi Lu Q. Green tea extract and epigallocatechin-3-gallate inhibit hypoxia- and serum-induced HIF-1A protein accumulation and VEGF expression in human cervical carcinoma and hepatoma cells. Mol Cancer Ther. 2006; 5(5): 1227-38.
28. Holloway GM, Gainer JL.The carotenoid crocetin enhances pulmonary oxygenation. J Appl Physiol. 1988; 65(2): 683-6.
29. Feizzadeh B, Afshari JT, Rakhshandeh H, Rahimi A, Brook A, Doosti H. Cytotoxic effect of saffron stigma aqueous extract on human transitional cell carcinoma and mouse fibroblast. Urol J. 2008; 5(3): 161-7.
30. Mousavi SH, Tavakkol-Afshari J, Brook A, Jafari-Anarkooli I. Role of caspases and Bax protein in saffron-induced apoptosis in MCF-7 cells. Food and Chemical Toxicology. 2009; 47 (8): 1909-13.
31. Tavakol afshari J, Brook A, Mousavi SH. Study of cytotoxic and apoptogenic properties of saffron extract in human cancer cell lines. Food and Chemical Toxicology. 2008; 46: 3443-7.
32. Saharinen P, Eklund L, Pulkki K, Bono P. VEGF and angiopoietin signaling in tumor angiogenesis and metastasis. Trend in molecular medicine. 2011; 17(7): 347-62.
33. Tugues S, Koch S, Gualandi L, Li X. Vascular endothelial growth factor and receptor: anti angiogenic therapy in treatment of cancer. Molecular Aspects of Medicine. 2011; 32: 88-111.