

بررسی اثر کروسین بر بیان ژن اینترلوکین-۶ در رده‌ی سلولی گلیوبلاستوما‌ی انسانی

نوشین دلفان^۱، حمید گله‌داری^۲، علیرضا ملایری^۳

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: کروسین، ماده‌ی مؤثره‌ی زعفران از خانواده‌ی Iridaceae، گیاهی علفی است که در طب قدیم ایران بر اثرات ضد التهابی و ضد توموری آن تأکید شده است. گلیوبلاستوما، از بدخیم‌ترین سرطان‌های مقاوم به پرتودرمانی و شیمی‌درمانی در بزرگسالان می‌باشد. ارتباط بین سطوح بالای اینترلوکین-۶ و افزایش توان حمله و گسترش گلیوبلاستوما در مطالعات مختلف ثابت شده است. هدف از انجام این مطالعه، بررسی اثر ماده‌ی مؤثره‌ی زعفران، کروسین، بر بیان اینترلوکین-۶ در رده‌ی سلولی گلیوبلاستوما‌ی انسانی بود.

روش‌ها: رده‌ی سلولی گلیوبلاستوما‌ی انسانی، از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران خریداری و با غلظت‌های مختلف کروسین به مدت ۲۴ ساعت تیمار و تأثیر آن بر میزان بقای سلولی با استفاده از آزمایش MTT ارزیابی شد و IC50 (Half maximal inhibitory concentration) محاسبه گردید. سلول‌های کشت شده، با غلظت‌های ۵، ۱۰ و ۱۵ میلی‌مولار کروسین تیمار شدند. RNA استخراج و cDNA Complementary DNA ساخته شد و برای سنجش میزان بیان اینترلوکین-۶ به روش Real-time polymerase chain reaction (Real-time PCR) مورد استفاده قرار گرفت.

یافته‌ها: میزان IC50 کروسین معادل ۵۳/۳ میلی‌مولار به دست آمد و غلظت‌های ۵، ۱۰ و ۱۵ میلی‌مولار کروسین، به صورت معنی‌دار و وابسته به دز، سبب کاهش بیان اینترلوکین-۶ شد ($P < 0.05$).

نتیجه‌گیری: نتایج حاصل از این آزمایش، حاکی از اثر ضد التهابی و ضد توموری کروسین از طریق کاهش بیان اینترلوکین-۶ در محیط التهابی سلول‌های توموری گلیوبلاستوما می‌باشد. از این رو، کروسین می‌تواند به عنوان ماده‌ای سودمند در مطالعه‌ی سرطان گلیوبلاستوما مورد توجه قرار گیرد.

واژگان کلیدی: گلیوبلاستوما، اینترلوکین-۶، کروسین

ارجاع: دلفان نوشین، گله‌داری حمید، ملایری علیرضا. بررسی اثر کروسین بر بیان ژن اینترلوکین-۶ در رده‌ی سلولی گلیوبلاستوما‌ی انسانی. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۸؛ ۳۷ (۵۳۷): ۹۰۳-۹۰۹

مقدمه

گلیوما، شایع‌ترین و بدخیم‌ترین تومور آستروسیتوما است که سیستم عصبی مرکزی یعنی نخاع یا مغز را درگیر می‌کند. گلیوبلاستوما‌ی چند شکلی، یکی از کشنده‌ترین سرطان‌های انسانی است که میزان زنده ماندن بیمار، دو سال پس از تشخیص بیماری می‌باشد. این سرطان، با ناهمگونی قابل توجه سلولی، تهاجم گسترده به بافت مغز، رشد لجام گسیخته و عود اجتناب‌ناپذیر مشخص می‌شود. گلیوبلاستوما، با وجود به کارگیری درمان‌هایی نظیر جراحی، پرتودرمانی و شیمی‌درمانی، به طور تقریبی غیر قابل درمان است (۱).

منشأ گلیوبلاستوما، از سلول‌های آستروسیت است و ۲۰ درصد کل تومورهای داخل جمجمه‌ای و ۶۰ درصد تومورهای آستروسیتی را به خود اختصاص می‌دهد (۲). پژوهش‌های اخیر، عامل اصلی رخداد و پیشرفت بسیاری از بیماری‌های عصبی را ناکارآمدی ساز و کارهای تنظیم و کنترل پاسخ‌های التهابی در مغز می‌دانند (۳). التهاب عصبی، می‌تواند ناشی از آسیب به خود بافت مغزی باشد و یا توسط التهاب محیطی القا شود. این فرایند، با فعال شدن میکروگلیاها، تحریک آستروسیت‌ها، آسیب به سد خونی-مغزی و افزایش در نفوذپذیری آن، ورود سلول‌های ایمنی محیطی به بافت

۱- دانشجو، گروه ژنتیک، دانشکده‌ی علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

۲- استاد، گروه ژنتیک، دانشکده‌ی علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

۳- استادیار، گروه فارماکولوژی، دانشکده‌ی داروسازی و مرکز تحقیقات گیاهان دارویی خلیج فارس، دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور اهواز، اهواز، ایران

Email: noshindelfan@yahoo.com

نویسنده‌ی مسؤول: نوشین دلفان

شیمی درمانی می‌شوند (۲).

از آن جایی که گلیوبلاستوماها تومورهایی هستند که به لحاظ ریخت‌شناسی، فنوتیپ و ویژگی‌های ژنتیکی بسیار ناهمگونند و مرزهای بین بافت توموری و بافت سالم مجاور در این تومورها نامشخص است، برداشت کامل تومور غیر ممکن می‌باشد. از این رو، مقاومت بالای این تومورها به درمان‌های رایج، سبب نیاز به دستیابی به راه‌های جدید در کنار درمان‌های متداول گلیوبلاستوما شده است که می‌تواند راه‌گشایی در جهت بهبود وضعیت این بیماران باشد.

در سال‌های اخیر، طب سنتی و پتانسیل بالای آن در درمان بیماری‌ها به خصوص سرطان، توجه زیادی را به خود معطوف کرده‌است. از جمله محصولات گیاهی رایج و در دسترس با اثرات ضد توموری اثبات شده در برخی از سرطان‌ها، کروسین است که از ماده‌ی مؤثره‌ی زعفران به دست می‌آید.

گیاه زعفران، با نام علمی *L. sativus Crocus* از خانواده‌ی Iridaceae گیاهی علفی، بدون ساقه و پایا است. زعفران، کلاله‌های خشک شده‌ی گل گیاه زعفران است که اثرات فارماکولوژیک متعددی دارد (۱۱). زعفران، گران‌ترین ادویه‌ی سنتی و گیاه آن گران‌ترین گیاه کشت شده در جهان است. گیاه زعفران، جزء خانواده‌ی زنبقیان است. زعفران خشک شده، سال‌ها به عنوان چاشنی غذایی مورد استفاده قرار گرفته است (۱۲). ریشه‌ی کلمه انگلیسی زعفران از کلمه‌ی فرانسوی *Safran* است که خود از کلمه‌ی لاتین *Safranum* گرفته شده است (۱۳).

ارزش درمانی کلاله‌ی خشک شده‌ی زعفران به علت وجود سه متابولیت ثانویه‌ی اصلی به نام‌های کروسین محلول در آب (مونوگلوکوزیل یا دی‌گلوکوزیل پلی‌اناسترها) و مشتقات آن که مسئول رنگ قرمز زعفران هستند، پیکروکروسین (مونوترپن گلیکوزید پیش‌ساز سافرانال و محصول تجزیه‌ی زنازانتین) که مسئول طعم تلخ زعفران است و سافرانال که مسئول عطر و بوی زعفران است، می‌باشد (۱۴). تاکنون اثرات درمانی زیادی از زعفران در مطالعات دیده شده است که عمده‌ی این اثرات مفید را به خواص آنتی‌اکسیدانی و ضد التهابی عصاره‌ی زعفران و اجزای فعال تشکیل دهنده‌ی آن نسبت می‌دهند (۱۵).

با وجود این که مطالعات بسیاری اثرات زعفران و اجزای فعال آن را در پیش‌گیری و درمان سرطان بررسی کرده‌اند، اما همچنان مکانیسم دقیقی برای این اثرات تعیین نشده است. در مجموع، کروسین زعفران را عمده‌ترین ترکیب ضد سرطانی آن می‌دانند. به نظر می‌رسد کروسین این اثر را به واسطه‌ی تغییراتی در سطح ژن و القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی اعمال می‌کند (۱۶). در این پژوهش، به منظور بررسی خواص ضد التهابی و ضد توموری، اثر

مغزی، تولید بیش از حد سیئوکاین‌ها، نیتریک اکساید، گونه‌های فعال اکسیژن و همچنین، پروستاگلاندین‌ها و در نهایت، با آسیب و مرگ نورون‌ها مشخص می‌شود (۴). اینترلوکین‌ها، نقش مهمی در بیماری‌های التهابی و سرطان ایفا می‌کنند و سبب القای پاسخ‌های پیش تومورژنیک در گلیوبلاستوما می‌شوند (۵).

در بافت توموری گلیوبلاستوما، سطوح بالایی از اینترلوکین‌های التهابی شامل اینترلوکین-6 (IL-6) مشاهده شده است و مطالعات، حاکی از ارتباط بین سطوح بالای اینترلوکین-6 و افزایش توان حمله و گسترش گلیوبلاستوما می‌باشد. بر همین اساس، پژوهش‌های متعددی بر روی کاهش عملکرد اینترلوکین-6 در جهت کمک به درمان گلیوبلاستوما تمرکز کرده‌اند (۶). اینترلوکین-6، در پاسخ به تحریکات و عوامل خارجی و یا داخلی همچون جهش‌های آنکوژنی در سلول‌های بدخیم تولید می‌شود. مطالعات نشان دادند که موش‌های ترانسژنی که در آستروسیت‌های خود دارای نقص در عملکرد اینترلوکین-6 بودند، با وجود داشتن توانایی بیان آنکوژن SRC، نمی‌توانستند تومورهای گلیوبلاستوما را ایجاد نمایند (۷).

انتقال پیام اینترلوکین-6 با اتصال اینترلوکین-6 به کمپلکس گیرنده‌های هترومیری شامل گیرنده‌ی اینترلوکین-6 و گیرنده‌ی انتقال پیام عمومی گلیکوپروتئین ۱۳۰ انجام می‌شود. هر دو گیرنده، در بافت‌های گلیوبلاستوما و سلول‌های استمی مشتق شده از گلیوبلاستوما در سطوح بالایی بیان می‌شوند که خود شاهدی بر نقش اینترلوکین-6 در عملکرد سلول‌های توموری است (۸). اتصال اینترلوکین-6 و اینترلوکین-8 به کمپلکس IL-6/gp130 و *G-protein-coupled receptor* (GPCR) ها، سبب فسفریله و فعال شدن *Janus kinase 2* (JAK2) می‌شود و از این رو، منجر به فعال‌سازی سریع عامل رونویسی *Signal transducer and activator of transcription 3* (STAT3) می‌شود. بیماران مبتلا به گلیوبلاستوما پیشرفته، مقادیر بالاتری از STAT3 فعال نسبت به مبتلایان به درجات پایین‌تر تومورهای مغزی نشان دادند (۸، ۲). فعال شدن STAT3 به واسطه‌ی اینترلوکین-6، سبب پیشبرد حمله و مهاجرت در سلول‌های گلیوبلاستوما U251، T98G، U87MG می‌شود و با افزایش بیان و ترشح *Matrix metalloproteinase-2* (MMP-2) همراه است (۹). همچنین، اینترلوکین-6 آزاد شده از سلول‌های مجاور در میکروگلیاها، به شدت سبب تحریک حمله‌ی سلول‌های گلیوبلاستوما می‌شود (۱۰).

IL-6، IL-8، IL-1b، نقش شاخصی در کارسینوژنز از طریق مکانیسم‌های تریاد، مهاجرت و تهاجمی شدن بازی می‌کنند. همچنین، این اینترلوکین‌ها فعال کننده‌های بالقوه‌ی مسیرهای پیام‌رسانی هستند که تنظیم کننده‌ی بقای سلولی می‌باشند و سبب افزایش مقاومت به

RNA سلولی توسط RNeasy Mini Kit شماره‌ی کاتالوگ Cat No./ID: 74104 (ساخت شرکت Qiagen)، استخراج شد. ۵۰۰ نانوگرم از RNA استخراج شده از هر نمونه، توسط کیت PrimeScript 1st strand cDNA Synthesis ساخت شرکت Takara به Complementary DNA (cDNA) تبدیل شد. پرایمرهای نوکلئوتیدی جهت انجام واکنش Real-time polymerase chain reaction (Real-time PCR) برای ژن‌های بتا-اکتین به عنوان شاهد داخلی و اینترلوکین-۶ توسط نرم‌افزار اولیگو۷ طراحی و در نرم‌افزار Primer Blast، از اختصاصی بودن پرایمر اطمینان حاصل شد (جدول ۱). Real-time PCR با استفاده از SYBR Green PCR Master Mix (ساخت شرکت Takara)، ۱۰ پیکومول از پرایمرهای Forward و Reverse و ۱۰۰ نانوگرم/میکرولیتر از cDNA سنتز شده در مرحله پیشین برای هر واکنش در حجم نهایی ۱۵ میکرولیتر در شرایط آرایه شده توسط شرکت سازنده انجام شد. واکنش داده‌های Real-time PCR به روش CT $\Delta\Delta$ انجام شد. تمام نمونه‌ها، به سطوح کنترل داخلی بتا-اکتین نرمالیزه شدند. تمام اندازه‌گیری‌ها به صورت سه بار تکرار انجام شد. اختلاف آماری با استفاده از نرم‌افزار GraphPad Prism 8.0 و آزمون One-way ANOVA (Parametric) محاسبه و $P < 0/05$ به عنوان سطح معنی‌داری تفاوت‌ها در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

اثر کشندگی غلظت‌های ۸۰-۰ میلی‌مولار کروسین بر روی سلول‌های 1321N1 توسط آزمون MTT بررسی شد. همان‌طور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود، میزان بقای سلول‌ها با افزایش غلظت کروسین کاهش یافت؛ به طوری که در غلظت ۵۳/۳ میلی‌مولار، ۵۰ درصد سلول‌ها توانایی زیستی خود را از دست دادند و در غلظت ۶۰ میلی‌مولار میزان زیست‌پذیری سلولی به ۳۳ درصد کاهش یافت و در غلظت ۸۰ میلی‌مولار به نزدیک صفر رسید.

کروسین بر بیان ژن اینترلوکین-۶ در سلول‌های گلیوبلاستومای انسانی مورد بررسی قرار گرفت.

روش‌ها

رده‌ی سلولی گلیوبلاستومای انسانی 1321N1، از بانک سلولی انسیتیو پاستور ایران خریداری و در محیط کشت انستیتیو Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) دارای Fetal bovine serum (FBS) ۱۰ درصد (Gibco, UK)، ۱۰۰ واحد/میلی‌لیتر پنی‌سیلین و استرپتومایسین (Gibco, UK) در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد، رطوبت ۹۵ درصد و CO₂ ۵ درصد در فلاسک کشت داده شد.

در مرحله‌ی بعد، جهت بررسی اثرات سیتوتوکسیک کروسین بر سلول‌های 1321N1 و محاسبه‌ی Half maximal inhibitory concentration (IC₅₀)، آزمون 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5- diphenyltetrazolium bromide (MTT) به صورت ۳ بار تکرار انجام شد (۱۷)؛ بدین ترتیب که در هر خانه از پلیت ۹۶ خانه‌ای، ۷۰۰۰ سلول کاشته شد و پس از ۲۴ ساعت و کسب اطمینان از چسبیدن سلول‌ها به کف چاهک‌ها، محیط سلول‌ها با ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت دارای غلظت‌های ۸۰-۰ میلی‌مولار کروسین تعویض شد و ۲۴ ساعت پس از تیمار ۲۰ میکرولیتر MTT حل شده در PBS) Phosphate buffered saline) با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم/میلی‌لیتر به هر چاهک اضافه شد و پس از ۴ ساعت انکوبه شدن در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد، رطوبت ۹۵ درصد و CO₂ ۵ درصد، به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر Dimethyl sulfoxide (DMSO) اضافه گردید. در نهایت، جذب ۵۷۰ نانومتر با طول موج رفرنس ۶۳۰ نانومتر توسط دستگاه خوانش میکروپلیت BIO-INTELLECTICA خوانده شد و IC₅₀ با استفاده از نرم‌افزار Excel برابر با ۵۳/۳ میلی‌مولار محاسبه گردید. سلول‌های گلیوبلاستوما در پلیت‌های ۶ خانه‌ای کشت داده شد و با غلظت‌های ۱۰ و ۱۵ میلی‌مولار کروسین به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد.

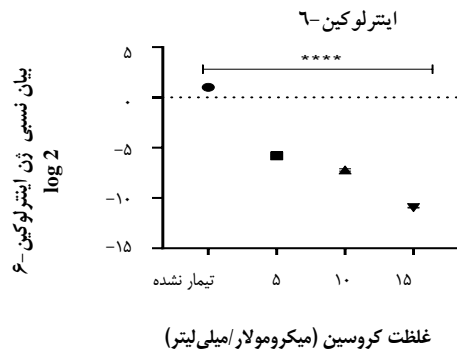
جدول ۱. مشخصات پرایمرهای به کار رفته در Real-time polymerase chain reaction (Real-time PCR)

| پرایمر | طول محصول (جفت‌باز) | %GC | دمای ذوب (درجه‌ی سانتی‌گراد) | طول (جفت‌باز) | توالی |
|---------------|---------------------|-------|------------------------------|---------------|--|
| بتا-اکتین F | ۱۰۳ | ۳۸/۵۲ | ۶۰/۵۵ | ۲۱ | 5'-GA GCA TCCCCA AA GTTCA CA-3' |
| بتا-اکتین R | | ۳۸/۵۲ | ۶۰/۵۴ | ۲۱ | 5'-GGGA CTT CCTGTAA CA A CGCA-3' |
| اینترلوکین F6 | ۱۴۲ | ۳۸/۵۲ | ۶۰/۶۰ | ۲۱ | 5'-GTGTGA AA GCA GCAA GA GGC-3' |
| اینترلوکین R6 | | ۴۴ | ۶۰/۹۲ | ۲۱ | 5'-TA CCTCA AA CT CCA AAAAGA CCAAGT-3' |

جدول ۲. واکاوی داده‌های ژن اینترلوکین-6 در نمونه‌های تیمار شده با کروسین

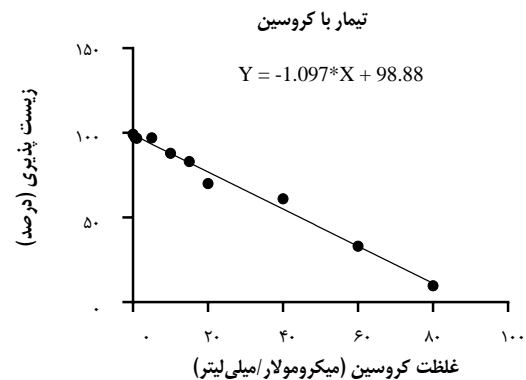
| نمونه‌ها | بتا-اكتين Ct | اینترلوکین-6 | ΔCt | $\Delta\Delta Ct$ | $2^{-\Delta\Delta Ct}$ | $-\Delta\Delta Ct$ |
|--------------------------------|--------------|--------------|-------------|-------------------|------------------------|--------------------|
| شاهد | ۱۰/۶۵۲۲۷۶ | ۲۰/۱۲۹۱۵۴ | ۹/۴۷۶۸۷۸ | ۰ | ۱ | ۰ |
| کروسین ۵ میکرومولار/میلی لیتر | ۱۲/۵۰۲۲۴ | ۲۷/۸۰۴۳۲۵ | ۱۵/۳۰۲۰۸۵ | ۵/۸۲۵۲۰۷ | ۰/۰۱۷۶۳۷۵ | -۵/۸۲۵۲۰۷ |
| کروسین ۱۰ میکرومولار/میلی لیتر | ۱۱/۰۵۳۶۸۴ | ۲۷/۸۶۲۹۹ | ۱۶/۸۰۹۳۰۶ | ۷/۳۳۲۴۲۸ | ۰/۰۰۰۶۲۰۴۷ | -۷/۳۳۲۴۲۸ |
| کروسین ۱۵ میکرومولار/میلی لیتر | ۱۱/۶۱۱۳۸۴ | ۳۲/۰۴۸۲۱۸ | ۲۰/۴۳۶۸۳۴ | ۱۰/۹۵۹۹۵۶ | ۰/۰۰۰۵۰۲ | -۱۰/۹۵۹۹۹۵ |

داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار سه بار تکرار گزارش شده‌اند...



شکل ۲. مقایسه‌ی میانگین بیان ژن اینترلوکین-6 در سلول‌های

گلیوبلاستوماى تیمار شده با کروسین ($P < 0/001$)



شکل ۱. اثر کروسین بر زیست پذیری سلول‌های گلیوبلاستوماى انسانی

بحث

با وجود پیشرفت‌های گسترده در حیطه‌ی پزشکی و درمان، سرطان همچنان دومین علت مرگ و میر به حساب می‌آید. از این رو، همواره نیاز به یافتن راه‌های درمانی جدید و داروهای با اثرات جانبی حداقل در کنار روش‌های درمانی موجود احساس می‌شود (۱۸). از طرفی، گیاهان دارویی به دلیل اثرات جانبی کم و در دسترس بودن، توجه زیادی را به خود معطوف کرده‌اند و تحقیقات روزافزونی در زمینه‌ی اثرات درمانی آن‌ها انجام شده است. در مطالعه‌ی اخیر، تأثیر ماده‌ی مؤثره‌ی زعفران، کروسین، بر سلول‌های سرطان گلیوبلاستوما مورد بررسی قرار گرفت. در زمینه‌ی بررسی اثر سمیت سلولی کروسین بر سلول‌های توموری مختلف، مطالعاتی انجام شده است. محققین، اثر چهار ترکیب عمده‌ی زعفران (کروسین، کروسیتین، پیکروکروسین و سافرانال) را در سلول‌های HeLa^ی کارسینوماى گردن رحم بررسی کرده‌اند. در این بین، کروسین بهترین اثر را داشته است و از این رو، کروسین مهم‌ترین ترکیب ضد سرطان زعفران گزارش شد (۱۹).

پس از تیمار سلول‌ها با غلظت‌های ۵، ۱۰ و ۱۵ میلی‌مولار کروسین به مدت ۲۴ ساعت، RNA استخراج شد و در بررسی اسپکتروفتومتری، نسبت جذب ۲۶۰/۲۸۰ آن بین ۲-۱/۸ به دست آمد که نشان دهنده‌ی خلوص RNA و عدم آلودگی آن با پروتئین می‌باشد. پس از سنتز cDNA و سنجش بیان اینترلوکین-6 در مقابل بتا-اكتين، داده‌های حاصل از Real-time PCR به روش $\Delta\Delta Ct$ با استفاده از نرم‌افزار Excel واکاوی شد (جدول ۲) و نمودار میانگین بیان اینترلوکین-6 در نمونه‌های تیمار شده در مقایسه با نمونه‌ی شاهد رسم شد (شکل ۲). آزمون One-way ANOVA پارامتریک با استفاده از نرم‌افزار GraphPad Prism 8.0 نشان داد که میانگین بیان ژن اینترلوکین-6 در رده‌ی سلولی 1321N1 تیمار شده با کروسین نسبت به نمونه‌ی شاهد در حالت وابسته به دز کاهش معنی‌داری یافته است و بیشترین کاهش مربوط به غلظت ۱۵ میکرومولار می‌باشد ($P < 0/001$) (جدول ۳).

جدول ۳. بررسی سطح معناداری گروه‌ها نسبت به کنترل با استفاده از آزمون Uncorrected Fisher's LSD برای ژن IL-6

| جدول ANOVA | SS | df | MS | F (DFn, DFd) | مقدار P | R square |
|--------------|-------|----|-------|--------------------------|-----------|----------|
| اینترلوکین ۶ | ۲۲۴/۵ | ۳ | ۷۴/۸۴ | F (1/۶۰۴, ۳/۲۰۸) = ۱۰۶۸۶ | P < 0/001 | 0/۹۹۹۸ |

دانست و کاهش بیان و عملکرد اینترلوکین-6 را به عنوان یک رویکرد درمانی در سرطان گلیوبلاستوما مطرح نمود و در حال حاضر، تلاش برای یافتن داروهای مسدود کننده مسیرهای پایین دست اینترلوکین-6 جهت کمک به درمان سرطان بسیار رایج است. نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان داد که هر سه غلظت کروسین به طور معنی داری ($P < 0/050$) توانایی کاهش بیان اینترلوکین-6 را نسبت به گروه شاهد داشته است. در غلظت 5 میلی-مولار، بیان اینترلوکین-6 به میزان 98/2 درصد نسبت به نمونه‌ی شاهد کاهش معنی دار نشان داد. در غلظت‌های 10 و 15 میلی-مولار، کاهش بیان اینترلوکین-6 نسبت به نمونه‌ی شاهد بیش از 99 درصد مشاهده شد و معنی دار بود.

بر طبق نتایج به دست آمده از این پژوهش و همگام با نتایج به دست آمده از مطالعات پیشین، تیمار رده‌ی سلولی گلیوبلاستوما ی انسانی با کروسین سبب کاهش بیان معنی دار اینترلوکین-6 می‌شود. از این رو، می‌توان آن را به عنوان کاندیدایی جهت ساخت داروهای جدید در زمینه‌ی درمان گلیوبلاستوما دانست و به طور کلی، می‌توان در زمینه‌ی درمان سرطان‌هایی که با افزایش بیان اینترلوکین-6 و مسیرهای پایین دست آن همراه هستند، استفاده از ترکیبات کروسین را به عنوان یکی از اهداف کمک درمانی در کنار داروهای کنونی مطرح نمود.

تشکر و قدردانی

این مقاله، برگرفته از پایان‌نامه‌ی مصوب دانشگاه شهید چمران اهواز به شماره‌ی 9318901 می‌باشد که تحت حمایت مالی و در گروه ژنتیک این دانشگاه انجام شد. بدین وسیله از همکاران جهت تأمین مالی و همکاری در اجرای مطالعه سپاسگزاری می‌گردد.

اثرات درمان طولانی مدت با کروسین، بر رشد تومور و طول عمر موش‌های صحرایی دارای تومور کولورکتال القا شده با تزریق زیر پوستی سلول‌های آدنوکارسینوما، بررسی شده است. درمان با کروسین، به طور معنی داری بقای این موش‌ها را افزایش داد و میزان رشد تومور را به خصوص در جنس ماده کاهش داد. بنابراین، کروسین اثر سیتوتوکسیک قوی علیه سلول‌های آدنوکارسینوما ی k12/DHD و HT-29 دارد (20).

در مطالعه‌ی دیگری، دیده شده است که کروسین به طور معنی داری رشد سه لایه از سلول‌های سرطان کولورکتال (HCT-116, SW-480 و HT-29) را مهار می‌کند و کاربرد درمانی دارد (21).

بررسی‌ها نشان داد که فقدان و یا میزان پایین اینترلوکین-6 در میکرومحیط توموری، سبب افزایش بازدهی ایمنی درمانی در سرطان‌ها می‌شود (22). در خون و مایع مغزی-نخاعی بیماران مبتلا به گلیوبلاستوما در مقایسه با نمونه‌های شاهد، میزان بالاتری از اینترلوکین-6 مشاهده می‌شود و این میزان، با افزایش درجه‌ی بدخیمی تومور، افزایش می‌یابد. همچنین، مشاهده شد که با افزودن اینترلوکین-6 به رده‌های سلولی گلیوبلاستوما، میزان حمله‌ی سلول‌های توموری افزایش می‌یابد (8).

در مطالعه‌ی دیگری نشان داده شد که غیر فعال کردن اینترلوکین-6 یا گیرنده‌ی اینترلوکین-6 توسط RNAهای کوتاه سنجاق سری در سلول‌های بنیادی رده‌ی سلولی گلیوبلاستوما، سبب کاهش تهاجم سلول‌ها و افزایش آپوپتوز می‌شود که این اتفاقات، از طریق کاهش عملکرد عامل پایین دست اینترلوکین-6 یعنی STAT3 واسطه‌گری می‌شوند (7). بر همین اساس، می‌توان میزان بیان بالای اینترلوکین-6 را عامل کلیدی در تهاجم و بدخیمی گلیوبلاستوما

References

1. Pourganji M, Hosseini M, Soukhtanloo M, Zabihi H, Hadjzadeh MA. Protective role of endogenous ovarian hormones against learning and memory impairments and brain tissues oxidative damage induced by lipopolysaccharide. *Iran Red Crescent Med J* 2014; 16(3): e13954.
2. Yeung YT, McDonald KL, Grewal T, Munoz L. Interleukins in glioblastoma pathophysiology: Implications for therapy. *Br J Pharmacol* 2013; 168(3): 591-606.
3. Saavedra JM. Angiotensin II AT(1) receptor blockers as treatments for inflammatory brain disorders. *Clin Sci (Lond)* 2012; 123(10): 567-90.
4. Bargi R, Salmani H, Asgharzadeh Yazdi F, Hosseini M. Inflammation and the brain disorders: A review. *Shefaye Khatam* 2017; 5(3): 68-82. [In Persian].
5. Snoussi K, Mahfoudh W, Bouaouina N, Ahmed SB, Helal AN, Chouchane L. Genetic variation in IL-8 associated with increased risk and poor prognosis of breast carcinoma. *Hum Immunol* 2006; 67(1-2): 13-21.
6. Shan Y, He X, Song W, Han D, Niu J, Wang J. Role of IL-6 in the invasiveness and prognosis of glioma. *Int J Clin Exp Med* 2015; 8(6): 9114-20.
7. Krohn K, Rao MS, Raman NV, Khalilullah M. High-performance thin layer chromatographic analysis of anti-inflammatory triterpenoids from *Boswellia serrata* Roxb. *Phytochem Anal* 2001; 12(6): 374-6.
8. Weissenberger J, Loeffler S, Kappeler A, Kopf M, Lukes A, Afanasieva TA, et al. IL-6 is required for glioma development in a mouse model. *Oncogene* 2004; 23(19): 3308-16.
9. Liu Q, Li G, Li R, Shen J, He Q, Deng L, et al. IL-6 promotion of glioblastoma cell invasion and angiogenesis in U251 and T98G cell lines. *J*

- Neurooncol 2010; 100(2): 165-76.
10. Zhang J, Sarkar S, Cua R, Zhou Y, Hader W, Yong VW. A dialog between glioma and microglia that promotes tumor invasiveness through the CCL2/CCR2/interleukin-6 axis. *Carcinogenesis* 2012; 33(2): 312-9.
 11. Liakopoulou-Kyriakides M, Kyriakidis DA. Croscus sativus-biological active constituents.. *Studies in Natural Products Chemistry Bioactive Natural Products* 2002; 26, Part G: 293-312.
 12. Gohari AR, Saeidnia S, Mahmoodabadi MK. An overview on saffron, phytochemicals, and medicinal properties. *Pharmacogn Rev* 2013; 7(13): 61-6.
 13. Kamalipour M, Akhondzadeh S. Cardiovascular effects of saffron: An evidence-based review. *J Tehran Heart Cent* 2011; 6(2): 59-61.
 14. Melnyk JP, Wang S, Marcone MF. Chemical and biological properties of the world's most expensive spice: Saffron. *Food Res Int* 2010; 43(8): 1981-9.
 15. Assimopoulou AN, Sinakos Z, Papageorgiou VP. Radical scavenging activity of *Crocus sativus* L. extract and its bioactive constituents. *Phytother Res* 2005; 19(11): 997-1000.
 16. Lee BM, Park KK. Beneficial and adverse effects of chemopreventive agents. *Mutat Res* 2003; 523-524: 265-78.
 17. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; 65(1-2): 55-63.
 18. Forouzandeh S, Naghsh N, Salimi S, Jahantigh D. Cytotoxic effect of *Boswellia serrata* hydroalcoholic extract on human cervical carcinoma epithelial cell line. *Med Lab J* 2014; 8(1): 7-13. [In Persian].
 19. Escribano J, Alonso GL, Coca-Prados M, Fernandez JA. Crocin, safranal and picrocrocin from saffron (*Crocus sativus* L.) inhibit the growth of human cancer cells in vitro. *Cancer Lett* 1996; 100(1-2): 23-30.
 20. Garcia-Olmo DC, Riese HH, Escribano J, Ontanon J, Fernandez JA, Atienzar M, et al. Effects of long-term treatment of colon adenocarcinoma with crocin, a carotenoid from saffron (*Crocus sativus* L.): An experimental study in the rat. *Nutr Cancer* 1999; 35(2): 120-6.
 21. 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.
 22. Ohno Y, Toyoshima Y, Yurino H, Monma N, Xiang H, Sumida K, et al. Lack of interleukin-6 in the tumor microenvironment augments type-1 immunity and increases the efficacy of cancer immunotherapy. *Cancer Sci* 2017; 108(10): 1959-66.

The Effect of Crocin on Expression of Interleukin 6 in Human Glioblastoma Cell Line

Nooshin Delfan¹, Hamid Galehdari², Alireza Malayeri³

Original Article

Abstract

Background: Crocin is one of the most important ingredients of saffron (the Iridaceae family) that has been emphasized in Iranian traditional medicine for its anti-inflammatory and anti-tumor effects. Glioblastoma is one of the most malignant cancers resistant to radiation and chemotherapy in adults. The goal of the present study was to investigate the effect of crocin on expression of interleukin 6 (IL-6) in human glioblastoma cell line.

Methods: Human glioblastoma cell line (1321N1) was purchased from Pasteur Institute of Iran. Cell was grown in Dulbecco's modified essential media (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS). The half-maximal inhibitory concentration (IC₅₀) value of crocin was obtained using MTT assay. Glioblastoma cell line was treated by different concentrations of crocin (5, 10, 15 mM/ml) for 24 hours. Then, total RNA was isolated from cells and used for cDNA synthesis. Expression level of IL-6 was assessed using real-time polymerase chain reaction (real-time PCR).

Findings: The IC₅₀ value of crocin against 1321N1 cells after 24 hours were determined as 53.3 mMol/ml. Moreover, the expression of IL-6 gene was downregulated by increasing of crocin concentration compared to the control group ($P < 0.05$).

Conclusion: It was observed that crocin inhibited production of IL-6 in glioblastoma cells. In conclusion, the result suggested crocin as a potential therapeutic candidate for neuroinflammation in glioblastoma cancer.

Keywords: Glioblastoma, Interleukin-6, Crocin

Citation: Delfan N, Galehdari H, Malayeri A. **The Effect of Crocin on Expression of Interleukin 6 in Human Glioblastoma Cell Line.** J Isfahan Med Sch 2019; 37(537): 903-9.

1- Student, Department of Genetics, School of Sciences, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

2- Professor, Department of Genetics, School of Sciences, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

3- Assistant Professor, Department of Pharmacology, School of Pharmacy AND Medicinal Plant Research Center, Ahvaz Jundishapur University of Medical sciences, Ahvaz, Iran

Corresponding Author: Nooshin Delfan, Email: noshindelfan@yahoo.com