Archive of SID

مجلـه‌ی علمـی، پژوهشـی دانشـگاه علـوم پزشـکی زنجـان
دوره‌ی ۲۵، شمـاره‌ی ۱۱۱، مهـر و آبان ۱۳۹۶، صفحات ۱۵ تا ۲۸

بررسی اثر عصاره‌ی روغنی بذر سیاه دانه (*N. sativa*) بر بقا، بیان ژن VEGF-A و آپوپتوز در رده‌ی سلولی سرطانی معده AGS(CRL-1739)

محسن رشید شیخ احمد[۱]، دکتر فرزانه صابونی[۲]، دکتر فروغ سنجریان[۳]

نویسنده‌ی مسئول: دپارتمان بیوتکنولوژی گیاهی، بخش زیست فرآورده‌های گیاهی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران fsanjarian@nigeb.ac.ir

دریافت: ۹۵/۴/۳ پذیرش: ۹۵/۸/۹

چکیده

زمینه و هدف: *سرطان یکی از بیماری‌های شایع در دنیا می‌باشد که به دلیل عوامل محیطی و ژنتیکی رخ می‌دهد. سرطان معده از جمله سرطان‌های شایع در دنیا و ایران است. گیاه سیاه دانه که دارای متابولیت‌های ثانویه ارزشمندی مانند تایموکوئینون است، از سالیان دور به‌عنوان دارو در بسیاری از بیماری‌ها استفاده می‌شده است. هدف از این مطالعه بررسی خواص ضد سرطانی عصاره‌ی بذر سیاه‌دانه بر روی رده‌ی سلولی سرطان معده و پتانسیل بالقوه روغن بذر گیاه جهت استفاده دارویی بود.*

روش بررسی: *ابتدا رده سلولی سرطانی معده AGS(CRL-1739) کشت داده شد، و با غلظت‌های مختلف از عصاره روغنی بذر سیاه دانه جنس N.sativa در زمان بهینه ۲۴ ساعت تیمارگردید. سپس تاثیرات سمی بودن و کشندگی عصاره توسط تست MTT، تست آپوپتوز القایی با رنگ‌آمیزی به وسیله کیت Annexin V و دستگاه فلوسایتومتری و در نهایت بررسی بیان ژن VEGF-A در سلول‌های تیمار شده با استفاده تکنیک Real-Time PCR انجام شد.*

یافته‌ها: *نتایج به دست آمده از این مطالعه نشان داد که عصاره‌ی بذر سیاه دانه تکثیر سلول‌های سرطانی را به‌طور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل کاهش می‌دهد ($P\leq$۰/۰۰۵). درصد سلول‌های در مرحله آپوپتوز زودرس در سلول‌های سرطانی تیمار شده با غلظت (تایموکوئینون ۳۹ میکرومول) ۱/۵ میکرولیتر به‌طور معنی‌داری (۰/۰۵$\geq P\geq$۰/۰۱) افزایش می‌یابد. ولی تیمار با این عصاره تاثیری بر افزایش یا کاهش میزان بیان ژن VEGF-A را نشان نداد ($P\geq$۰/۰۵).*

نتیجه گیری: *عصاره‌ی روغنی بذر سیاه دانه می‌تواند بر روی کاهش تکثیر و افزایش آپوپتوز سلولی در سلول‌های سرطانی موثر باشد.*

واژگان کلیدی: رده سلولی AGS، سرطان معده، سیاه‌دانه، رگ زایی، آپوپتوز

مقدمه

سرطان گروهی از بیماری‌ها را شامل می‌شود که مشخصه آن‌ها رشد سلولی تنظیم‌نشده، تهاجم و انتشار سلول‌ها از جایگاه اصلی یا مکان اولیه به نقاط دیگر بدن می‌باشد. در اکثر منابع سرطان به‌عنوان گروهی از بیماری‌ها مطرح می‌شود

۱- کارشناس ارشد علوم سلولی مولکولی، بخش زیست فرآورده‌های گیاهی، گروه بیوتکنولوژی گیاهی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران
۲- دکترای تخصصی بیوشیمی، استادیار بخش پزشکی مولکولی، گروه بیوتکنولوژی پزشکی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران
۳- دکترای تخصصی علوم سلولی مولکولی، استادیار بخش زیست فرآورده‌های گیاهی، گروه بیوتکنولوژی گیاهی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران

Downloaded from zums.ac.ir at 9:57 IRDT on Wednesday June 7th 2017

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from zums.ac.ir at 9:57 IRDT on Wednesday June 7th 2017

(۱). در پژوهشی که توسط هاناهن و وینبرگ در سال ۲۰۰۰ انجام شد، شش علامت اصلی اکثر سرطان‌ها را مشخص کردند. آن‌ها پیشنهاد کردند که کسب توانایی ایجاد پیام‌های رشد خودمختار، فرار از پیام‌های مهاری رشد، گریز از مرگ سلولی آپوپتوزی، توان همانندسازی نامحدود، رگ‌زایی (تشکیل رگ‌های خونی جدید، آنژیوژنز)، تهاجم و متاستاز برای سرطان‌ها ضروری هستند (۱).

سرطان عامل اصلی مرگ و میر در کشورهای توسعه یافته و دومین عامل مرگ در کشورهای در حال توسعه می‌باشد (۲). بنابر اعلام سازمان بهداشت جهانی در سال ۲۰۰۸ از حدود ۱۲/۷ میلیون بیمار سرطانی تخمین زده شده، ۷/۶ میلیون بیمار جان خود را از دست داده‌اند (۱۳ درصد کل مرگ‌ها) و انتظار می‌رود این میزان با توجه به افزایش جمعیت و بالا رفتن میانگین سنی با روند افزاینده‌ای به حدود ۱۳/۱ میلیون نفر در سال ۲۰۳۰ میلادی برسد. سرطان‌های ریه، معده، کبد، کولون، سینه و پروستات بیشترین میزان مرگ در اثر سرطان را سالیانه به خود اختصاص می‌دهند (۳). سرطان معده یکی از شایع‌ترین سرطان‌ها می‌باشد و از لحاظ شیوع در مردان در رتبه‌ی چهارم و در زنان در رتبه‌ی پنجم قرار دارد. این سرطان یکی از مرگ آورترین سرطان‌ها می‌باشد به‌طوری که ۷۵ درصد از مبتلایان به این سرطان جان خود را از دست می‌دهند (۳).

تشکیل عروق خونی جدید از سلول‌های قدیمی (Pre-Existing) طی پروسه‌ی فیزیولوژیکی پیچیده‌ای به نام رگ‌زایی، صورت می‌گیرد (۴). این پروسه شامل فعل و انفعالاتی بین سلول‌ها، فاکتورهای محلول و ماتریکس خارج سلولی می‌باشد که در نهایت باعث تکثیر و مهاجرت سلول‌های اندوتلیالی می‌شود (۴). به‌طور مشخص پروسه‌های فیزیولوژیکی طبیعی به‌منظور ترمیم زخم‌ها و تشکیل بافت‌ها نیازمند فرایند رگ‌زایی می‌باشند (۵). همچنین فرایند رگ‌زایی نقش مهمی در فرایند تکامل و تبدیل تومورهای اولیه به تومورهای بدخیم دارد (۵و ۴) و ارتباط بین رگ زایی و بسیاری از بیماری‌های انسانی مانند رشد تومور، متاستاز و التهاب به اثبات رسیده است (۴).

بیان بیش از حد فاکتورهای رشد مختلف، به ویژه فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (VEGF)، فاکتورهای رشد فیبروبلاستی پایه (bFGF) و فاکتور رشد انتقالی آلفا (TGF-α) به‌عنوان تحریک کننده‌های رگ‌زایی عنوان شده‌اند. این فاکتورها از سلول‌های سرطانی ترشح و باعث تحریک رشد بیش از حد سلول‌های اندوتلیال طبیعی توسط مکانیسم پاراکرین می‌شوند (۶). ژن VEGF-A (فاکتور رشد اندوتلیال عروقی) به‌عنوان مسبب و فاکتور اصلی رگ‌زایی شناخته می‌شود، همچنین بیان بیش از حد این ژن در برخی از سرطان‌های انسانی مشاهده شده است (۷). دانشمندان به فرایند رگ‌زایی به‌عنوان یک هدف جدید برای درمان سرطان نگاه می‌کنند و تاکنون مطالعات فراوانی پیرامون تشکیل رگ‌های خونی بر روی سرطان‌های متفاوت انجام شده است (۸).

آپوپتوز به معنی مرگ برنامه‌ریزی شده سلول است که در جانوران پر سلولی رخ می‌دهد (۹). این فرآیند برای رشد و تکامل سلول‌های طبیعی مورد نیاز و ضروری می‌باشد. در شرایط طبیعی، سلول‌ها به‌صورت معمول توسط فرآیند آپوپتوز دچار مرگ می‌شوند، در حالی که در سلول‌های سرطانی که دچار تکثیر غیر قابل کنترل شدند فرایند آپوپتوز مهار و متوقف می‌شود. تکثیر بیش از حد سلول‌های توموری باعث کاهش اکسیژن در دسترس سلول‌ها شده، که این شرایط در سلول‌های طبیعی باعث تحریک آپوپتوز و درسلول‌های سرطانی تکثیر لجام گسیخته را موجب می‌شود (۱۰). به‌طور کلی، مسیرهای درگیر در تحریک فرآیند آپوپتوز را به دو دسته تقسیم می‌کنند: ۱) مسیر درونی (یا مسیر میتوکندریایی) که به وسیله‌ی اعضای خانواده BCL-۲ کنترل می‌شود و با فعالسازی Bak/Bax منجر به نفوذ پذیری غشای میتوکندریایی می‌گردند، ۲) مسیر بیرونی (یا مسیر

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from zums.ac.ir at 9:57 IRDT on Wednesday June 7th 2017

رسپتورهای مرگ) که این مسیر به‌دنبال لیگاندپوشی رسپتورهای خانواده TNF آغاز شده و منجر به فعال سازی کاسپاز-۸ و متعاقبا کاسپاز-۳ می‌گردد (۱۲و ۱۱). گیاهان دارویی سال‌هاست که به عنوان درمان بسیاری از بیماری‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند و به‌عنوان منبعی برای تولید دارو هستند که در مقایسه با داروهای شیمیایی عوارض جانبی کمتری دارند. در بین گیاهان دارویی، گیاهان جنس سیاه دانه، Nigella، معروف به گیاهان اعجاز انگیز هستند (۱۳). در این راستا حدیثی از پیامبر اکرم نقل شده است که می‌فرمایند: سیاه دانه برای هر دردی درمان است به جز مرگ (۱۴). سیاه دانه بومی مناطق جنوب اروپا، شمال افریقا و آسیای شرقی می‌باشد و همچنین این گیاهان در بسیاری از مناطق دیگر مانند کشورهای خاورمیانه، هند، پاکستان و ترکیه نیز کاشته می شوند (۱۵). این جنس از خانواده *Ranunculaceae* می‌باشد و دارای ۱۴ گونه است که مهم‌ترین گونه از لحاظ دارویی *Nigella sativ L.* می‌باشد. (۱۶). از لحاظ دارویی مواد موجود در بذر و روغن استخراج شده از گیاه سیاه دانه *N. sativa* دارای خواص ضد قارچی (۱۷) آنتی اکسیدانی (۱۸) ضد دیابت (۱۹) ضد سرطانی (۲۰) ضد التهاب (۲۱) است که این خصوصیات را به تایموکوینون، مهم‌ترین ماده‌ی دارویی موجود در آن، نسبت می‌دهند. با توجه به عدم تاثیر سمیت شدید عصاره‌ی گیاه سیاه دانه بر روی سلول‌های طبیعی بدن (۲۲)، در این مطالعه خاصیت سمیت، توانایی بازدارندگی رگ‌زایی و نوع مرگ سلولی القایی توسط عصاره بذر گیاه *N. sativa* روی سلول‌های سرطانی معده بررسی شد.

روش بررسی

مواد: رده‌ی سلولی سرطانی معده (AGS IBRC C10071) و بذر سیاه دانه *N. sativa* (IBRC P1006713) از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران تهیه شد. سرم گاوی (FBS: Fetal bovine serum, cat No:10437028)، محیط کشت DMEM (cat No: 11965092) و Hams F12(cat No:21127022) از شرکت GIBCO کشور امریکا خریداری شد. پودر MTT(cat No:298-93-1) از شرکت سیگما، DMSO (cat No:A994.1) از شرکت Roth، کیت سنتز cDNA(cat No:04379012001) و استخراج RNA(cat No:11828665001) از شرکت Roche آلمان، مستر میکس Real-time(cat No:A325402) از شرکت آمپلیکون دانمارک و Annexin V Apoptosis Detection Kit(cat No:88-8005-72) از شرکت Bioscience آمریکا تهیه گردید. ابتدا ۴۰ گرم بذر سیاه دانه توسط دستگاه کرانچر (Retsh MM301) خرد و به صورت پودر در آمده و سپس عصاره گیری الکلی (الکل ۹۶ درصد) به وسیله‌ی دستگاه سوکسله در طی هفت الی هشت ساعت انجام شد. برای خالص سازی عصاره و خارج کردن الکل از عصاره از دستگاه خلا ساز (Buchi rotavapor R200) با فشار ۱۵۰ میلی بار و دمای ۵۰ درجه‌ی سانتی‌گراد استفاده شد. بعد از دو ساعت ۸ میلی‌لیتر عصاره‌ی روغنی بدون الکل به دست آمد. این عصاره در زیر هود توسط فیلتر ۰/۲ استریل و آماده استفاده شد.

رده‌ی سلولی خریداری شده در محیط کشت Ham's F12 با FBS ۱۵ درصد کشت داده شد. زمانی که سلول‌ها ۸۰ درصد فلاسک را پر کرده بودند، سلول‌ها تریپسینه شده و سپس شمارش سلول‌های زنده توسط رنگ تریپان بلو انجام شد. در نهایت این سلول‌ها به پلیت‌های ۹۶ خانه منتقل شدند، بدین ترتیب که در هر چاهک از پلیت ۹۶ خانه، تعداد ۱۰ هزار سلول از رده‌ی سلولی AGS معده با ۲ درصد FBS و ۲۰۰ میکرولیتر محیط ریخته شدند. به سلول‌ها هفت ساعت فرصت داده شد تا به ته فلاسک بچسبند و مورفولوژی مناسب خود را به دست بیاورند. پس از تایید مورفولوژی و چسبیدن سلول ها به ته فلاسک توسط

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from zums.ac.ir at 9:57 IRDT on Wednesday June 7th 2017

مشاهده‌ی میکروسکوپی، سلول‌ها با عصاره‌ی سیاه دانه با غلظت‌های ۷و ۵، ۳، ۱/۵ میکرولیتر مورد تیمار قرار گرفتند.طبق اندازه‌گیری توسط دستگاه اسپکتوفتومتری (Specord 210,Analytik) در طول موج ۲۵۴ نانومتر هر کدام از غلظت‌ها به ترتیب دارای ۳۹، ۷۸، ۱۳۰ و ۱۸۲ میکرومولار تایموکوینون بودند. آزمایش با سه تکرار و دوبار متوالی انجام پذیرفت (۲۳و ۲۱). جهت تعیین بقای سلولی، بعد از گذشت ۲۴ ساعت به هر چاهک ۲۰ میکرولیتر از محلول ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر MTT اضافه شده (۲۴)، سلول‌ها سه ساعت در معرض این ماده قرار گرفتند. سپس کل محیط خالی شده و هم حجم DMSO به چاهک‌ها اضافه شد. بلافاصله جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۵۸۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. به‌منظور بررسی بیان ژن VEGF-A به‌عنوان عامل رگ زایی، سلول‌ها در پلیت‌های شش خانه (در هر خانه ۲۰۰ هزار سلول) کشت داده شدند و بعد از به دست آوردن مورفولوژی مناسب سلول‌ها با غلظت‌های مناسب از عصاره بذر سیاه دانه به‌دست آمده از مرحله‌ی قبل، تیمار شدند. بعد از سپری شدن ۲۴ ساعت (بر اساس نتایج حاصل از تست MTT)، سلول‌ها تریپسینه شده و با انجام سانتریفوژ جدا شدند. استخراج RNA با استفاده از کیت Roche محصول کشور آلمان انجام شد. آزمون Real-time PCR با استفاده از ۲/۵ پیکومولار از پرایمرها (جدول ۱)، ۱۰۰ نانوگرم cDNA الگو در حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر با دمای اتصال ۶۲ به مدت ۳۰ ثانیه انجام پذیرفت. از ژن β-actin به‌عنوان کنترل داخلی استفاده شد. نتایج حاصل توسط نرم‌افزار Rest2009 آنالیز و نمودارها در نرم‌افزار اکسل رسم گردید.

جدول ۱: توالی پرایمر های استفاده شده در فرایند Real-time PCR

	VEGF-A	β-actin
F	AACTTTCTGCTGTCTTGGGTG	CCTGGGCATGGAGTCCTGT
R	ATGTCCACCAGGGTCTCGATT	ATCTCCTTCTGCATCCTGTCG
PCR product	179 bp	152 bp

در نهایت به منظور بررسی تاثیر عصاره‌ی بذر سیاه دانه در مرگ سلولی، سلول‌ها همانند مرحله‌ی قبل در پلیت‌های شش خانه کشت و تیمار شدند. بعد از سپری شدن زمان تیمار، سلول‌ها تریپسینه شده و با Annexin V Apoptosis Detection Kit محصول شرکت Bioscience آمریکا رنگ آمیزی شدند به‌طوری که در مرحله‌ی اول سلول‌ها با PBS و Binding Buffer 1X شستشو داده شده و از سلول‌ها رسوب گرفته شد، سپس سلول‌های رسوب داده شده در ۱۰۰ میکرولیتر Binding Buffer 1X حل شد. در ادامه ۵ میکرولیتر رنگ FITC-Annexin5 به این سلول‌ها اضافه گردید و سلوها به مدت ۱۰ الی ۱۵ دقیقه در دمای اتاق (۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد) با رنگ انکوبه گردیدند. سپس سلول‌ها را رسوب داده و مایع رویی خارج گردید و سلول‌ها دوباره در ۲۰۰ میکرولیتر محلول Binding beffer 1X حل شدند و ۵ میکرولیتر رنگ PI اضافه گردید و در محیط تاریک به محل بررسی انتقال داده شدند و با دستگاه فلوسایتومتری واقع در پژوهشگاه رویان، نوع و میزان مرگ سلولی در سلول‌های کنترل (سلول بدون تیمار) و سلول‌های تیمار شده آنالیز و مشخص گردید. کلیه‌ی نتایج به‌دست آمده با نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۲ آنالیز و نمودارها توسط نرم‌افزار Excel رسم گردید.

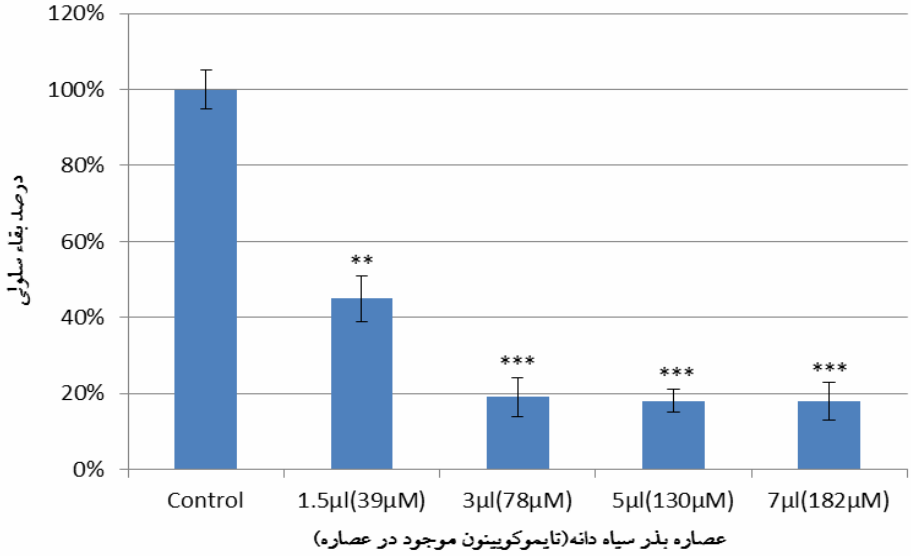
www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from zums.ac.ir at 9:57 IRDT on Wednesday June 7th 2017

یافته‌ها

در بررسی نتایج حاصل از سمیت عصاره *N. sativa* بر روی بقای رده‌ی سلولی معده (AGS) مشاهده شد که در تیمار با مقدار (۳۹ میکرومول Thymoquinone) ۱/۵ میکرولیتر از عصاره تقریبا ۵۰ درصد سلول‌ها از بین می‌روند و تفاوت معناداری را نسبت به سلول‌های کنترل ایجاد می‌کند. در نهایت از بین غلظت‌های تیماره شده ۱/۵، ۳، ۵ و ۷ میکرولیتر که به‌ترتیب دارای غلظت ۳۹،۷۸، ۱۳۰ و ۱۸۲ میکرومولار تایموکوینون بودند، غلظت ۱/۵ میکرولیتر به عنوان غلظت IC_{50} تعیین گردید. اگرچه میزان کشندگی در استفاده از مقدارهای بالاتر بیشتر شده (بیش از ۸۰ درصد)، اما در مقدارهای ۳، ۵ و ۷ میکرولیتر تفاوت معنی‌داری را نسبت به هم ندارند. از این نتایج می‌توان برداشت کرد که کشندگی عصاره در مقادیر سه تا هفت میکرولیتر وابسته به مقدار استفاده شده از عصاره نیست (نمودار ۱).



نمودار ۱): درصد بقای رده سلولی AGS بعد از تیمار با غلظت‌های متفاوت از عصاره‌ی بذر سیاه دانه

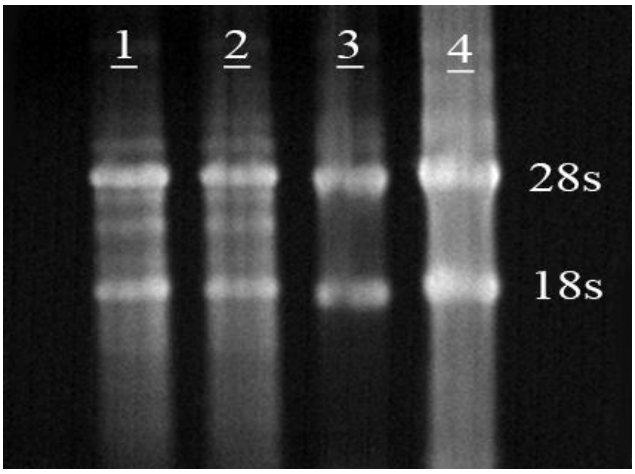
محور افقی: تیمارهای متفاوت از عصاره‌ی بذر گیاه سیاه دانه محور عمودی: درصد بقای سلولی در تیمار با غلظت‌های متفاوت از عصاره‌ی بذر گیاه سیاه دانه (** نشان دهنده‌ی اختلاف معنی‌دار (۰/۰۱ ≤P≤ ۰/۰۰۱) و *** نشان دهنده‌ی وجود اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل می‌باشد (P<۰/۰۰۱)

نخست سلول‌ها کشت داده شده و بعد از تایید مورفولوژی مناسب سلول‌ها، با عصاره‌ی بذر سیاه دانه تیمار شدند. بعد از گذشت زمان مقرر، بقایای سلول‌ها توسط آزمایش MTT ارزیابی شد. آزمایش به‌صورت سه بار تکرار بود و با استفاده از تست one way anova-tukey در نرم افزار SPSS مورد آنالیز آماری قرار گرفت. برای بررسی بیان ژن VEGF-A سلول‌ها با سه غلظت از عصاره، به منظور بررسی تاثیر متفاوت غلظت بالا و پایین تایموکوینون موجود در عصاره (غلظت IC_{50}، غلظت بالا (دارای تایموکوینون بالا) و پایین‌تر از غلظت IC_{50} (تایموکوینون پایین) حاصل از مرحله‌ی قبل، تیمار گردیدند. از سلول‌های تیمار شده RNA استخراج گردید (شکل ۱) و با انجام تست Real-time بیان ژن‌ها

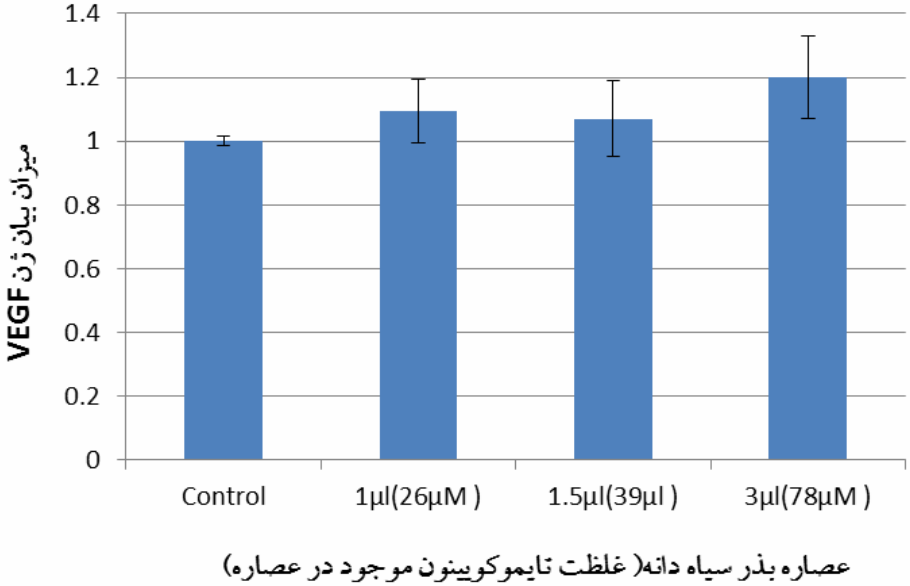
www.SID.ir

Archive of SID

مقایسه گردید. در مشاهده‌ی نتایج حاصل از تاثیر عصاره بذر این گیاه بر روی بیان ژن VEGF-A، مشاهده گردید که هیچ یک از غلظت‌های عصاره این بذر توانایی کاهش یا افزایش بیان این ژن را به صورت معنی‌دار را ندارند (P>۰/۰۵) (نمودار ۲).



شکل ۱: RNA استخراج شده و سلول‌های تیمار شده و کنترل بر روی ژل آگارز ۱درصد ۱) سلول‌های تیمار شده با (۲۶ میکرومول تایموکوییون) ۱ میکرو لیتر عصاره بذر سیاه‌دانه ۲) سلول‌های تیمار شده با ۳۹ میکرومول تایموکوییون ۱/۵ میکرومول از عصاره ۳) سلول‌های تیمار شده با (۴۸ میکرومول تایموکوییون) ۳ میکرولیتر از عصاره بذر سیاه‌دانه ۴) RNA استخراج شده از سلول‌های کنترل (سلول‌های بدون تیمار)



نمودار ۲: تیمار رده‌ی سلولی AGS با عصاره‌ی بذر سیاه دانه به منظور بررسی میزان بیان ژن VEGF-A به وسیله‌ی تست Real-time PCR. محور افقی: غلظت‌های متفاوت تیمار شده از عصاره بذر و میزان تایموکوییون موجود در آنها

محور عمودی: میزان بیان ژن VEGF-A.

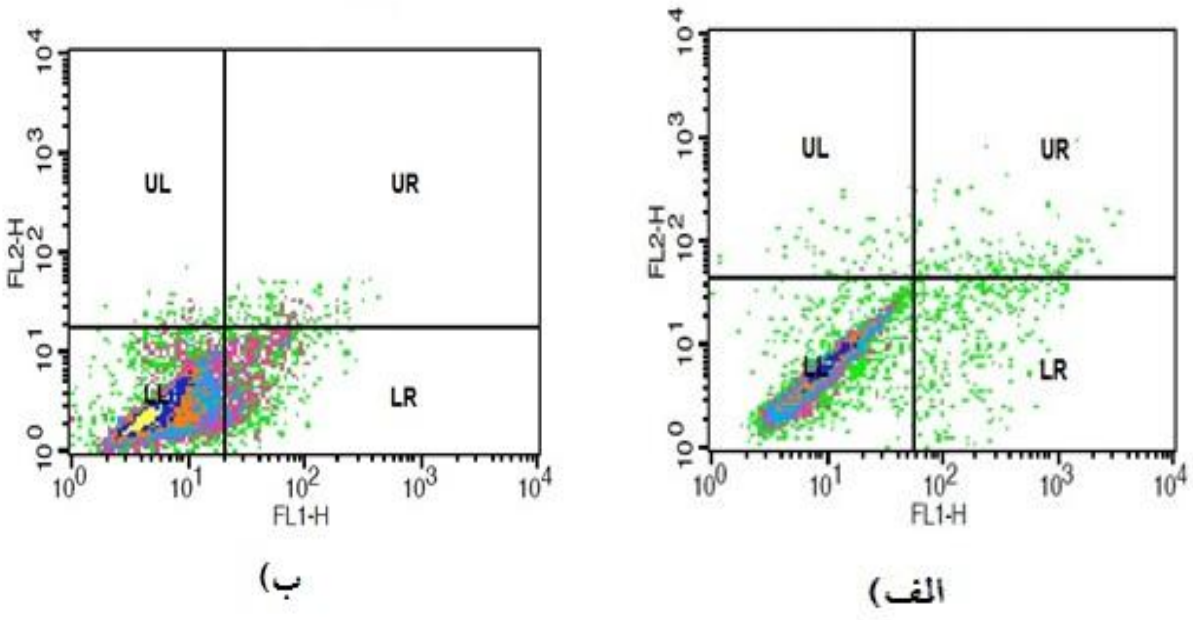
Downloaded from zums.ac.ir at 9:57 IRDT on Wednesday June 7th 2017

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from zums.ac.ir at 9:57 IRDT on Wednesday June 7th 2017

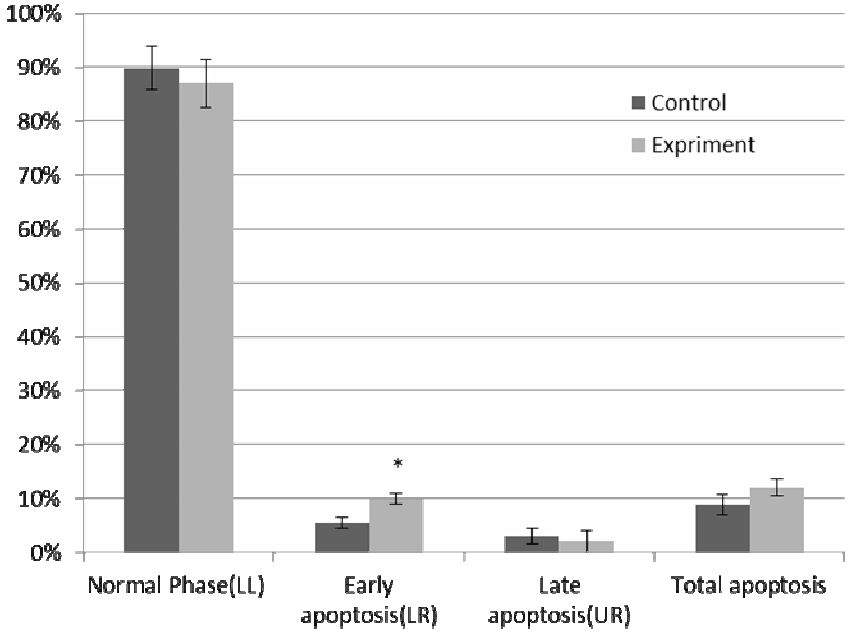
تست‌ها به‌صورت سه تکرار بوده، نتایج حاصل به وسیله فرمول لیواک بررسی شد. بررسی‌های آماری به وسیله‌ی تست one way anova-Tukey نرم‌افزار SPSS انجام پذیرفت، که در نهایت هیچ کدام از نمونه‌ها به صورت معنی‌دار افزایش یا کاهشی را در بیان ژن VEGF-A نشان ندادند ($P\geq$ ۰/۰۵)، در نهایت سلول‌ها با غلظت IC_{50} از عصاره‌ی بذر سیاه دانه به مدت ۲۴ ساعت تیمار شدند. نتایج حاصل از تست آپوپتوز، نشان می‌دهد که غلظت (۳۹ میکرومول تایموکوئینون) ۱/۵ میکرولیتر از عصاره‌ی بذر توانایی القای مرگ سلولی برنامه ریزی شده را به میزان ۵ درصد افزایش می‌دهد که این افزایش نسبت به میزان آپوپتوز در سلول‌های بدون تیمار معنی‌دار می‌باشد ($P\leq$ ۰/۰۵) (نمودار ۳). شکل به‌دست آمده از دستگاه فلوسایتومتری نیز نشان از افزایش آپوپتوز زودرس (Early Apoptosis)، دیر رس (Late Apoptosis) و میزان نکروز(Necrosis) را به صورت کیفی نشان می‌دهد (شکل ۲)



شکل ۲: تصویر دریافتی از دستگاه فلوسایتومتری بعد از تیمار سلول‌ها با عصاره‌ی بذر و بررسی با کیت annexin-V FITC PI برای سلول کنترل و تیمار شده الف) سلول‌های کنترل (بدون تیمار) ب) سلول‌های تیمار شده با عصاره‌ی روغنی بذر سیاه دانه ۳۹ میکرومول تایموکوئینون)۱/۵ میکرولیتر: سلول‌های موجود در مرحله طبیعی رشد LR): سلول‌های وارد شده به مرحله‌ی آپوپتوز زودرس (Early apoptosis) – UR): سلول‌های وارد شده به مرحله‌ی آپوپتوز با تاخیر (Late apoptosis) – UL) سلول‌های وارد شده به مرحله‌ی نکروز

www.SID.ir

Archive of SID



نمودار ۳: تیمار سلول‌های AGS با غلظت (۳۹ میکرومول TQ تایموکوییننون (۱/۵ میکرولیتر) از عصاره‌ی بذر سیاه دانه محور افقی: فاز طبیعی و فازهای متفاوت مرگ سلولی محور عمودی: میزان سلول‌ها در فاز طبیعی و فاز مرگ سلولی. (* نشان دهنده معنی‌داری (۰/۰۵ ≥P≥ ۰/۰۱ می‌باشد). طبق مشاهدات میزان آپوپتوز در سلول‌های تیمار شده در مرحله آپوپتوز زود رس به‌صورت معنی‌دار افزایش پیدا کرده است (۰/۰۱ ≥P ≥ ۰/۰۵)، در مرحله آپوپتوز با تاخیر، تفاوت معنی‌داری در افزایش یا یا کاهش آپوپتوز در سلوهای کنترل و تیمار شده وجود ندارد (P≥ ۰/۰۵) .

بحث

در پژوهش حاضر، اثر مقادیر مختلف عصاره‌ی بذر سیاه دانه (۱/۵، ۳، ۵ و ۷ میکرولیتر) بر روی رده سلولی سرطان معده (AGS) بررسی شد. ارزیابی بقای سلول‌ها توسط آزمایش MTT، مشخص کرد که غلظت ۱/۵ میکرولیتر از عصاره (معادل ۳۹ میکرومول تایموکوییننون) باعث مرگ بیش از ۵۰ درصد سلول‌ها نسبت به گروه کنترل می‌شود. با افزایش غلظت، تاثیر کشندگی افزایش می‌یابد اما از غلظت ۳ میکرولیتر (معادل ۷۸ میکرومول تایموکوییننون) به بعد این افزایش معنی‌دار نیست و بنابراین تاثیر دارو در محدوده‌ی آزمایش شده، وابسته به دوز نمی‌باشد. نوع مرگ سلولی در غلظت ۱/۵ میکرولیتر (غلظت IC_{50}) نیز بررسی شد. داده‌های به‌دست آمده نشان داد که تیمار عصاره باعث کاهش معنی‌دار بقای سلولی می‌شود (آزمایش MTT). همچنین تیمار، درصد سلول‌های آغازگر آپوپتوز را نیز به‌طور معنی‌داری افزایش می‌دهد اما مقدار کلی آپوپتوز در سلول‌های تیمار شده با سلول‌های کنترل تفاوت معنی‌داری نشان نمی‌دهد. خاصیت سمی بودن این ترکیبات موجود در سیاه دانه (تایموکوییننون و دی تایموکوییننون) بر روی رده‌های سلولی مختلف مورد آزمایش قرار گرفته و تایید شده است (۲۵). به‌طوری که مقدار ۵۰ الی ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در رده‌ی سلول‌های سرطانی کبدی (Hep G2)، لنفوسیت T (Molt 4)، ماهیچه موش (Wehi 164)، کلون (Sw 620) و رده سلولی مثانه (J82) تمامی سلول‌ها را از بین می‌برد که نشان دهنده‌ی سمیت بالای این عصاره بر روی رده‌های سلولی مختلف است (۲۶). در عین حال عصاره‌ی این گیاهان

Downloaded from zums.ac.ir at 9:57 IRDT on Wednesday June 7th 2017

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from zums.ac.ir at 9:57 IRDT on Wednesday June 7th 2017

سمیت بسیار پایینی را بر روی سلول‌های طبیعی اندوتلیالی دارند (۲۶). قریب به اتفاق آزمایشات صورت گرفته روی خواص درمانی از جمله خواص ضد سرطانی و یا حتی کلیه صفات ضد میکروبی سیاه‌دانه بر گونه *N. sativa* بوده و وجود تایموکوییننون باعث شده که کلیه‌ی این اثرات به این ترکیب نسبت داده شود. (۲۷). مرگ برنامه‌ریزی‌شده (PCD) باعث هومئوستازی و در تعادل بودن مرگ سلولی و بقای سلولی در سلول‌های طبیعی می‌شود. مرگ برنامه‌ریزی‌شده نقش بسیار اساسی در سرنوشت سلول‌های سرطانی بازی می‌کند (۲۸). در مطالعه‌ای که توسط محمود الحسین و همکارانش در سال ۲۰۱۰ انجام پذیرفت، نقش تحریکی القای آپوپتوز توسط تایموکوییننون بر روی سلول‌های لوکمیا از طریق ژن‌های P53 و P73 مشخص گردید، در تیمار سلول‌ها با غلظت صفر الی ۱۰۰ میکرومولار، درصد سلول‌های آپوپتوزی از صفر تا ۱۰۰ درصد افزایش پیدا کرده است (۲۹). همچنین مطالعه‌ای در سال ۲۰۰۴ بر روی سلول‌های کلورکتال انجام پذیرفت که نشان‌دهنده القای آپوپتوز توسط کولورکتال استخراج‌شده از گیاه سیاه‌دانه بر این سلول‌ها می‌باشد، این تیمار، مقدار mRNAهای هدف مربوط به P53 وp21 افزایش و همچنین مقدار ژن Bcl-2 را کاهش می‌دهد (۳۰). طبق مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۵ بر روی سلول‌های لوکمیا HL-60 انجام پذیرفت، تیمار این سلول‌ها با غلظت ۱۰۰ میکرومولار تایموکوییننون باعث رخداد آپوپتوز، از لحاظ مورفولوژیکی و ژنومی گردید. تیمار این سلول‌ها با غلظت ۱۰۰ میکرومولار از تایموکوییننون، باعث افزایش ۷۰ درصدی آپوپتوز در سلول‌ها می‌باشد (۳۱). در مطالعه‌ی حاضر، مقدار کلی آپوپتوز (آپوپتوز زودرس و آپوپتوز با تاخیر) در سلول‌های کنترل و تیمار شده تفاوت معنی‌داری نسبت به هم ندارند. مطالعات تکمیلی از جمله بررسی بیان ژن‌های درگیر در فرآیند آپوپتوز، می‌تواند جهت توضیح دقیق راهگشا باشد. با توجه به اینکه مسئول ۹۰ درصد از مرگ‌ومیر حاصل از سرطان‌ها مربوط به رگ‌زا بودن یا متاستاتیک بودن بافت سرطانی گزارش شده است (۳۲)، بسیار حائز اهمیت است که بتوان از روند رگ زایی بافت‌های سرطانی به بافت‌های دیگر جلوگیری کرد. به همین منظور تغییرات بیان ژن VEGF-A در سلول‌های تیمار شده با غلظت های مختلف عصاره با روش Real time PCR بررسی شد. نتایج حاصل نشان داد که بیان این ژن در سلول‌های تیمار شده در مقایسه با سلول‌های کنترل تغییر معنی‌داری نکرده است. در همین زمینه مطالعات فراوانی انجام پذیرفته است، همچنان که در آزمایشی که به صورت درون تنی انجام پذیرفته است، گزارش شده است که تایموکوییننون از طریق کاهش رونویسی ژن VEGF-A باعث مهار رگ زایی در Zebra fish می‌شود، که این مشخصه دلیل معرفی تایموکوییننون به‌عنوان یه ماده ضد سرطانی است (۳۳). همچنین در سال ۲۰۱۲ مطالعه‌ای درباره‌ی اثر مهاری تایموکوییننون بر روی مهار رشد سلولی و رگ زایی بافت‌های سرطانی انجام پذیرفت، که در نهایت مهار رشد سلولی بسیار قوی و کاهش میزان پروتئین VEGF-A به‌عنوان نتایج این مطالعه گزارش داده شد (۳۴). در آزمایشی دیگر که توسط تینگ فانگ و همکارانش انجام پذیرفت، مشاهده شد که تایموکوییننون اثر مهاری بر روی رگ زایی سلول‌های اندوتلیالی بند نافی دارد و باعث مهار رشد و رگ‌زایی سلول‌های سرطانی پروستات موشی به صورت درون تنی و برون تنی می‌شود (۳۵). علیرغم تعدد گزارشات مبنی بر تاثیر ضد رگ زایی تایموکوییننون استاندارد، ولی عصاره‌ی بذر سیاه دانه با وجود داشتن تایموکوییننون توانایی کاهش رگ‌زایی ندارد، که شاید بتوان این موضوع را به دلیل سمیت بالایی این عصاره برای سلول‌ها رده سرطانی معده (AGS) دانست. امروزه بازگشت به استفاده از ترکیبات طبیعی و به‌خصوص داروهای گیاهی در جوامع بشری رو به افزایش است. بیش از ۶۰ درصد ترکیباتی که امروزه برای درمان

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from zums.ac.ir at 9:57 IRDT on Wednesday June 7th 2017

سرطان استفاده می‌شوند ترکیبات طبیعی هستند که از منابعی مانند گیاهان به‌دست می‌آیند (۳۶). داروهای گیاهی معروف تاکسول، وین بلاستین و وین کریستین امروزه نیز در درمان سرطان‌ها به‌کار می‌روند و تعداد بسیاری از ترکیبات گیاهی ضد سرطانی نیز در مراحل پیش کلینیکی قرار دارند (۳۷). یکی از ترکیبات معروف گیاهی که در سال‌های اخیر، خصوصا در ایران، معرفی شده و نیز در داروخانه‌ها موجود است، کورکومین (سینا کورکومین) ماده موثره زرد چوبه است. اگرچه در برخی از موارد (مانند کورکومین) نمی‌توان از ترکیبات گیاهی به‌عنوان روش درمان اصلی استفاده کرد، اما به‌عنوان طب مکمل جایگاه ویژه‌ای دارند (۳۸). علاوه بر این در کاربرد درمانی از گیاهان دارویی با در نظر گرفتن خواص هم‌افزایی ترکیبات موثره، تصمیم به استفاده از عصاره کل داروی گیاهی یا داروی تک ترکیب مشتق شده از گیاه دارویی جای تامل دارد. در خصوص گیاهان دارویی معرفی شده در این تحقیق، علاوه بر تاکید بر روی استاندارد سازی و در نظر گرفتن تاثیر ترکیبات مختلف در عصاره‌ی یک گیاه، تحقیقات بیشتر آزمایشگاهی در مورد چگونگی تاثیر بر روی مسیرهای داخل سلولی، تاثیر بر اندام‌های مختلف و مطالعات در جمعیت‌های بزرگ مدل حیوانی جهت مطالعات پیش کلینیکی ضروری است.

نتیجه گیری

طبق نتایج حاصل مشخص گردید که عصاره‌ی روغنی بذر سیاه دانه تاثیر بازدارندگی برروی رشد و همانند سازی رده سلول‌های سرطانی AGS به صورت معنی‌داری دارد (P≤۰/۰۵)، همچنین این بازدارندگی وابسته به مقدار (Dose Dependent) نمی‌باشد. در نتایج حاصل از Real Time PCR مشاهده شد که عصاره‌ی روغنی توانایی کاهش بیان ژن VEGF-A را ندارد. ولی بر طبق نتایج حاصل از فلوسایتومتری عصاره روغنی توانایی تحریک و افزایش میزان مرگ سلولی برنامه ریزی شده (آپوپتوز) را در سلول‌های تیمار شده را دارا می‌باشد (P≤۰/۰۵).

تشکر و قدردانی

این مقاله قسمتی از پایان نامه کارشناسی ارشد نویسنده اول با کد اخلاق: IR.NIGEB.EC.1395.4.1.E است. نویسندگان از پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری به دلیل فراهم آوردن تسهیلات این پژوهش، تشکر و قدردانی می‌کنند.

References

1- Pecorino L. Molecular biology of cancer: mechanisms, targets, and therapeutics: Oxford university press; 2012.

2- Umar A, Dunn BK, Greenwald P. Future directions in cancer prevention. Nature Rev Cancer. 2012; 12: 835-48.

3- Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013. CA: a cancer journal for clinicians. 2013; 63: 11-30.

4- Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. Nature medicine. 1995; 1: 27-30.

5- Penn JS. Retinal and choroidal angiogenesis: Springer Science & Business Media; 2008.

6- Ferrara N. The role of vascular endothelial growth factor in pathological angiogenesis. *Breast Cancer Res Treat.* 1995; 36: 127-37.

7- Gasparini G, Harris AL. Clinical importance of the determination of tumor angiogenesis in breast carcinoma: much more than a new

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from zums.ac.ir at 9:57 IRDT on Wednesday June 7th 2017

prognostic tool. *Journal of clinical oncology*. 1995; 13: 765-82.

8- Rössler J, Lagodny J. Blood and lymph vessels in embryonic tumors. *Hematological Oncology*. 2005; 23: 94-101.

9- Green DR. Means to an end: apoptosis and other cell death mechanisms: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2011.

10- Evan GI, Vousden KH. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. Nature. 2001; 411: 342-8.

11- He B, Lu N, Zhou Z. Cellular and nuclear degradation during apoptosis. Current opinion in cell biology. 2009; 21: 900-12.

12- Suen D-F, Norris KL, Youle RJ. Mitochondrial dynamics and apoptosis. Genes & development. 2008; 22: 1577-90.

13- Ahmad A, Husain A, Mujeeb M, Khan SA, Najmi AK, Siddique NA, et al. A review on therapeutic potential of Nigella sativa: A miracle herb. Asian Pacific journal of tropical biomedicine. 2013; 3: 337-52.

14- Al-Bukhari M, Sahi A-B. The collection of authentic sayings of Prophet Mohammad (peace be upon him), division 71 on medicine. Hilal Yayinlari, Ankara, Turkey. 1976.

15- Khare CP. Indian medicinal plants: an illustrated dictionary: Springer Science & Business Media; 2007.

16- Al-Ali A, Alkhawajah AA, Randhawa MA, Shaikh NA. Oral and intraperitoneal LD50 of thymoquinone, an active principle of Nigella sativa, in mice and rats. *J Ayub Med Coll Abbottabad*. 2008; 20: 25-7.

17- Bita A, Rosu A, Calina D, et al. An alternative treatment for candida infections with *Nigella sativa* extracts. *Europ J Hosp Pharm.* 2012; 19: 162.

18- Umar S, Zargan J, Umar K, Ahmad S, Katiyar CK, Khan HA. Modulation of the oxidative stress and inflammatory cytokine response by thymoquinone in the collagen induced arthritis in Wistar rats. *Chemico Biol Interact.* 2012; 197: 40-6.

19- Abdelmeguid NE, Fakhoury R, Kamal SM, Al Wafai RJ. Effects of *Nigella sativa* and thymoquinone on biochemical and subcellular changes in pancreatic β‐cells of streptozotocin‐induced diabetic rats. *J Diabetes.* 2010; 2: 256-66.

20- Salem M, Alenzi F, Attia W. Thymoquinone, the active ingredient of *Nigella sativa* seeds, enhances survival and activity of antigen-specific CD8-positive T cells in vitro. *Br J Biomed Sci.* 2011; 68: 131-9.

21- Alemi M, Sabouni F, Sanjarian F, Haghbeen K, Ansari S. Anti-inflammatory effect of seeds and callus of *Nigella sativa L.* extracts on mix glial cells with regard to their thymoquinone content. *AAPS PharmSci Tech.* 2013; 14: 160-7.

22- Ng WK, Saiful Yazan L, Yap LH, et al. Thymoquinone-Loaded nanostructured lipid carrier exhibited cytotoxicity towards breast cancer cell lines (MDA-MB-231 and MCF-7) and

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from zums.ac.ir at 9:57 IRDT on Wednesday June 7th 2017

cervical cancer cell lines (HeLa and SiHa). *Biomed Res Int.* 2015; 2015.

23- Ismail AFH, Doolaanea AA, Mohamed F, Mansor NI, Shafri MAM, Yusof FA. Method development and validation using UV spectrophotometry for *Nigella sativa* oil microparticles quantification. 2015.

24- Gerlier D, Thomasset N. Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. J Immunol Method. 1986; 94: 57-63.

25- Worthen DR, Ghosheh OA, Crooks P. The in vitro anti-tumor activity of some crude and purified components of blackseed, Nigella sativa L. *Anticancer Res.* 1997; 18: 1527-32.

26- Swamy S, Tan B. Cytotoxic and immunopotentiating effects of ethanolic extract of *Nigella sativa L.* seeds. *J Ethnopharmacol.* 2000; 70: 1-7.

27- Havlik J, Kokoska L, Vasickova S, Valterova I. Chemical composition of essential oil from the seeds of *Nigella arvensis L.* and assessment of its actimicrobial activity. *Flavour Fragrance J.* 2006; 21: 713-7.

28- Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. C*ell.* 2011; 144: 646-74.

29- AlHossein M, Abusnina A, Achour M, Sharif T, Muller C, Peluso J, et al. Induction of apoptosis by thymoquinone in lymphoblastic leukemia Jurkat cells is mediated by a p73-dependent pathway which targets the epigenetic integrator UHRF1. *Biochemical Pharmacol.* 2010; 79: 1251-60.

30- Gali-Muhtasib H, Diab-Assaf M, Boltze C, et al. Thymoquinone extracted from black seed triggers apoptotic cell death in human colorectal cancer cells via a p53-dependent mechanism. *Int J Oncol.* 2004; 25: 857-66.

31- El‐Mahdy MA, Zhu Q, Wang QE, Wani G, Wani AA. Thymoquinone induces apoptosis through activation of caspase‐8 and mitochondrial events in p53‐null myeloblastic leukemia HL‐60 cells. *Int J Cancer.* 2005; 117: 409-17.

32- Fidler IJ. The pathogenesis of cancer metastasis: the'seed and soil'hypothesis revisited. *Nature Reviews Cancer*. 2003; 3: 453-8.

33- Paramasivam A, Kalaimangai M, Sambantham S, Anandan B, Jayaraman G. Anti-angiogenic activity of thymoquinone by the down-regulation of VEGF using zebrafish (Danio rerio) model. Biomedicine Prevent Nut. 2012; 2: 169-73.

34- Paramasivam A, Raghunandhakumar S, Sambantham S, et al. In vitro anticancer and anti-angiogenic effects of thymoquinone in mouse neuroblastoma cells (Neuro-2a). *Biomed Prevent Nut.* 2012; 2: 283-6.

35- Ting fang Yi, Cho S-G, Yi Z, et al. Thymoquinone inhibi ts tumor angiogenesis and tumor growth through suppressing AKT and extracellular signal-regulated kinase signaling pathways. *Molecular Cancer Therap.* 2008; 7: 1789-96.

36- Kaur R, Kapoor K, Kaur H. Plants as a source

www.SID.ir

Archive of SID

of anticancer agents. *J Nat Prod Plant Resour*. 2011; 1: 119-24.

37- Cragg GM, Newman DJ. Plants as a source of anti-cancer agents. *J Ethnopharmacol*. 2005; 100: 72-9.

38- Hosseinimehr SJ. A review of preventive and therapeutic effects of curcumin in patients with cancer. *J Clin Excellence*. 2014; 2: 50-63.

Downloaded from zums.ac.ir at 9:57 IRDT on Wednesday June 7th 2017

www.SID.ir

Archive of SID

Investigation of Cell Viability, VEGF-A Gene Expression and Rate of Programmed Cell Death in AGS Cell Line-Treated with Black Cumin *(N. sativa)* Seeds Oil Extract

Rashid Shyekh Ahmad M[1], Sanjarian F[1], Sabouni F[1]

[1]National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Department of Agricultural Biotechnology, Tehran, Iran

Corresponding Author: Sanjarian F, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Department of Agricultural Biotechnology, Tehran, Iran

E-mail: fsanjarian@nigeb.ac.ir

Received: 23 Jun 2016 **Accepted:** 30 Oct 2016

Background and Objective: Cancer is a prevalent disease that occurs due to genetic and environmental factors. Gastric cancer is one of the most common cancers around the world and also in Iran. *N. sativa* has been used as a drug in the treatment of many diseases owing to its valuable secondary metabolites such as thymoquinone. In this study, the anti-cancer properties of black seed extract on gastric cancer cells was studied and the seeds oil was evaluated for possible drug use.

Materials and Methods: Stomach gastric adenocarcinoma (AGS) cell line was cultured and treated with various concentrations of *N. sativa* seed soil for 24 hours. Consequently the cytotoxic effect of the extract on the cell line was determined using MTT assay while the rate of apoptosis was determined by Annexin V and Flow cytometry and finally, VEGF-A expression was determined by Real-Time PCR.

Results: Black seed oil treatment significantly reduced cancer cell proliferation compared to control cells. This treatment also led to an increased rate of programmed cell death. however, black seed oil treatment had no effect on the expression of VEGF-A.

Conclusion: Extract of black seed has a positive impact on reducing proliferation and elevating apoptosis in cancer cells.

Key words: AGS cell line, Stomach Cancer, Black seed, Angiogenesis, Apoptosis

Downloaded from zums.ac.ir at 9:57 IRDT on Wednesday June 7th 2017

www.SID.ir