

## Study of Crocin (Saffron Component) on Apoptosis or Survival of MCF7 Breast Cancer Cells Lines (PTEN/AKT1 Signaling Pathway)

Aysan Hajizadeh<sup>1</sup> , Saeid Ghorbian<sup>1\*</sup> 

<sup>1</sup> Dept of Molecular Genetics, Ahar Branch, Islamic Azad University, Ahar, Iran

### Article Info

#### Article type:

Research article

#### Article History:

Received: 03 November 2021

Revised: 28 January 2022

Accepted: 06 February 2022

Published Online: 09 October 2022

#### \* Correspondence to:

Saeid Ghorbian

Dept of Molecular Genetics, Ahar Branch, Islamic Azad University, Ahar, Iran.

Email:

s\_ghorbian@iau-ahar.ac.ir

### ABSTRACT

**Introduction:** Evidence shows that secondary metabolites of saffron can be used in the formulation of new drugs for the treatment of various human cancers. It is demonstrated that saffron crocin inhibits the proliferation of cancer cells while having no inhibition effect on the growth of normal cells. Consumption of this substance also reduces the side effects of cancer chemotherapy. Therefore, the present study was performed to investigate the effect of crocin on the proliferation and apoptosis of breast cancer cells and determine its molecular mechanism.

**Material & Methods:** Initially, MCF7 breast cancer cells were prepared from the Pasteur Institute of Iran Cell Bank and cultured in RPMI1640 medium with FBS 10%. To determine the effect of crocin toxicity on cancer cells, treatment was conducted at different concentrations and different hours, and (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay was performed. The cell proliferation or cell apoptosis was evaluated as well. DAPI staining was performed to demonstrate cell apoptosis. After RNA extraction and cDNA preparation, the expression of an apoptosis-related gene (PTEN) and Akt pathway genes were measured by Real-time polymerase chain reaction (PCR) to determine the mechanism of the crocin effect.

**Findings:** Results of the MTT assay showed that crocin inhibited the proliferation of MCF7 cells and induced apoptosis in these cells. In addition, real-time PCR results showed that crocin increased PTEN gene expression (P=0.041) in MCF7 breast cancer cells and significantly decreased Akt1 gene expression (P=0.038).

**Discussion & Conclusion:** The results indicate that crocin stimulates the apoptotic cells in MCF7 breast cancer cells and can be used as a new therapeutic strategy for the treatment of breast cancer.

**Keywords:** Apoptosis, Breast cancer, Crocin, MCF7

### ➤ How to cite this paper

Hajizadeh A, Ghorbian S. Study of Crocin (Saffron Component) on Apoptosis or Survival of MCF7 Breast Cancer Cells Lines (PTEN/AKT1 Signaling Pathway). Journal of Ilam University of Medical Sciences. 2022;30(4): 47-55.



## مطالعه تأثیر کروسین زعفران بر آپوپتوز و یا زنده‌مانی رده سلول‌های سرطانی سینه MCF7 و بیان ژن‌های مسیر سیگنالینگ PTEN/AKT1

آیسان حاجی‌زاده<sup>۱</sup> ID، سعید قربان<sup>۱</sup> ID

<sup>۱</sup> گروه ژنتیک مولکولی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اهر، اهر، ایران

### چکیده

### اطلاعات مقاله

#### نوع مقاله: پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۸/۱۲

تاریخ ویرایش: ۱۴۰۰/۱۱/۰۸

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۱/۱۷

تاریخ انتشار: ۱۴۰۱/۰۷/۱۷

#### نویسنده مسئول:

سعید قربان

گروه ژنتیک مولکولی، دانشگاه

آزاد اسلامی، واحد اهر، اهر، ایران

Email:

s\_ghorbani@iau-ahr.ac.ir

**مقدمه:** نتایج تحقیقات طب جدید نشان داده است که می‌توان از متابولیت‌های ثانویه زعفران در تولید داروهای مکمل مرتبط با درمان انواع سرطان‌های انسانی استفاده کرد. کلاله زعفران به شکل اختصاصی رشد و تکثیر سلول‌های سرطانی را مهار می‌کند، درحالی‌که بر رشد سلول‌های طبیعی بی‌تأثیر است؛ همچنین مصرف این ماده به کاهش عوارض جانبی ناشی از شیمی‌درمانی منجر می‌شود؛ بنابراین، تحقیق حاضر به منظور مطالعه اثر کروسین زعفران بر رشد و آپوپتوز سلول‌های سرطانی سینه و نیز تعیین سازوکار مولکولی آن انجام گرفت.

**مواد و روش‌ها:** ابتدا سلول‌های سرطانی سینه MCF7 از مجموعه سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه گردید و سپس در داخل محیط کشت RPMI1640 با ۱۰ درصد FBS، درون فلاسک کشت داده شدند. به منظور تعیین اثر سمیت کروسین بر سلول‌های سرطانی، تیمار در غلظت‌های گوناگون و در ساعت‌های مختلف صورت گرفت؛ سپس با استفاده از روش آزمایش MTT، تکثیر و یا مرگ سلول‌ها مطالعه گردید. آزمایش رنگ‌آمیزی DAPI برای نشان دادن آپوپتوز سلولی انجام شد و استخراج RNA از همه تیمارها صورت گرفت. پس از تهیه cDNA به منظور تعیین سازوکار تأثیر کروسین، بیان ژن‌های مرتبط با آپوپتوز PTEN و نیز ژن مسیر ضد آپوپتوز Akt به روش Real-time PCR مطالعه گردید.

**یافته‌ها:** نتایج به دست آمده از آزمایش MTT نشان داد که کروسین تکثیر سلول‌های MCF7 را مهار می‌کند و سبب القای آپوپتوز در این سلول‌ها می‌شود. نتایج DAPI تغییرات کیفی آپوپتوز سلول سرطانی را پس از تیمار کروسین نشان داد. علاوه بر این، نتایج Real-time PCR نشان داد که کروسین سبب افزایش بیان ژن PTEN ( $P=0.041$ ) در سلول‌های سرطانی سینه MCF7 و نیز کاهش معنادار ژن Akt1 ( $P=0.038$ ) شد.

**بحث و نتیجه‌گیری:** یافته‌ها نشان داد که کروسین مسیر آپوپتوز در سلول‌های سرطانی سینه MCF7 را تحریک می‌کند؛ بنابراین می‌توان در جهت راهبرد جدید درمانی برای تیمار سرطان سینه، از کروسین استفاده کرد.

**واژه‌های کلیدی:** آپوپتوز، سرطان سینه، کروسین، MCS7

**استناد:** حاجی‌زاده، آیسان؛ قربان، سعید. مطالعه تأثیر کروسین زعفران بر آپوپتوز و یا زنده‌مانی رده سلول‌های سرطانی سینه MCF7 و بیان ژن‌های مسیر سیگنالینگ PTEN/AKT1. مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی ایلام، آبان ۱۴۰۱؛ ۳۰(۴): ۴۷-۵۵.



و تومور می‌شود؛ در نتیجه، سرطان نیز با کاهش آپوپتوز مرتبط است. AKT1 و PTEN مسیرهای سیگنالی هستند که در آپوپتوز سلول‌های سرطانی نقش دارند (۸، ۳). AKT4 به فسفاتیدیل تری فسفات متصل می‌گردد و مسیر سیگنالینگ را به سوی داخل سیتوپلاسم شلیک می‌کند. AKT جزء مهم مسیر است و فعالیت بیش‌ازحد طبیعی در این مولکول با بسیاری از سرطان‌ها ارتباط دارد (۹، ۱۰). AKT چند نقش ایفا می‌کند: ۱. مرگ سلولی و آپوپتوز را مهار می‌نماید و AKT این کار را با فعال کردن مهارکننده‌های آپوپتوز مثل XIAP انجام می‌دهد؛ ۲. AKT سرکوبگر تومور مشهور به P53 را مهار می‌کند؛ ۳. AKT مانع ساخت گلیکوژن می‌شود و بدین‌وسیله گلوکز برای متابولیسم سلول در دسترس قرار می‌گیرد. AKT این کار را با مهار آنزیم گلیکوژن سنتتاز کیناز ۳ یا Gsk-3 انجام می‌دهد؛ ۴. AKT با فعال‌سازی کمپلکس mTOR، دستگاه سنتز پروتئین و حفرات غشایی درون سلول را فعال می‌کند و به‌وسیله اتوفازی فعال می‌گردد (۱۰). با توجه به اینکه فعالیت Akt با فعالیت کینازی PI3K آغاز می‌شود، آنزیمی کلیدی به نام PTEN که یک فسفاتاز است، توانایی دفسفریله کردن فسفاتیدیل تینوزیتول تری فسفات را دارد و عکس عملکرد PI3K نقش سرکوبگری تومور دارد. برای کنترل مسیر AKT، آنزیم PTEN باید به‌درستی کار کند. چنانچه PTEN دچار اختلال یا جهش غیرفعال‌کننده باشد، پیشرفت سرطان صورت می‌گیرد (۱۲، ۱۱). از آنجاکه سرطان سینه یکی از شایع‌ترین سرطان در کشور است، هدف از این پژوهش مطالعه تأثیر کروسین زعفران بر آپوپتوز یا زنده‌مانی (مسیر سیگنالینگ AKT1/PTEN) در رده سلولی MCF7 سرطان سینه است تا شاید بتوان برای درمان و یا پیشگیری استفاده شود (۱۲، ۱۱).

### مواد و روش‌ها

تهیه محیط کشت RPMI1640: برای تهیه ۵ لیتر محیط کشت RPMI1640 به این صورت عمل گردید: ۵۲/۱۵ گرم

امروزه استفاده از شیمی‌داروها یک راهکار امیدوارکننده برای مهار سرطان است؛ اما از سوی دیگر، به علت افزایش مقاومت سلول‌های سرطانی به درمان‌های رایج به‌ویژه شیمی‌درمانی، کشف و شناسایی عوامل ضدسرطانی گیاهی جدید مورد توجه قرار گرفته است (۲، ۱). تحقیقات نشان داده است که عوامل آنتی‌اکسیدانی مانند ویتامین‌ها و عصاره برخی گیاهان، به‌عنوان منابع اصلی تولید و توسعه داروهای شیمی-پیشگیر در سرطان، از بروز یا پیشرفت سرطان جلوگیری می‌کنند (۳). زعفران یکی از گیاهان طبی است که این گیاه آثار درمانی متنوعی از جمله ضدافسردگی، ضدتشنج، اثرات ضدآسمی، ضددیابت، ضدالتهاب، ضداکسیدانت و ضدسرطان دارد. اولین گزارش از خواص ضدسرطانی این گیاه را گایر و همکارانش در سال ۱۹۷۶ میلادی ارائه دادند (۴). از آن زمان تاکنون، مطالعات بسیاری مبنی بر آثار آنتی‌توموری آن روی سرطان‌های مختلف دهانه رحم، کبد، ریه، کلون، پوست، پانکراس و مثانه در محیط آزمایشگاهی یا در حیوانات انجام شده است (۵).

سرطان به‌عنوان یکی از علل عمده مرگ‌ومیر در جهان شناخته شده است. پس از سرطان ریه و سرطان پوست، شایع‌ترین نوع سرطان در میان زنان، سرطان سینه یا همان سرطان پستان است که سالانه ۱۰ هزار نفر در ایران به این سرطان مبتلا می‌شوند و دومین سرطان کشنده در میان زنان است. سرطان پستان اولین سرطانی است که درمان هدفمند برای آن انجام شد. سرطان پستان اختلالی است که طی آن، سلول‌های بافت پستان تغییر می‌کنند یا جهش می‌یابند و به تولیدمثل ادامه می‌دهند. به‌طور کلی این سلول‌های غیرطبیعی برای تشکیل تومور به هم می‌چسبند. تومور سرطانی یا بدخیم زمانی است که این سلول‌های غیرطبیعی به سایر قسمت‌های سینه نفوذ می‌کنند (۶، ۷).

بسیار تقسیم شدن در سطح مولکول نیز باعث سرطان

جدول شماره ۱. پرایمرهای استفاده شده در Real Time – PCR

نام ژن	Tm(°C)	توالی پرایمر
PTEN	60°C	5'- TCCCAGTCAGAGGCGCTATG-3' 5'- CACAAACTGAGGATTGCAAG-3'
AKT1	59°C	5'- CATCACACCACCTGACCAAT-3' 5' CTCAAATGCACCCGAGAAAT -3'
GAPDH	63°C	F: 5 -AAGCTCATTTCTGGTATGACAACG -3 R: 5- TCTTCCTCTTGTGCTCTTGCTGG -5

رویی سلول‌ها روی دستمال خالی گردید و سلول‌های داخل هر چاهک با ۶۰ میکرولیتر PBS، سه بار شستشو داده و هر بار ۵ دقیقه PBS در داخل چاهک‌ها نگه داشته شد.

*استخراج RNA:* مقدار RNA استخراج شده به روش نوری و با استفاده از دستگاه NanoDrop، اندازه‌گیری و کیفیت RNA به دست آمده با روش الکتروفورز روی ژل ارزیابی گردید. نمونه RNA بعداً برای سنتز cDNA استفاده شد.

سنتز cDNA: تیوب‌ها را در دستگاه PCR قرار می‌دهیم و دستگاه را روی این برنامه «۱۰ دقیقه ۲۵ درجه، ۶۰ دقیقه ۴۲ درجه و ۱۰ دقیقه ۷۲ درجه» تنظیم می‌کنیم تا cDNAها سنتز شوند.

*طراحی پرایمر:* پرایمرهای استفاده شده توسط وبسایت NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov)، BLAST گردیدند که اطلاعات آن‌ها در جداول شماره ۱ و ۲ موجود است. همه پرایمرها توسط شرکت تکاپوزیست سنتز شدند. نرم‌افزار طراحی شده الیگو ۵ است.

پودر RPMI1640 به همراه ۱۰ گرم NaHCO<sub>3</sub> و آب مقطر استریل به حجم ۴ لیتر رسانده و به کمک مگنت و همزن مغناطیسی اجازه داده شد تا مواد به خوبی حل گردند تا اینکه محلول شفاف شود و هیچ رسوبی در آن مشاهده نگردد.

*آزمایش MTT:* اثر آزمایش MTT که یک روش رنگ سنجی است، بر اساس احیا شدن و شکسته شدن کریستال‌های زردرنگ تترازولیوم با فرمول شیمیایی 3-4,5-dimethylthiazol-2-yl-2,5-diphenyltetrazolium bromide، به وسیله آنزیم سوکسینات دهیدروژناز و تشکیل کریستال‌های آبی انجام می‌شود.

*رنگ آمیزی DAPI:* برای بررسی مستقیم کروموسوم بر سلول‌های MCF-7، پس از کشت و تیمار سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت با کروموسوم، مایع رویی یعنی محیط کشت سلول‌ها با سمپلر و سرسمپلر کاملاً خالی گردید و با افزودن ۶۰ میکرولیتر پارافمالدهید (paraformaldehyde) ۴ درصد به هر چاهک، به مدت ۸ دقیقه (بیشتر از ۱۰ دقیقه نشود) فیکس شد؛ سپس مایع

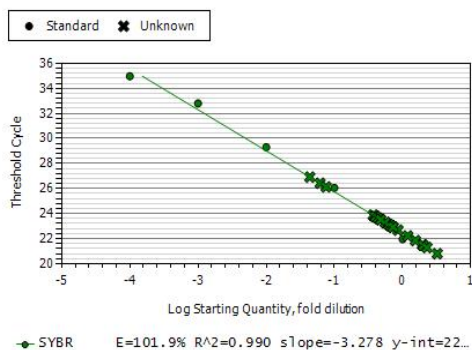
جدول شماره ۲. برنامه ترموسایکلر

مرحله	دما (درجه سانتی‌گراد)	زمان	تعداد سیکل
فعال‌سازی اولیه	۹۴	۱۰ دقیقه	۱
جداسازی	۹۴	۱۵ ثانیه	۴۰
اتصال و جذب نوری	۶۳-۶۰-۵۴	۳۰ ثانیه	
طول‌سازی	۷۲	۲۵ ثانیه	
طول‌سازی نهایی	۷۲	۵ دقیقه	۱

هر نمونه برای ژن‌های PTEN/AKT1 و استفاده از مقادیر CT محاسبه گردید. در نمونه‌های تیمار شده نسبت به نمونه کنترل که به وسیله میزان بیان ژن

## یافته‌ها

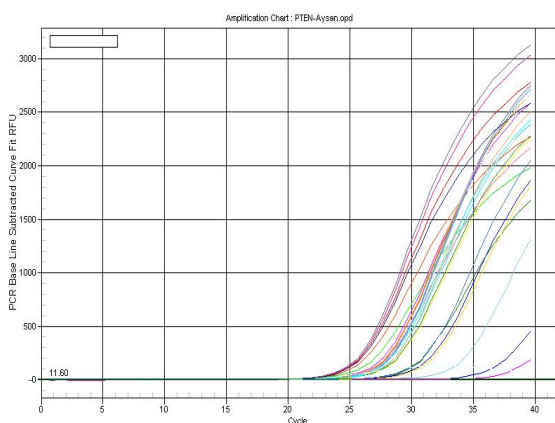
*آنالیز اطلاعات بیان ژنی:* تعیین سیکل آستانه CT برای هر کدام از نمونه‌ها صورت پذیرفت. میزان بیان در



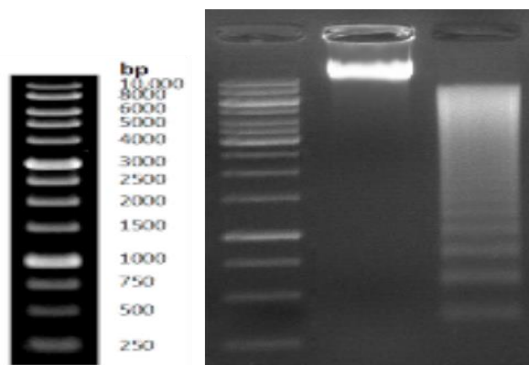
PCR Standard Curve : PTEN-Aysan.opd

**شکل شماره ۲.** منحنی استاندارد Realtime PCR. این منحنی نشان‌دهنده این موضوع است که همراه با افزایش غلظت cDNA، نمونه‌های با غلظت‌های بیشتر در سیکل‌های پایین‌تری به حد آستانه رسیده‌اند و چون همه عوامل جز مقدار cDNA در نمونه‌ها ثابت است، مشخص می‌گردد که CT‌های حاصل شده تنها به غلظت cDNA بستگی داشته است که نشان‌دهنده صحت کار است. وجود بازدهی نزدیک ۱۰۰ درصد بیانگر آزمایش صحیح و قابل‌اطمینان برای آنالیز است.

سلول‌های سرطانی سینه توسط کروسین، بیان ژن akt1 بررسی گردید. همان‌طور که شکل شماره ۵ نشان می‌دهد، میزان بیان ژن AKt1 در ساعت‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت پس تیمار کاهش پیدا کرده است و سلول‌ها به سوی آپوپتوز حرکت خواهند کرد.



**شکل شماره ۳.** منحنی تکثیر Real time PCR برای ژن PTEN از تیمار سلول‌های MCF7 با کروسین. برای هر تیمار، آزمایش سه بار تکرار شد و نیز ۶ نمونه با رقت‌سازی به‌عنوان استاندارد تکثیر گردیدند. همان‌طور که در شکل دیده می‌شود، CT نمونه‌ها تقریباً بین ۲۲ تا ۳۰ است و نیز پیک‌های سیگموتیدی که نشان از تکثیر بدون اختلال واکنش است.



**شکل شماره ۱.** ایجاد DNA Ladder به‌واسطه مرگ سلول‌ها در اثر آپوپتوز. در نمونه کنترل قطعه‌قطعه شدن دیده نمی‌شود؛ اما در تیمار کروسین به مقدار ۱۶۰۰ میکرومولار، به علت القای آپوپتوز، قطعه‌قطعه شدن DNA مشاهده می‌گردد

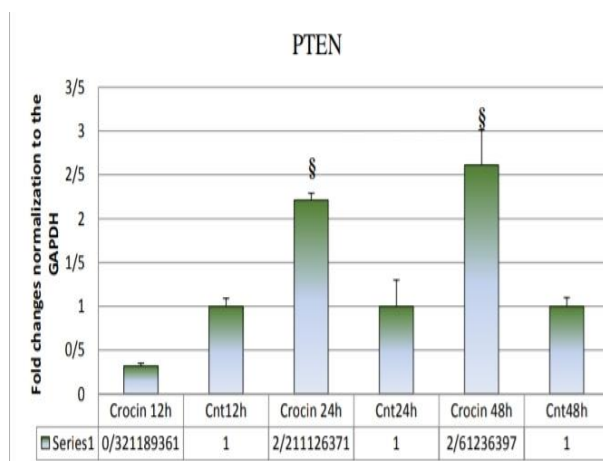
GAPDH نرمالایزه شده است، محاسبات با استفاده از فرمول ارائه‌شده از سوی پفل (Michael W. Pfaffl) و همکاران صورت گرفت (۲۳)؛ همچنین به‌منظور مقایسه میانگین تیمارها نسبت به گروه کنترل، از t-test و برای مقایسه میانگین تیمارهای مختلف نسبت به هم از آزمون ANOVA استفاده شد. از GAPDH به‌عنوان رفرنس استفاده گردید؛ زیرا تحت تیمارهای مختلف بیان می‌شود و تغییری در آن ایجاد نمی‌گردد.

$$\text{ratio} = \frac{(E_{\text{target}})^{\Delta C_{\text{P}}^{\text{target}}(\text{control} - \text{sample})}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta C_{\text{P}}^{\text{ref}}(\text{control} - \text{sample})}}$$

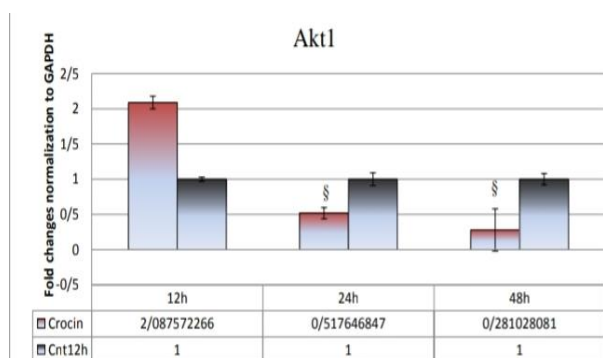
**نتایج آزمایش DNA Ladder:** پلیت حاوی سلول توسط غلظت ۱۶۰۰ میکرومولار دوباره به مدت ۴۸ ساعت تیمار شد و پس از استخراج DNA، در ژل آگارز ۱ درصد در مجاورت لدر kb1 الکتروفورز گردید و نتایج آن در دستگاه ژلداک و زیر نور UV مشاهده شد که به قرار زیر است (شکل شماره ۱).

**نتایج Real-time PCR:** برای انجام این آزمایش، سلول‌ها در پلیت‌های ۶ خانه‌ای با غلظت‌های IC ۵۰ کروسین تیمار داده شد و بر اساس شیوه بیان‌شده، آزمایش مولکولی صورت پذیرفت که نتایج آن در شکل‌های شماره ۴-۲ نشان داده شده است.

همچنین به‌منظور اطمینان از سازوکار آپوپتوز



**شکل شماره ۴.** میزان بیان ژن PTEN در سلول‌های MCF7 تحت تأثیر کروسین به مدت ۱۲ و ۲۴ و ۴۸ ساعت و میزان تغییرات بیان ژن نسبت به کنترل و با نرمالیزه کردن بر ژن خانه‌دار GAPDH، با روش Real time PCR سنجیده شد. همه آزمایش‌ها سه بار تکرار گردید و  $P > 0.05$  معنادار (§) در نظر گرفته شد ( $P=0.041$ ).



**شکل شماره ۵.** نمودار میزان بیان AKT1 در سلول‌های MCF7 تحت تأثیر کروسین زعفران. سلول‌های MCF7 با غلظت‌های IC<sub>50</sub> کروسین به مقدار ۱۶۰۰ میکرومولار، به صورت تکی و به مدت ۱۲ و ۲۴ و ۴۸ ساعت تیمار گردیدند و میزان تغییرات بیان ژن MCF7 به روش Real time PCR سنجیده شد. همه آزمایش‌ها سه بار تکرار گردید و  $P > 0.05$  معنی‌دار (\*\*\*) در نظر گرفته شد ( $P=0.038$ ).

## بحث و نتیجه‌گیری

علت بروز سرطان تعادل نداشتن میان مرگ و تکثیر سلولی از طریق چرخه سلولی است. p27 یکی از مهارکننده‌های کینازهای وابسته سیکلون است که فعالیت آن به مهار چرخه سلولی منجر می‌شود. داروهای ضدسرطان به‌طور معمول با القای آپوپتوز مرگ برنامه‌ریزی شده سلول و یا توقف در چرخه تقسیم سلولی، باعث مهار رشد و تکثیر سلولی می‌گردند.

مطالعات متعددی اشاره کرده‌اند که کروسین با افزایش بیان پروتئین پیش‌آپوپتوزی Bax و کاسپازها و کاهش بیان پروتئین ضدآپوپتوزی Bcl-2،

آپوپتوز را در سلول‌های سرطانی القا نموده‌اند (۲۰-۱۸). نتایج ما نشان داد، کروسین با تأثیر معنی‌دار در افزایش بیان PTEN و نیز اثر مهارى بر بیان ژن akt1 می‌تواند آپوپتوز سلول‌های سرطانی سینه را مهیا کند. کاروتنوئیدها و مونوتیرین آلدئیدهای کلالة خشک زعفران در کاهش رشد و تکثیر سلول‌های سرطانی مثل پستان و معده مؤثر هستند و تأثیر این مواد وابسته به زمان و غلظت ترکیبات است. IC<sub>50</sub> (غلظت القاکننده ۵۰ درصد مرگ سلولی) عصاره زعفران روی رده‌های سلول سرطانی پستان (MCF7)، سلول‌های سرطان کبدی (HepG2)، دهانه رحم (Hela) و کلون (ht29) به ترتیب ۰/۹۷، ۰/۹۵،



به صورت اثر مهارى روى رشد و یا پیشرفت تومور است (۲۱). هوشیار و همکاران در پژوهشى، اثر درمانى زعفران بر تومورهای سرطان پستان را مطالعه کردند و نتایج پژوهش آنان نشان داد که کروسین و کروسین از کاروتنوئیدهای مهم زعفران هستند که آثار ضدتومورى و ضدسرطانى دارند؛ در نتیجه، کروسین و کروسین تأثیر بسزایى در فعال‌سازى p27 در تومورهای سرطان پستان ایفا می‌کنند (۲۲). حیدرزاده و همکاران در مطالعه‌ای با عنوان «بررسى اثر سمى کروسین بر رده سلولى MDA-MB-468 بر اساس القای آپوپتوز و تغییرات نشانگرهای تنش شبکه آندوپلاسمی و اتوفازى» نشان داده بودند که کروسین به صورت وابسته به دوز و زمان، موجب مرگ رده سلولى MDA-MB-468 شد. تیمار با کروسین تغییر فراوانى در فعال شدن کاسپاز ۹ و شکستن آن و در نتیجه، افزایش نسبت Cleaved-Cas9/Cas9 داشت. پیرایش ژن XBP1 نیز پس از تیمار افزایش یافت؛ همچنین افزایش معنی‌دار بیان پروتئین پیرایش شده XBP1 (XBP1s) و تجمع پروتئین LC3-II و افزایش نسبت LC3-II/LC3-I در این سلول‌ها مشاهده شد. نتایج نشان داد که این رده از سلول‌های سرطان پستان پس از تیمار با کروسین، دچار آپوپتوز گردید. با توجه به تغییرات نشانگرهای مسیره‌های UPR و اتوفازى، احتمالاً این دو مسیر نیز در پیشبرد سلول به‌سوی مرگ سلولى و تنظیمات درون‌سلولى نقش دارند (۲۳). مطالعه حاضر با نتایج استفاده از زعفران مطابقت دارد و بنابراین می‌توان نتیجه‌گیری کرد که کروسین می‌تواند اصلی‌ترین ماده ضدسرطانى در ترکیبات زعفران به‌شمار آید. در ادامه پیشنهاد می‌شود که بررسى اثر سایر ترکیبات زعفران از جمله سافرانین و کروسین نیز بررسى گردد. از آنجاکه ما در این مطالعه اثر کروسین را در سطح ژن‌ها ارزیابى کردیم و با توجه به اینکه افزایش یا کاهش بیان ژن در روش Real time PCR، تنها تغییرات کمی میزان بیان ژن را نشان می‌دهد و

۰/۸ و ۰/۴ (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) گزارش شده است، درحالی‌که اثر با‌دارندگى معنی‌دارى روى رشد و تکثیر سلول‌های طبیعى فیروبلاست موش L929 نشان نداده است (۱۶-۱۳). با وجود آن، علت آثار ضدسرطانى زعفران دقیقاً مشخص نشده است و عصاره آبی زعفران ترکیبات بسیار فراوانى دارد که اثر ضدسرطانى دم‌کرده آن نمی‌تواند مشخص کند کدام ماده ترکیبات اصلی زعفران ضدسرطان‌زاست؛ بنابراین، در این پژوهش کروسین که یک ترکیب اصلی در زعفران است، به‌منظور اثر ضدسرطانى و مشخص کردن سازوکار مولکولى آن انتخاب شد. گزارش شده است که ۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره زعفران حاوی ۰/۶ میلی‌مولار کروسین است؛ بنابراین، بسىارى از آثار عصاره زعفران می‌تواند مربوط به این ماده باشد. کروسین در یک رفتار انتخابى وابسته به غلظت و زمان، تکثیر سلول‌های آدنوکارسینوماى معده (AGS) را مهار می‌کند، درحالی‌که اثر مهارى معنادارى بر رشد سلول‌های طبیعى فیروبلاست پوست (PI3-HFSF) ندارد (۲۰). تاکنون هیچ مطالعه‌ای درباره تأثیر کروسین بر سلول‌های سرطان سینه گزارش نشده است؛ اما نتایج به‌دست‌آمده در این پژوهش همانند خود زعفران و کروسین، بر سلول‌های سرطانى تأثیر گذاشت و آن‌ها را وادار به آپوپتوز کرد؛ بنابراین، نتایج ما با نتایج مطالعات پیشین درباره سایر سرطان‌ها مطابقت دارد. مرور مطالعات و گزارش‌های دیگر نیز نشان می‌دهد، زعفران اثر ضدسرطانى دارد؛ اما کدام ماده اصلی ترکیبات زعفران این کار را انجام می‌دهد، کاملاً مشخص نشده است. خسروى و همکاران پژوهشى درباره خواص سیتوتوکسیک عصاره زعفران در آپوپتوز سلول‌های سرطانى انسان ارائه دادند که در این مطالعه، اثر سیتوتوکسیک عصاره زعفران در رده‌های HepG2 و HeLa ارزیابى شد. نتایج مطالعه حاضر مؤید شواهد روزافزون نقش عصاره زعفران به‌عنوان یک ترکیب پیشگیرى‌کننده از سرطان،

عوامل طبیعی و ایمن در پیشگیری و درمان انواع سرطان‌ها بسیار مورد توجه قرار گیرند. نتایج این پژوهش نشان داد، کروسین اصلی‌ترین ماده ضدسرطانی زعفران است و می‌تواند با افزایش بیان PTEN، باعث مهار رشد و آپوپتوز سلول‌های سرطان سینه شود.

### تشکر و قدردانی

مقاله حاضر برگرفته از پایان‌نامه کارشناسی ارشد ژنتیک با کد مصوب 931251 از دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهر است. از همه افرادی که ما را در انجام این تحقیق یاری کردند، تشکر و قدردانی می‌گردد.

### تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌کنند که هیچ تضادی در منافع ندارند.

درباره تولید و عملکرد پروتئین‌ها هیچ گونه آگاهی‌ای برایمان به همراه ندارد، نیاز است بررسی‌های لازم در زمینه بیان ژن، مقدار و عملکرد پروتئین‌های ژن صورت گیرد.

امروزه شیوع سرطان در کشورهای توسعه یافته و در حال توسعه به صورت چشمگیری افزایش یافته است. بسیاری از درمان‌های رایج سرطان مانند شیمی‌درمانی و پرتودرمانی به علت اثر بر سلول‌های طبیعی، عوارض جانبی بسیاری را به همراه دارند و ممکن است در بیماران مقاومت به درمان را ایجاد کنند؛ بنابراین، شناسایی داروهای گیاهی با بیشترین اثر ضدسرطانی و کمترین عوارض جانبی که منجر به افزایش طول عمر و کیفیت زندگی بیمار سرطانی می‌شوند، از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است و بر اساس این، مطالعات در دهه‌های اخیر پیشنهاد می‌کنند که کلاله زعفران و متابولیت‌های ثانویه آن به علت خاصیت ضدتوموری مؤثر می‌تواند به عنوان

## References

- Labriola D, Livingston R. Possible interactions between dietary antioxidants and chemotherapy. *Oncology* 1999;13:1003-8.
- Conklin KA. Cancer chemotherapy and antioxidants. *J Nutr* 2004;134:3201S-3204S. doi: 10.1093/jn/134.11.3201S.
- Nair S, Pannikar B, Panikkar K. Antitumor activity of saffron (*Crocus sativus*). *Cancer Lett* 1991; 57:109-14. doi: 10.1016/0304-3835(91)90203-t.
- Rios J, Recio M, Giner R, Manez S. An update review of saffron and its active constituents. *Phytother Res* 1996;10:189-93. doi:10.1002/(SICI)1099-1573(199605)10.
- Abdullaev FI. Antitumor effect of saffron (*Crocus sativus* L.): overview and perspectives. I International Symposium on Saffron Biology and Biotechnology 650; 2003. doi: 10.17660/ActaHortic.2004.650.60
- Molnar J, Szabo D, Pusztai R, Mucsi I, Berek L, Ocsosvzki I, et al. Membrane associated antitumor effects of crocine, ginsenoside-and cannabinoid derivatives. *Anticancer Res* 2000; 20:861-7.
- Ortega V, Antón A, Garau I, Afonso N, Calvo L, Fernández Y, et al. Phase II, multicenter, single-arm trial of eribulin as first-line therapy for patients with aggressive taxane-pretreated HER2-negative metastatic breast cancer: the MERIBEL study. *Clin Breast Cancer* 2019;19:105-12. doi: 10.1016/j.clbc.2018.12.012.
- Hosseinzadeh H, Sadeghnia HR. Effect of safranin, 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 Cell Biol* 2007; 26:841-6. doi: 10.1089/dna.2007.0631.
- Abdullaev F, Espinosa-Aguirre J. Biomedical properties of saffron and its potential use in cancer therapy and chemoprevention trials. *Cancer Detect Prev* 2004; 28:426-32. doi: 10.1016/j.cdp.2004.09.002.
- Kaefer CM, Milner JA. The role of herbs and spices in cancer prevention. *J Nutr Biochem* 2008; 19:347-61. doi: 10.1016/j.jnutbio.2007.11.003.
- Cristofanilli M, Broglio KR, Guarneri V, Jackson S, Fritsche HA, Islam R, et al. Circulating tumor cells in metastatic breast cancer: biologic staging beyond tumor burden. *Clin Breast Cancer* 2007; 7:471-9.
- Onsory K, Ranapoor S. Breast cancer and the effect of environmental factors involved. *New Cell Mol Biotech J* 2011;1:59-70.
- Milajerdi A, Djafarian K, Hosseini B. The toxicity of saffron (*Crocus sativus* L.) and its constituents against normal and cancer cells. *J Nut Intermed Metabol* 2016;3:23-32. doi.org/10.1016/j.jnim.2015.12.332
- 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 Complement Altern Med* 2012;12:69. doi: 10.1186/1472-6882-12-69.
- Samarghandian S, Boskabady MH, Davoodi S. Use of in vitro assays to assess the potential antiproliferative and cytotoxic effects of saffron (*Crocus sativus* L.) in human lung cancer cell



- line. *Pharmacogn Mag* 2010; 6:309-14. doi: 10.4103/0973-1296.71799.
16. 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 Chem Toxicol* 2009; 47:1909-13. doi: 10.1016/j.fct.2009.05.017.
  17. 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;32:50-7. doi.org/10.1089/dna. 2012.1866.
  18. Xu H, Zhao X, Liu X, Xu P, Zhang K, Lin X. Antitumor effects of traditional Chinese medicine targeting the cellular apoptotic pathway. *Drug Des Devel Ther* 2015;9:2735. doi:10.2147/ DDDT. S80902.
  19. Teiten M-H, Gaascht F, Dicato M, Diederich M. Anticancer bioactivity of compounds from medicinal plants used in European medieval traditions. *Biochem Pharmacol* 2013;86:1239-47. doi: 10.1016/j.bcp.2013.08.007.
  20. Valavi M, Saedabad AGA, Hoshyar R, Mollaei H. Effects of Combined Crocin and Epirubicin on Apoptosis and Cell Cycle Pathways in a Human Cervical Cancer Cell Line. *Int J Cancer Manage* 2018;11. doi: 10.5812/ijcm.82575
  21. Khosravi A, Faridhoseini R, Jabbari Azad F, Yousefzadeh H, Moghiman T, Vaez Tabasi M, et al. Studying the Inhibitory Effect of Saffron Extract on Adenocarcinoma of Colon Cell Line. *Med J Mashhad Uni Med Sci* 2013;56:283-8.
  22. Hoshyar R, Mostafavinia SE, Bathaie SZ. Anticancer effects of saffron stigma (*Crocus Sativus*): a review study. *Razi J Med Sci* 2016;22:69-78.
  23. Heidarzadeh H, Bathaie SZ, Abroun S, Mohagheghi MA. Evaluating the cytotoxic effect of crocin on MDA-MB-468 cell line based on apoptosis induction, ER stress, and autophagy markers. *Pathobiol Res* 2018;20:37-51.