ژنتیک نوین
دوره هفدهم، شماره ۳، پاییز ۱۴۰۱
صفحه ۲۸۱ - ۲۷۳

بررسی تأثیر ضدسرطانی عصاره بذر زیره کرمانی بر بیان برخی ژن‌ها در سلول‌های سرطانی MCF-7

Evaluation of Anti-Cancer Effect of Black Cumin Seed Extract on Expression of Some Genes in MCF-7 Cancer Cells

محمدرسول سمندری بهرآسمان[۱]، احمد اسماعیلی[*۱]، سعید اسماعیلی ماهانی[۲]، اسماعیل ابراهیمی[۳]، اولین لوییت[٤]

۱- به‌ترتیب دانشجوی دکتری، استاد، گروه تولیدات گیاهی و مهندسی ژنتیک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران
۲- استاد، گروه زیست‌شناسی دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران
۳- استاد، گروه سلامت و دانش دانشگاه ملبورن، استرالیا
٤- کرسی علوم زراعی و زیست‌شناسی گیاهی، موسسه علوم کشاورزی و زیست‌محیطی، دانشگاه علوم زیستی استونی، تارتو

Samandari-Bahraseman MR [1], Ismaili A [*2], Esmaeili-Mahani S[3], Ebrahimi E[4], Loit E [5]

1- PhD Candidate, Professor, Plant Production and Genetic Engineering Department, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran
2- Professor, Department of Biology, Faculty of Sciences, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran
3- Professor, La Trobe Genomics Research Platform, School of Life Sciences, College of Science, Health and Engineering, La Trobe University, Melbourne, VIC 3086, Australia
4- Professor, Chair of Crop Science and Plant Biology, Institute of Agricultural and Environmental Sciences, Estonian University of Life Sciences, Tartu, Estonia

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: ismaili.a@lu.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۲/۱۰ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۶/۲۹)

چکیده

زیره کرمانی یکی از مهم‌ترین گیاهان دارویی بومی ایران است که دانه‌های آن در رژیم غذایی استفاده می‌شود و اثرات مضر جانبی برای انسان ندارد. مطالعات گذشته تأثیر دارویی این گیاه را در زمینه‌های مختلف نشان داده است اما تاکنون مطالعه‌ای در مورد تأثیر ضدسرطانی بذر این گیاه صورت نگرفته است. در این مطالعه، اثر ضد سرطانی عصاره دانه زیره کرمانی بر سلول‌های سرطانی رده پستان MCF-7 موردبررسی قرارگرفته است. در ابتدا با آنالیز متن‌کاوی مسیرها و ژن‌های مهم متأثر از عوامل شیمی‌جلوگیری کننده گیاهی در درمان سرطان مشخص شد. بعد از عصاره‌گیری از بذرهای زیره کرمانی، ابتدا با استفاده از روش Neutral Red میزان زنده‌مانی سلول‌های MCF-7 تحت تیمار با غلظت‌های متفاوت عصاره مورد بررسی قرار گرفت. سپس برای بررسی تأثیر عصاره بر فرایند آپوپتوز از تکنیک فلوسایتومتری استفاده شد. در آخر بیان چند ژن مهم به‌دست‌آمده از آنالیز متن‌کاوی با استفاده از روش real-time PCR ارزیابی شد. تأثیر عصاره بر میزان زنده‌مانی سلولی به‌صورت وابسته به غلظت بود. عصاره بذر زیره در دوز ۱۶۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر باعث کاهش زنده‌مانی سلولی به میزان ۵۰ درصد در سلول‌های MCF-7 شد. تحت تیمار با عصاره زیره ژن‌های به‌دست‌آمده از آنالیز متن‌کاوی به نحوی تغییر نشان دادند که می‌تواند در درمان سرطان تأثیر مثبتی داشته باشد. مطالعه حاضر برای اولین بار نشان می‌دهد که عصاره بذر زیره کرمانی می‌تواند آپوپتوز را در سلول‌های سرطانی MCF-7 القا کند.

واژه‌های کلیدی

آپوپتوز
درمان سرطان
سرطان
مرگ سلولی

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-18]

مقدمه

پیشرفت‌های اخیر در درمان با عوامل ضد سرطان، کیفیت روند درمان و کیفیت زندگی بیماران سرطانی را بهبود بخشیده است. به گفته سازمان جهانی بهداشت، نئوپلاسم‌های بدخیم خطرات عمده سلامتی برای زن‌ها هستند که ۱۹/٦ میلیون زن را مستعد ابتلا به سرطان پستان کرده است. سرطان پستان با ۲/۲٦ میلیون مورد جدید در سال ۲۰۲۰ شایع‌ترین سرطان تشخیص داده شده در زن‌ها و همچنین عامل اصلی مرگ‌ومیر ناشی از سرطان در زن‌ها در سراسر جهان است (Nikolaou et al. 2018). پیدا کردن ترکیبات مؤثر برای درمان سرطان پستان می‌تواند در کمک به درمان این بیماری کمک‌کننده باشد.

آپوپتوز یکی از مهم‌ترین مکانیسم‌های مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلولی است که در سال‌های اخیر از استراتژی‌های اصلی مبارزه با سرطان بوده است (D'Arcy 2019). دو مسیر اصلی مرگ سلولی به‌واسطه آپوپتوز، مسیر داخلی و مسیر خارجی است. در مسیر داخلی یا میتوکندری، کاسپاز آغازگر کاسپاز-۹ است و کاسپازهای اجرایی ۳،٦،۷ را فعال می‌کند و درنتیجه، کاسپازهای اجرایی بر روی هدف خود عمل می‌کنند و روند آپوپتوز اتفاق می‌افتد (Carneiro and El-Deiry 2020).

به ترکیباتی که در رژیم غذایی روزانه وجود دارند، مانند سبزی‌ها، میوه‌ها، ادویه‌جات ترشی جات و چاشنی‌ها و باعث جلوگیری از پیشرفت بیماری‌های مزمن مانند سرطان می‌شوند، ترکیبات شیمی‌پیشگیری‌کننده[1] گفته می‌شود (Levi et al. 2012; Thomasset et al. 2007). این ترکیبات بی‌ضرر هستند و مدت‌هاست که در رژیم غذایی انسان مصرف می‌شوند. علاوه بر این، در دهه گذشته، تحقیقات زیادی در مورد این ترکیبات و عصاره‌های گیاهی برای بررسی اثرات ضد سرطانی و پیشگیری از سرطان انجام‌شده است (Boocock et al. 2007; Verschoyle et al. 2007). برخی از آن‌ها در مدل‌های مختلف آزمایشگاهی موردمطالعه قرارگرفته‌اند و نشان داده‌شده است که به‌طور قابل توجهی از تکثیر سلول‌های سرطانی جلوگیری می‌کنند. یافتن ترکیباتی با اثرات کشنده بر سلول‌های سرطانی با عوارض جانبی اندک برای انسان بسیار مهم است. (De Flora and Ferguson 2005).

زیره کرمانی (*Bunium persicum*) گیاهی است که حدود ۳۰ تا ۸۰ سانتی‌متر ارتفاع دارد. این گیاه با نام های مختلفی ازجمله زیره کوهی، زیره کرمانی، زیره وحشی، کله زیره، زیره سیاه ایرانی و غیره شناخته می‌شود و دارای گل‌های کوچک سفید و دانه‌های قهوه‌ای مایل به زرد تیره بیضی‌شکل است (Hassanzadazar et al. 2018). دانه‌های این گیاه ترکیبات ارزشمندی تولید می‌کنند که دارای خواص ضد میکروبی، آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی، ضد دیابت، ضد چربی خون و ضد درد هستند. عطرمایه زیره سیاه ایرانی حاوی مقادیر زیادی مونوترپن‌های اکسیژنه، به‌ویژه γ- ترپینن، کومینالدهید، ρ- سیمن و لیمونن است که دارای اثرات ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی بالایی هستند (Chizzola et al. 2014). ازآنجاکه زیره سیاه ایرانی به‌عنوان ماده طعم‌دهنده در رژیم غذایی افراد به‌طور گسترده‌ای استفاده می‌شود، نگرانی در مورد اثرات سمی این گیاه وجود ندارد. زیره سیاه ایرانی رژیم غذایی ایرانیان برای اهداف آشپزی به‌عنوان ادویه و طعم‌دهنده در غذاها و نوشیدنی‌ها استفاده می‌شود (Hassanzadazar et al. 2018). تحقیقات در مورد اثر شیمیایی پیشگیری *Carum carvi* (گونه‌ای از زیره سیاه) نشان می‌دهد که این گیاه به‌خوبی می‌تواند از تشکیل توده‌های سرطانی روده بزرگ موش ناشی از تیمار با 1،2-dimethylhydrazine (DMH) جلوگیری کند (Deeptha et al. 2006). علاوه بر این، اثر ضد سرطانی عصاره *Carum carvi* همراه با چندین گونه از خانواده Apiaceae گزارش شده است (Bogucka-Kocka et al. 2008).

تاکنون مطالعه‌ای برای بررسی اثر ضد سرطانی زیره کرمانی انجام نشده است. این مطالعه برای اولین بار به بررسی اثر ضد سرطانی عصاره دانه این گیاه روی سلول‌های سرطانی MCF-7 پرداخته است. برای درک بهتر تأثیر عوامل دارویی گیاهی در روند درمان سرطان، تأثیر عوامل شیمی جلوگیری‌کننده در درمان سرطان توسط متن‌کاوی بر مسیرهای مهم پیام‌رسانی مرتبط با سرطان مشخص شد. همچنین این اثرات با داروی شیمی‌درمان وین‌کریستین مقایسه شد و در ادامه تأثیر عصاره دانه زیره‌کرمانی بر چند ژن مهم به‌دست آمده از آنالیز متن‌کاوی بررسی شد.

[1] chemopreventive

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-18]

مواد و روش‌ها

برای تجزیه‌وتحلیل اثر عوامل شیمی پیشگیری کننده و وین‌کریستین بر مسیرهای سیگنال‌دهی سلولی مرتبط با سرطان، ابتدا چندین عامل شیمی پیشگیری کننده و وین‌کریستین به‌عنوان ورودی انتخاب شدند و سپس فرآیندهای سیگنال دهی سلولی مختلف مرتبط با سرطان توسط دستورالعمل‌های نرم‌افزار Pathway Studio انتخاب و توسط این پایگاه داده[1] مورد تجزیه‌وتحلیل قرار گرفتند. بعد از آنالیز مسیرها و ژن‌های مختلف توسط متن‌کاوی نتایج حاصل به‌صورت تأثیر مثبت، منفی و یا دوجانبه روی هدف مشخص شدند. در ادامه با بررسی مقالات مختلف و بررسی اثر هرکدام از هدف‌ها روی روند درمان سرطان، نتایج را به گروه‌های تأثیر مثبت (آبی)، تأثیر منفی (قرمز) و دوجانبه (سبز) دسته‌بندی کردیم. برای مثال درجایی که تأثیر داروی شیمی‌درمانی بر NF-κB مثبت (P) بود این اثر به‌عنوان اثر منفی در روند درمان به‌حساب آمد و با رنگ قرمز مشخص شد و یا در جایی که تأثیر عامل دارویی بر پروتئین آنکوژنی مثل BCL-2 منفی (N) بود این اثر به‌عنوان اثر مثبت (آبی) در نظر گرفته شد. بذور زیره کرمانی با شماره ۳۸۴۳ (ثبت‌شده در دانشگاه شهید باهنر کرمان) از دامنه کوه‌های دالفارد کرمان جمع‌آوری شد. سپس بذرها به مدت یک هفته در سایه و در دمای اتاق (۲۵-۲۲ درجه سانتی‌گراد) خشک و سپس آسیاب شدند. پودر بذرها با متانول ۸۰ درصد مخلوط شد. نمونه با سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه در دمای اتاق به مدت ٤٨ ساعت تکان داده شد. عصاره به‌دست آمده چندین بار با کاغذ صافی معمولی و کاغذ صافی واتمن تصفیه شد تا محلولی شفاف به‌دست آید. برای حذف حلال آلی و تغلیظ عصاره از تقطیر خلأ در دمای ٤٠ درجه سانتی‌گراد استفاده شد. سلول‌های سرطانی MCF-7 انسانی از مرکز منابع ژنتیکی ایران خریداری شده‌اند. از محیط DMEM حاوی ۱۰ درصد سرم گاو جنین و یک درصد آنتی‌بیوتیک برای تکثیر سلول استفاده شد. شرایط نگهداری سلول‌ها در دستگاه انکوباتور با ۵ درصد CO_2 و در دمای ۳۷°C بود. در روش Neutral Red، سلول‌های MCF-7 پس از دو پاساژ در پلیت‌های ۹٦ چاهکی با تراکم ۵۰۰۰ سلول در هر چاهک کشت داده شدند. سلول‌های کنترل در DMEM طبیعی رشد کردند و گروه‌های دیگر پس از تیمار در دوزهای مورد نظر به مدت ٢٤ ساعت نگهداری شدند. برای بررسی روند آپوپتوتیک و real-time PCR، سلول‌ها در ظروف شش چاهک رشد داده شدند و به آن‌ها اجازه اتصال و رشد به مدت ٢٤ ساعت داده شد. سپس سلول‌ها با غلظت مدنظر عصاره بذر زیره سیاه تحت تیمار قرار گرفتند و به مدت ٢٤ ساعت نگهداری شدند.

پس از شمارش سلول‌ها به‌وسیله لام نئوبار تعداد ۵۰۰۰ از آن‌ها در هر چاهک پلیت ۹٦ چاهکی ریخته شد. به هر چاهک ۲۰۰ میکرو لیتر DMEM اضافه شد. پلیت حاوی سلول‌ها به مدت ٢٤ ساعت در انکوباتور نگه داشته شد. سپس با تعویض محیط کشت دوزهای مورد نظر عصاره اضافه شد. پلیت ۹٦ چاهکی حاوی عصاره و سلول برای مدت ٢٤ ساعت به انکوباتور انتقال یافت. سپس محیط کشت حاوی عصاره با سمپلر کشیده شد و به آن ۲۰۰ میکرو لیتر Neutral Red اضافه شد و به مدت ٤ ساعت در انکوباتور گذاشته شد. سپس مایع کشیده شد و به هر چاهک ۲۰۰ میکرولیتر محلول تثبیت کننده اضافه شد. بعد از آن محتوی چاهک‌ها کشیده شد و به هر چاهک ۲۰۰ میکرولیتر از محلول disturb اضافه شد. بعد از گذشت ۸ دقیقه برای خوانده شدن توسط دستگاه الایزا ریدر به دستگاه انتقال یافت و در طول موج ٥٤٠ نانومتر خوانده شد.

پس از تیمار سلول‌ها با دوز موردنظر و پس از ٢٤ ساعت، آپوپتوز و نکروز سلول با استفاده از کیت تشخیص آپوپتوز nexin-V PE/7-ADD (کیت BD Biosciences) مورد بررسی قرار گرفت. سلول‌ها ابتدا با PBS شسته و سپس در ۱۰۰ میکرولیتر بافر اتصال آنکسین V، ۵ میکرولیتر PE Annexin V و ۵ میکرولیتر AAD به حالت تعلیق درآمده و به مدت ۱۵ دقیقه در تاریکی قرار گرفتند. سرانجام، با افزودن ٤٠٠ میکرولیتر بافر اتصال، نمونه‌ها با استفاده از فلوسیتومتر مورد سنجش قرار گرفتند (Becton Dickinson، Franklin Lakes NJ).

پس از کشت سلول و تیمار سلول‌ها با عصاره بذر زیره سیاه طبق دوزهای ذکرشده، RNA نمونه‌ها توسط کیت زیست آسیا طبق پروتکل سازنده استخراج شدند. برای جداسازی RNAها توسط کروفرم و ایزوپروپانول و شستشو با اتانول ۷۵ درصد انجام شد و

[1] www.pathwaystudio.com

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-18]

در نهایت RNAها در آب DEPC حل شدند. برای اندازه‌گیری کیفیت RNAها از دستگاه Nanodrop استفاده شد. cDNA طبق پروتکل و توسط کیت فرمنتاز ساخته شد. پس از ساخت cDNA، برای انجام real-time PCR، از مسترمیکس[1] Ampliqon استفاده شد. ژن GAPDH به‌عنوان کنترل داخلی برای بررسی بیان ژن‌ها استفاده شد. آغازگرهای طراحی‌شده برای هر ژن با استفاده از BLAST در سایت NCBI ازنظر ویژگی انحصاری بودن کنترل شدند. برای برآورد درصد بیان تغییرات نسبی از فرمول $۲^{-\Delta\Delta CT}$ و همچنین از سه تکرار برای هر نمونه استفاده شد. لیست آغازگرها در جدول ۱ نمایش داده شده است.

داده‌ها با استفاده از آنالیز واریانس ANOVA تجزیه‌وتحلیل شد. از آزمون توکی برای ارزیابی اثرات بین گروه‌ها توسط نرم‌افزار SPSS استفاده شد. همه آزمایش‌ها حداقل با سه تکرار انجام شد. میانگین گروه‌های مختلف با استفاده از ANOVA یک‌طرفه و به دنبال آن آزمون Newman– Keuls اندازه‌گیری شد. نتایج به‌صورت میانگین ± SEM نشان داده شد و ازنظر آماری مقادیر معنی‌داری در $P <.05$، $P <.01$ و $P <0.001$ تعریف شد.

نتایج و بحث

اثر ترکیبی وین‌کریستین و عوامل شیمی پیشگیری کننده بر مسیرهای انتقال سیگنال

همان‌طور که در جدول ۲ نشان داده شده است، نتایج نشان می‌دهد که در تعدادی از ژن‌ها و فرآیندهای سلولی، هم وین‌کریستین و هم عوامل شیمی پیشگیری کننده می‌توانند برای درمان سرطان مفید باشند (رنگ آبی). وین‌کریستین علاوه بر اثرات مفیدی که در مبارزه با سرطان دارد، دارای معایبی نیز هست. این دارو بیان پروتئین‌ها و فرآیندهایی را مسدود یا تقویت می‌کند که می‌تواند اثرات مضری بر روند درمان سرطان داشته باشد (رنگ قرمز). ازجمله ژن‌هایی که توسط وین‌کریستین دچار تغییر بیان می‌شوند و می‌توانند روند درمان را دشوارتر کنند عبارت‌اند از mTOR، NF-κB، JUN و غیره. جالب است که نتایج متن‌کاوی نشان می‌دهد که این ژن‌ها توسط عوامل شیمی جلوگیری‌کننده سرکوب می‌شوند. فرآیندهای نکروز و آتوفاژی که معمولاً برای درمان سرطان مطلوب نیستند نیز توسط هر دو نوع عامل (که با رنگ سبز مشخص شده‌اند) رخ می‌دهند. همان‌طور که در جدول ۲ خلاصه شده است، نتایج متن‌کاوی نشان می‌دهد که داروی شیمی‌درمان، VCR، ژن‌هایی را بیان یا سرکوب می‌کند که در فرآیند درمان موردعلاقه ما نیستند و می‌توانند باعث بدخیمی بیشتر و رشد و توسعه بیشتر تومور شود. به‌عنوان مثال، ژن‌هایی مانند NF-κB، Jon/Fos، MYC و mTOR با داروی وین‌کریستین افزایش می‌یابند. جالب اینجاست که داستان در مورد ترکیبات شیمیایی پیشگیرانه متفاوت است و در جایی که داروی شیمی درمان وین‌کریستین نقاط ضعف دارد، این ترکیبات اثر معکوس از خود نشان می‌دهند. علاوه بر این، تعداد زیادی از ژن‌ها و فرآیندهای مفید برای درمان سرطان توسط هر دو نوع عامل بیان یا سرکوب می‌شوند که هماهنگی خوبی برای درمان سرطان نشان می‌دهد. تنها عیب عوامل شیمی پیشگیری کننده کاهش ROS سلولی است که می‌تواند به سلول‌های سرطانی در مقاومت در برابر مرگ سلولی کمک کند.

[1] Mastermix

جدول ۱- آغازگرهای اختصاصی

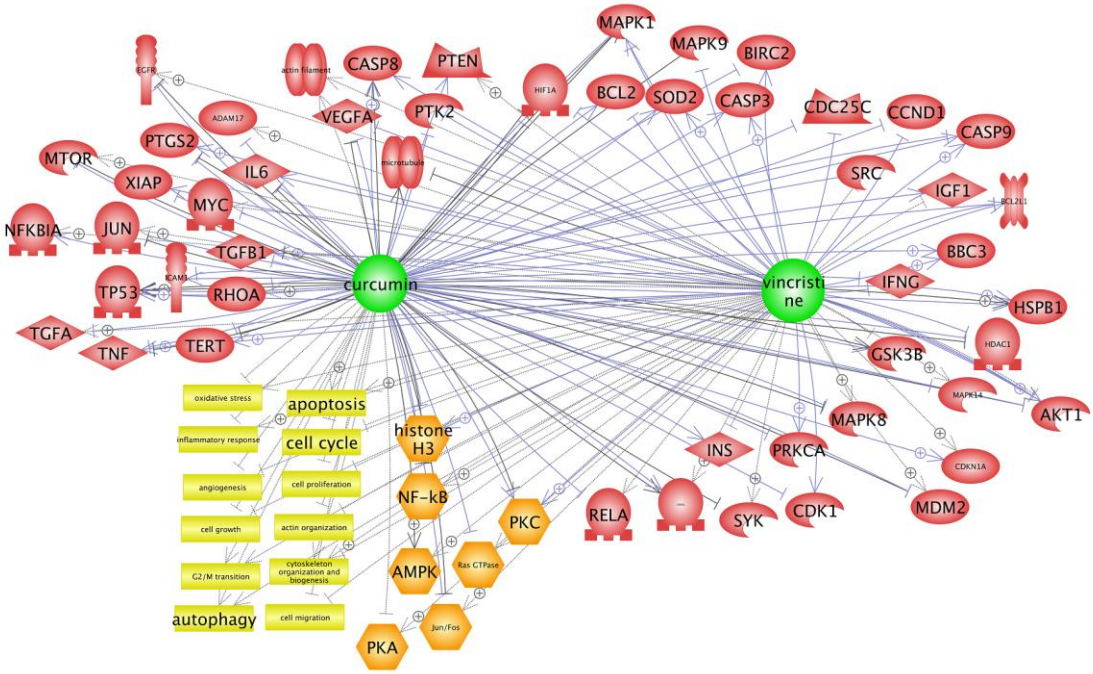
Gene	Forward primer	Reverse primer
VEGFA	' TTGCCTTGCTGCTCTACCTCCA3'	' GATGGCAGTAGCTGCGCTGATA3'
JUN	'CCTTGAAAGCTCAGAACTCGGAG3'	'TGCTGCGTTAGCATGAGTTGGC3'
GAPDH	' CCCCAGCAAGAGCACAAGAGG3'	' AGGAGGGGAGATTCAGTGTGG 3'
PTEN	' CGGCAGCATCAAATGTTTCAG3'	' AACTGGCAGGTAGAAGGCAACTC3'
BCL-2	' TGGGGTCATGTGTGTGGAG3'	' CGGTTCAGGTACTCAGTCATCC 3'
BAX	'CCCGAGAGGTCTTTTTCCGAG3'	'CCAGCCCATGATGGTTCTGAT3'

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-18]

جدول۲- نتایج خلاصه‌شده متن‌کاوی تأثیر چند عامل شیمی پیشگیری کننده و داروی وین‌کریستین بر ژن‌ها و فرایندهای مرتبط با سیگنالینگ سلولی دخیل در سرطان

ژن و یا فرایند سلولی	وین‌کریستین	کورکومین	رزوراترول	سیلیبینین	کورستین
آپوپتوز	P	P	P	P	P
رگ زایی	N	N	N	N	N
PTEN	N	P	P	P	P
رشد سلولی	N	N	N	N	N
VEGFA	N	N	N	N	N
TP53	P	P	N	P	U
TERT	P	N	N	N	N
نکروز	P	p	P	P	P
آتوفاژی	U	P	P	P	P
NF-κB	P	N	N	N	N
MYC	U	N	N	N	N
TNF	P	N	N	N	N
استرس اکسیداتیو	U	N	N	N	N
التهاب	P	N	N	N	N
JUN	P	N	N	N	N
mTOR	P	N	N	N	N
AKT1	P&N	N	N	N	P&N
IL-6	U	N	N	N	N
Ras GTPase	U	N	N	N	N

N: کاهش بیان، P: افزایش بیان، U: مشخص‌نشده. رنگ قرمز نشان‌دهنده ضعف عوامل در درمان سرطان، رنگ آبی نشان‌دهنده نقاط قوت عوامل در درمان سرطان و شدت رنگ‌ها سطح اعتماد آن‌هاست (سطح اطمینان از ۱ تا ۳). رنگ بنفش نشان‌دهنده اثر نامشخص بر روند درمان سرطان است.



شکل ۱- تأثیر کورکومین و وین‌کریستین بر فرایندها و ژن‌های مؤثر در سرطان

برای درک بهتر مقایسه تأثیر عوامل گیاهی در مقابل عامل شیمی درمان وین‌کریستین تأثیر مقابل این کورکومین در مقابل با وین‌کریستین در شکل ۱ مشخص شده است. آنالیز متن‌کاوی نشان از تفاوت زیاد این دو نوع عامل بر ژن‌های مهم و مؤثر در درمان سرطان است و همچنین نشان‌دهنده این موضوع است که عوامل گیاهی شیمی جلوگیری کننده دارای نقاط ضعف کمتری نسبت به وین‌کریستین برای درمان سرطان هستند. همان‌طور که در جدول ۲ مشخص است به‌طورکلی، با توجه به نتایج متن‌کاوی، عوامل شیمی پیشگیرانه می‌توانند گزینه مناسبی برای درمان سرطان باشند.

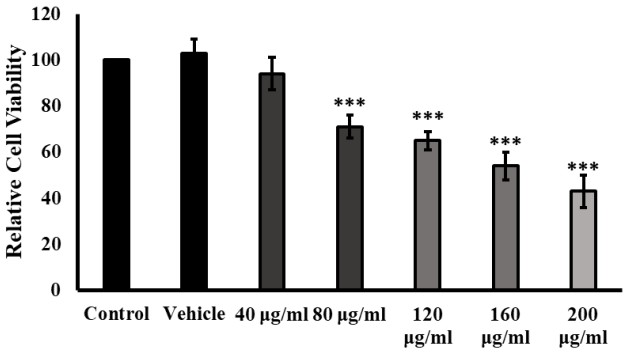
ما در ادامه سه تا از مهم‌ترین ژن‌های دخیل در فرایندهای مختلف سلولی مرتبط با درمان سرطان را برای بررسی تأثیر عصاره زیره

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-18]

کرمانی بررسی کردیم تا مشخص شود این عصاره می‌تواند مانند دیگر عوامل شیمی پیشگیری کننده دارای اثرات مثبتی در درمان سرطان باشد.

میزان زنده‌مانی سلول‌های MCF-7 تحت تیمار با عصاره بذر زیره سیاه

ازآنجایی‌که سرطان یکی از علل اصلی مرگ‌ومیر در جوامع بشری است، یافتن استراتژی مناسب برای درمان سرطان ضروری است. ترکیبات شیمی پیشگیری کننده علاوه بر نقشی که در پیشگیری از سرطان دارند، دارای خواص سیتوتوکسیک برای سلول‌های سرطانی هستند (Kotecha et al. 2016). از روش Neutral Red برای ارزیابی میزان زنده‌مانی سلول‌های سرطانی MCF-7 پس از تیمار با عصاره بذر زیره سیاه به مدت ۲٤ ساعت استفاده شد (شکل ۲). عصاره بذر زیره کرمانی به‌طور معنی‌دار و وابسته به دوز میزان زنده‌مانی سلول‌های MCF-7 را کاهش داد. IC_{50} عصاره بذر زیره کرمانی، تقریباً ۱٦۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر را در ۲٤ ساعت بود.



شکل ۲- بررسی میزان زنده‌مانی سلول‌های MCF-7 تحت تیمار عصاره توسط روش Neutral Red (۲٤ ساعت). عصاره به‌صورت وابسته به دوز میزان زنده‌مانی سلول‌های MCF-7 را کاهش داد و IC_{50} آن در دوز ۱٦۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود (۲٤ ساعت). ***: ۰/۰۰۱، سطح معنی‌داری را نشان می‌دهد.

تغییرات مورفولوژیک سلول‌های MCF-7 تحت تأثیر تیمار با عصاره دانه زیره کرمانی

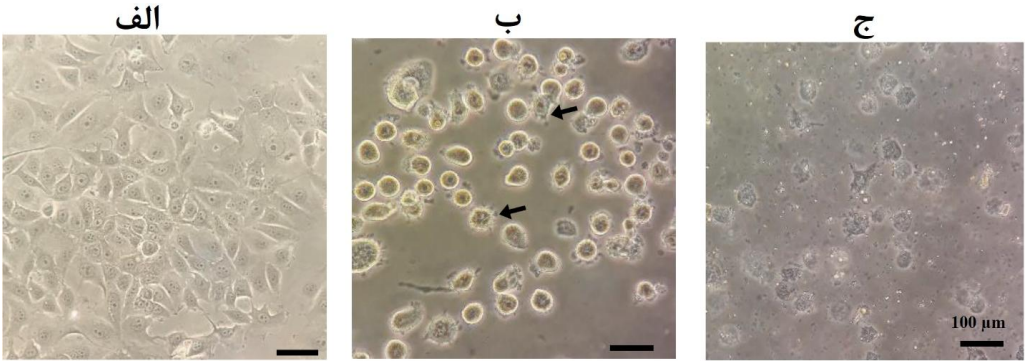
تغییر مورفولوژیکی سلول‌های MCF-7 نشان داد که پس از تیمارهای مختلف تغییرات مورفولوژیکی مرتبط با آپوپتوز رخ می‌دهد (شکل ۳). سلول‌های سرطانی MCF-7 پس از تیمار با عصاره بذر زیره کرمانی گرد شدند و اجسام آپوپتوزی در غشای سلولی سلول‌های تحت تیمار دیده شد. بعد از گذشت ۲٤ ساعت تیمار سلول‌های سرطانی MCF-7 با دوز ۱٦۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر باعث ایجاد سلول‌هایی با غشاء حاوی برآمدگی‌های مرتبط با علائم آپوپتوز (membrane blebbing) شدند. سلول‌های MCF-7 بعد از گذشت ۲٤ ساعت تحت تیمار عصاره بذر زیره کرمانی با دوز ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر مورفولوژی مرتبط با مراحل نهایی آپوپتوز را نشان دادند و سلول‌ها وارد فاز نهایی مرگ سلولی شدند و اجسام آپوپتوزی مرتبط با مراحل نهایی آپوپتوز در اطراف سلول‌ها پراکنده شدند.

تأثیر عصاره بذر زیره کرمانی، بر آپوپتوز سلول‌های MCF-7

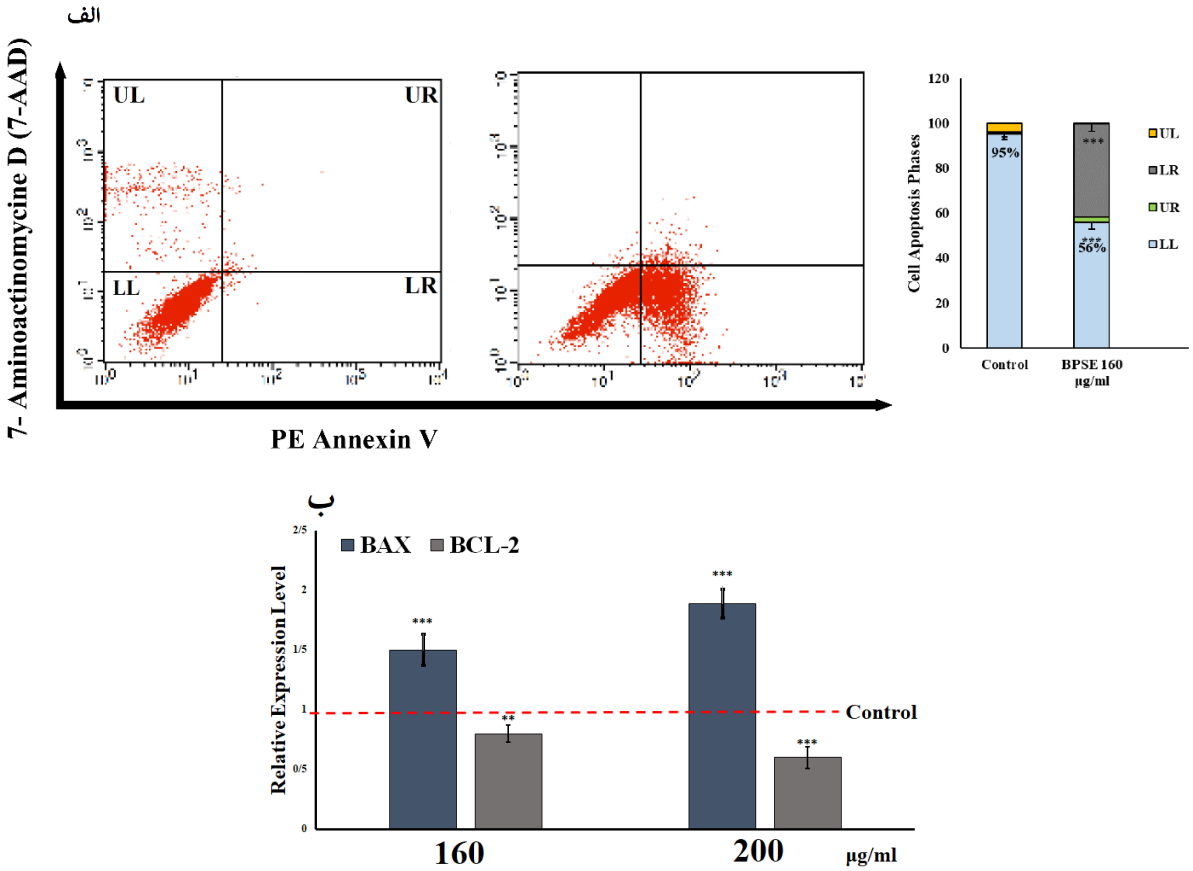
نتایج رنگ‌آمیزی PE Annexin V نشان داد که عصاره بذر زیره سیاه با دوز IC_{50} به‌طور قابل‌توجهی باعث آپوپتوز شد. تیمار سلول‌های MCF-7 باعث القای ٤٤ درصد آپوپتوز نسبت به گروه کنترل شد (شکل ٤ الف). بررسی میزان بیان ژن‌های *BAX* و *BCL-2* نشان داد که عصاره بذر زیره کرمانی باعث کاهش معنی‌داری در میزان بیان *BCL-2* و همچنین باعث افزایش بیان معنی‌داری برای ژن *BAX* نسبت به گروه کنترل شد. (شکل ٤ ب). پروتئین‌های خانواده *BCL-2* نقش اساسی در محافظت و نفوذپذیری غشای خارجی میتوکندری ایفا می‌کنند. افزایش بیان پروتئین *BCL-2* باعث افزایش مقاومت در برابر مرگ سلولی و کاهش آن به‌همراه افزایش پروتئین *BAX* از طریق نفوذپذیری غشای خارجی میتوکندری (MOMP) می‌شود که باعث آپوپتوز می‌شود (Fletcher et al. 2008).

نتایج بررسی میزان بیان *BAX*، *BCL-2* و فلوسایتومتری نشان داد که عصاره زیره سیاه از طریق مسیر داخلی میتوکندریایی باعث القای آپوپتوز می‌شود. القای مرگ سلولی آپوپتوز از استراتژی‌های مهم درمان سرطان است. عواملی که بتوانند مرگ برنامه‌ریزی شده آپوپتوز را از مسیر داخلی تحریک کنند مورد علاقه محققان در زمینه درمان سرطان هستند. نتایج تحقیقات قبلی روی خانواده Apiaceae نشان داده است که چندین گونه از این خانواده اثر القای آپوپتوز داشتند (Bogucka-Kocka et al. 2008)، که با نتایج این مطالعه همخوانی دارد.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-18]



شکل ۳- تأثیر تیمارهای مختلف عصاره بر مورفولوژی سلول MCF-7. الف: کنترل. ب: تحت تأثیر عصاره بذر زیره کرمانی با غلظت ۱۶۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر سلول‌ها گرد شده و دچار آپوپتوز شدند. ج: تیمار با عصاره بذر زیره کرمانی در دوز ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به‌شدت باعث آپوپتوز می‌شود و وضعیت آن‌ها شبیه سلول‌های مرده است که آخرین مراحل آپوپتوز هستند.



شکل ٤- ارزیابی اثر آپوپتوتیک عصاره. الف: بررسی فرایند آپوپتوز توسط تکنیک فلوسایتومتری نشان داد که عصاره در مدت ٢٤ ساعت در دوز IC_{50} به‌طور قابل‌توجهی باعث القای آپوپتوز شد. ب: بررسی میزان بیان ژن‌های *BAX* و *BCL-2* نشان داد که تحت تأثیر عصاره میزان بیان *BAX* افزایش و *BCL-2* کاهش یافت. UL: نکروز، LR: آپوپتوز اولیه، UR: آپوپتوز ثانویه، LL: سلول‌های زنده. ***: سطح معنی‌داری ۰/۰۰۱، را نشان می‌دهد.

عصاره بذر زیره سیاه که دارای اثر جانبی مضری بر بدن انسان نیست می‌تواند گزینه مناسبی در درمان سرطان باشد (Hassanzadazar et al. 2018).

بررسی ژن‌های به‌دست‌آمده از آنالیز real-time PCR

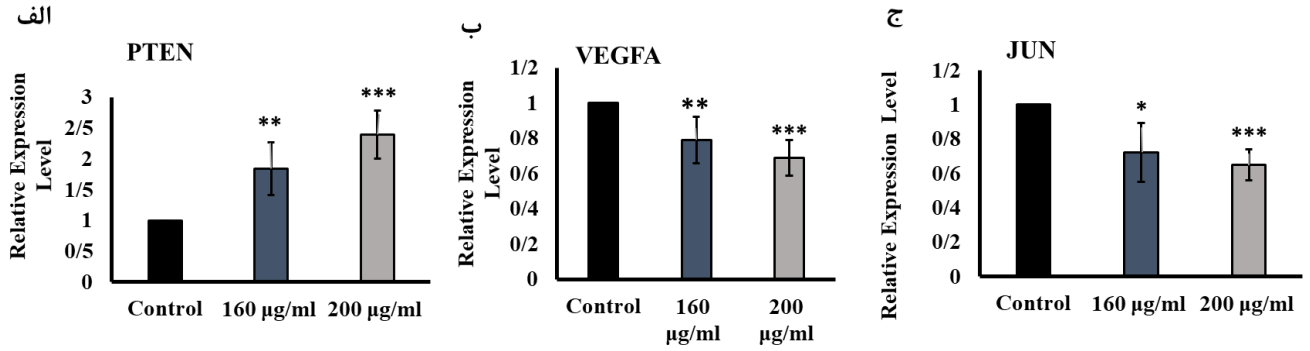
همان‌طور که در شکل ۵ ب مشاهده می‌شود، تیمار سلول‌های MCF-7 با عصاره بذر زیره سیاه با دوزهای ۱۶۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، بیان پروتئین PTEN را به‌طور قابل‌توجهی افزایش داد. بررسی بیان ژن *VEGFA* نشان داد که این ژن تحت تیمار با دوزهای ۱۶۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره بذر

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-18]

زیره سیاه کاهش یافت. تغییرات بیان ژن *JUN* تحت تیمارهای مختلف نشان داد که عصاره بذر زیره سیاه به‌طور قابل توجهی باعث کاهش بیان این ژن می‌شود.

ژن *JUN* یکی از مهم‌ترین عوامل در تعیین سرنوشت سلولی است. مطالعات متعدد نشان داده است که فعال‌سازی ژن *JUN* در سلول‌های سرطانی باعث مقاومت در برابر القای آپوپتوز می‌شود (Duan et al. 2007). نتایج real time PCR نشان دادند که عصاره بذر زیره سیاه می‌تواند بیان این ژن را در سلول‌های MCF-7 کاهش دهد. عصاره بذر زیره سیاه با کاهش بیان ژن *JUN* سلول را به سمت آپوپتوز سوق داد و این ممکن است مکانیسم عملکرد عصاره بذر زیره سیاه را برای تحریک آپوپتوز باشد. مطالعات دیگر نشان داده است که عوامل شیمی‌پیشگیری از جمله رسوراترول و کورکومین، می‌توانند میزان بیان ژن *JUN* را کاهش دهند و در ادامه باعث آپوپتوز شوند (Guo et al. 2013; Kutuk et al. 2006). افزایش بیان ژن *PTEN* یکی از مهم‌ترین عوامل القا مرگ سلولی است و عصاره زیره سیاه در دوزهای ۱۶۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به‌طور معنی‌داری باعث افزایش بیان این ژن شد. مطالعات مختلف نشان داده‌اند که عوامل ضد سرطانی با القای بیان ژن *PTEN*، چرخه سلولی را در نقاط بازرسی سلولی مهار می‌کنند و درنتیجه باعث القای آپوپتوز می‌شوند (Jing et al. 2016; Liu et al. 2020). بیان بیش‌ازحد ژن *VEGFA* در بسیاری از سرطان‌ها باعث القای رگ‌زایی و تقویت رشد تومور می‌شود. نتایج نشان داد که عصاره زیره سیاه ایرانی باعث کاهش بیان *VEGFA* می‌شود. این نتایج حاکی از تأثیر مناسب عصاره زیره سیاه در جلوگیری از رشد تومور است. در مطالعه‌ای، محققان نشان دادند که رسوراترول می‌تواند با کاهش بیان *VEGF*، رگ‌زایی را مهار می‌کند و باعث کاهش رشد تومور می‌شود (Trapp et al. 2010)؛ بنابراین عصاره‌هایی گیاهی پتانسیل جلوگیری از رشد تومور را از طریق مسیرهای مختلف دارند.

این مطالعه برای اولین بار تأثیر ضدسرطانی عصاره زیره کرمانی را بر سلول‌های سرطانی MCF-7 بررسی کرد. ما این احتمال را پیش‌بینی می‌کنیم که عصاره بذر زیره کرمانی با کاهش بیان *JUN* و افزایش بیان *PTEN*، سلول‌های MCF-7 را به آپوپتوز مستعد می‌کند. با توجه به این موضوع که بذر زیره کرمانی دارای اثرات مضری برای انسان نیست استفاده از ترکیب‌های مؤثر این گیاه برای درمان سرطان می‌تواند مفید باشد. پیشنهاد می‌شود برای بررسی دقیق‌تر این موضوع، بررسی‌های بیشتر روی مدل‌های حیوانی انجام شود.



شکل ۵- ارزیابی تأثیر عصاره بذر زیره سیاه (۲٤ ساعت) بر بیان ژن‌های به‌دست آمده از آنالیز متن‌کاوی در سلول‌های MCF-7 با استفاده از روش real-time PCR. الف: میزان بیان ژن *PTEN* تحت تیمار با عصاره بذر زیره در دوزهای ۱۶۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر. ب: میزان بیان ژن *VEGFA* توسط تیمارهای ۲۰۰ و ۱۶۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تحت تیمار با عصاره. ج: بیان ژن *JUN* در دوزهای ۲۰۰، ۱۶۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تحت تیمار با عصاره بذر زیره کرمانی. ***: ۰/۰۰۱، **: ۰/۰۱، *: ۰/۰۵، سطوح معنی‌داری را نشان می‌دهد.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-18]

منابع

Bogucka-Kocka A, Smolarz H, Kocki J (2008) Apoptotic activities of ethanol extracts from some Apiaceae on human leukaemia cell lines. Fitoterapia 79:487-497.

Boocock D, Faust G, Patel K, Schinas A, Brown V, Ducharme M, Booth T, Crowell J, Perloff M, Gescher A, Steward W, Brenner D (2007) Phase I dose escalation pharmacokinetic study in healthy volunteers of resveratrol, a potential cancer chemopreventive agent. Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention 16:1246-1252.

Carneiro B, El-Deiry W (2020) Targeting apoptosis in cancer therapy. Nature Reviews Clinical Oncology 17:395-417.

Chizzola R, Saeidnejad A, Azizi M, Oroojalian F, Mardani H (2014) Bunium persicum: variability in essential oil and antioxidants activity of fruits from different Iranian wild populations. Genetic Resources and Crop Evolution 61:1621-1631.

D'Arcy M (2019) Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. Cell Biology International 43:582-592.

De Flora S, Ferguson L (2005) Overview of mechanisms of cancer chemopreventive agents. Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis 591:8-15.

Deeptha K, Kamaleeswari M, Sengottuvelan M, Nalini N (2006) Dose dependent inhibitory effect of dietary caraway on 1,2- dimethylhydrazine induced colonic aberrant crypt foci and bacterial enzyme activity in rats. Investigational New Drugs 24:479-488.

Duan L, Sterba K, Kolomeichuk S, Kim H, Brown P, Chambers T (2007) Inducible overexpression of *c-Jun* in MCF7 cells causes resistance to vinblastine via inhibition of drug-induced apoptosis and senescence at a step subsequent to mitotic arrest. Biochemical Pharmacology 73:481-490.

Fletcher J, Meusburger S, Hawkins C, Riglar D, Lee E, Fairlie W, Huang D, Adams J (2008) Apoptosis is triggered when prosurvival Bcl-2 proteins cannot restrain Bax Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 105:18081-18087.

Guo H, Xu Y, Ye ZQ, Yu J, Hu X (2013) Curcumin induces cell cycle arrest and apoptosis of prostate cancer cells by regulating the expression of *IκBα, c-Jun* and androgen receptor. Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences 68:431-434.

Hassanzadazar H, Taami B, Aminzare M, Daneshamooz S (2018) *Bunium persicum* (Boiss.) B. Fedtsch: An overview on phytochemistry, therapeutic uses and its application in the food industry. Journal of Applied Pharmaceutical Science 8:150-158.

Jing X, Cheng W, Wang S, Li P, He L (2016) Resveratrol induces cell cycle arrest in human gastric cancer MGC803 cells via the PTEN- regulated PI3K/Akt signaling pathway. Oncology Reports 35:472-478.

Kotecha R, Takami A, Espinoza J (2016) Dietary phytochemicals and cancer chemoprevention: A review of the clinical evidence. Oncotarget 7:52517-52529.

Kutuk O, Poli G, Basaga H (2006) Resveratrol protects against 4-hydroxynonenal-induced apoptosis by blocking JNK and c-JUN/AP-1 signaling. Toxicological Sciences 90:120-132.

Levi M, Borne R, Williamson J (2012) A Review of Cancer Chemopreventive Agents. Current Medicinal Chemistry 8:1349-1362.

Liu M, Ma R, Ni Z, Thakur K Cespedes-Acuña C, Jiang L, Wei Z (2020) Apigenin 7-O-glucoside promotes cell apoptosis through the PTEN/PI3K/AKT pathway and inhibits cell migration in cervical cancer Hela cells. Food and Chemical Toxicology 146:111843.

Nikolaou M, Pavlopoulou A, Georgakilas A, Kyrodimos E (2018) The challenge of drug resistance in cancer treatment: a current overview. Clinical and Experimental Metastasis 35:309-318.

Thomasset S, Berry D, Garcea G, Marczylo T, Steward W, Gescher A (2007) Dietary polyphenolic phytochemicals - Promising cancer chemopreventive agents in humans? A review of their clinical properties. International Journal of Cancer 120:451-458.

Trapp V, Parmakhtiar B, Papazian V, Willmott L, Fruehauf J (2010) Anti-angiogenic effects of resveratrol mediated by decreased VEGF and increased TSP1 expression in melanoma-endothelial cell co-culture. Angiogenesis 13:305-315.

Verschoyle R, Steward W, Gescher A (2007) Putative cancer chemopreventive agents of dietary origin - How safe are they? Nutrition and Cancer 59:152-162.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-18]