Original Article

Evaluation of the effect of Fennel extract on *TERT* gene expression changes in mouse liver tumors induced with cancer

Mousaee Z[1], Shahrokhabadi Kh[2*], Entezary M[1]

1- Department of Biology, Tehran Medical Sciences Branch, Islamic Azad University, Tehran, I. R. Iran.
2- Department of Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, I. R. Iran.

Received July 11, 2017; Accepted October 18, 2017

Abstract:

Background: The use of plants for therapeutic purposes is the source of many modern medical treatments. In this study, at first, the cytotoxicity of the *Foeniculum vulgare* (Fennel) extract on cancer cells was studied. Then, *TERT* gene expression changes were estimated via induction of cancer and extract treatment.

Materials and Methods: At first, different concentrations of the Fennel extract were obtained for cell morphology and the MTT assay. Afterwards, cancer in mice was induced. Sampling was performed to determine changes in gene expression after 7, 14, 21 and 28 days. After that, RNA was extracted, cDNA was synthesized, and gene expression changes were studied.

Results: Results showed an inhibitory effect on both cell lines at 50% inhibition (IC50) of proliferation at 200 µg/ml after 72 hours using the MTT assay. The morphology results in the third day in 100 and 200 concentrations showed that the extract caused complete degeneration and destruction of cancer cells. The results of analysis of the graphs revealed that the expression of *TERT* gene in treated cancer samples decreased on days 7, 14 and 28 compared with the control.

Conclusion: The Fennel extract has dual effects on cancer cells through initiating intracellular events. In high concentrations, the extract stimulates proliferative growth in cancer cells and in low concentrations it has inhibitory effects on cell growth and proliferation. In the evaluation of the extract on *TERT* gene expression, a reduction was observed in gene expression on days 7, 14 and 28. Therefore, the Fennel extract can affect the gene expression through its effect on molecular pathways.

Keywords: Hepato carcinoma, *TERT* Gene, MTT assay, TUBO cell line, *Foeniculum vulgare*

* **Corresponding Author.**
Email: Shahrokhabady@yahoo.com
Tel: 0098 915 508 6805
Fax: 0098 513 843 5050

Conflict of Interests: ***No***

Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences, February, 2018; Vol. 21, No 6, Pages 543-552

Please cite this article as: Mousaee Z, Shahrokhabadi Kh, Entezary M. Evaluation of the effect of Fennel extract on *TERT* gene expression changes in mouse liver tumors induced with cancer. ***Feyz*** 2018; 21(6): 543-52.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2024-03-28]

بررسی تاثیر عصاره رازیانه بر تغییرات بیان ژن *TERT* در تومور القا شده کبد موش

زینب موسائی [۱]، خدیجه شاهرخ آبادی [*۲]، ملیحه انتظاری [۳]

خلاصه:

سابقه و هدف: استفاده از گیاهان برای اهداف درمانی منشا بسیاری از درمان‌های طب مدرن است. در این تحقیق ابتدا اثر سیتو-توکسیسیتی عصاره رازیانه روی سلول‌های سرطانی بررسی گردید. سپس، با القا سرطان و تیمار با عصاره، تغییرات بیان ژن *TERT* برآورد شد.

مواد و روش‌ها: ابتدا غلظت‌های مختلف عصاره رازیانه برای بررسی مورفولوژی سلول‌ها و تست MTT تهیه گردید. سپس، القا سرطان در موش‌ها صورت گرفت. برای بررسی تغییرات بیان ژن پس از ۷، ۱۴، ۲۱ و ۲۸ روز، نمونه‌برداری انجام گردید. پس از استخراج RNA و سنتز cDNA، تغییرات بیان ژن مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج: نتایج تست MTT بعد از ۷۲ ساعت غلظت مهارکنندگی ۵۰ درصد رشد سلول‌ها (IC50) برای هر دو رده سلول را ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نشان داد. مقایسه نتایج مورفولوژی روز سوم، در غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ بیان‌گر تحلیل‌رفتگی و نابودی کامل سلول سرطانی بود. بررسی نمودارها نشان داد که بیان ژن *TERT* در نمونه‌های سرطانی تیمار شده نسبت به شاهد در روزهای ۷، ۱۴ و ۲۸ کاهش یافته است.

نتیجه‌گیری: عصاره رازیانه با ایجاد تغییرات درون‌سلولی اثرات دوگانه‌ای بر سلول‌های سرطانی دارد؛ به‌طوری‌که در غلظت بالا، عصاره محرک رشد و تکثیر سلول سرطانی است و در غلظت پایین اثرات مهاری بر رشد و تکثیر سلول‌ها دارد. در ارزیابی عصاره بر بیان ژن *TERT* نیز در روزهای ۷، ۱۴ و ۲۸ کاهش در بیان ژن مشاهده شد. بنابراین عصاره رازیانه می‌تواند از طریق تاثیر بر مسیرهای مولکولی بیان ژن را تحت تاثیر قرار دهد.

واژگان کلیدی: هپاتوکارسینوما، ژن *TERT*، رنگ‌سنجی MTT، رده سلولی TUBO، رازیانه

دو ماه‌نامه علمی– پژوهشی فیض، دوره بیست و یکم، شماره ۶، بهمن و اسفند ۱۳۹۶، صفحات ۵۵۲-۵۴۳

مقدمه

سرطان‌های کبد و پستان از جمله سرطان‌هایی با شیوع بالا در جوامع مختلف هستند. هپاتوسلولار کارسینوما یک بدخیمی اولیه کبد است و عمدتاً در بیماران مبتلا به زمینه کبدی و سیروزی رخ می‌دهد [۱]. شیوع این بیماری در نقاط گوناگون جهان متفاوت است. شیوع بالای آن در بخش‌هایی از آسیا و آفریقا به‌دلیل ضعف سیستم بهداشتی است [۲]. نیاز به تحقیقات پایه برای بررسی مسیرهای مولکولی در مسیر پاتوژنز بیماری‌ها و سرطان‌ها وجود دارد [۳].

[۱] کارشناس ارشد ژنتیک، گروه زیست شناسی، واحد علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

[۲] استادیار، گروه زیست شناسی، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران

[۳] استادیار، گروه زیست شناسی، واحد پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

* **نشانی نویسنده مسئول**

مشهد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی

تلفن: ۰۹۱۵۵۰۸۶۸۰۵ **دورنویس:** ۰۵۱۸۴۳۵۰۵۰

پست الکترونیک: shahrokhabady@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۴/۲۰ **تاریخ پذیرش نهایی:** ۱۳۹۶/۷/۲۶

امروزه با وجود پیشرفت‌های زیاد در زمینه درمان‌های رایج سرطان، از جمله شیمی‌درمانی، جراحی و رادیوتراپی، هنوز هم استفاده از مدل حیوانی مناسب به‌عنوان پلی بین مطالعات آزمایشگاهی و مطالعات بالینی ضروری است [۴]. چهار مدل القای تومور به نام‌های سینژیک، آنرژیک، گزنوژنیک و آلوژنیک وجود دارد [۵] که هرکدام دارای مزایا و معایبی است. در مدل گزنوژنیک منشا حیوان و سلول تزریقی از نظر گونه متفاوت است (مثل انسان و موش) و بنابراین حتماً باید همراه با مهار و تضعیف سیستم ایمنی صورت گیرد [۶]. بنابراین باتوجه به محدودیت دسترسی به مدل‌های سینژنیک، با القا تومور زیر-پوستی در مدل گزنوژنیک، می‌توان با خیال آسوده‌تر به ارزیابی و مطالعه مسیرهای مولکولی، هم‌چنین بررسی پارامترهای متعدد، آزمایش داروهای جدید درمانی و نیز تحقیقات جدیدتر پرداخت. بنابراین هنوز هم استفاده از درمان‌های نوین و اثربخش مثل ژن‌درمانی و ژن‌تراپی جزو اهداف اصلی درمان سرطان-هاست [۸،۷]. استفاده از گیاهان برای اهداف درمانی به قبل از تاریخ می‌رسد و منشا بسیاری از درمان‌های طب مدرن است. بسیاری از داروهای معمولی از منابع گیاهی سرچشمه گرفته‌اند [۹]. رازیانه یکی از گیاهان دارویی با اهمیت است که در طب

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2024-03-28]

سنتی از آن استفاده می‌شود. به‌دلیل کاربردهای متعدد رازیانه از جمله داروسازی، صنایع غذایی و آرایشی بهداشتی در حال حاضر در اکثر نقاط جهان مانند جنوب و مرکز اروپا، کشورهای آسیایی و بسیاری از کشورهای آفریقایی و همچنین در برزیل و آرژانتین، زمین‌های زراعی وسیعی زیر کشت رازیانه قرار دارند [۱۰]. رازیانه یا بادیان (Fennel) با نام علمی *Foenicu-lum vulgare* گیاهی علفی و معطر با ارتفاع ۲ متر، دارای برگ‌هایی با قطعات نازک و نخی‌شکل است، به‌صورت وحشی گیاهی چند ساله، اما با کشت و پرورش گیاهی دوساله است. در مناطق وسیعی از اروپا، مدیترانه تا آسیا و ایران رشد می‌یابد [۱۱]. مصرف خوراکی اسانس رازیانه در موش به‌طور قابل توجهی تکرارهای متافاز نابه‌جا، ناهنجاری کروموزومی، تشکیل ریزهسته‌ک‌ها و سمیت سلولی را در سلول‌های مغز استخوان القاء شده با سیکلوفسفامید مهار می‌نماید. علاوه‌برآن، رازیانه استرس-های اکسیداتیو ناشی از سیکلوفسفامید را نیز کاهش می‌دهد [۱۲]. رازیانه به‌دلیل ترکیباتی مانند اسید لینولئیک، اندکانال، ۱،۳ بنزندیال، اسید اولئیک و ۲،۴- اندکادینال فعالیت ضدباکتریایی دارد. رازیانه دارای ۵-هیدروکسی فورانوکومارین می‌باشد که نقش مهمی در فعالیت ضدباکتریایی این گیاه به عهده دارد. عصاره رازیانه فعالیت ضدباکتریایی در برابر *آنتراکوک فکالیس*، *استرپتوکوکوس اورئوس*، *اشریشیاکلی*، *سودوموناس آئروژینوزا*، *سالمونلا تیفی‌موریوم* و *شیگلا فلکسنری* نشان می‌دهد [۱۳]. رازیانه به‌عنوان یک منبع عالی از اکسیدان‌های طبیعی به رژیم غذایی آنتی‌اکسیدانی روزانه کمک می‌نماید. روغن‌های فرار فعالیت آنتی‌اکسیدانی قوی را در مقایسه با هیدروکسی بوتیرات و هیدروکسی بوتیلات نشان می‌دهند [۱۴]. باتوجه به نقش رازیانه در رژیم غذایی و نیز خصوصیات دارویی گیاه، این مطالعه با هدف بررسی اثرات ضدتوموری رازیانه روی سلول-های سرطانی رده HepG2 و TUBO و تاثیر آن بر تغییرات بیان ژن *TERT* در شرایط سرطان کبد القا شده صورت گرفت. ژن *TERT* ترانس‌کریپتاز معکوسی را رمزگذاری می‌کند که با مجموعه RNA تلومراز (که توسط ژن *TERTC* رمزگذاری می‌شود)، مجموعه تلومراز را تشکیل می‌دهند [۱۵]. شواهد نشان می‌دهد که اختلاف تلومر که به‌وسیله فعال‌سازی تلومراز ایجاد شده، یک نیروی محرکه در رشد سرطان است [۱۶]. همچنین با-توجه به اینکه مدل حیوانی باید خصوصیات مناسب ازجمله پذیرش تومور و شباهت به مدل انسانی را داشته باشد، در این مطالعه از رده سلولی HepG2 برای القا و بررسی بیان ژن مورد نظر استفاده شد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه ابتدا دانه تجاری رازیانه از فروشگاه گیاهان دارویی تهیه و توسط آسیاب کاملاً پودر گردید. سپس، ۵۰ گرم از پودر رازیانه در کاغذ کارتوش درون دستگاه سوکسله قرار داده شد. برای تهیه عصاره تام رازیانه ۱۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر و ۱۵۰ میلی‌لیتر الکل ۹۶ درصد به بالن دستگاه عصاره‌گیری اضافه شد. عصاره‌گیری به‌مدت ۱۲ ساعت با دستگاه سوکسله انجام شد تا اطمینان حاصل گردد که تمامی عصاره خارج شده است. سپس، عصاره برای خشک شدن کامل به انکوباتور ۳۷ درجه منتقل گردید. در نهایت پودر خشک جمع‌آوری شد و غلظت‌های مورد نظر در PBS حل شده و تا زمان انجام آزمایش در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. اثر عصاره تام رازیانه جهت بررسی مورفولوژی و میزان اتصال بین سلولی در شرایط کشت سلولی و بررسی کمیت و تعداد سلول‌ها توسط تست MTT با روش زیر مورد بررسی قرار گرفت.

کشت سلول:

رده‌های سلولی مورد نظر شامل L929 (سلول‌های فیبروبلاست)، HepG2 (سلول‌های سرطان کبد) و TUBO (سلول سرطان پستان) از انستیتو پاستور ایران تهیه شد. سلول‌ها در محیط DMED حاوی پنی‌سیلین و استرپتومایسین (۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر) و سرم جنین گوساله (FBS) که به‌ترتیب برای رده‌های سلولی ذکر شده ۱۰، ۱۴ و ۲۰ درصد بود در دمای ۳۷ درجه در انکوباتور ۵ درصد CO2 با RH=۱۰۰ رشد داده شدند. درصد زنده بودن سلول‌ها و شمارش سلولی توسط لام نئوبار و رنگ تریپان بلو جهت اطمینان از مناسب بودن تعداد سلول‌ها برای کشت در فلاسک انجام شد. قابلیت توانایی سلول-های زنده ۹۰ درصد به‌دست آمد. برای هر رده سلولی ۵ فلاسک کوچک با تعداد 5×10^5 سلول در ۵ میلی‌لیتر محیط کشت در نظر گرفته شد. بعد از گذشت ۲۴ ساعت که از اتصال و چسبندگی و عدم آلودگی اطمینان حاصل گردید، رقت‌های تهیه شده عصاره پس از فیلتر شدن به فلاسک‌ها افزوده گردید؛ فلاسک‌ها حاوی صفر، ۱۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ µg/ml از عصاره رازیانه بود. برای مقایسه وضعیت ظاهری و چسبندگی و اتصالات بین سلولی در فلاسک‌ها به‌مدت ۳ روز متوالی عکس برداری انجام و برای مقایسه ذخیره شد.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2024-03-28]

بررسی زنده بودن سلول‌ها:

تعیین تعداد سلول‌ها و همچنین بررسی اثرات سیتو-توکسیسیتی رازیانه توسط تست MTT (۳،۴،۵ دی‌متیل تیازول ۲ یل ۵، ۲ دی فنیل ترازولیوم) مورد ارزیابی قرار گرفت. برای هر سه رده سلولی پلیت ۹۶ خانه‌ای به‌صورت سه‌تایی (و در سه پلیت جداگانه) استفاده شد. در آغاز مرحله کشت در هر چاهک پلیت 5×10^{3} سلول به‌همراه ۲۰۰ µl محیط کشت اضافه شد. سلول‌ها به‌مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند و سپس عصاره با غلظت‌های صفر، ۱۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰، ۸۰۰ و ۱۰۰۰ µg/ml به هر چاهک اضافه شد. سه پلیت تهیه شده به‌مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت انکوبه شد. پس از طی زمان موردنظر محیط کشت چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای کاملا خارج شد و به هر چاهک از پلیت ۲۰ µl رنگ MTT با غلظت ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر اضافه شد. پلیت در کاغذ آلومینیومی پیچیده شد و به-مدت ۴ ساعت در شرایط تاریکی انکوبه گردید. برای پلیت اول بعد از گذشت ۲۴ ساعت، با برگرداندن پلیت تمام محیط کشت خارج شد. سپس، به هر چاهک ۲۰۰ µl از DMSO اضافه شد و بلافاصله پس از مخلوط کردن، خوانش در طول موج ۵۷۰ نانومتر توسط دستگاه الایزا انجام شد. درصد سلول‌های زنده تحت تاثیر عصاره نسبت به سلول‌های کنترل با استفاده از فرمول ذیل محاسبه شد:

$$\frac{\text{جذب نوری سلول‌های تیمارشده با عصاره در هر چاهک}}{\text{میانگین جذب نوری سلول های کنترل}} \times 100$$

حیوانات آزمایشگاهی:

در مرحله بعدی تحقیق تعداد ۲۴ سر موش به‌صورت تصادفی به سه گروه (n=۸) تقسیم شدند. این سه گروه شامل: گروه شاهد دریافت کننده PBS، گروه سرطانی، و گروه سرطانی دریافت کننده عصاره تام رازیانه به‌عنوان تیمار (تومور+ تیمار) بودند.

ایجاد مدل تومور حیوانی:

جهت القا سرطان در موش از رده سلول توموری HepG2 استفاده شد. برای جلوگیری از پس‌زدن سلول‌های سرطانی تزریق شده، نیاز به تضعیف و مهار سیستم ایمنی بدن موش بود؛ بدین منظور از سیکلوسپورین A روزانه به مقدار ۵۰ mg/kg وزن بدن موش به‌صورت خوراکی استفاده شد.

نمونه‌برداری از بافت کبد:

موش‌ها با کلروفرم بیهوش شدند و پس از تشریح، یک لوب کبد با وزن ۱۰۰ تا ۱۵۰ میلی‌گرم برداشته شد. کل RNA بافت کبد با استفاده از Column RNA isolation Kit (DENA zist) III مطابق دستورالعمل استخراج شد. جهت تعیین کمیت و کیفیت RNA استخراج شده به‌ترتیب از استفاده نانودراپ اسپکتروفوتومتری و ژل الکتروفورز استفاده شد. سپس، با استفاده از RNA الگو و کیت سنتز (Fermentas)، cDNA سنتز شد.

بررسی تغییرات ژن *TERT*:

برای انجام RT-PCR از کیت Pars Tous استفاده شد. پرایمرهای اختصاصی توسط شرکت Meta Bion مالزی ساخته شد. جدول شماره ۱ توالی نوکلئوتیدی پرایمرهای مورد استفاده را نشان می‌دهد. تکثیر ژن با یک مرحله اولیه انکوباسیون در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای ۱۰ دقیقه انجام شد و سپس ۴۰ دور در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۵ ثانیه، ۵۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ ثانیه و در نهایت در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه انجام شد. هر RT-PCR دو بار تکرار شد و نتایج مورد بررسی قرار گرفت. نتایج آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS و تست ANOVA در سطح معنی‌داری $P<0/05$ مورد ارزیابی قرار گرفت.

جدول شماره ۱- توالی پرایمر ژن‌های مورد استفاده در مطالعه

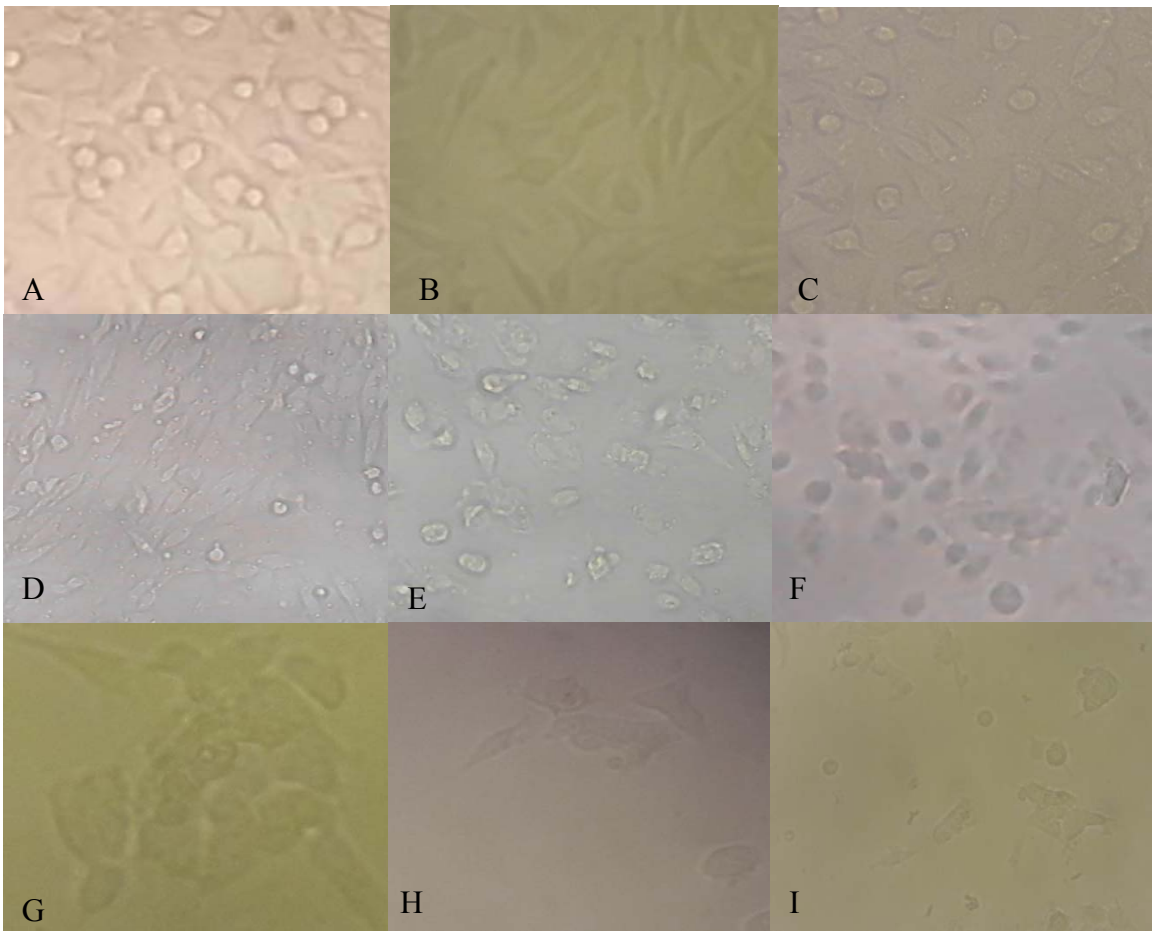
TERT
Forward: 5'-CTTGCTGCTGGACACTCAGA-3'
Reverse: 5'-GCTGTTCACCTGCAAGTCT-3'
GAPDH
Forward: 5'-GTCAAGGCTGAGAACGGGAA-3'
Reverse: 5'-AAATGAGCCCCAGCCTTCTC-3'

نتایج

این مطالعه با هدف بررسی اثر عصاره رازیانه روی رده‌های سلولی سرطانی صورت گرفت. در نتایج به‌دست آمده انتظار بر این بود که عصاره در غلظت‌های خاص روی مهار رشد سلول‌های سرطانی تاثیر داشته باشد. بررسی نتایج مورفولوژی در سلول‌های L929 نشان داد که سلول‌های کنترل که هیچ غلظتی از عصاره را دریافت نکرده بودند، دارای تکثیر مناسب در هر سه روز کشت فلاسک بودند. روز سوم فلاسک کاملا پر شده بود. همچنین، در روز دوم در غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ اتصالات بین سلولی مشابه نمونه کنترل بود. شکل شماره ۱

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2024-03-28]

(A, B, C) تاثیر عصاره بر این سلول‌ها را در روزهای مختلف نشان می‌دهد. بررسی نتایج مورفولوژی روی سلول‌های HepG2 نشان داد که سلول‌های شاهد (بدون دریافت عصاره) در هر سه روز رشد نرمالی را نشان دادند. در روز دوم تاثیر غلظت ۵۰ نامحسوس بود، اما تغییرات مورفولوژی در غلظت ۱۰۰ با کاهش اتصالات سلولی کاملا مشهود بود، درحالی‌که در غلظت ۲۰۰ اتصالات بین سلولی نه‌تنها کاهش نیافته بود، بلکه تکثیر سلولی و افزایش سلول‌ها نیز مشاهده شد که بیان‌گر اثر تحریکی عصاره در این غلظت روی سلول‌ها بوده است. در روز سوم تکثیر تغییرات مورفولوژی تحت تاثیر غلظت‌های ۱۰ تا ۲۰۰ میکروگرم به‌خوبی آشکار شد؛ به‌نحوی‌که با افزایش غلظت از ۱۰ تا ۲۰۰ به نسبت فراوانی از تکثیر سلول‌ها کاسته شد، و در غلظت ۲۰۰ تمامی سلول‌ها از حالت دوکی شکل به سلول‌هایی با سیتوپلاسم کوچک و گرانوله تبدیل شدند. شکل شماره ۱ (D, E, F) این تاثیرات را نشان می‌دهد. بررسی نتایج مورفولوژی رده سلولی TUBO نشان داد که در مقایسه با سلول‌های کنترل که به نسبت مناسبی رشد و تکثیر داشتند، تاثیر غلظت عصاره از روز دوم با غلظت ۱۰۰ شروع شد. نتایج در روز دوم نشان داد که کاهش اتصالات در غلظت ۱۰۰ و با شدت بیشتری در غلظت ۲۰۰ وجود داشت. در روز سوم در-حالی‌که در غلظت‌های ۱۰ و ۵۰ اثرات قابل مشاهده‌ای وجود نداشت، در غلظت‌های ۱۰۰ و به‌خصوص ۲۰۰ اثرات تحلیل رفتگی و نابودی کامل سلول‌ها کاملا مشاهده شد (شکل شماره ۱, G, H, I).



شکل شماره ۱- تغییرات مورفولوژیک سلول‌ها تحت تاثیر غلظت‌های مختلف عصاره رازیانه

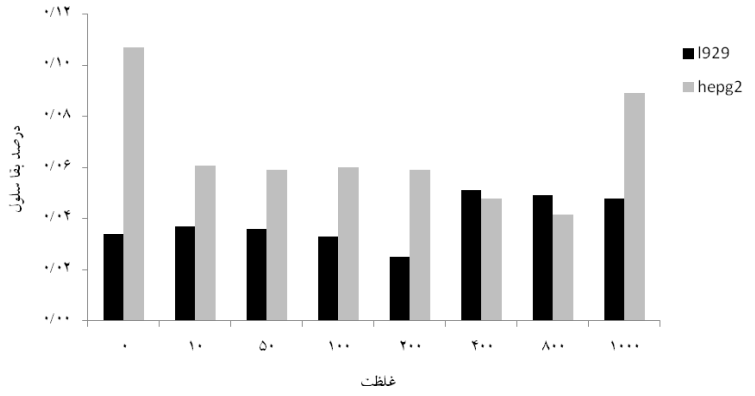
A: سلول‌های L929 بدون تاثیر عصاره؛ B: سلول‌های L929 در غلظت ۱۰۰ میکروگرم عصاره پس از ۴۸ ساعت؛ C: سلول‌های L929 در غلظت ۱۰۰ میکروگرم پس از ۷۲ ساعت؛
D: سلول HepG2 بدون تاثیر عصاره؛ E: سلول HepG2 در غلظت ۱۰۰ میکروگرم عصاره پس از ۴۸ ساعت؛ F: سلول HepG2 در غلظت ۱۰۰ میکروگرم پس از ۷۲ ساعت؛
G: سلول TUBO بدون تاثیر عصاره؛ H: سلول TUBO در غلظت ۱۰۰ میکروگرم عصاره پس از ۴۸ ساعت؛ و I: TUBO در غلظت ۱۰۰ میکروگرم عصاره پس از ۷۲ ساعت.

نتایج تست MTT:

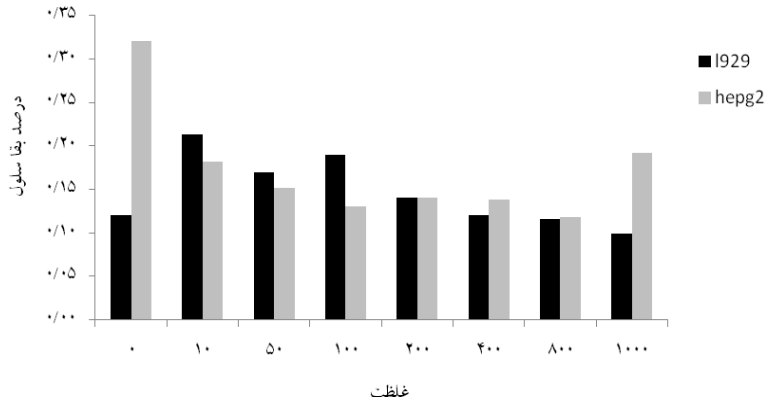
آزمایش MTT در سه پلیت جداگانه با ۸ غلظت متفاوت برای ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت انجام شد. نتایج در نمودارهای شماره ۱ تا ۴ مقایسه شده‌اند. نمودارهای شماره ۱ و

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2024-03-28]

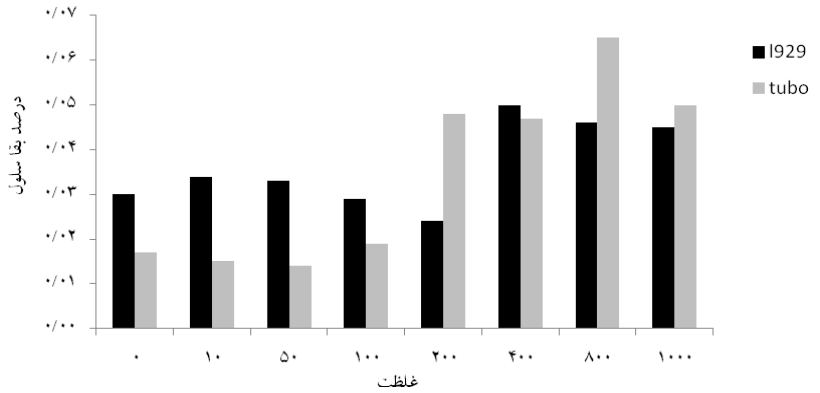
۲ تغییرات سلول‌های HepG2 را به‌ترتیب بعد از ۴۸ و ۷۲ ساعت نشان می‌دهد. عصاره تاثیر معنی‌داری بر مهار رشد سلول‌های سرطانی HepG2 داشت. نمودارهای شماره ۳ و ۴ تغییرات سلولی را در سلول‌های TUBO نشان می‌دهد. نتایج در نمودار ۴۸ و ۷۲ ساعته بیانگر اثرات تحریک‌کنندگی عصاره از غلظت ۲۰۰ به بالاست. اثرات دوگانه تاثیر دوزهای متفاوت غلظت در مهار و تکثیر سلولی مشاهده می‌شود. در بررسی بیان ژن بعد از استخراج RNA برای تعیین کیفیت نمونه‌ها از تکنیک ژل الکتروفورز استفاده شد. شکل شماره ۲ تعدادی از نمونه‌های استخراج شده را روی ژل نشان می‌دهد.



نمودار شماره ۱- تاثیر غلظت‌های مختلف عصاره پس از ۴۸ ساعت بر سلول‌های HepG2 با روش MTT.

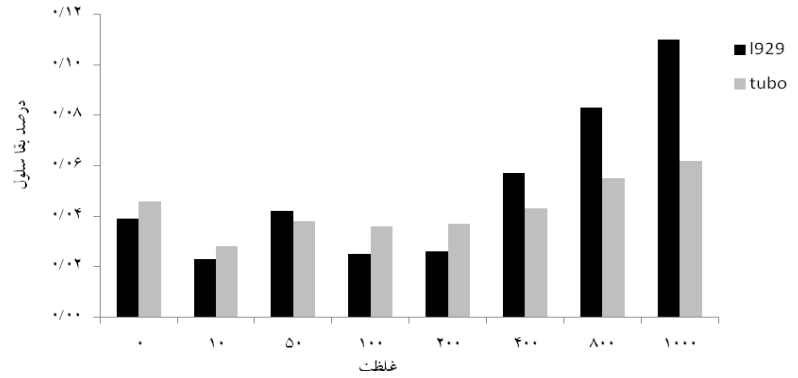


نمودار شماره ۲- تاثیر غلظت‌های مختلف عصاره پس از ۷۲ ساعت بر سلول‌های HepG2 با روش MTT.

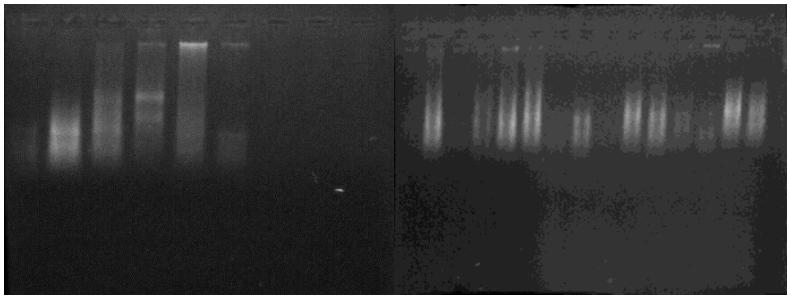


نمودار شماره ۳- تاثیر غلظت‌های مختلف عصاره بر سلول‌های TUBO و L929 پس از ۴۸ ساعت با روش MTT.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2024-03-28]



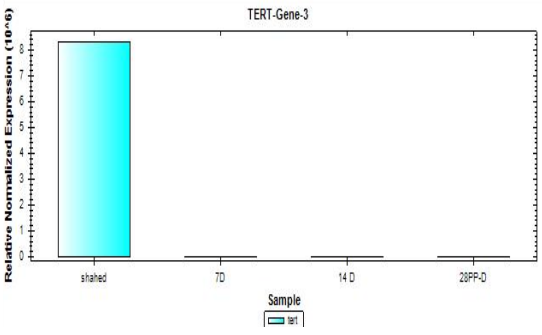
نمودار شماره ۴- تاثیر غلظت‌های مختلف عصاره بر سلول‌های TUBO و L929 پس از ۷۲ ساعت با روش MTT.



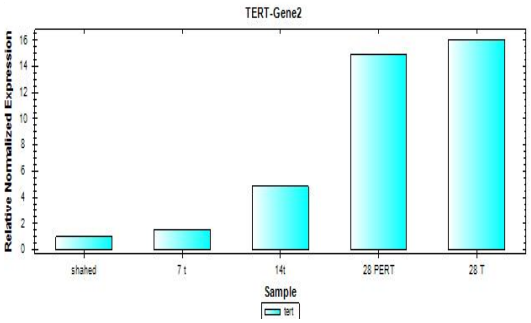
شکل شماره ۲- نمونه‌های RNA استخراج شده روی ژل آگاروز

از تکرارهایی برای سنتز cDNA استفاده شد که دارای سه باند مشخص روی ژل باشند.

نمودارهای شماره ۵ و ۶ بیان ژن مورد نظر را در تکنیک RT-PCR به‌ترتیب در نمونه‌های سرطانی تیمار شده با عصاره و نمونه‌های سرطانی بدون تیمار نشان می‌دهد. در نمونه‌های سرطانی تیمار شده با عصاره در روزهای ۷، ۱۴ و ۲۸ بهترین پاسخ که مهار کامل بیان ژن *TERT* بود، مشاهده شد (نمودار شماره ۵). نمودار شماره ۶ میزان بیان ژن *TERT* در نمونه‌های سرطانی بدون تیمار با عصاره تام رازیانه را نشان می‌دهد. بیان ژن در نمونه شاهد نرمال و در روز هفتم، و همچنین به‌ترتیب در روز چهاردهم و روز بیست‌وهشتم میزان بیان ژن *TERT* بسیار افزایش یافته است.



نمودار شماره ۵- بیان ژن *TERT* در نمونه‌های سرطانی تیمار شده با عصاره تام رازیانه. ستون‌های نمودار از چپ به راست عبارتند از: شاهد یا کنترل، تیمار روز ۷، روز ۱۴ و روز ۲۸.



نمودار شماره ۶- بیان ژن *TERT* در نمونه‌های سرطانی بدون تیمار با عصاره تام رازیانه. ستون‌های نمودار از چپ به راست عبارتند از: نمونه شاهد یا کنترل، نمونه روز ۷، روز ۱۴، و تکرارهای روز ۲۸.

بحث

گیاهان و عصاره‌های گیاهی از قرن‌ها پیش به‌عنوان یک درمان بیماری‌ها استفاده می‌شده است. امروزه بسیاری از داروها از منابع گیاهی سرچشمه گرفته‌اند. تعداد زیادی از داروهای مؤثر، مبنای گیاهی داشته‌اند که نمونه‌ای از این داروها عبارتند از آسپرین (از پوست درخت بید)، دیگوکسین (از گل انگشتانه)، کینین (از پوست درخت گنه گنه) و مورفین (از خشخاش) [۱۷]. گیاه رازیانه به‌عنوان یک گیاه دارویی مهم در طیف گسترده‌ای از درمان‌ها، به‌ویژه دل‌درد، تهوع و استفراغ، ورم مفاصل، سرطان،

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2024-03-28]

کولیک کودکان، ورم ملتحمه، و درد کبد استفاده می‌شود. همچنین، عصاره‌های مختلف رازیانه در زمینه‌های دارویی، مانند ترکیب با ویتامین‌ها، داروی ضدحساسیت، ضدالتهاب، ضد-میکروبی و ضدویروسی، ضددرد، ضدتب، مهار سیتوکروم P450A4 کبد انسان استفاده می‌شوند [۱۱]. دم‌کرده ریشه و میوه این گیاه به‌عنوان شل‌کننده، تولید استروژن، ضددرد و عامل ضدالتهاب می‌باشد. این گیاه در درمان اختلالات دستگاه تنفسی و سوءهاضمه و همچنین برای افزایش شیر در مادران شیرده استفاده می‌شود [۱۴-۱۲]. رازیانه دارای بیش از ۸۷ ترکیب فرار می‌باشد. تجمع این ترکیبات فرار در داخل گیاه متغیر است، و عملا در هر قسمت از گیاه، یعنی ریشه، ساقه، جوانه‌ها، گل و میوه آن متفاوت است [۱۸]. در سال‌های اخیر مشخص شده است که استراگول ترکیب عمده موجود در رازیانه می‌باشد. این ترکیب فرار می‌تواند خواص سرطان‌زایی بالقوه‌ای ایجاد نماید [۱۹]. مطالعات نشان داده است که روغن‌های فرار دانه رازیانه ممکن است پتانسیل ضدسرطان قابل‌توجهی در برابر رده سلول سرطان پستان (MCF-7) داشته باشند [۲۱،۲۰]. گزارش شده است که رازیانه وحشی دارای خواص ضدسرطانی قابل‌توجهی می‌باشد که می‌تواند رده سلول‌های کبدی (HepG2) را هدف قرار دهد [۲۲]. اثر رازیانه در رده سلول سرطان پستان (4T1) با روش Brdu بررسی شده و مشخص گردید که فعالیت ضد-سرطانی رازیانه ممکن است فعالیت تکثیر سلول 4T1 را در شرایط درون‌تنی کاهش دهد [۲۳]. مطالعه حاضر جهت بررسی اثر عصاره تام رازیانه بر مورفولوژی سلول‌های سرطانی و تکثیر و بقا سلول‌ها و تاثیر آن روی بیان ژن *TERT* صورت گرفت. نشان داده شده است که عصاره متانولی رازیانه روی سلول‌های سرطانی باعث وارد شدن آسیب به DNA می‌شود که این اثر در سلول‌های MCF-7 نسبت به رده سلولی HepG2 و HCT116 بیشتر می‌باشد [۲۴]. همچنین، Timsina و همکاران در سال ۲۰۱۲، قسمت‌های مختلف عصاره رازیانه شامل بخش متانولی، بخش روغنی و بخش کلروفرمی را روی ۴ رده سلولی سرطانی، HepG2، A549 (سرطان ریه)، HT-29 (آدنوکار-سینومای کلون انسان)، MCF7 (سرطان پستان انسان) و MDBK (سلول‌های نرمال کلیه گاو) در شرایط آزمایشگاهی ارزیابی کردند که در نتیجه میزان IC50 بخش متانولی بیشتر از IC50 بخش روغنی و بخش کلروفرم در ۴ رده سلولی گزارش شد [۲۵]. نتایج مطالعه ما نشان داد که IC50 برای رده سلول سرطانی (TUBO) پس از ۷۲ ساعت ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر است. همچنین عصاره تام رازیانه در غلظت µg/ml ۲۰۰ پس از ۷۲ ساعت توانایی مهارکنندگی تکثیر سلول سرطان HepG2 را نشان داد. این نتایج نشان می‌دهد که تفاوت بارزی در مورفولوژی و زیست‌پذیری سلول‌های نرمال و سلول‌های سرطانی پس از تیمار با رازیانه وجود دارد؛ یعنی رازیانه می-تواند بر رده‌های سلولی HepG2، TUBO و L929 از لحاظ مورفولوژی تاثیر داشته باشد و تکثیر سلولی را در غلظت‌های مختلف عصاره مهار نماید، اما برخلاف تصور غلظت‌های بالای این عصاره به‌خصوص اثر تحریک کننده رشد سلول‌های سرطانی را نشان می‌دهد. این نکته در مطالعه Samir و همکاران که استراگول را به‌عنوان یک ماده سرطان‌زای بالقوه معرفی کرده، اشاره شده است [۲۶]. این نوع فعالیت دوگانه، سرطان‌زایی و مهار سرطان، به‌خصوص در استفاده از گیاهان دارویی به‌صورت خوراکی می‌تواند هشداری برای مصرف کنندگان آن باشد. در واقع دوز مصرف یک گیاه دارویی برای به‌دست آوردن اثرات مثبت یا منفی آن بسیار مهم و تاثیرگذار است. همچنین، مطابق با نمودارهای ۵ و ۶، نتایج ما نشان داد که در سلول‌های سرطانی بیان ژن *TERT* افزایش داشته، درحالی‌که در سلول‌های سرطانی تیمار شده با عصاره کاهش محسوسی در بیان ژن دیده شد. مطالعات متعدد نشان داده است که در ۹۰ درصد سلول‌های سرطانی بیان آنزیم تلومراز افزایش می‌یابد. بنابراین محققان به-دنبال کشف داروهای ضدسرطانی با خاصیت ضدتلومرازی هستند [۲۷]. میزان بیان ژن *hTERT* در پدیده تومورزایی و پیشرفت آن نقش اساسی دارد. بیان *hTERT* در سطح mRNA ارتباط مستقیمی با فعایت تلومرازی در سلول‌های سرطانی دارد [۲۸] و مهار بیان آن منجر به تخریب تلومر و درنتیجه کاهش رشد سلول‌های سرطانی می‌گردد. این ژن در سلول‌های سوماتیک بیان نمی‌گردد و در سلول‌های جنینی و سرطانی فعال می‌شود. لذا استراتژی‌های درمانی که قادر به کاهش بیان این ژن باشند، از قابلیت بالایی جهت کاهش رشد و القای مرگ برنامه-ریزی شده در این سلول‌ها برخوردار می‌باشند. اگرچه مکانیسم تأثیر عصاره بر تغییر بیان ژن نامشخص است، اما به‌نظر می‌رسد که کاهش بیان *hTERT*، از تأثیرات فیزیولوژیک عصاره بوده که در القاء مرگ برنامه‌ریزی شده در سلول‌های سرطانی نقش دارد. بنابراین تاثیر عصاره سبب کاهش فعالیت تلومراز شده و بدین شکل از تکثیر و نامیرایی سلول‌های سرطانی جلوگیری می‌نماید. در مطالعه دیگری نشان داده شده است که سلول‌های تیمار شده با کورکومین علاوه بر کاهش فعالیت تلومراز، دچار مرگ برنامه‌ریزی شده نیز می‌شوند [۲۹]. در مطالعه‌ای که روی اثر ماده گیاهی گوسپیل (ترکیب پلی‌فنولیک مشتق از پنبه‌دانه)

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2024-03-28]

انجام گرفت، مشاهده گردید که گوسپیل فعالیت آنزیم تلومراز را در سلول‌های K562 مهار می‌کند [۳۰]. در نتایج حاصل از این مطالعه نیز اثربخشی تیمار عصاره تام رازیانه روی بیان ژن *TERT* در نمونه‌های سرطانی مشخص گردید. مطابق با این یافته‌ها در تمام نمونه‌های روزهای ۷، ۱۴ و ۲۸ (نمونه‌های تومور و تیمار شده با عصاره رازیانه) سطح بیان ژن *TERT* کاهش یافته و عصاره رازیانه توانسته است اثر مهارکننده بر بیان ژن *TERT* در نمونه‌های سرطانی را نشان دهد.

نتیجه‌گیری

نتایج این تحقیق نشان داد که عصاره تام رازیانه در غلظت‌های بالاتر اثرات تحریک کنندگی و در غلظت‌های پایین‌تر اثرات جلوگیری کننده بر رشد و تکثیر سلول‌های سرطانی HepG2 و TUBO دارد. بنابراین مطالعه تغییرات درون سلولی از طریق بررسی و بیان ژن‌های درگیر در مسیر رشد و تکثیر سلولی می‌تواند برای درک مسیرهای مولکولی بسیار سودمند باشد.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از انستیتو پاستور ایران، گروه زیست شناسی واحد مشهد و واحد علوم پزشکی تهران تشکر و قدردانی می‌گردد. این مقاله مستخرج از پایان‌نامه تصویب شده در گروه زیست شناسی واحد علوم پزشکی تهران است.

References:

[1] Jin UK, Mohamed IF, Mary ME, Maria GR, Haddy KSF, Simone DT, et al. Hepatocellular carcinoma: Review of disease and tumor biomarkers. ***World J Hepatol*** 2016; 8(10): 471-484.

[2] Chen XP, Qiu FZ, Wu ZD, Zhang ZW, Hung ZY, Chen YF. Long-term outcome or resection of large hepatocellular carcinoma. ***Br J Surg*** 2006; 93(5):600-6.

[3] Shelton LM, Mukherjee P, Huysentruyt LC, Urits I, Rosenberg JA, Seyfried TN. A novel preclinical in vivo mouse model for malignant brain tumor growth and invasion. ***J Neurooncol*** 2010; 99: 165-76.

[4] Shabason JE, Tofilon PJ, Camphausen K. Grand rounds at the National Institutes of Health: HDAC inhibitors as radiation modifiers, from bench to clinic. ***J Cell Mol Med*** 2011; 15: 2735-44.

[5] Esmaeilzadeh AR, Ebtekar M, Biglari AR, Hassan ZM. Induction of Allogeneic Subcutaneous Glioma Tumor with GL 26 Cell Line in Balb/c Mice. ***JZUMS*** 2012; 20(87): 13-22.

[6] Brehar FM, Ciurea AV, Chivu M, Zarnescu O, Radulescu R, Dragu D. The development of xenograft glioblastoma implants in nude mice brain. ***J Med Life*** 2008; 1: 275-86.

[7] Biglari A, Bataille D, Naumann U, Weller M, Zirger J, Castro MG, et al. Effects of ectopic decorin in modulating intracranial glioma progression in vivo, in a rat syngeneic model. ***Cancer Gene Ther*** 2004; 11: 721-32.

[8] Reilly KM, Rubin JB, Gilbertson RJ, Garbow JR, Roussel MF, Gutmann DH, et al. Rethinking brain tumors: the fourth mouse models of human cancers consortium nervous system tumors workshop. ***Cancer Res*** 2008; 68: 5508-11.

[9] Anderew V, Catherine Z, Robert L. Herbal medicine. ***West J Med*** 2001; 175(2): 125-8.

[10] Manonmani R, Khadir VA. Antibacterial screening on *Foeniculum vulgare* M. ***Int J Pharm Bio Sci*** 2011; 2(4): 390–4.

[11] Parejo I, Jauregui O, Sánchez-Rabaneda F, Viladomat F, Bastida J, Codina C. Separation and characterization of phenolic compounds in fennel (*Foeniculum vulgare*) using liquid chromatography-negative electrospray ionization tandem mass spectrometry. ***J Agric Food Chem*** 2004; 52(12): 3679-87.

[12] Birdane FM, Cemek M, Birdane YO, Gulcin I, Buyukokuroglu ME. Beneficial effects of *Foeniculum vulgare* on ethanol-induced acute gastric mucosal injury in rats. ***World J Gastrol*** 2007; 13(4): 607-11.

[13] Choi EM, Hwang JK. Antiinflammatory, analgesic and antioxidant activities of the fruit of Foeniculum vulgare. ***Fitoterapia*** 2004; 75: 557–65.

[14] Amjad H, Jafary HA. *Foeniculum vulgare* therapy in irritable bowel syndrome. ***Am J Gastroenterol*** 2000; 95: 24-91.

[15] Blackburn EH. Switching and signaling at the telomere. ***Cell*** 2001; 106: 661–73.

[16] Armanios M. Telomeres and age-related disease: how telomere biology informs clinical paradigms. ***J Clin Invest*** 2013; 123: 996–1002.

[17] Shahat AA, Ibrahim AY, Hendawy SF, Omar EA, Hammouda FM, Abdel-Rahman FH, et al. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of essential oils from organically cultivated fennel cultivars. ***Molecules*** 2011; 16(2): 1366–77.

[18] Özbek H, Uğraş S, Dulger H, Bayram I, Tuncer I, Ozturk G, et al. Hepato protective effect of Foeniculum vulgare essential Oil. Fitoterapia. 2003; 74: 317–9.

[19] Raffo A, Nicoli S, Leclercq C. Quantification of estragole in fennel herbal teas: implications on

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2024-03-28]

the assessment of dietary exposure to estragole. ***Food Chem Toxicol*** 2011; 49, 370–5.
[20] Dai Zhi, Zhou Jian, Fan Jia. Hepatocellular carcinoma (HCC) and the relevant important molecular pathways. ***Chin Liver Dis*** 2010; 18: 955-7.
[21] Mosaddegh M, Esmaeili S, Hamzelo-moghadam M, Alembagheri A. In vitro cytotoxic assay of giant Fennel fractions. ***Res Pharm Sci*** 2012; 29;7(5):113.
[22] Mansourabadi AH, Shams A, Mansouri R, Najafi A, Ajami M. Effects of fennel as a fetida and ginseng ethanolic extracts on growth and proliferation of mouse breast cancer 4T1 cell lines. ***Advanced Herbal Med*** 2015; 1(2): 34-39.
[23] Shamkant B, Vainav V and Atmaram H. Foeniculum vulgare Mill: A Review of its Botany, Phytochemistry, Pharmacology, Contemporary Application, and Toxicology. ***Biomed Res Int*** 2014; Article ID 842674. 32 p.
[24] Mohamad RH, El-Bastawesy AM, Abdel-Monem MG, Al-Mehdar HA, Sharawy SM, et al. Antioxidant and anti carcinogenic effects of methanolic extract and volatile oil of fennel seeds (Foeniculum vulgare). ***J Med Food*** 2011; 14(9): 986–1001.
[25] Timsina B, Shukla M, Nadumane VK. A review of few essential oils and their anticancer property. ***J Natural Pharm*** 2012; 3(1): 1-8.
[26] Samir AM, Zaahkouk, Ezzat I. Aboul-Ela, Ramadan MA, Sayed Bakry and Ahmed BM. Mhany. Anti carcinogenic activity of Methanolic Extract of Fennel Seeds (Foeniculum vulgare) against breast, colon, and liver cancer cells. ***Int J Advanced Res*** 2015; 3(5): 1525-37.
[27] Tian X, Chen B, Liu X. Telomere and telomerase as targets for cancer therapy. ***Appl Biochem Biotechnol*** 2010; 160(5): 1460-72.
[28] Shay JW and Wright WE. Telomeres and telomerase in normal and cancer stem cells. ***FEBS Lett*** 2010; 584(17): 3819-25.
[29] Mishra V, Verma R, and Raghubir R. Neuroprotective effect of flurbiprofen in focal cerebral ischemia: the possible role of ASIC1a. ***Neuro Pharmacolgy*** 2010; 59(7-8): 582-8.
[30] Moon DO, Kim MO, Choi YH, Lee HG, Kim ND, Kim GY. Gossypol suppresses telomerase activity in human leukemia cells via regulating hTERT. ***FEBS Lett*** 2008; 582(23-24): 367-73.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2024-03-28]