مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد
دوره بیست و ششم، شماره دهم، دی ۱۳۹۷

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۶/۲۳
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۸/۲۶

بررسی تغییرات الگوی بیان ژن *VEGF* و القاء آپوپتوز در رده سلولی سرطان پستان MCF-7 تیمار شده با کروسین

رویا سراوانی[۱]، سامان سرگزی[۲]، محبوبه ربانی[۳]، رامین سراوانی[۴*]

مقاله پژوهشی

مقدمه: هدف گیری فاکتور رشد اندوتلیالی عروقی (*VEGF*) به عنوان یک هدف درمانی در تومور های جامد و به خصوص سرطان پستان می باشد. به دلیل عدم ایجاد عوارض جانبی در سلول های سالم، استفاده از داروهای حاوی ترکیبات طبیعی در درمان سرطان در حال افزایش می باشد. کروسین به عنوان ماده موثر زعفران نشان داده که اثرات بیولوژیکی مختلفی در انواع بدخیمی ها دارد. هدف از این مطالعه بررسی اثر کروسین بر مهار رشد، القاء آپوپتوز و الگوی بیان ژن *VEGF* در رده سلول سرطان پستان MCF-7 می باشد .

روش بررسی: در این مطالعه مداخله ای، اثر کروسین در القاء مرگ سلولی در غلظت های مختلف از ۰ تا ۸ میلی گرم بر میلی لیتر در زمان های ۲۴ تا ۴۸ ساعت به کمک تست رنگ سنجی MTT انجام شد. رنگ آمیزی Annexin V/PI و متود realtime-PCR به ترتیب برای بررسی نوع مرگ سلولی و ارزیابی الگوی بیان ژن VEGF به کار گرفته شد. به منظور تجزیه و تحلیل داده ها از نرم افزار SPSS V.16 و آزمون غیر پارامتریک ANOVA استفاده شد و مقادیر $p< ۰/۰۵$ معنی دار در نظر گرفته شد.

نتایج: سلول های MCF-7 تیمار شده با کروسین در مقایسه با گروه کنترل کاهش معنی‌داری در رشد و تکثیر در زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت دریک روند وابسته به دوز و زمان نشان دادند. خروجی دستگاه فلوسایتومتری نشان از افزایش درصد سلول‌های آپوپتوتیک مطابق با افزایش غلظت کروسین داشت. هم چنین کاهش بیان ژن *VEGF* در یک الگوی وابسته به زمان در سلول‌های تیمار شده مشاهده شد ($p< ۰/۰۵$).

نتیجه‌گیری: نتایج نشان می‌دهد که کروسین باعث القاء آپوپتوز وابسته به زمان و در عین حال کاهش بیان ژن *VEGF* در سلول‌های MCF-7 می‌شود. مطالعات بیشتری برای پی بردن به کارایی قطعی کروسین به عنوان یک داروی ضد سرطان در درمان سرطان پستان ضروری می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: سرطان پستان، کروسین، فاکتور رشد اندوتلیال عروقی، آپوپتوز

ارجاع: سراوانی رویا، سرگزی سامان، ربانی محبوبه، سراوانی رامین. **بررسی تغییرات الگوی بیان ژن *VEGF* و القاء آپوپتوز در رده سلولی سرطان پستان MCF-7 تیمار شده با کروسین.** مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد ۱۳۹۷؛ ۲۶ (۱۰): ۵۶-۸۴۵.

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد شیمی گرایش نانوشیمی، دانشگاه علم و صنعت ،تهران، ایران
۲- دانشجوی دکتری بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی خدمات بهداشتی درمانی شهید صدوقی یزد، یزد، ایران
۳- استادیار گروه شیمی، دانشکده شیمی، دانشگاه علم و صنعت، تهران، ایران
۴- دانشیار مرکز تحقیقات سلولی و مولکلولی و گروه بیوشیمی بالینی دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، زاهدان، ایران
*(نویسنده مسئول)؛ تلفن: ۰۹۱۵۵۴۳۲۶۰۹، پست الکترونیکی: saravaniramin@yahoo.com، کد پستی : ۹۸۱۶۷۳۷۷۸۹

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-06-11]

[DOI: 10.18502/ssu.v26i10.474]

مقدمه

از میان سرطان ها، سرطان پستان جزء شایع‌ترین نوع سرطان و علت اصلی مرگ ومیر در بین زنان است و به عنوان یکی از مشکلات بهداشتی قرن محسوب می شود (۱) و این بیماری به سرعت در دنیا در حال افزایش است؛ به گونه ای که در طی چند سال گذشته در برخی در کشورهای در حال توسعه طی چند دهه اخیر به ۳ تا ۴ برابر رسیده است. سالانه بیش از ۱/۱ میلیون مورد سرطان پستان گزارش می شود و بیش از ۴۱۰ هزار مورد بر اثر سرطان پستان می میرند (۲). متأسفانه در ایران ۸۵۰۰ مورد جدید از سرطان پستان ثبت شده و ۱۴۰۰ نفر به دلیل این بیماری جان خود را از دست می‌دهند (۳) . تاکنون پیشرفت های قابل ملاحظه‌ای در برنامه‌های چند جانبه درمانی سرطان پستان صورت گرفته است و با تکمیل روش های درمانی امکان افزایش بقای ۵ ساله بیماران فراهم گردیده است. جراحی هنوز به عنوان اولین روش انتخاب شده در مقابله با سرطان مهاجم مرحله I و II استفاده می‌گردد (۴). درمان های کمکی مثل پرتودرمانی، هورمون درمانی و شیمی درمانی نیز برای کند کردن تهاجم و تکثیر این نوع سلول های بدخیم کاربرد دارد (۵) هر چند شیمی درمانی نیز عاری از عوارض ناخواسته نیست (۶).

به هر حال با توجه به تهاجمی بودن روش های درمانی موجود، نیاز به استفاده از ترکیبات و روش های نوین به ویژه از ترکیبات موجود در طبیعت در کنترل و درمان این سرطان بیش از پیش احساس می شود. زعفران گران ترین گونه ای است که به طور گسترده به عنوان داروهای گیاهی، طعم و رنگ دهنده غذایی و عامل مطلوب به دلیل رنگ، بو و طعم منحصر به فرد آن از دوران باستان می باشد و از نواحی گرمسیر از گیاهی با نام علمی Linnaeus Crocus sativus به دست می آید (۷) و این گیاه در بسیاری از کشورها مثل اسپانیا- چین و ایران برای مصارف خوراکی و دارویی مختلف کاشته می شود (۸). مطالعات نشان داده عصاره زعفران به دلیل حاوی بودن متابولیت‌های فعال از نظر بیولوژیک، دارای خواص آنتی‌توموری و مهاری بر رشد سلول‌های سرطانی انسانی در شرایط in-vivo می‌باشد (۱۰, ۹). در زعفران با حدود ۱۵۰ نوع ترکیب فعال و غیر فعال وجود دارد که مهم ترین ترکیب فعال بیولوژیکی در این گیاه کروسین می‌باشد (۱۲, ۱۱). کروسین با فرمول شیمیایی کروسین $C_{44}H_{64}O_{24}$ یک کاروتنوئید محلول در آب با خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی ثابت شده است. به علاوه برخی از مطالعات نشان داده است که کروسین باعث مهار رشد در انواع سلول‌های سرطانی مشتق شده از دهانه رحم و غدد پستان می‌گردد (۱۳, ۱۰). اثرات موثر کروسین بر کاهش رشد و تکثیر سایر سلول های سرطانی از جمله سرطان کولون و ریه به واسطه کاهش بیان Bcl-2 و افزایش بیان Bax و توقف رشد سلولی در مرحله G1 از سیکل سلولی و همین طور دخالت این متابولیت زعفران در فعال کردن سایر مسیرهای پیام‌رسانی درون سلولی به خوبی مطالعه شده است (۱۵, ۱۴). با توجه به مطالب عنوان شده، برای درمان موثر سلول های خارج شده از روند تکثیر طبیعی، استفاده از منابع طبیعی و گیاهان دارویی و ترکیبات موثر آن ها از جمله کروسین و شناخت دقیق مسیرهای پیام‌رسانی سلولی به عنوان یک راهکار درمانی سودمند و مهم تلقی می‌شود.

یکی از مسیرهای پیام‌رسانی منتهی شونده به تهاجم سلول‌های سرطانی پستان، پدیده ایجاد رگ‌زایی می‌باشد (۱۶). آنژیوژنز یا رگ‌زایی در ابتدا با تکثیر و تمایز پیش‌سازهای سلول های اندوتلیال عروق (واسکولوژنز) شروع و تا شکل‌گیری رگ های خونی اولیه پیش می‌رود و در ادامه شبکه عروقی ایجاد می‌شود. آنژیوژنز فیزیولوژیک در بارداری و شرایط پاتولوژیک مثل ترمیم زخم، رتینوپاتی دیابتی و سرطان‌ها دیده می‌شود (۱۷). فاکتورهایی که موجب این پدیده می‌شوند، اعضای خانواده فاکتور رشد اندوتلیال عروق (*Vascular endothelial growth factor* (*VEGF*)) به همراه گیرنده‌های آن ها می‌باشد (۱۸). ژن *VEGF* به طول ۱۴ کیلو جفت باز طول داشته و بر روی کروموزوم ۶ قرار گرفته است و شامل ۸ اگزون و ۷ اینترون می باشد (۱۹) و محصول ژنی غالب آن پروتئینی است که عمدتاً به صورت هومودایمر یافت می‌شود (۲۰). در شرایط کاهش فشار اکسیژن در شرایط بی‌هوازی،

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-06-11]

[DOI: 10.18502/ssu.v26i10.474]

VEGF با اتصال به گیرنده‌های اختصاصی خود بر میزان نفوذپذیری عروق تغذیه کننده بافت توموری اثر گذاشته و آن ها را فعال می‌کند که در نهایت منجر به تسریع رشد رگ‌های خونی از طریق تخریب ماتریکس اطراف سلولی و سهولت در مهاجرت سلول ها و به طبع مهار آپوپتوز می‌شود (۲۱). اهمیت نقش VEGF در وقوع آنژیوژنز در انواع سلول های سرطانی باعث شده که این فاکتور عروقی به عنوان یکی اهداف دارویی بلقوه برای درمان سرطان و به خصوص سرطان پستان در نظر گرفته شود. از آن جا که فعالیت این فاکتور رشد عروقی در برخی از رده های سلول های سرطانی افزایش می یابد و مطالعات نشان می‌دهد که عصاره آبی زعفران باعث کاهش بیان *VEGF* در سایر سرطان ها می‌گردد، هدف از مطالعه اخیر بررسی اثرات احتمالی کروسین به عنوان اصلی‌ترین متابولیت بیولوژیک زعفران برمهار رشد، القای آپوپتوز و تغییرات الگوی بیان ژن *VEGF* در رده سلولی سرطان پستان MCF-7 می‌باشد.

روش بررسی

جهت انجام این مطالعه مداخله ای، کروسین از پژوهشکده بوعلی وابسته به دانشگاه علوم پزشکی مشهد با درجه خلوص ۹۷ درصد خریداری و در آب مقطر حل و به صورت استوک در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. رده سلولی سرطان پستان MCF-7 از بانک سلولی ایران (NCBI) مستقر در انستیتو پاستور خریداری شد. مواد کشت سلولی از جمله محیط کشت سلولی RPMI-1640، محلول پنی‌سیلین- استرپتومایسین؛ تریپسین-EDTA و سرم جنین گاوی (FBS) از شرکت اینوکلون (INOCLON) (ایران) تهیه شد. رنگ MTT و کیت RNX برای استخراج RNA به ترتیب از شرکت های سیگما (آمریکا) و شرکت سینا ژن (ایران) خریداری شد. کیت های سنجش آپوپتوز (Biovision، آمریکا) و سنتز cDNA (تاکارا ؛ژاپن) نیز از طریق ثبت سفارش تهیه شد .

کشت سلولی

رده های سلولی سرطان سینه، MCF-7 در محیط کشت RPMI-1640 حاوی ده درصد FBS قرار داده شد و بعداً به انکوباتور حاوی ۵٪ CO2، ۹۵٪ رطوبت و دمای ۳۷ °C منتقل شدند. فلاسک‌ها روزانه به وسیله میکروسکوپ معکوس از نظر رشد و تراکم سلولی، مورفولوژی و کنترل آلودگی مورد بررسی قرار می‌گرفتند. تعویض محیط کشت در زمان مورد نیاز انجام می‌گرفت. پس از این که تراکم سلول‌ها در فلاسک به ۸۰ تا ۸۵٪ می‌رسید، سلول‌ها پاساژ داده می‌شدند. به منظور تعیین درصد سلول های زنده در شمارش تام سلول های فلاسک از رنگ آمیزی تریپان بلو ۰/۱ درصد استفاده شد.

بررسی سمیت سلولی به روش MTT assay

ابتدا سلول‌های موجود در فلاسک تریپسینه شده و پس از شمارش سلولی، سلول‌ها با دانسیته مشخص (۵×۱۰^{۳} سلول در میلی لیتر) به پلیت ۹۶ چاهکی منتقل شده و به هر چاهک ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت کامل همراه با سلول افزوده می‌گردید. سپس سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت در این شرایط انکوبه شده تا سلول‌ها کاملاً به کف ظرف چسبیده و در فاز رشد لگاریتمی قرار گیرند. پس از این زمان، محیط کشت چاهک‌ها تخلیه شده و سلول‌ها با غلظت‌های متفاوت کروسین (۰ تا ۸ میلی گرم بر میلی لیتر) تیمار شدند. این آزمایشات حداقل سه بار تکرار شد و برای هرغلظت در هر آزمایش سه چاهک در نظر گرفته شد. پس از طی شدن زمان مورد نظر (۲۴ و ۴۸ ساعت)، به هر چاهک ۲۰ میکرو لیتر محلول MTT (غلظت نهایی ۵ میلی گرم بر میلی لیتر در PBS) اضافه و به مدت ۳ ساعت در انکوباتور مجدداً انکوبه شده و پس سپری شدن زمان محیط رویی دور ریخته می‌شد و به هر چاهک ۲۰۰ میکرولیتر DMSO افزوده شده تا کریستال های فورمازان حل شوند. سپس میزان جذب چاهک‌های مربوط به گروه های تیمار شده با غلظت‌های مختلف کروسین در طول موج ۵۷۰ نانومتر توسط دستگاه Elisa reader خوانده شده و بر میزان متناظر آن در گروه کنترل تقسیم و ضربدر ۱۰۰ شد تا درصد زنده مانی سلول ها پس از تیمار به دست آید.

بررسی آپوپتوز

سلول ها با دانسیته ۳×۱۰^{۵} سلول در میلی لیتر به پلیت ۶ چاهکی اضافه شد و پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون، تیمار

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-06-11]
[DOI: 10.18502/ssu.v26i10.474]

سلول‌ها به جز گروه کنترل با غلظت های ۴،۲ و ۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر انجام شد. پس از سپری شدن زمان؛ محیط رویی چاهک ها و سلول های کف پلیت به واسطه افزودن مقادیر کافی از تریپسین-EDTA جدا شدند و کل محتویات هر چاهک به یک فالکون منتقل گردید. سپس طبق پروتکل کیت آپوپتوز (Biovision Technologies)، سلول های کنترل و تیمار شده از کف پلیت جدا شده و در ۴۰۰ میکرولیتر از بافر مخصوص کیت شناور شدند. پس از افزودن ۵ میکرولیتر رنگ آنکسین V و ۱۵ دقیقه انکوباسیون در تاریکی، مجدداً ۵ میکرولیتر رنگ PI با آن ها افزوده شده و ۱۵ دقیقه به دور از نور در دمای محیط قرار گرفت. پس از سانتریفوژ (۹۰۰ دور در دقیقه)، هر نمونه در ۱۰۰۰ میکرولیتر محلول ایزوتونیک رقیق شده و توسط دستگاه فلوسیتومتر (Partec PASII) آنالیز شد.

سنجش بیان ژن *VEGF* به روش انجام Real-Time PCR

محتوای RNA سلولی با استفاده از متد Acid Guanidinum Thiocyanate Phenol (RNX شرکت سینا ژن) استخراج گردید. برای این منظور ابتدا سلول‌های کنترل و تیمار از ته پلیت‌های ۶ چاهکی جدا کرده و بعداً ۱ میلی لیتر از محلول RNX اضافه شده و بر طبق پروتکل شرکت سینا ژن پس از لیز عصاره سلولی و استخراج آن توسط کلروفورم و اتانول، RNA استخراج شده و در ۵۰ میکرولیتر از آب دیونیزه حل شده و در دمای ۸۰- درجه سانتی گراد ذخیره شد. پس از نرمال سازی غلظت RNA، از کیت سنتز cDNA (TaKaRa, Japan) طبق پروتکل استفاده شد.

برای اجرای Realtime-PCR با روش سایبرگرین، از پرایمرهای طراحی شده به صورت exon-exon junction با توالی F: GAAGGAGGAGGGCAGAATCATCAC و R:CACAGGATGGCTTGAAGATGTACTC با طول باند ۱۴۲ جفت باز برای ژن *VEGF* (NC_000006.12 در پایگاه NCBI) و F: GAGCCATCGTCAGACAC و R:CATGTAGTTGGAATGAAGG با ۱۵۰ جفت باز برای *GAPDH* (NC_000012.12 در پایگاه NCBI) استفاده شد. جهت انجام سنجش بیان از ۱۰ میکرولیتر Master Mix SYBR Green، ۲ میکرولیتر Primer F,R ، ۳ مایکرولیتر CDNA به همراه ۵ میکرولیتر DEPC Water برای ژن مورد مطالعه و ژن *GAPDH* (به عنوان ژن مرجع تحت عنوان کنترل داخلی) استفاده شد. برنامه دمایی اجرایی به صورت ذیل انجام شد: جداسازی اولیه ۱۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد، جداسازی بعدی ۱۵ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد، اتصال و تکثیر برای هر دو ژن ۶۰ ثانیه در دمای ۶۱ درجه سانتی گراد به مدت ۴۰ سیکل توسط دستگاه ABI 7700 انجام شد. نتایج حاصل از آنالیز منحنی های تکثیری ژن هدف در مقایسه با ژن مرجع، توسط روش $2^{-\Delta\Delta C_T}$ مورد سنجش قرار گرفته و تغییرات میزان mRNA به صورت Fold گزارش شد.

تجزیه و تحلیل آماری

به منظور تجزیه و تحلیل داده ها از نرم افزارSPSS V.16.0 و آزمون غیر پارامتریک One way analysis of ANOVA استفاده شد. نتایج به صورت Mean ± SEM گزارش و مقادیر p< ۰/۰۵ معنی دار در نظر گرفته شد.

ملاحظات اخلاقی

پروپوزال این تحقیق توسط دانشگاه علوم پزشکی زاهدان تایید شده است.

نتایج.

نتایج بررسی اثرات کروسین بر رشد رده‌های سلولی MCF-7

نتایج تیمار سلول‌ها نسبت به چاهک شاهد متناظر خود مقایسه گردید و درصد سلول‌های زنده نسبت به کنترل محاسبه شد. شکل ۱ نشان‌دهنده اثر ضد تکثیری غلظت‌های مختلف کروسین بر روی سلول های رده MCF-7 می‌باشد. اثر مهاری کروسین بر رشد این سلول‌ها در غلظت‌های بالاتر از ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر برای زمان ۴۸ ساعت و بالاتر از ۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر برای زمان‌های۲۴ و ۴۸ ساعت مشهود می‌باشد. به طوری که درصد سلول‌های زنده در غلظت ۴ میلی گرم بر میلی‌لیتر کروسین در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت به ترتیب به۲/۵±۴۵ و۳/۱±۳۱ درصد می رسد. IC50 در این

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-06-11]
[DOI: 10.18502/ssu.v26i10.474]

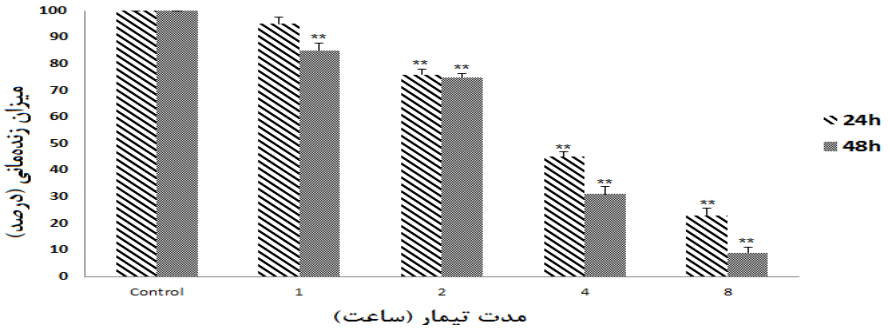
آزمایش تقریباً ۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در زمان ۲۴ ساعت به دست آمد (P< ۰/۰۵ در مقایسه با کنترل).

تأثیر کروسین بر درصد فراوانی سلول های آپوپتوزی در رده MCF-7 با استفاده از تکنیک فلوسایتومتری:

مطابق منحنی تراکمی نشان داده شده در شکل ۲، درصد سلول های متحمل فرایند آپوپتوز با افزایش غلظت کروسین در مقایسه با گروه کنترل به افزایش یافته است. هم چنین این افزایش معنی دار به صورت هیستوگرام در شکل ۳ نمایش داده شده اند. همان طور که مشاهده می شود، درصد سلول های آپوپتوتیک اولیه و دیررس با افزایش غلظت کروسین افزایش یافت که میزان این افزایش همواره در مقایسه با گروه کنترل معنی دار بوده است (p= ۰/۰۲۲). هم چنین نتایج رنگ آمیزی Annexin V/PI نشان می دهد در هیچ یک از غلظت‌های عنوان شده، نکروز مکانیسم اصلی مرگ سلولی نبوده است.

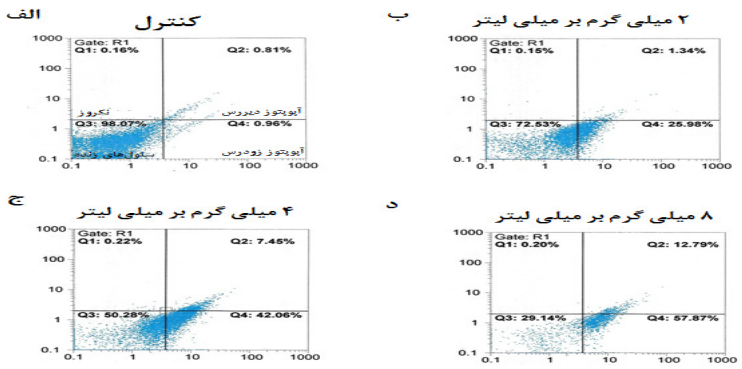
نتایج بررسی الگوی بیان *VEGF* با استفاده از Real time –PCR

شکل ۴ نتایج بیان ژن *VEGF* را در زمان های ۶، ۱۲ و ۲۴ ساعت در حضور غلظت ۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر کروسین نشان می‌دهد. همان طور که مشاهده می شود میزان بیان *VEGF* یک کاهش وابسته به زمان نسبت به گروه کنترل (سلول های غیر تیمار) تا زمان ۱۲ ساعت نشان می دهد و بعد از این زمان افزایش بیان در ژن *VEGF* مشاهده می شود (p= ۰/۰۳۹).



شکل ۱: تاثیر غلظت های مختلف کروسین بر درصد زنده مانی سلول های MCF-7 در زمان های ۲۴ و ۴۸ ساعت.

نتایج بر اساس Mean ± SD در مقایسه با کنترل ارائه شده است (**p< ۰/۰۵)

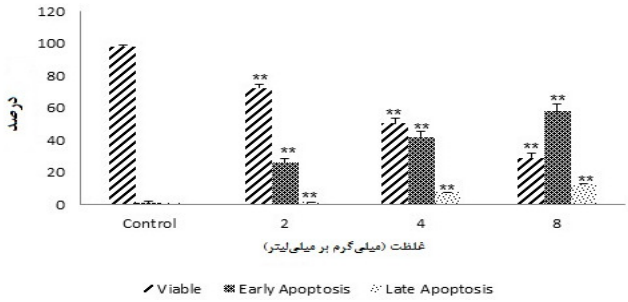


شکل ۲: منحنی تراکمی خروجی دستگاه فلوسایتومتر در اثر تیمار سلول هایMCF-7 سرطان پستان با غلظت های

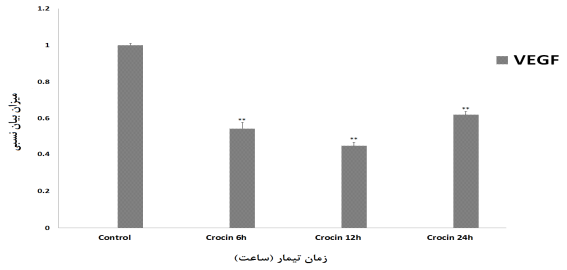
الف) صفر (کنترل)، ب) غلظت ۲ میلی گرم بر میلی لیتر ج) غلظت ۴ میلی گرم بر میلی لیتر و د) غلظت ۸ میلی گرم بر میلی لیتر کروسین.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-06-11]

[DOI: 10.18502/ssu.v26i10.474]



شکل ۳: هیستوگرام درصد سلول های آپوپتوتیک اولیه و دیررس در رده سلولی MCF-7 پس از تیمار با کروسین. نتایج کمی بر اساس Mean ± SD در مقایسه با کنترل به صورت درصد ارائه شده است (**p< ۰/۰۵)



شکل ۴: بررسی اثرات کروسین بر الگوی بیان ژن *VEGF* در رده سلولی MCF-7 (**p< ۰/۰۵).

بحث

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که کروسین به صورت مشهودی باعث کاهش بیان ژن *VEGF* و سبب کاهش زیستایی و القاء فرایند آپوپتوز در رده‌های سلول سرطان پستان MCF-7می‌شود. سرطان نتیجه تغییرات پیچیده مولکولی-بیوشیمیایی است که مکانیسم طبیعی رشد و تمایز سلولی از نظم طبیعی خارج شده و این مکانیسم‌ها به گونه‌ای تغییر یافته که باعث افزایش رشد و تکثیر و مانع تمایز سلولی می‌شوند. سرطان پستان دومین سرطان پس از سرطان پوست و شایع ترین علت مرگ‌ومیر ناشی از سرطان در زنان ۴۰ تا ۴۴ ساله می باشد. سرطان پستان ۳۲ درصد از کل سرطان های زنان و ۱۹ درصد مرگ‌های ناشی از سرطان در زنان را شامل می شود (۲۲). هدف اصلی از درمان سرطان توسط مواد طبیعی و شیمیایی کندکردن یا مهار فرایند سرطان‌زایی می‌باشد. این نگرش به طور هدفمند بر روی مسیرهای داخلی غیرطبیعی سلولی متمرکز می‌باشد (۲۳). درمان های رایج سرطان پستان دارای اثرات جانبی قابل توجهی است و محصولات طبیعی یا فتوشیمیایی با توجه به مزایایی از جمله ایمنی بیشتر، صرفه اقتصادی و مقاومت دارویی کمتر جایگاه ویژه ای در درمان پیدا کرده اند. تلاش های بسیاری در جهت افزایش اثربخشی داروهای ضد سرطان با منشاء گیاهی در حال انجام است و بر همین اساس ۶۰ درصد داروهای ضدسرطان از منابع طبیعی مشتق شده اند (۲۵, ۲۴) .

در نتیجه در سال های اخیر استفاده از داروهای طبیعی گیاهی برای پیشگیری و درمان سرطان مطرح شده است. در این روش نه تنها سلول های توموری کنترل می شود بلکه به سلول سالم نیز آسیبی نمی رسد (۲۷, ۲۶) و می تواند از طریق مهار تکثیر سلولی، القا آپوپتوز، تعدیل مکانیسم استرس اکسیداتیو و خصوصا تنظیم مسیرهای سیگنالینگ سلولی اثرات خود را بروز دهند (۲۴). زعفران گران ترین گونه ای است که به طور گسترده به عنوان داروهای گیاهی، طعم و رنگ دهنده غذایی و عامل مطلوب به دلیل رنگ، بو و طعم منحصر به فرد آن می باشد که تحقیقات نشان می دهد مکانیسم مولکولی عملکرد زعفران و اجزای تشکیل دهنده آن میان کنش بین این تشکیل دهنده های زعفران با DNA می باشد. آثار ضد توموری

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-06-11]

[DOI: 10.18502/ssu.v26i10.474]

نیز در سرطان پستان القا شده دارد (۲۸). مطالعات نشان می‌دهد که عصاره زعفران باعث کاهش بیان ژن‌های مرتبط با فاکتورهای رشد در سلول های سرطان پستان می‌گردد (۲۹). مهم ترین ترکیب فعال زعفران کروسین است که مطالعات نشان داده است که کروسین می تواند انواع مختلفی از رشد سلول های سرطانی را کاهش دهد و بر بیان ژن های مرتبط با پیشروی سلول های بدخیم تاثیر گذار باشد (۱۰). به طور کلی، VEGF از جمله فاکتورهای اصلی روند جوانه‌زدن عروق خونی جدید از بستر عرقی اندوتلیال محسوب می‌شود. در فرایند آنژیوژنز و کاهش فشار اکسیژن بافت از اهمیت فوق العاده برخوردار است. در تومورهای جامد به دلیل رشد فزایند سلول های سرطانی روند رشد سلول بر روند مرگ غالب می گردد و در نتیجه سلول ها بر روی یکدیگر تجمع یافته که وضعیت کاهش اکسیژن در مرکز توده حائز اهمیت شده که در این حین سلول های سرطانی اقدام به ترشح فاکتور رشد اندوتلیایی بر ایجاد رگ‌زایی جهت دریافت مواد غذایی لازم برای رشد و تکثیر و اکسیژن می کنند (۳۰).

در مطالعه حاضر و اثر کروسین بر درصد سلول های زنده، میزان آپوپتوز و بیان ژن *VEGF* در سلول های MCF-7 سرطان پستان بررسی شد. رده سلولی انتخاب شده به عنوان مدل‌های کاملاً شناخته شده برای مطالعات سرطان پستان در خارج از بدن موجود زنده کاربرد بسیار وسیعی دارد. نتایج به دست آمده از تست رنگ سنج MTT نشان داد که کروسین به صورت وابسته به دوز و زمان باعث کاهش درصد سلول های زنده می شود و درصد زنده ماندن سلول ها در زمان ۴۸ ساعت در مقایسه با همان غلظت در زمان ۲۴ ساعت پایین تر بوده است. Sun و همکاران از چین در سال ۲۰۱۳ با بررسی اثر کروسین بر سلول های لوکمی HL-60 نشان دادند که افزایش غلظت این ماده کاهش رشد مشاهده می شود، به طوری که در غلظت ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر کروسین در زمان ۲۴ حدود ۴۵ درصد و در زمان ۴۸ ساعت با همان غلظت ۶۵ درصد کاهش رشد مشاهده می شود. در پژوهش حاضر در زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت بیشترین کاهش مشاهده شد که با نتایج این مطالعه هم خوانی دارد (۳۱). پنگ‌وی و همکاران در سال ۲۰۱۵ گزارش کردند که کروسین باعث کاهش رشد و افزایش سلول های آپوپتوتیک در سلول‌های رده سرطانی MCF-7 در غلظت‌های ۲۵ تا ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به واسطه افزایش فعالیت کاسپاز ۸ و افزایش بیان پروتئین BAX به همراه افزایش پروتئین می‌شود (۳۲). فائزه والی و همکاران در سال ۲۰۱۵ گزارش داد که در غلظت های ۴/۵ و ۶ میلی گرم بر میلی لیتر کروسین در تیمار سلول های MCF-7 در زمان های ۲۴و ۴۸ ساعت در صد سلول زنده کاهش یافته (۳۳) که یافته‌های این تحقیق نیز با روند کاهشی رشد این سلول ها در مطالعه ما منطبق است. هم چنین، عمر امین و همکاران از هند در سال ۲۰۱۱ گزارش دادند که کروسین در کاهش رشد سلول‌های سرطانی کبد تاثیر گذار می‌باشد (۳۴). شانگ شن و همکاران در سال ۲۰۱۵ نشان دادند که کروسین در سلول سرطانی پستان MCF-7 باعث کاهش رشد سلول های سرطانی ریه در شرایط وابسته به دوز و زمان می گردد که بیشترین کاهش رشد در غلظت های ۸ و ۱۶ در زمان ۴۸ مشاهده شده بود. این داده‌ها با غلظت ۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در مطالعه فعلی در زمان های ۶ و ۱۲ ساعت مطابقت دارد.

نتایج آنالیز بیان ژن در مطالعه فعلی حاکی از کاهش معنی‌دار بیان ژن *VEGF* در زمان های ۶ و ۱۲ ساعت پس از تیمار نسبت به گروه کنترل بوده است. این در حالیست که پس از ۲۴ ساعت تیمار سلول‌های MCF-7 با ۳ میلی گرم بر میلی لیتر از کروسین، از میزان کاهش بیان این ژن نسبت به گروه کنترل کاسته شد که خود می تواند حاکی از افزایش میزان mRNA مربوط به *VEGF* و رسیدن به سطح طبیعی باشد. در هر صورت، آنالیز بیان *VEGF* در دوره های تیماری طولانی تر از جمله ۴۸ یا ۷۲ ساعت، می تواند به نتیجه‌گیری بهتر ما در مورد نقش این متابولیت فعال زعفران در کاهش پتانسیل آنژیوژنتیک سلو ل های سرطانی پستان کمک کند. El-kharrag و همکاران در سال ۲۰۱۷ ضمن مقایسه اثرات سایتوتوکسیک کروسین و نانوذره کروسین دار بر روی سلول های سرطانی، مشاهده کردند کروسین با غلظت ۳ میلی گرم بر میلی لیتر قادر به کاهش ۲۵ درصدی تعداد سلول های زنده در رده سلولی HepG2 کبد پس از تیمار ۷۲ ساعته بوده و هم چنین غلظت های بالاتر از کروسین قادر به کاهش میزان VEGF در این سلول ها می‌شود (۳۵). نتایج

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-06-11]

[DOI: 10.18502/ssu.v26i10.474]

مطالعه حاضر نشان‌دهنده این است که سلول های MCF-7 به مقادیر کمتر از کروسین حساسیت نشان داده اند اما در مورد تغییرات الگوی بیان ژن *VEGF* پس از ۱۲ ساعت در سلول های MCF-7، مطالعه مشابهی یافت نشد. هم چنین Chen و همکاران در سال ۲۰۱۵ اثر کروسین بر القای آپوپتوز و بر میزان بیان ژن *P53* را مورد مطالعه قرار دادند و نتیجه گرفتند که کروسین باعث افزایش سلول های آپوپتیک در یک الگوی وابسته به غلظت می شود که با نتایج مطالعه اخیر هم خوانی داشت (۳۶). تعدادی از مطالعات نشان می‌دهد که کروسین در رده های سلولی منحصری از جمله سرطان کبد و مالتیپل میلومای انسانی باعث کاهش بیان ژن *VEGF* ضمن اثرگذاری بر مسیر های سیگنالینگ (STAT3) می‌باشد که در مطالعه حاضر نیز کاهش بیان ژن *VEGF* در رده سلول‌های سرطانی پستان انسان MCF-7 مشاهده شد (۳۷). بررسی میزان آپوپتوز القاء شده توسط کروسین با روش های دیگری از جمله TUNEL Assay و همین طور اندازه گیری میزان فعالیت آنزیمی کاسپاز ۳ جهت تشخیص وابستگی این مسیر مرگ سلولی به آبشار کاسپازی، می تواند به تأیید نتایج مطالعه فعلی کمک کند.

نتیجه گیری

نتایج حاصله نشان می‌دهد که کروسین می‌تواند بیان ژن *VEGF* دریک الگوی وابسته به زمان در رده سلولی MCF-7 سرطان پستان کاهش دهد و همین طور باعث القاء آپوپتوز گردد. پیشنهاد می‌گردد که مطالعات بیشتری برای بررسی دقیق‌تر درک مکانیسم‌های پیام‌رسانی سلولی وابسته به کروسین انجام شود تا بتواند راهکار مناسب برای تأیید کارایی و توسعه استفاده از کروسین به عنوان یک درمان موثر دارویی برای سرطان پستان باشد .

سپاسگزاری

از پرسنل مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی زاهدان و همین طور گروه شیمی دانشگاه علم و صنعت ایران به جهت مساعدت در انجام این پروژه قدردانی به عمل می آید. این پژوهش حاصل از پایان نامه دانشگاه علم و صنعت ایران بوده و با هزینه شخصی انجام شده است.

تعارض در منافع: وجود ندارد.

References:

*1-*Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. ***Global cancer statistics***. CA Cancer J Clin 2011; 61(2): 69-90.

*2-*Salehzadeh M, Norouzian P, Abbasalipourkabir R. ***The use of nanoparticles in diagnosis and treatment of breast cancer: A review.*** PSJ 2015;13(2):1-12.

*3-*Soltaninejad M. ***The Relationship Of Self-Differentiation And Cognitive Emotion Regulation With Quality Of Life In Women With Breast Cancer*** 2018 Iranian Quarterly J Breast Diseas 2018; 11(1): 58.

*4-*Sharma K, Sharma D, Gupta M, Seam R, MInhas S. ***Response to neoadjuvant chemotherapy in operable breast carcinoma and conversion of modified radical mastectomy to breast conservation surgery, long term results: an Indian perspective***. ISJ 2017; 4(7): 2330-5.

*5-*Robert NJ ,Diéras V, Glaspy J, Brufsky AM, Bondarenko I, Lipatov ON, et al. ***RIBBON-1: randomized, double-blind, placebo-controlled, phase III trial of chemotherapy with or without bevacizumab for first-line treatment of human epidermal growth factor receptor 2–negative,***

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-06-11]

[DOI: 10.18502/ssu.v26i10.474]

locally recurrent or metastatic breast cancer. J Clin Oncol 2011; 29(10): 1252-60.

6-Galluzzi L, Goubar A, Olaussen K, Vitale I, Senovilla L, Michels J, et al. Prognostic value of LIPC in non-small cell lung carcinoma. Cell Cycle 2013; 12(4): 647-54.

7-Baharara J, Ramezani T, Shahrokhabadi K, Nazemi M. ***Effects of Crocus sativus L. extract and vitamin D3 on in vitro osteogenesis of mecenchymal stem cells***. International J Cellular & Molecular Biotechnology 2014; 1:1-10.

8-Pitsikas N, Sakellaridis N. ***Crocus sativus L. Extracts Antagonize Memory Impairments In Different Behavioural Tasks In The Rat.*** Behav Brain Res 2006;173(1):112-5.

9-Nair S, Pannikar B, Panikkar K. ***Antitumour activity of saffron (Crocus sativus)*** .Cancer lett 1991; 57(2): 109-14.

10- Escribano J, Alonso GL, Coca-Prados M, Fernández JA. ***Crocin, safranal and picrocrocin from saffron (Crocus sativus L.) inhibit the growth of human cancer cells in vitro***. Cancer lett 1996; 100(1-2): 23-30.

11- Gismondi A, Serio M, Canuti L, Canini A. ***Biochemical, antioxidant and antineoplastic properties of Italian saffron (Crocus sativus L.).*** American J Plant Sci 2012; 3(11): 1573-80.

12- Lage M, Cantrell CL. ***Quantification of saffron (Crocus sativus L (metabolites crocins, picrocrocin and safranal for quality determination of the spice grown under different environmental Moroccan conditions***. Scientia Horticulturae 2009; 121(3): 366-73.

13- Chryssanthi DG, Lamari FN, Iatrou G, Pylara A, Karamanos NK, Cordopatis P. ***Inhibition of breast cancer cell proliferation by style constituents of different Crocus species***. Anticancer research. 2007 Jan 1;27(1A):357-62.

14- 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(2): 50-7.

15- Arzi L, Riazi G, Sadeghizadeh M, Hoshyar R, Jafarzadeh N. ***A Comparative Study on Anti-Invasion, Antimigration, and Antiadhesion Effects of the Bioactive Carotenoids of Saffron on 4T1 Breast Cancer Cells Through Their Effects on Wnt/β-Catenin Pathway Genes***. DNA Cell Biol 2018; 37(8): 697-707.

16- Egeblad M, Werb Z. ***New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression.*** Nature Rev Cancer 2002; 2(3): 161-74.

17- Mostafaie A, Motlagh HRM, Mansouri K. ***Angiogenesis and the Models to Study Angiogenesis.*** Yakhteh Med J 2010;11(4): 351-74. [Persian]

18- Wu Y, Hooper AT, Zhong Z, Witte L, Bohlen P, Rafii S, et al. ***The vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR1) supports growth and survival of human breast carcinoma.*** Int J Cancer 2006; 119(7): 1519-29.

19- Sfar S, Saad H, Mosbah F, Chouchane L. ***Combined effects of the angiogenic genes polymorphisms on prostate cancer susceptibility***

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-06-11]

[DOI: 10.18502/ssu.v26i10.474]

and aggressiveness. Molecular Biology Reports 2009; 36(1): 37-45.

20- Unemori EN, Ferrara N, Bauer EA, Amento EP. ***Vascular endothelial growth factor induces interstitial collagenase expression in human endothelial cells***. J Cell Physiol 1992; 153(3): 557-62.

21- Martínez A. ***A new family of angiogenic factors***. Cancer Letters 2006; 236(2): 157-63.

22- Key TJ, Verkasalo PK, Banks E. ***Epidemiology of breast cancer***. The lancet oncology. 2001 2(3):133-40.

23- Aggarwal BB, Surh YJ, Shishodia S. ***The molecular targets and therapeutic uses of curcumin in health and disease:*** Springer Science & Business Media; 2007.

24- Xiong Y, Wu X, Rao L. ***Tetrastigma hemsleyanum (Sanyeqing) root tuber extracts induces apoptosis in human cervical carcinoma HeLa cells***. J Ethnopharmacol 2015; 165: 46-53.

25- Cragg GM, Grothaus PG, Newman DJ. ***Impact of natural products on developing new anti-cancer agents.*** Chem Rev 2009; 109(7): 3012-43.

26- Hashemi M, Nouri Lang M, Entezari M, Nafisi S, Nowrouzi H. ***Evaluation of induced apoptosis of apigenin in 3 lines of human B cell lymphoma in vitro.*** Medical Science Journal of Islamic Azad Univesity-Tehran Med Branch 2009; 19(2): 87-92.

27- Hashemi M, Lang M, Entezari M, Nafisi S, Nowrouzi H. ***Evaluation of induced apoptosis of apigenin in 3 lines of human B cell lymphoma in vitro.*** Med Sci J Islamic Azad Uni 2009;19(2): 87-92.[Persian]

28- El-kharrag R, Amin A, Hisaindee S, Greish Y, Karam SM. ***Development of a Therapeutic Model of Early Liver Cancer Using Crocin-Coated***. Int J Oncol 2017; 50(1): 212-22.

29- Mousavi M, Baharara J. ***Effect of Crocus sativus L. on Expression of VEGF-A and VEGFR-2 Genes (Angiogenic Biomarkers) in MCF-7 Cell Line***. ZJRMS 2014; 16(12): 8-14.

30- Brown NS, Bicknell R. ***Hypoxia and oxidative stress in breast cancer Oxidative stress-its effects on the growth, metastatic potential and response to therapy of breast cancer***. Breast Cancer Res 2001; 3(5): 323-27.

31- Sun Y, Xu HJ, Zhao YX, Wang LZ, Sun LR, Wang Z, et al. ***Crocin exhibits antitumor effects on human leukemia HL-60 cells in vitro and in vivo***. Evidence-Based Complementary and Alternative Med 2013; 2013.

32- Lu P, Lin H, Gu Y, Li L, Guo H, Wang F, et al. ***Antitumor effects of crocin on human breast cancer cells.*** International J Clinical Experimental Med 2015; 8(11): 20316-22.

33- Vali F, Changizi V, Safa M. ***Synergistic apoptotic effect of crocin and paclitaxel or crocin and radiation on MCF-7 cells, a type of breast cancer cell line***. International J Breast Cancer 2015; 2015.

34- Amin A, Hamza AA, Bajbouj K, Ashraf SS, Daoud S. ***Saffron: a potential candidate for a novel anticancer drug against hepatocellular carcinoma.*** Hepatology 2011; 54(3): 857-67.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-06-11]

[DOI: 10.18502/ssu.v26i10.474]

35- El-Kharrag R, Amin A, Hisaindee S, Greish Y, Karam SM. ***Development of a therapeutic model of precancerous liver using crocin-coated magnetite nanoparticles***. Inter J Oncol 2017; 50(1): 212-22.

36- Chen S, Zhao S, Wang X, Zhang L, Jiang E, Gu Y, et al. ***Crocin inhibits cell proliferation and enhances cisplatin and pemetrexed chemosensitivity in lung cancer cells***. Transl Lung Cancer Res 2015; 4(6): 775-83.

37- Kim B, Park B. ***Saffron carotenoids inhibit STAT3 activation and promote apoptotic progression in IL-6-stimulated liver cancer cells***. Oncol Report 2018; 39(4): 1883-91

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-06-11]

[DOI: 10.18502/ssu.v26i10.474]

Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences
Vol 26| NO 10 | Jan 2019

Received: 14 Sep 2018
Accepted: 17 Nov 2018

Evaluation of *VEGF* gene expression levels and induction of apoptosis in crocin-treated MCF-7 breast cancer cells

Roya Saravani [1], Saman Sargazi [2], Mahboubeh Rabbani [3], Ramin Saravani [*4]

Original Article

Introdution: Targeting vascular endothelial growth factor (*VEGF*) is considered as a therapeutic goal in solid tumors; especially breast cancer. The use of drugs with natural compounds in the treatment of cancer is increasing because of exerting no adverse effects in normal cells. Crocin, as the main component of saffron, has been proved to have different biological activities on various types of malignancies. The aim of this study was to evaluate the effect of crocin on growth inhibition, induction of apoptosis and expression of *VEGF* in MCF-7 breast cancer cell line.

Methods: In this interventional study, MTT cytotoxic assay was performed to evaluate the cell death-inducing effects of crocin on MCF-7 cells growth at different concentrations ranging from 0 to 8 mg/mL for 24 to 48 hours. Annexin V/PI staining and realtime-PCR assay were used in order to determine the type of cell death and assess the changes in the expression pattern of *VEGF* gene, respectively. The nonparametric ANOVA test was applied for data analysis via SPSS software version 16 where *p*-value less than 0.05 were regarded statistically significant.

Results: Compared to untreated cells, crocin-treated MCF-7 cells demonstrated a significant decrease in growth at 24 and 48 hours in a dose- and time-dependent manner. Results of Flow-cytometry showed an increase in the percentage of apoptotic cells coincident with increased crocin concentration. Also, decreased expression of the *VEGF* in a time-dependent manner was observed $p<0.05$).

Conclusion: The results indicated that crocin induces marked apoptosis in a time-dependent manner while reducing the expression of *VEGF* in MCF-7 cells. More studies are required to confirm the efficacy of crocin as an anti-tumor agent for cancer therapies.

Keywords: Breast cancer; Crocin; vascular endothelial growth factor; apoptosis.

Citation: Saravani R, Sargazi S, Rabbani M, Saravani R. **Evaluation of VEGF gene expression levels and induction of apoptosis in crocin-treated MCF-7 breast cancer cells.** J Shahid Sadoughi Uni9 Med Sci 2019; 26(10): 845-56

[1]Master of Science in Chemistry, Nano science; Department of Chemistry, Iran of Science and Technology; Tehran, Iran.

[2]Ph.D. Candidate of Clinical Biochemistry, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran.

[3]Assistant Professor, Department of Chemistry, Iran of Science and Technology; Tehran, Iran.

[4] Associate Professor, Cellular and molecule Research Center; Department of Clinical Biochemistry, School of medicine, Zahedan University of Medical Sciences, Zahedan, Iran.

***Corresponding author: Tel:** +989155432609, **Email:** saravaniramin@yahoo.com

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-06-11]

[DOI: 10.18502/ssu.v26i10.474]