DOI: 10.22122/jims.v37i537.12190 Published by Vesnu Publications

مجله دانشکده پزشکی اصفهان سال سی و هفتم/شماره‌ی ۵۳۷/هفته‌ی اول مهر ۱۳۹۸

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۵/۴ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۶/۲۸ تاریخ چاپ: ۱۳۹۸/۷/۱

بررسی اثر کروسین بر بیان ژن اینترلوکین-۶ در رده‌ی سلولی گلیوبلاستومای انسانی

نوشین دلفان[۱]، حمید گله‌داری[۲]، علیرضا ملایری[۳]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: کروسین، ماده‌ی مؤثره‌ی زعفران از خانواده‌ی Iridaceae، گیاهی علفی است که در طب قدیم ایران بر اثرات ضد التهابی و ضد توموری آن تأکید شده است. گلیوبلاستوما، از بدخیم‌ترین سرطان‌های مقاوم به پرتودرمانی و شیمی‌درمانی در بزرگسالان می‌باشد. ارتباط بین سطوح بالای اینترلوکین-۶ و افزایش توان حمله و گسترش گلیوبلاستوما در مطالعات مختلف ثابت شده است. هدف از انجام این مطالعه، بررسی اثر ماده‌ی مؤثره‌ی زعفران، کروسین، بر بیان اینترلوکین-۶ در رده‌ی سلولی گلیوبلاستومای انسانی بود.

روش‌ها: رده‌ی سلولی گلیوبلاستومای انسانی، از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران خریداری و با غلظت‌های مختلف کروسین به مدت ۲۴ ساعت تیمار و تأثیر آن بر میزان بقای سلولی با استفاده از آزمایش MTT ارزیابی شد و Half maximal inhibitory concentration (IC50) محاسبه گردید. سلول‌های کشت شده، با غلظت‌های ۵، ۱۰ و ۱۵ میلی‌مولار کروسین تیمار شدند. RNA استخراج و Complementary DNA (cDNA) ساخته شد و برای سنجش میزان بیان اینترلوکین-۶ به روش Real-time polymerase chain reaction (Real-time PCR) مورد استفاده قرار گرفت.

یافته‌ها: میزان IC50 کروسین معادل ۵۳/۳ میلی‌مولار به دست آمد و غلظت‌های ۵، ۱۰ و ۱۵ میلی‌مولار کروسین، به صورت معنی‌دار و وابسته به دز، سبب کاهش بیان اینترلوکین-۶ شد ($P < ۰/۰۵۰$).

نتیجه‌گیری: نتایج حاصل از این آزمایش، حاکی از اثر ضد التهابی و ضد توموری کروسین از طریق کاهش بیان اینترلوکین-۶ در محیط التهابی سلول‌های توموری گلیوبلاستوما می‌باشد. از این رو، کروسین می‌تواند به عنوان ماده‌ای سودمند در مطالعه‌ی سرطان گلیوبلاستوما مورد توجه قرار گیرد.

واژگان کلیدی: گلیوبلاستوما، اینترلوکین-۶، کروسین

ارجاع: دلفان نوشین، گله‌داری حمید، ملایری علیرضا. **بررسی اثر کروسین بر بیان ژن اینترلوکین-۶ در رده‌ی سلولی گلیوبلاستومای انسانی.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۸؛ ۳۷ (۵۳۷): ۹۰۹-۹۰۳

مقدمه

گلیوما، شایع‌ترین و بدخیم‌ترین تومور آستروسیتوما است که سیستم عصبی مرکزی یعنی نخاع یا مغز را درگیر می‌کند. گلیوبلاستومای چند شکلی، یکی از کشنده‌ترین سرطان‌های انسانی است که میزان زنده ماندن بیمار، دو سال پس از تشخیص بیماری می‌باشد. این سرطان، با ناهمگونی قابل توجه سلولی، تهاجم گسترده به بافت مغز، رشد لجام گسیخته و عود اجتناب‌ناپذیر مشخص می‌شود. گلیوبلاستوما، با وجود به کارگیری درمان‌هایی نظیر جراحی، پرتودرمانی و شیمی‌درمانی، به طور تقریبی غیر قابل درمان است (۱).

منشأ گلیوبلاستوما، از سلول‌های آستروسیت است و ۲۰ درصد کل تومورهای داخل جمجمه‌ای و ۶۰ درصد تومورهای آستروسیتی را به خود اختصاص می‌دهد (۲). پژوهش‌های اخیر، عامل اصلی رخداد و پیشرفت بسیاری از بیماری‌های عصبی را ناکارآمدی ساز و کارهای تنظیم و کنترل پاسخ‌های التهابی در مغز می‌دانند (۳).

التهاب عصبی، می‌تواند ناشی از آسیب به خود بافت مغزی باشد و یا توسط التهاب محیطی القا شود. این فرایند، با فعال شدن میکروگلیاها، تحریک آستروسیت‌ها، آسیب به سد خونی- مغزی و افزایش در نفوذپذیری آن، ورود سلول‌های ایمنی محیطی به بافت

۱- دانشجو، گروه ژنتیک، دانشکده‌ی علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

۲- استاد، گروه ژنتیک، دانشکده‌ی علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

۳- استادیار، گروه فارماکولوژی، دانشکده‌ی داروسازی و مرکز تحقیقات گیاهان دارویی خلیج فارس، دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور اهواز، اهواز، ایران

نویسنده‌ی مسؤول: نوشین دلفان

Email: noshindelfan@yahoo.com

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 Unported License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

مغزی، تولید بیش از حد سیتوکاین‌ها، نیتریک اکساید، گونه‌های فعال اکسیژن و همچنین، پروستاگلاندین‌ها و در نهایت، با آسیب و مرگ نورون‌ها مشخص می‌شود (٤). اینترلوکین‌ها، نقش مهمی در بیماری‌های التهابی و سرطان ایفا می‌کنند و سبب القای پاسخ‌های پیش تومورژنیک در گلیوبلاستوما می‌شوند (٥).

در بافت توموری گلیوبلاستوما، سطوح بالایی از اینترلوکین‌های التهابی شامل اینترلوکین-٦ (IL-6) مشاهده شده است و مطالعات، حاکی از ارتباط بین سطوح بالای اینترلوکین-٦ و افزایش توان حمله و گسترش گلیوبلاستوما می‌باشد. بر همین اساس، پژوهش‌های متعددی بر روی کاهش عملکرد اینترلوکین-٦ در جهت کمک به درمان گلیوبلاستوما تمرکز کرده‌اند (٦). اینترلوکین-٦، در پاسخ به تحریکات و عوامل خارجی و یا داخلی همچون جهش‌های آنکوژنی در سلول‌های بدخیم تولید می‌شود. مطالعات نشان دادند که موش‌های ترانسژنی که در آستروسیت‌های خود دارای نقص در عملکرد اینترلوکین-٦ بودند، با وجود داشتن توانایی بیان آنکوژن SRC، نمی‌توانستند تومورهای گلیوبلاستوما را ایجاد نمایند (٧).

انتقال پیام اینترلوکین-٦ با اتصال اینترلوکین-٦ به کمپلکس گیرنده‌های هترومری شامل گیرنده‌ی اینترلوکین-٦ و گیرنده‌ی انتقال پیام عمومی گلیکوپروتئین ١٣٠ انجام می‌شود. هر دو گیرنده، در بافت‌های گلیوبلاستوما و سلول‌های استمی مشتق شده از گلیوبلاستوما در سطوح بالایی بیان می‌شوند که خود شاهدی بر نقش اینترلوکین-٦ در عملکرد سلول‌های توموری است (٨). اتصال اینترلوکین-٦ و اینترلوکین-٨ به کمپلکس IL-6/gp130 و G-protein-coupled receptor (GPCR)ها، سبب فسفریله و فعال شدن Janus kinase 2 (JAK2) می‌شود و از این رو، منجر به فعال‌سازی سریع عامل رونویسی Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) می‌شود. بیماران مبتلا به گلوبلاستومای پیشرفته، مقادیر بالاتری از STAT3 فعال نسبت به مبتلایان به درجات پایین‌تر تومورهای مغزی نشان دادند (٨، ٢). فعال شدن STAT3 به واسطه‌ی اینترلوکین-٦، سبب پیشبرد حمله و مهاجرت در سلول‌های گلیوبلاستومای U251، T98G و U87MG می‌شود و با افزایش بیان و ترشح Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) همراه است (٩). همچنین، اینترلوکین-٦ آزاد شده از سلول‌های مجاور در میکروگلیاها، به شدت سبب تحریک حمله‌ی سلول‌های گلیوبلاستوما می‌شود (١٠).

IL-1b، IL-6 و IL-8، نقش شاخصی در کارسینوژنز از طریق مکانیسم‌های تزاید، مهاجرت و تهاجمی شدن بازی می‌کنند. همچنین، این اینترلوکین‌ها فعال کننده‌های بالقوه‌ی مسیرهای پیام‌رسانی هستند که تنظیم کننده‌ی بقای سلولی می‌باشند و سبب افزایش مقاومت به شیمی‌درمانی می‌شوند (٢).

از آن جایی که گلیوبلاستوماها تومورهایی هستند که به لحاظ ریخت‌شناسی، فنوتیپ و ویژگی‌های ژنتیکی بسیار ناهمگونند و مرزهای بین بافت توموری و بافت سالم مجاور در این تومورها نامشخص است، برداشت کامل تومور غیر ممکن می‌باشد. از این رو، مقاومت بالای این تومورها به درمان‌های رایج، سبب نیاز به دستیابی به راه‌های جدید در کنار درمان‌های متداول گلیوبلاستوما شده است که می‌تواند راه‌گشایی در جهت بهبود وضعیت این بیماران باشد.

در سال‌های اخیر، طب سنتی و پتانسیل بالای آن در درمان بیماری‌ها به خصوص سرطان، توجه زیادی را به خود معطوف کرده‌است. از جمله محصولات گیاهی رایج و در دسترس با اثرات ضد توموری اثبات شده در برخی از سرطان‌ها، کروسین است که از ماده‌ی مؤثره‌ی زعفران به دست می‌آید.

گیاه زعفران، با نام علمی L. sativus Crocus از خانواده‌ی Iridaceae گیاهی علفی، بدون ساقه و پایا است. زعفران، کلاله‌های خشک شده‌ی گل گیاه زعفران است که اثرات فارماکولوژیک متعددی دارد (١١). زعفران، گران‌ترین ادویه‌ی سنتی و گیاه آن گران‌ترین گیاه کشت شده در جهان است. گیاه زعفران، جزء خانواده‌ی زنبقیان است. زعفران خشک شده، سال‌ها به عنوان چاشنی غذایی مورد استفاده قرار گرفته است (١٢). ریشه‌ی کلمه انگلیسی زعفران از کلمه‌ی فرانسوی Safran است که خود از کلمه‌ی لاتین Safranum گرفته شده است (١٣).

ارزش درمانی کلاله‌ی خشک شده‌ی زعفران به علت وجود سه متابولیت ثانویه‌ی اصلی به نام‌های کروسین محلول در آب (مونوگلوکوزیل یا دی‌گلوکوزیل پلی‌اناسترها) و مشتقات آن که مسؤول رنگ قرمز زعفران هستند، پیکروکروسین (مونوترپن گلیکوزید پیش‌ساز سافرانال و محصول تجزیه‌ی زئازانتین) که مسؤول طعم تلخ زعفران است و سافرانال که مسؤول عطر و بوی زعفران است، می‌باشد (١٤). تاکنون اثرات درمانی زیادی از زعفران در مطالعات دیده شده است که عمده‌ی این اثرات مفید را به خواص آنتی‌اکسیدانی و ضد التهابی عصاره‌ی زعفران و اجزای فعال تشکیل دهنده‌ی آن نسبت می‌دهند (١٥).

با وجود این که مطالعات بسیاری اثرات زعفران و اجزای فعال آن را در پیش‌گیری و درمان سرطان بررسی کرده‌اند، اما همچنان مکانیسم دقیقی برای این اثرات تعیین نشده است. در مجموع، کروسین زعفران را عمده‌ترین ترکیب ضد سرطانی آن می‌دانند. به نظر می‌رسد کروسین این اثر را به واسطه‌ی تغییراتی در سطح ژن و القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی اعمال می‌کند (١٦). در این پژوهش، به منظور بررسی خواص ضدالتهابی و ضدتوموری، اثر

کروسین بر بیان ژن اینترلوکین-۶ در سلول‌های گلیوبلاستومای انسانی مورد بررسی قرار گرفت.

روش‌ها

رده‌ی سلولی گلیوبلاستومای انسانی 1321N1، از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران خریداری و در محیط کشت Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) دارای Fetal bovine serum (FBS) ۱۰ درصد (Gibco, UK)، ۱۰۰ واحد/میلی‌لیتر پنی‌سیلین و استرپتومایسین (Gibco, UK) در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد، رطوبت ۹۵ درصد و CO_2 ۵ درصد در فلاسک کشت داده شد.

در مرحله‌ی بعد، جهت بررسی اثرات سیتوتوکسیک کروسین بر سلول‌های 1321N1 و محاسبه‌ی Half maximal inhibitory concentration (IC50)، آزمون 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) به صورت ۳ بار تکرار انجام شد (۱۷)؛ بدین ترتیب که در هر خانه از پلیت ۹۶ خانه‌ای، ۷۰۰۰ سلول کاشته شد و پس از ۲۴ ساعت و کسب اطمینان از چسبیدن سلول‌ها به کف چاهک‌ها، محیط سلول‌ها با ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت دارای غلظت‌های ۸۰-۰ میلی‌مولار کروسین تعویض شد و ۲۴ ساعت پس از تیمار ۲۰ میکرولیتر MTT حل شده در Phosphate buffered saline (PBS) با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم/میلی‌لیتر به هر چاهک اضافه شد و پس از ۴ ساعت انکوبه شدن در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد، رطوبت ۹۵ درصد و CO_2 ۵ درصد، به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر Dimethyl sulfoxide (DMSO) اضافه گردید. در نهایت، جذب ۵۷۰ نانومتر با طول موج رفرنس ۶۳۰ نانومتر توسط دستگاه خوانش میکروپلیت BIO-INTELLECTICA خوانده شد و IC50 با استفاده از نرم‌افزار Excel برابر با ۵۳/۳ میلی‌مولار محاسبه گردید. سپس، سلول‌های گلیوبلاستوما در پلیت‌های ۶ خانه‌ای کشت داده شد و با غلظت‌های ۵، ۱۰ و ۱۵ میلی‌مولار کروسین به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد.

RNA سلولی توسط RNeasy Mini Kit دارای شماره‌ی کاتالوگ Cat No./ID: 74104 (ساخت شرکت Qiagen)، استخراج شد. ۵۰۰ نانوگرم از RNA استخراج شده از هر نمونه، توسط کیت PrimeScript 1st strand cDNA Synthesis ساخت شرکت Takara به Complementary DNA (cDNA) تبدیل شد.

پرایمرهای نوکلئوتیدی جهت انجام واکنش Real-time polymerase chain reaction (Real-time PCR) برای ژن‌های بتا-اکتین به عنوان شاهد داخلی و اینترلوکین-۶ توسط نرم‌افزار اولیگو۷ طراحی و در نرم‌افزار Primer Blast، از اختصاصی بودن پرایمر اطمینان حاصل شد (جدول ۱). Real-time PCR با استفاده از ۷/۵ میکرولیتر SYBR Green PCR Master Mix (ساخت شرکت Takara)، ۱۰ پیکومول از پرایمرهای Forward و Reverse و ۱۰۰ نانوگرم/میکرولیتر از cDNA سنتز شده در مرحله‌ی پیشین برای هر واکنش در حجم نهایی ۱۵ میکرولیتر در شرایط ارایه شده توسط شرکت سازنده انجام شد. واکاوی داده‌های Real-time PCR به روش CTΔΔ انجام شد. تمام نمونه‌ها، به سطوح کنترل داخلی بتا-اکتین نرمالیزه شدند. تمام اندازه‌گیری‌ها به صورت سه بار تکرار انجام شد. اختلاف آماری با استفاده از نرم‌افزار GraphPad Prism 8.0 و آزمون One-way ANOVA (Parametric) محاسبه و $P < ۰/۰۵۰$ به عنوان سطح معنی‌داری تفاوت‌ها در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

اثر کشندگی غلظت‌های ۸۰-۰ میلی‌مولار کروسین بر روی سلول‌های 1321N1 توسط آزمون MTT بررسی شد. همان‌طور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود، میزان بقای سلول‌ها با افزایش غلظت کروسین کاهش یافت؛ به طوری که در غلظت ۵۳/۳ میلی‌مولار، ۵۰ درصد سلول‌ها توانایی زیستی خود را از دست دادند و در غلظت ۶۰ میلی‌مولار میزان زیست پذیری سلولی به ۳۳ درصد کاهش یافت و در غلظت ۸۰ میلی‌مولار به نزدیک صفر رسید.

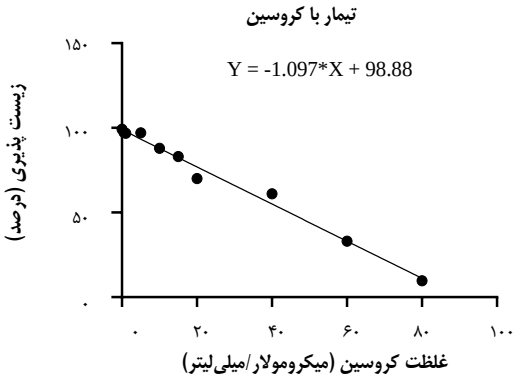
جدول ۱. مشخصات پرایمرهای به کار رفته در Real-time polymerase chain reaction (Real-time PCR)

پرایمر	طول محصول (جفت‌باز)	%GC	دمای ذوب (درجه‌ی سانتی‌گراد)	طول (جفت‌باز)	توالی
بتا-اکتین F	۱۰۳	۳۸/۵۲	۶۰/۵۵	۲۱	5′-GA GCA TCCCCCA AA GTTCA CA-3′
بتا-اکتین R		۳۸/۵۲	۶۰/۵۴	۲۱	5′-GGGA CTT CCTGTAA CA A CGCA-3′
اینترلوکین F6	۱۴۲	۳۸/۵۲	۶۰/۶۰	۲۱	5′-GTGTGA AA GCA GCAA GA GGC-3′
اینترلوکین R6		۴۴	۶۰/۹۲	۲۱	5′-TA CCTCA AA CT CCA AAAAGA CCAGT-3′

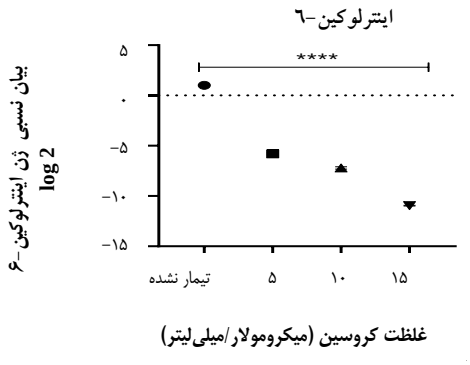
جدول ۲. واکاوی داده‌های ژن اینترلوکین-٦ در نمونه‌های تیمار شده با کروسین

نمونه‌ها	بتا-اکتین Ct	اینترلوکین-٦	ΔCt	ΔΔCt	2^-ΔΔCt	-ΔΔCt
شاهد	۱۰/۶۵۲۲۷۶	۲۰/۱۲۹۱۵۴	۹/۴۷۶۸۷۸	۰	۱	۰
کروسین ۵ میکرومولار/میلی‌لیتر	۱۲/۵۰۲۲۴	۲۷/۸۰۴۳۲۵	۱۵/۳۰۲۰۸۵	۵/۸۲۵۲۰۷	۰/۰۱۷۶۳۷۵	-۵/۸۲۵۲۰۷
کروسین ۱۰ میکرومولار/میلی‌لیتر	۱۱/۰۵۳۶۸۴	۲۷/۸۶۲۹۹	۱۶/۸۰۹۳۰۶	۷/۳۳۲۴۲۸	۰۰/۰۰۶۲۰۴۷	-۷/۳۳۲۴۲۸
کروسین ۱۵ میکرومولار/میلی‌لیتر	۱۱/۶۱۱۳۸۴	۳۲/۰۴۸۲۱۸	۲۰/۴۳۶۸۳۴	۱۰/۹۵۹۹۵۶	۰/۰۰۰۵۰۲	-۱۰/۵۶۹۹۹۵

داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار سه بار تکرار گزارش شده‌اند..



شکل ۱. اثر کروسین بر زیست پذیری سلول‌های گلیوبلاستومای انسانی



شکل ۲. مقایسه‌ی میانگین بیان ژن اینترلوکین-٦ در سلول‌های گلیوبلاستومای تیمار شده با کروسین (****P < ۰/۰۰۱)

پس از تیمار سلول‌ها با غلظت‌های ۵، ۱۰ و ۱۵ میلی‌مولار کروسین به مدت ٢٤ ساعت، RNA استخراج شد و در بررسی اسپکتروفتومتری، نسبت جذب ٢٦٠/٢٨٠ آن بین ٢-١/٨ به دست آمد که نشان دهنده‌ی خلوص RNA و عدم آلودگی آن با پروتئین می‌باشد. پس از سنتز cDNA و سنجش بیان اینترلوکین-٦ در مقابل بتا-اکتین، داده‌های حاصل از Real-time PCR به روش ΔΔCt با استفاده از نرم‌افزار Excel واکاوی شد (جدول ۲) و نمودار میانگین بیان اینترلوکین-٦ در نمونه‌های تیمار شده در مقایسه با نمونه‌ی شاهد رسم شد (شکل ۲). آزمون One-way ANOVA پارامتریک با استفاده از نرم‌افزار GraphPad Prism 8.0 نشان داد که میانگین بیان ژن اینترلوکین-٦ در رده‌ی سلولی 1321N1 تیمار شده با کروسین نسبت به نمونه‌ی شاهد در حالت وابسته به دز کاهش معنی‌داری یافته است و بیشترین کاهش مربوط به غلظت ۱۵ میکرومولار می‌باشد (P < ۰/۰۰۱) (جدول ۳).

بحث

با وجود پیشرفت‌های گسترده در حیطه‌ی پزشکی و درمان، سرطان همچنان دومین علت مرگ و میر به حساب می‌آید. از این رو، همواره نیاز به یافتن راه‌های درمانی جدید و داروهایی با اثرات جانبی حداقل در کنار روش‌های درمانی موجود احساس می‌شود (۱۸). از طرفی، گیاهان دارویی به دلیل اثرات جانبی کم و در دسترس بودن، توجه زیادی را به خود معطوف کرده‌اند و تحقیقات روزافزونی در زمینه‌ی اثرات درمانی آن‌ها انجام شده است. در مطالعه‌ی اخیر، تأثیر ماده‌ی مؤثره‌ی زعفران، کروسین، بر سلول‌های سرطان گلیوبلاستوما مورد بررسی قرارگرفت. در زمینه‌ی بررسی اثر سمیت سلولی کروسین بر سلول‌های توموری مختلف، مطالعاتی انجام شده است. محققین، اثر چهار ترکیب عمده‌ی زعفران (کروسین، کروستین، پیکروکروسین و سافرانال) را در سلول‌های HeLa کارسینومای گردن رحم بررسی کرده‌اند. در این بین، کروسین بهترین اثر را داشته است و ازاین رو، کروسین مهم‌ترین ترکیب ضد سرطان زعفران گزارش شد (۱۹).

جدول۳. بررسی سطح معناداری گروه‌ها نسبت به کنترل با استفاده از آزمون Uncorrected Fisher's LSD برای ژن IL-6

جدول ANOVA	SS	df	MS	F (DFn, DFd)	مقدار P	R square
اینترلوکین ۶	۲۲۴/۵	۳	۷۴/۸۴	F (۱/۶۰۴ ،۳/۲۰۸) = ۱۰۶۸۶	P < ۰/۰۰۱	۰/۹۹۹۸

اثرات درمان طولانی مدت با کروسین، بر رشد تومور و طول عمر موش‌های صحرایی دارای تومور کولورکتال القا شده با تزریق زیر پوستی سلول‌های آدنوکارسینوما، بررسی شده است. درمان با کروسین، به طور معنی‌داری بقای این موش‌ها را افزایش داد و میزان رشد تومور را به خصوص در جنس ماده کاهش داد. بنابراین، کروسین اثر سیتوتوکسیک قوی علیه سلول‌های آدنوکارسینومای k12/DHD و HT-29 دارد (۲۰).

در مطالعه‌ی دیگری، دیده شده است که کروسین به طور معنی‌داری رشد سه لایه از سلول‌های سرطان کولورکتال (HCT-116، SW-480 و HT-29) را مهار می‌کند و کاربرد درمانی دارد (۲۱).

بررسی‌ها نشان داد که فقدان و یا میزان پایین اینترلوکین-۶ در میکرومحیط توموری، سبب افزایش بازده‌ی ایمنی‌درمانی در سرطان‌ها می‌شود (۲۲). در خون و مایع مغزی- نخاعی بیماران مبتلا به گلیوبلاستوما در مقایسه با نمونه‌های شاهد، میزان بالاتری از اینترلوکین-۶ مشاهده می‌شود و این میزان، با افزایش درجه‌ی بدخیمی تومور، افزایش می‌یابد. همچنین، مشاهده شد که با افزودن اینترلوکین-۶ به رده‌های سلولی گلیوبلاستوما، میزان حمله‌ی سلول‌های توموری افزایش می‌یابد (۸).

در مطالعه‌ی دیگری نشان داده شد که غیر فعال کردن اینترلوکین-۶ یا گیرنده‌ی اینترلوکین-۶ توسط RNAهای کوتاه سنجاق سری در سلول‌های بنیادی رده‌ی سلولی گلیوبلاستوما، سبب کاهش تهاجم سلول‌ها و افزایش آپوپتوز می‌شود که این اتفاقات، از طریق کاهش عملکرد عامل پایین دست اینترلوکین-۶ یعنی STAT3 واسطه‌گری می‌شوند (۷). بر همین اساس، می‌توان میزان بیان بالای اینترلوکین-۶ را عامل کلیدی در تهاجم و بدخیمی گلیوبلاستوما دانست و کاهش بیان و عملکرد اینترلوکین-۶ را به عنوان یک رویکرد درمانی در سرطان گلیوبلاستوما مطرح نمود و در حال حاضر، تلاش برای یافتن داروهای مسدود کننده‌ی مسیرهای پایین دست اینترلوکین-۶ جهت کمک به درمان سرطان بسیار رایج است.

نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان داد که هر سه غلظت کروسین به طور معنی‌داری ($P < ۰/۰۵۰$) توانایی کاهش بیان اینترلوکین-۶ را نسبت به گروه شاهد داشته است. در غلظت ۵ میلی‌مولار، بیان اینترلوکین-۶ به میزان ۹۸/۲ درصد نسبت به نمونه‌ی شاهد کاهش معنی‌دار نشان داد. در غلظت‌های ۱۰ و ۱۵ میلی‌مولار، کاهش بیان اینترلوکین-۶ نسبت به نمونه‌ی شاهد بیش از ۹۹ درصد مشاهده شد و معنی‌دار بود.

بر طبق نتایج به دست آمده از این پژوهش و همگام با نتایج به دست آمده از مطالعات پیشین، تیمار رده‌ی سلولی گلیوبلاستومای انسانی با کروسین سبب کاهش بیان معنی‌دار اینترلوکین-۶ می‌شود. از این رو، می‌توان آن را به عنوان کاندیدایی جهت ساخت داروهای جدید در زمینه‌ی درمان گلیوبلاستوما دانست و به طور کلی، می‌توان در زمینه‌ی درمان سرطان‌هایی که با افزایش بیان اینترلوکین-۶ و مسیرهای پایین دست آن همراه هستند، استفاده از ترکیبات کروسین را به عنوان یکی از اهداف کمک درمانی در کنار داروهای کنونی مطرح نمود.

تشکر و قدردانی

این مقاله، برگرفته از پایان‌نامه‌ی مصوب دانشگاه شهید چمران اهواز به شماره‌ی ۹۳۱۸۹۰۱ می‌باشد که تحت حمایت مالی و در گروه ژنتیک این دانشگاه انجام شد. بدین وسیله از همکاران جهت تأمین مالی و همکاری در اجرای مطالعه سپاسگزاری می‌گردد.

References

1. Pourganji M, Hosseini M, Soukhtanloo M, Zabihi H, Hadjzadeh MA. Protective role of endogenous ovarian hormones against learning and memory impairments and brain tissues oxidative damage induced by lipopolysaccharide. Iran Red Crescent Med J 2014; 16(3): e13954.
2. Yeung YT, McDonald KL, Grewal T, Munoz L. Interleukins in glioblastoma pathophysiology: Implications for therapy. Br J Pharmacol 2013; 168(3): 591-606.
3. Saavedra JM. Angiotensin II AT(1) receptor blockers as treatments for inflammatory brain disorders. Clin Sci (Lond) 2012; 123(10): 567-90.
4. Bargi R, Salmani H, Asgharzadeh Yazdi F, Hosseini M. Inflammation and the brain disorders: A review. Shefaye Khatam 2017; 5(3): 68-82. [In Persian].
5. Snoussi K, Mahfoudh W, Bouaouina N, Ahmed SB, Helal AN, Chouchane L. Genetic variation in IL-8 associated with increased risk and poor prognosis of breast carcinoma. Hum Immunol 2006; 67(1-2): 13-21.
6. Shan Y, He X, Song W, Han D, Niu J, Wang J. Role of IL-6 in the invasiveness and prognosis of glioma. Int J Clin Exp Med 2015; 8(6): 9114-20.
7. Krohn K, Rao MS, Raman NV, Khalilullah M. High-performance thin layer chromatographic analysis of anti-inflammatory triterpenoids from Boswellia serrata Roxb. Phytochem Anal 2001; 12(6): 374-6.
8. Weissenberger J, Loeffler S, Kappeler A, Kopf M, Lukes A, Afanasieva TA, et al. IL-6 is required for glioma development in a mouse model. Oncogene 2004; 23(19): 3308-16.
9. Liu Q, Li G, Li R, Shen J, He Q, Deng L, et al. IL-6 promotion of glioblastoma cell invasion and angiogenesis in U251 and T98G cell lines. J

Neurooncol 2010; 100(2): 165-76.
10. Zhang J, Sarkar S, Cua R, Zhou Y, Hader W, Yong VW. A dialog between glioma and microglia that promotes tumor invasiveness through the CCL2/CCR2/interleukin-6 axis. Carcinogenesis 2012; 33(2): 312-9.
11. Liakopoulou-Kyriakides M, Kyriakidis DA. Croscus sativus-biological active constitutents.. Studies in Natural Products Chemistry Bioactive Natural Products 2002; 26, Part G: 293-312.
12. Gohari AR, Saeidnia S, Mahmoodabadi MK. An overview on saffron, phytochemicals, and medicinal properties. Pharmacogn Rev 2013; 7(13): 61-6.
13. Kamalipour M, Akhondzadeh S. Cardiovascular effects of saffron: An evidence-based review. J Tehran Heart Cent 2011; 6(2): 59-61.
14. Melnyk JP, Wang S, Marcone MF. Chemical and biological properties of the world's most expensive spice: Saffron. Food Res Int 2010; 43(8): 1981-9.
15. Assimopoulou AN, Sinakos Z, Papageorgiou VP. Radical scavenging activity of Crocus sativus L. extract and its bioactive constituents. Phytother Res 2005; 19(11): 997-1000.
16. Lee BM, Park KK. Beneficial and adverse effects of chemopreventive agents. Mutat Res 2003; 523-524: 265-78.
17. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods 1983; 65(1-2): 55-63.
18. Forouzandeh S, Naghsh N, Salimi S, Jahantigh D. Cytotoxic effect of Boswellia serrata hydroalcholic extract on human cervical carcinoma epithelial cell line. Med Lab J 2014; 8(1): 7-13. [In Persian].
19. Escribano J, Alonso GL, Coca-Prados M, Fernandez 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.
20. Garcia-Olmo DC, Riese HH, Escribano J, Ontanon J, Fernandez JA, Atienzar M, et al. Effects of long-term treatment of colon adenocarcinoma with crocin, a carotenoid from saffron (Crocus sativus L.): An experimental study in the rat. Nutr Cancer 1999; 35(2): 120-6.
21. Aung HH, Wang CZ, Ni M, Fishbein A, Mehendale SR, Xie JT, et al. Crocin from Crocus sativus possesses significant anti-proliferation effects on human colorectal cancer cells. Exp Oncol 2007; 29(3): 175-80.
22. Ohno Y, Toyoshima Y, Yurino H, Monma N, Xiang H, Sumida K, et al. Lack of interleukin-6 in the tumor microenvironment augments type-1 immunity and increases the efficacy of cancer immunotherapy. Cancer Sci 2017; 108(10): 1959-66.

DOI: *10.22122/jims.v37i537.12190* *Published by Vesnu Publications*

Journal of Isfahan Medical School **Vol. 37, No. 537, 1st Week, October 2019**

Received: 26.07.2019 Accepted: 19.09.2019 Published: 23.09.2019

The Effect of Crosin on Expression of Interleukin 6 in Human Glioblastoma Cell Line

Nooshin Delfan[1], Hamid Galehdari[2], Alireza Malayeri[3]

Original Article

Abstract

Background: Crosin is one of the most important ingredients of saffron (the Iridaceae family) that has been emphasized in Iranian traditional medicine for its anti-inflammatory and anti-tumor effects. Glioblastoma is one of the most malignant cancers resistant to radiation and chemotherapy in adults. The goal of the present study was to investigate the effect crosin on expression of interleukin 6 (IL-6) in human glioblastoma cell line.

Methods: Human glioblastoma cell line (1321N1) was purchased from Pasteur Institute of Iran. Cell was grown in Dulbico's modified essential media (DMEM) supplemented whit 10% fetal bovine serum (FBS). The half-maximal inhibitory concentration (IC_{50}) value of crosin was obtained using MTT assay. Glioblastoma cell line was treated by different concentration of crosin (5, 10, 15 mM/ml) for 24 hours. Then, total RNA was isolated from cells and used for cDNA synthesis. Expression level of IL-6 was assessed using real-time polymerase chain reaction (real-time PCR).

Findings: The IC_{50} value of crosin against 1321N1 cells after 24 hours were determined as 53.3 mMol/ml. Moreover, the expression of IL-6 gene was downregulated by increasing of crosin concentration compare to the control group ($P < 0.050$).

Conclusion: It was observed that crosin inhibited production of IL-6 in glioblastoma cells. In conclusion, the result suggested crosin as a potential therapeutic candidate for neuroinflammation in glioblastoma cancer.

Keywords: Glioblastoma, Interleukin-6, Crosin

Citation: Delfan N, Galehdari H, Malayeri A. **The Effect of Crosin on Expression of Interleukin 6 in Human Glioblastoma Cell Line.** J Isfahan Med Sch 2019; 37(537): 903-9.

1- Student, Department of Genetics, School of Sciences, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
2- Professor, Department of Genetics, School of Sciences, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
3- Assistant Professor, Department of Pharmacology, School of Pharmacy AND Medicinal Plant Research Center, Ahvaz Jundishapur University of Medical sciences, Ahvaz, Iran
Corresponding Author: Nooshin Delfan, Email: noshindelfan@yahoo.com