

تأثیر کروسین بر میزان بیان miRNA-15a در سلول های B ترانسفورم شده با ویروس اپشتاین بار

نویسندگان:

عبدالرضا ستوده جهرمی^۱، ملیحه مرادزاده^۲، محمد کارگر*^۳، فرشید کفیل زاده^۳، مرضیه جمالی دوست^۴

۱- دانشجوی دکتری، گروه میکروبیولوژی، واحد جهرم، دانشگاه آزاد اسلامی، جهرم، ایران

۲- مرکز تحقیقات روماتولوژی گلستان، بیمارستان صیاد شیرازی گلستان، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران

۳- استاد، گروه میکروبیولوژی، واحد جهرم، دانشگاه آزاد اسلامی، جهرم، ایران

۴- مرکز تحقیقات میکروب شناسی، بیمارستان نمازی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران

Pars Journal of Medical Sciences, Vol.18, No.3, Fall 2020

چکیده:

مقدمه: با وجود پیشرفت های چشمگیر در تشخیص و درمان، سرطان یکی از عوامل اصلی مرگ و میر در دنیا محسوب می شود. کروسین به عنوان کاروتنوئید اصلی موجود در زعفران، اثرات ضد توموری قوی در تومورهای پستان، لوزالمعده و معده از خود نشان داده است. با این حال، هنوز اثرات ضد لنفومای کروسین به ویژه در لنفوم های سلول B مشخص نیست. هدف از مطالعه حاضر، بررسی اثر سایتوتوکسیسیته کروسین روی سلول های B ترانسفورم شده با ویروس اپشتاین بار لنفوم بود.

روش کار: در این مطالعه، تأثیر کروسین بر رده سلولی CO 88BV59-1 LCL که نوعی لنفوم B آلوده به ویروس اپشتاین بار است مورد بررسی قرار گرفت. سلول ها به مدت سه روز با کروسین ۰/۲ تا ۲۰۰ میکرومولار تحت درمان قرار گرفتند. میزان زنده ماندن سلول و آپوپتوز به ترتیب با استفاده از روش MTT و فلوسیتومتری مورد بررسی قرار گرفتند. همچنین بیان miRNA-15a3p و miRNA-15a5p توسط Real-Time PCR تعیین شد.

یافته ها: کروسین به طور قابل توجهی تکثیر و آپوپتوز ناشی از سلول های آلوده به ویروس به روش وابسته به دوز و زمان را مهار کرد ($P < 0/05$). در سلول های تیمار شده با کروسین تغییر معناداری در میزان بیان miRNA-15a3p و miRNA-15a5p در مقایسه با سلول های تیمار نشده مشاهده نشد ($P > 0/05$).

نتیجه گیری: نتایج نشان داد که با توجه به تأثیر کروسین در کاهش زنده ماندن و افزایش آپوپتوز سلول های لنفومی و همچنین عدم تغییر در میزان بیان miRNA-15a می توان از آن به عنوان یک کاندید درمانی در درمان لنفوم سلول B مرتبط با ویروس اپشتاین بار در نظر گرفت.

واژگان کلیدی: آپوپتوزیس، لنفوم سلول B، کروسین

Pars J Med Sci 2020;18(3):21-31

مقدمه:

ویروس اپشتاین بار (EB) جزء خانواده هرپس گاما ویروس است که بیش از ۹۰ درصد افراد جامعه را آلوده کرده است [۲،۱]. این ویروس باعث تکثیر بی رویه سلول های B در بدن شده و به دنبال عفونت و ضعف سیستم ایمنی باعث بیماری لنفوپرولیفراتیو می شود. این ویروس با بدخیمی های سلول B از جمله لنفوم هوچکین، لنفوم بورکیت و بیماری لنفوپرولیفراتیو پس از پیوند (Post-Transplant PTLD) از

ویروس اپشتاین بار (EB) جزء خانواده هرپس گاما ویروس است که بیش از ۹۰ درصد افراد جامعه را آلوده کرده است [۲،۱]. این ویروس باعث تکثیر بی رویه سلول های B در بدن شده و به دنبال عفونت و ضعف سیستم ایمنی باعث بیماری لنفوپرولیفراتیو می شود. این ویروس با بدخیمی های سلول B از جمله لنفوم هوچکین، لنفوم بورکیت و بیماری لنفوپرولیفراتیو پس از پیوند (Post-Transplant PTLD) از

* نویسنده مسئول، نشانی: گروه میکروبیولوژی، واحد جهرم، دانشگاه آزاد اسلامی، جهرم، ایران.
تلفن تماس: ۰۹۱۷۳۱۴۹۲۰۳ - فکس: ۰۷۱۵۴۳۷۲۰۰۱
پست الکترونیک: microkargar@gmail.com

اصلاح: ۱۳۹۹/۸/۲۵ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۰/۱

دریافت: ۱۳۹۹/۸/۱۸

کلی، PTLD درمان مناسبی نداشته و از آن جایی که در پی تضعیف سیستم ایمنی در افراد دریافت کننده پیوند اعضا ایجاد می‌شود، تنها راه درمان آن کاهش تجویز داروهای سرکوب‌گر سیستم ایمنی خواهد بود که خود می‌تواند باعث دفع پیوند شود [۲۰].

ترکیبات مشتق شده از گیاهان از جمله کاروتنوئیدها نقش مهمی در درمان سرطان داشته و منبع ارزشمندی از عوامل ضدسرطان را فراهم می‌کنند. شواهد نشان می‌دهد که کروسین به عنوان یک کاروتنوئید جدا شده از گیاه زعفران، اثرات ضدسرطانی دارد [۲۱]. با توجه به نتایج پژوهش‌ها، کروسین دارای خاصیت بازدارندگی و ضدسرطانی در سرطان سلول‌های کبدی [۲۲]، سرطان سلول‌های سنگ فرشی سر و گردن [۲۳]، سلول‌های سرطان دهانه رحم [۲۴] و سلول‌های سرطانی روده بزرگ است [۲۵]. در حالی که هیچ اثر سیتوتوکسیسیته روی سلول‌های طبیعی ندارد [۲۶]. زعفران و ترکیبات فعال آن مانند کروسین باعث حفاظت سلول‌های اندوتلیال از آسیب‌هایی همچون اکسیداتیو استرس و آپوپتوز می‌شود [۲۴].

از آنجائی که تا کنون تأثیر کروسین موجود در زعفران روی لنفوم ایجاد شده ناشی از ویروس اپشتاین بار مورد بررسی قرار نگرفته است و با توجه به میزان بالای موارد درمانی مرتبط با پیوند اعضا در کشور و به تبع آن شیوع بالا و عدم درمان مناسب PTLD، این پژوهش با هدف بررسی اثر سیتوتوکسیسیته کروسین بر روی لنفوم سلول B آلوده به ویروس اپشتاین بار رده سلولی CO 88BV59-1 انجام شد. همچنین تغییرات بیانی miRNA-15a در پی این تیمار در این رده سلولی مورد بررسی قرار گرفت.

روش کار:

پژوهش تجربی- آزمایشگاهی حاضر روی لنفوسیت‌های B سرطانی آلوده به ویروس اپشتاین بار رده CO 88BV59-1 انجام شد. رده سلولی فوق با کد سلولی CRL-10624 از شرکت بانک سلولی ATCC خریداری و در محیط کشت RPMI 1640 که با ۱۰ درصد سرم گاوی (Fetal bovine serum, FBS) غنی شده و حاوی آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین، استرپتومایسین و آمفوتریپسین B بود در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد نگهداری شد. کروسین از شرکت سیگما و دیگر مواد لازم از جمله تریپسین (-Trypsin) (EDTA)، MTT، محیط کشت (RPMI 1640)، آنکسین (Annexin-V-FITC) و پروپیدیوم آیویدید (propidium iodide) (PI) از شرکت مرک و کیت استخراج (RNA extraction Kit) (TRIZOL reagent) و کیت RT-PCT از شرکت Roche و کیت ساخت cDNA از شرکت Fermentas خریداری شد. این پروژه

نوکلوتیدی غیر کدکننده هستند که بیان ژن را در مرحله پس از رونویسی تنظیم می‌کنند. نزدیک به یک سوم ژنوم بدن انسان توسط miRNA تنظیم می‌شود [۴]. به طور متوسط هر miRNA می‌تواند بیان ۳۰ درصد از ژنوم را تنظیم کند [۵].

با توجه به گستره‌ای از پروتئین‌هایی که بیان شان توسط miRNA تنظیم می‌شود، miRNA تقریباً در تنظیم همه فرآیندهای زیستی نقش ایفا می‌کند. در بسیاری از پژوهش‌ها، نقش miRNA در تکوین و شکل‌گیری اندام‌ها و دستگاه‌های بدن [۶]، حفظ حالت خودتکثیری در سلول‌های بنیادی و تنظیم تمایز آن‌ها به انواع سلول‌های دیگر [۷]، رشد، آپوپتوز [۸]، تنظیم و تکوین سیستم ایمنی [۹]، تومورزایی [۱۰] سرکوب تومور، متاستاز و مقاومت دارویی [۱۱] اثبات شده است. miRNA-15a که در جایگاه ژنی BCL2 قرار دارند، به عنوان تنظیم‌کننده‌های منفی پروتئین BCL2 عمل کرده و کاهش فعالیت و یا حذف شان می‌تواند منجر به لنفوم سلول B شود. بنابراین miRNA سرکوب‌گر تومور است [۱۲، ۱۳].

در بیشتر سلول‌های آلوده به ویروس اپشتاین بار، کاهش فعالیت و یا حذف miRNA-15a دیده می‌شود که در نتیجه آن فعالیت ژن BCL2 افزایش پیدا می‌کند. افزایش این ژن به نوبه خود باعث افزایش فعالیت و تکثیر بی‌رویه سلول‌های توموری [۱۴]، کاهش آپوپتوز و نامیرایی سلول می‌شود [۱۵].

بیماری PTLD به دلیل ورود ویروس اپشتاین بار از طریق دهنده پیوند EBV+ به گیرنده پیوند رخ می‌دهد. حتی ممکن است فرد گیرنده پیوند قبل از دریافت پیوند به این ویروس آلوده شده باشد و ویروس را به صورت نهفته در بدن خود داشته باشد و به دلیل فعال شدن ویروس در نتیجه تضعیف سیستم ایمنی، بیماری PTLD رخ دهد. با توجه به شیوع بالای ویروس اپشتاین بار در جامعه پیشگیری از PTLD در بیماران پیوندی مقدور نیست [۲].

از آن جایی که ویروس اپشتاین بار عضو خانواده ویروس‌های هرپس است، می‌توان از داروهای ضدویروسی همچون اسیکلوویر و گانسیکلوویر که برای درمان بقیه اعضای این خانواده استفاده می‌شود، برای درمان PTLD حاصل از این ویروس نیز استفاده کرد. اما مشخص شده است این داروها در درمان PTLD کارایی چندانی ندارند. همچنین داروهای شیمی درمانی همچون وینکریستین، سیکلوفسامید، دوکوروبیسین هیدروکلراید و پردنیزولون که برای درمان سایر لنفوم‌ها از جمله بورکیت، هوچکین و لنفوم سلول B بزرگ منتشره استفاده می‌شوند در درمان PTLD کارایی ندارند [۱۶]. از سوی دیگر، از ایمونوتراپی همچون ریتوکسی ماپ نیز در درمان PTLD استفاده می‌شود که روش درمانی بسیار پرهزینه بوده و در صورتی موثر است که به صورت ترکیبی با شیمی درمانی استفاده شود [۱۷-۱۹]. به طور

کیت RNase-free DNase تیمار شد. غلظت RNA به دست آمده در طول موج ۲۶۰ نانومتر به ۲۸۰ نانومتر با استفاده از دستگاه نانودراپ تعیین شد [۲۸]. از نمونه های که نسبت جذب نوری ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر بین ۱/۸ تا ۲/۲ داشتند، برای ساخت cDNA استفاده شد.

یک میکرولیتر از پرایمرهای (۲۵ میکرومولار) (نسخه برداری معکوس) عمومی miRNA (USTL universal step loop primer) [۲۹] (جدول ۱) و دو میکروگرم از RNA رقیق شده در آب دو بار تقطیر (RNase free) به حجم ۱۰ میکرولیتر رسانده شد. پس از ۱۰ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی گراد برای دناتوراسیون، فوراً روی یخ قرار داده شد. چهار میکرو لیتر از بافر RT⁺، چهار میکرو لیتر dNTPs mix، یک میکرو لیتر آنزیم ReverTra Ace (100 U/μL; TOYOBO, Osaka, Japan) و ۱۱ میکرو لیتر آب دو بار تقطیر (RNase free) به آن اضافه شد و در دمای ۴۲ درجه سانتی گراد به مدت یک ساعت انکوبه شد و سپس ۱۰ دقیقه در ۹۰ درجه سانتی گراد قرار داده شد. cDNA حاصل بعنوان یک cDNA کلی برای بررسی میزان بیان هر دو نوع miRNA-15a و به روش Real Time PCR مورد بررسی قرار گرفت. هر تیمار سلولی در هر کدام از مدت زمان تیمار (۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت) سه بار تکرار شد و برای هر تکرار سه بار آزمایش PCR انجام شد.

آزمایش Real-time PCR با استفاده از کیت Platinum SYBR Green qPCR Super Mix-UDG شرکت Invitrogen بر طبق دستورالعمل مربوطه انجام شد. به طور خلاصه، هر واکنش شامل یک میکرو لیتر cDNA، ۱/۵ میکرو لیتر پرایمر فوروارد (۱۰ میکرومولار)، ۱/۵ میکرو لیتر پرایمر معکوس (Universal Revers primer) (۱۰ میکرومولار) (جدول ۱)، ۲۵ میکرو لیتر SYBR mix و ۲۱ میکرو لیتر آب دو بار تقطیر بود. به منظور خارج کردن حباب های هوا از درون میکروتیوب ها، پلیت حاوی میکروتیوب ها به مدت یک دقیقه در دور $1000 \times g$ سانتریفیوژ شد. سپس پلیت مذکور برای بررسی واکنش Real-time PCR و تشخیص میزان فلورسنت در دستگاه (QIAGEN Rotor-Gene Q (QIAGEN, Hilden, Germany) قرار داده شد. برنامه دمایی دستگاه به صورت زیر تعیین شد:

مرحله اولیه فعال سازی PCR به مدت ۱۰ دقیقه و دمای ۹۵ درجه سانتی گراد که در آن آنزیم Hot Star Taq DNA پلی مرز فعال می شود. مرحله دوره ای شامل دناتوراسیون ۱۵ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد، آنیلینگ ۴۵ ثانیه در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد و طولیل شدن ۳۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد بود. این چرخه به تعداد ۴۰ بار تکرار شد [۲۸].

پژوهشی در کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی جهرم با کد IR.JUMS.REC.1399.026 به تصویب رسیده است.

تعیین میزان سلول های زنده به روش MTT

برای تعیین غلظت موثری از کروسین که باعث مرگ سلولی در نیمی از سلول ها (IC₅₀) می شود از روش MTT استفاده شد. ابتدا سلول های رده CO 88BV59-1 در محیط کشت RPMI 1640 که با FBS ده درصد غنی شده و حاوی آنتی بیوتیک پنی سیلین، استرپتومایسین، و آمفوتریپسین B بودند در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، رطوبت ۹۰ درصد و دی اکسید کربن ۵ درصد کشت داده شدند. پس از این که هم پوشانی سلول ها به حدود ۸۰ درصد رسید، سلول ها را با تریپسین جمع آوری و پس از شستشو، در پلیت های ۹۶ خانه ای با غلظت ۱۰۵ × ۳ کشت داده شدند. پس از ۲۴ ساعت، محیط کشت با محیط حاوی کروسین با غلظت های از ۰/۲ تا ۲۰۰ میکرومول جایگزین شد و سلول ها با کروسین تیمار شدند. محیط کشت سلول های گروه کنترل تنها حاوی دی متیل سولفاکساید (DMSO) بود. بعد از گذشت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از تیمار، سلول های گروه های آزمایش و کنترل با PBS شستشو و محلول MTT برای مدت ۴ ساعت به آن ها اضافه شد. پس از آن کریستال های رنگی ایجاد شده را با دی متیل سولفاکساید حل کرده و میزان رنگ ایجاد شده در طول موج ۵۷۰ نانومتر توسط دستگاه قرائت الیزا مورد بررسی قرار گرفت. هر آزمایش سه بار تکرار شد.

تعیین سلول های آپپتوتیک به روش فلوسیتومتری

برای تعیین میزان آپپتوز سلولی، سلول های رده CO 88BV59-1 در پلیت های ۲۴ خانه با غلظت ۱۰۵ × ۳ کشت داده شدند. پس از گذشت مدت زمان ۲۴ ساعت، محلول کشت با محلول حاوی کروسین متناسب با IC₅₀ زمان های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، به ترتیب ۱۶۵/۹، ۱۱۷/۷ و ۷۹/۲ میکرومولار جایگزین شد و در گروه کنترل نیز تنها دی متیل سولفاکساید وجود داشت. پس از گذشت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت از تیمار، تمام سلول ها با استفاده از تریپسین جمع آوری و با محلول PBS شستشو داده شدند و سپس با Annexin-V و PI رنگ آمیزی و سلول های آپپتوتیک با دستگاه فلوسیتومتری FACScanTM شمارش شدند.

تعیین میزان بیان mi-RNA با استفاده از روش Real-time RT-PCR

پس از گذشت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت از تیمار سلول ها، تمام RNA سلول ها به وسیله کیت RNeasy mini kit طبق پروتکل مربوطه استخراج و به منظور حذف DNA ژنومی، RNA به دست آمده با

توالی پرایمر های استفاده شده، در جدول ۱ مشخص شده است.

تحلیل آماری:

آزمون‌های مربوط به هر نمونه به صورت سه تایی انجام شد. داده‌ها به صورت $mean \pm SD$ نمایش داده شده است. تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ و با کمک آزمون واریانس یک طرفه انجام شد. در تمام آزمون‌ها سطح معناداری کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد. داده‌هایی که تفاوت آن‌ها از نظر آماری معنادار بوده است با علامت ستاره (*، **) مشخص شده است.

بیان نسبی mi-RNAها با استفاده فرمول $2^{-\Delta\Delta CT}$ به صورت زیر محاسبه شدند.

$$\Delta\Delta CT = (Ct(\text{experimental target gene}) - Ct(\text{experimental internal control})) - (Ct(\text{control target gene}) - Ct(\text{control internal control}))$$

در نهایت با روش سایبرگرین، Real-time RT-PCR انجام شد و میزان بیان نسبی mi-RNA مورد نظر تعیین شد. از ژن mi-RNA U6 به عنوان کنترل و از cDNA ساخته شده با USTL primer نیز برای بیان mi-RNA U6 استفاده شد.

جدول ۱: توالی آغازگر های مورد استفاده برای hsa-miR-15a [۲۸]

mi-RNA	سکانس	دما
USTL primer	5-GAAGGCGAGGAGCAGATCGAGGAAGAAGACGGAA GAATGTGCGTCTCGCCTTCTTTCNNNNNNNN-3	۹۰ درجه سانتی‌گراد
hsa-miR-15a-3p	5-CAGGCCAUUAUGUGCGCCUCA-3	
hsa-miR-15a-3P-F primer	5-ACACTCCAGCTGGGCAGGCCATATTGTGCTGCCTC-3	۶۰ درجه سانتی‌گراد
hsa-miR-15a-5p	5-UAGCAGCACAAUUGGUUUGUG-3	
hsa-miR-15a-5P-F primer	5-ACACTCCAGCTGGGTAGCAGCACATAATGGTTTGT-3	۶۰ درجه سانتی‌گراد
Universal Revers primer	5-TGGTGTCTGGAGTCG-3	۵۹/۸ درجه سانتی‌گراد
U6 internal control F primer	5-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3	۵۹/۱ درجه سانتی‌گراد
U6 internal control R primer	5-CTCGCTTCGGCAGCACA-3	۵۹/۱ درجه سانتی‌گراد

یافته‌ها:

بررسی میزان سلول‌های زنده با استفاده از MTT

آزمایش MTT با تیمار رده سلولی B آلوده به ویروس به صورت وابسته به زمان و دوز کروسین انجام گرفت و سلول‌های تیمار نشده به عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شدند. نتایج با کمک روش MTT در سه تکرار به این شکل بود. همچنان که در شکل نیز نشان داده شده است، کروسین به صورت وابسته به دوز و وابسته به زمان میزان زنده مانی رده سلولی را کاهش داد. نتایج نشان داد که با افزایش غلظت کروسین درصد بقای سلولی کاهش می‌یابد به طوری که کمترین بقای سلولی در غلظت ۲۰۰ میکرومولار و در زمان ۷۲ ساعت مشاهده شد ($P < 0/001$) (شکل ۱). همچنین میزان IC50 در زمان‌های مختلف انکوباسیون در شکل ۱ نشان داده است. میانگین غلظت IC50 کروسین در مدت زمان ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به ترتیب ۱۶۵/۹، ۱۱۷/۷ و ۷۹/۲ میکرومولار بود.

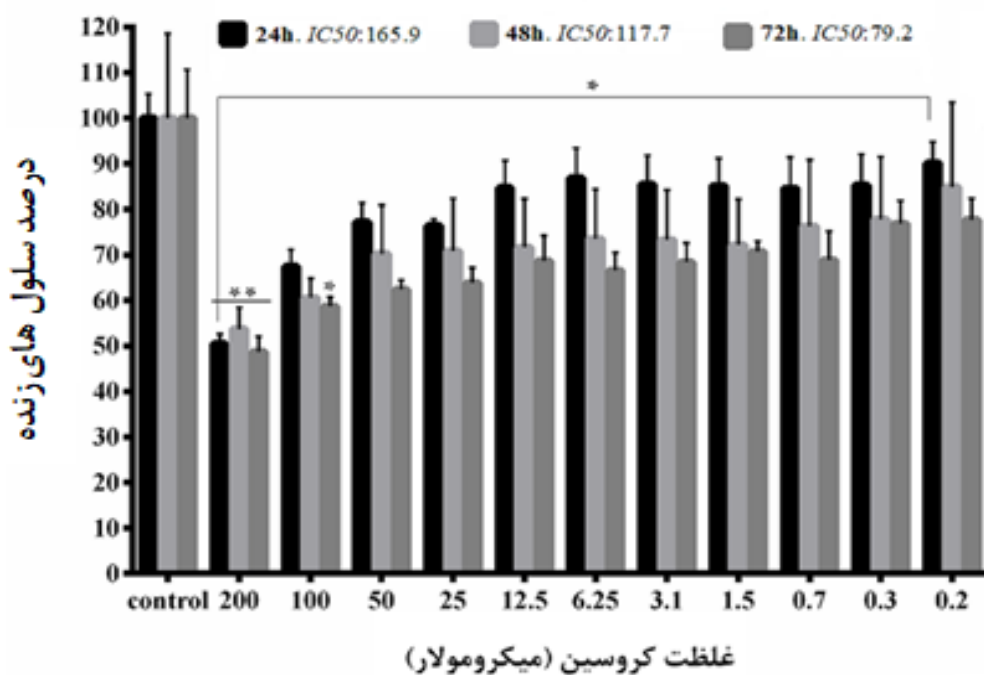
نتایج میزان آپوپتوز سلولی به روش فلوسایتومتری:

برای تعیین تأثیر آپوپتوتیک روی رده سلولی CO 88BV59-1 LCL، سلول‌ها با توجه به مقادیر IC50 به دست آمده در آزمایش MTT، در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت با کروسین تحت تیمار قرار گرفتند و سپس اثرات آپوپتوزی به روش فلوسیتومتری و استفاده از Annexin V و PI شناسایی شد. در این روش سلول‌هایی که دچار آپوپتوز اولیه شده، فقط رنگ Annexin و سلول‌هایی که دچار آپوپتوز ثانویه شده و غشای سلولی آن‌ها اندکی نفوذپذیر شده بود دو رنگ Annexin و PI و سلول‌هایی که دچار نکروز شده فقط رنگ PI را به خود گرفتند (شکل ۲). همان‌طور که در شکل ۳ نیز نشان داده شده است، کروسین اثرات آپوپتوتیک قابل توجهی در رده سلولی به صورت وابسته به دوز و وابسته به زمان نشان داد ($P < 0/001$).

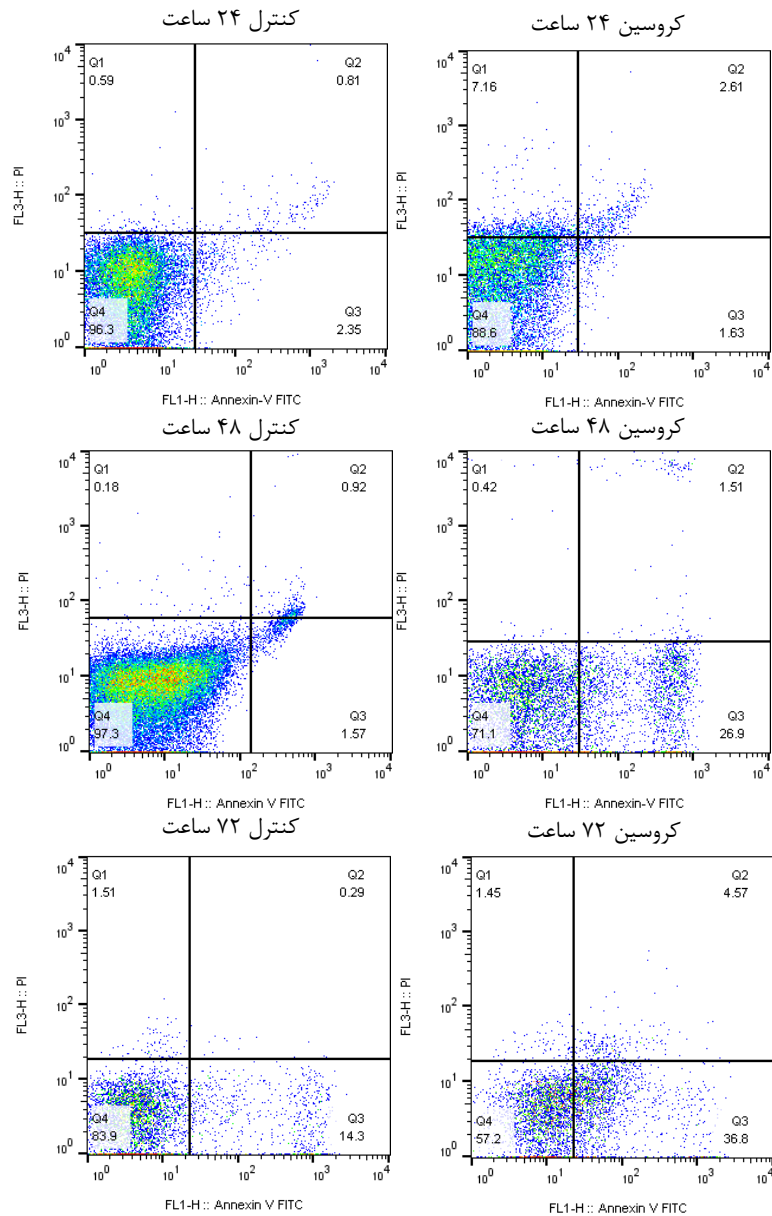
طول موج ۲۶۰ نانومتر به ۲۸۰ نانومتر بین ۱/۸ تا ۲ به دست آمد که نشان دهنده عدم آلودگی آن به پروتئین و DNA بود. در ادامه با قرار دادن RNA استخراجی به عنوان الگو و ساخت cDNA، میزان بیان miRNA ها به روش Real Time PCR مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد میزان بیان نسبی miRNA-15a3p و miRNA-15a5p در رده سلولی تیمار شده با کروسین در مقایسه با سلول کنترل، تغییر آماری معناداری در زمان های مختلف انکوباسیون نداشته است (شکل ۴)(جدول ۲).

نتایج میزان بیان miRNA-15a با استفاده از Real Time-PCR

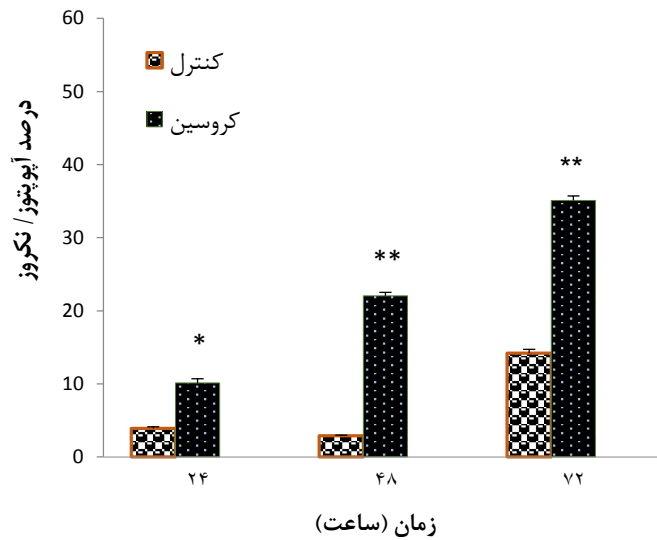
در این مطالعه برای تعیین عملکرد کروسین بر میزان بیان miRNA-15a5p و miRNA-15a3p سلول ها پس از تیمار با غلظت های مختلف کروسین در زمان های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از تیمار جمع آوری شده و RNA آن ها استخراج شد. بررسی کمی و کیفی RNA استخراجی تعیین شد. نسبت جذب RNA در



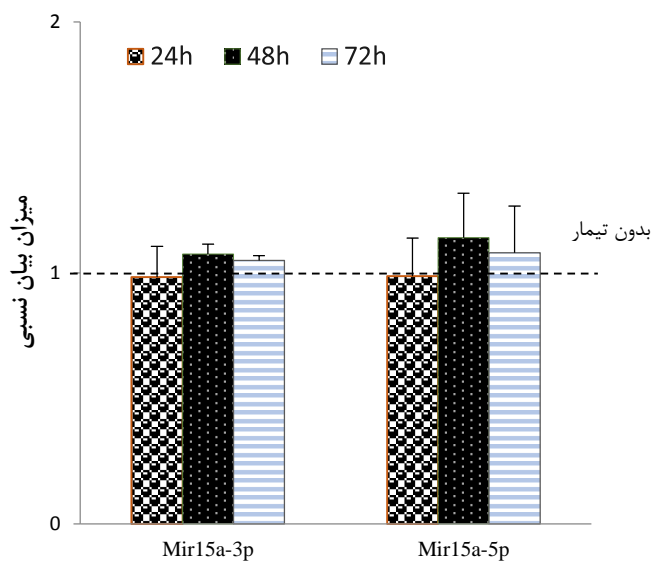
شکل ۱: تاثیر کروسین بر زنده ماندن رده سلولی



شکل ۲: نتایج فلوسیتومتری نشان دهنده القای آپوپتوزیس در رده سلولی تیمار شده با کروسین در زمان های مختلف: جمعیت سلولی در چهار حالت ممکن (یک چهارمها) توزیع شده اند. ناحیه Q1 شامل سلول های نکروتیک است که به صورت مکانیکی تخریب شده اند و فقط از نظر PI مثبت هستند. ناحیه Q2 شامل سلول های درگیر در آپوپتوز تاخیری که برای هر دو رنگ مثبت هستند. ناحیه Q3 شامل جمعیت سلول هایی است که متحمل آپوپتوز اولیه می شوند و PI منفی و Annexin V مثبت هستند. ناحیه Q4 شامل جمعیت سلول های زنده یعنی سلول هایی که کنترل های منفی برای Annexin V و PI می باشند.



شکل ۳: تحلیل مقداری آپتوزیس در رده سلولی تیمار شده با کروسین در زمان های مختلف انکوباسیون: تأثیر آپتوزی کروسین روی رده سلولی در مقایسه با گروه کنترل قابل توجه بود ($P=0.002$ ، $P=0.001$) (**)



شکل ۴: میزان بیان نسبی miRNA-15a در رده سلولی تیمار شده با کروسین در زمان های مختلف انکوباسیون

جدول ۲: میزان بیان نسبی miRNA-15a در رده سلولی تیمار شده با کروسین در زمان های مختلف انکوباسیون

miRNA	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت	P value
15a3p	۰٫۸۳	۰٫۱۱	۰٫۱۳	۰٫۱۷
15a5p	۰٫۷۲	۰٫۲۷	۰٫۵۳	۰٫۰۹

بحث:

اثرات مهارى رشد در رده سلولى CO 88BV59-1 LCL به روشى وابسته به زمان مى‌شود كه ممكن است سلول‌ها را از طريق افزايش بيان ژن‌هاى پيش-آپوپتوز و يا مهار بيان ژن‌هاى ضدآپوپتوزى از بين ببرد. القای آپوپتوز اوليه و تاخیرى در سلول‌هاى سرطانى BT-474 تيمار شده با سافرنال و کروسین زعفران، توسط فریدی و همکاران در شرایط *in vitro* مورد بررسی قرار گرفته است [۳۹]. اثر ضد توموری کروسین به میزان خوبی به واسطه تنظیم بیان ژن‌هاى کنترل کننده چرخه سلولى است. برای ارزیابی دقیق سازوکار کروسین در برابر انواع مختلف سرطان‌ها مطالعات مختلفی تاکنون طراحی شده است [۴۰، ۴۱]. به تازگی گزارش شده است كه کروسین در مدل *in-vivo* بی‌خطر است و مى‌تواند با فعال کردن مسیر ذاتی و خارجى، آپوپتوز قابل توجهی را در رده سلولى سرطان پستان (MCF-7) ایجاد کند [۴۲]. همچنین نشان داده شده است كه کروسین باعث القای آپوپتوز در سلول‌هاى سرطانى سر و گردن [۲۳] و گردن رحم مقاوم به شیمی درمانی مى‌شود [۴۳].

در این مطالعه همچنین میزان بیان miRNA-15a (3p, 5p) در سلول‌هاى تيمار شده با کروسین مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد كه در سلول‌هاى تيمار شده با کروسین تغییر معنادارى در میزان بیان miRNA-15a3p و miRNA-15a5p در مقایسه با سلول‌هاى تيمار نشده وجود ندارد. شواهد بسیاری نشان داده اند كه miRNA-15a كه در لولوس ۱۳q۱۴ قرار دارد، در اكثر موارد لنفوم‌هاى سلول B به ویژه لوسمی لنفوسیتی مزمن (CLL) کاهش بیان داشته يا حذف شده‌اند. miRNA-15a به عنوان تنظیم کننده منفی پروتئین BCL2 عمل مى‌کند. این امر نشان دهنده سازوکار مولكولى است كه در نتیجه کاهش فعالیت و يا حذف miRNA-15a مى‌تواند منجر به CLL شود [۱۲، ۱۳]. بنابراین، miRNA-15a مى‌تواند سرکوب گر تومور باشد.

ویروس اپشتاین بار از طریق تغییر در بیان miRNA‌هاى سلولى و در پی آن تغییر بیان ژن‌هاى ویروسی باعث نامیرا شدن و يا سرطانى شدن سلول آلوده مى‌شود [۳]. در بیشتر سلول‌هاى آلوده به این ویروس به علت کاهش فعالیت و يا حذف miRNA-15a تکثیر تومور افزایش مى‌یابد.

نتیجه‌گیری:

داده‌هاى حاصل از این مطالعه نشان داد كه کروسین مى‌تواند به عنوان يك عامل ضد تكثیرى در لنفوم سلول B با افزایش آپوپتوز وابسته به دوز و زمان در سلول‌هاى تيمار شده عمل کند. این یافته‌ها شواهدی را در رابطه با استفاده بالقوه از کروسین به عنوان يك داروى خاص در درمان بیماران مبتلا به لنفوم سلول B آلوده

اختلال‌هاى لنفرپروفلیفاتيو مرتبط با ویروس اپشتاین بار داراى تظاهرات بالینی ناهمگن بوده و در پاسخ به درمان رفتار متغیرى دارند [۳۰]. از آن جایی كه درمان‌هاى امروزی لنفوم داراى عوارض جانبی بوده و علاوه بر بافت‌هاى تومورى به بافت‌هاى طبیعی بیمار نیز آسیب مى‌رساند، استفاده از گیاهان دارویی برای درمان در جهان محبوبیت بیشتری پیدا کرده‌اند. گیاهان دارویی منبع خوبی از ترکیبات ضدتوموری هستند كه بیماری‌هاى مختلفی از جمله لنفوم را درمان مى‌کنند [۳۱]. تنوع زیادى از ترکیبات گیاهی در درمان نئوپلاسم‌هاى انسانی بررسی شده‌اند. یافته‌هاى علمى اخیر نشان داده است كه يك نوع گیاه زعفران و مواد تشکیل دهنده آن به ویژه کروسین داراى فعالیت ضد سرطانى قابل توجهی در برابر اختلال‌هاى نئوپلاستیک هستند، بدون این كه اثرات سيتوتوكسیك روى بافت‌هاى طبیعی ایجاد کنند [۳۲]. *Crocus sativus* كه معمولاً با نام زعفران شناخته مى‌شود شامل ترکیبات اصلی همچون سافرنال، کروسین و کروسیتین است. کروسین به عنوان جزء اصلی زعفران محسوب مى‌شود و داراى فعالیت‌هاى بیولوژیكى قابل توجهی است [۳۳]. تاکنون هیچ پژوهشى در راستای بررسی تأثیر کروسین روى لنفوم سلول‌هاى B در شرایط *in vitro* انجام نشده است. بنابراین، در مطالعه حاضر اثرات سمیت سلولى و آپوپتوتیک کروسین جدا شده از این گیاه با غلظت‌هاى مختلف علیه رده سلولى CO 88BV59-1 LCL كه نوعى سلول B تغییر شكل یافته و آلوده شده با ویروس اپشتاین بار است مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج این پژوهش نشان داد كه کروسین به طور قابل توجهی زنده مانى سلول‌هاى رده CO 88BV59-1 LCL را کاهش مى‌دهد. این تأثیر با گزارش‌هاى قبلى منتشر شده در خصوص خاصیت مهارى کروسین در برابر سلول‌هاى مختلف تومورى سازگار است [۲۲، ۳۴، ۳۵]. در مطالعه دیگرى، کروسین خواص ضدتومورى در بهبود تومور ملانوما در داخل بدن نشان داده است [۳۶].

در پژوهش حاضر همچنین تأثیر کروسین بر میزان آپوپتوز رده سلولى مورد بررسی قرار گرفت. فرایند آپوپتوز يا مرگ برنامه‌ریزی شده سلول يك فرایند بیولوژیكى پیچیده در موجودات زنده است كه به عنوان روشى حفاظت شده، تحت کنترل ژن‌ها به منظور حذف سلول‌هاى ناخواسته به كار مى‌رود و در بسیاری از سازوکارهاى سیستم ایمنى يا بیماری‌ها مداخله مى‌کند [۳۷]. اصلی‌ترین تفاوت این مسیر با نكروز سلولى به عنوان مسیر اصلی حذف سلول‌هاى ناخواسته، عدم ایجاد التهاب و محدود بودن اثر به سلول‌هاى هدف است. القای آپوپتوز در سلول‌هاى تومورى یکی از روش‌هاى اصلی در تولید داروهای ضد سرطانى است [۳۸]. نتایج مطالعه حاضر نشان داد كه تيمار کروسین باعث ایجاد

تشکر و قدردانی:

بدین وسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم برای بررسی و تصویب پروژه پژوهشی حاضر و از کمیته اخلاق پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی جهرم برای تایید آن تقدیر و تشکر به عمل می‌آید.

به ویروس اپشتاین بار ارائه می‌دهد که شاید دلیل آن تأثیر کم این ترکیب بر سلول‌های B طبیعی باشد. با توجه به محبوبیت استفاده از گیاهان دارویی در بیماران سرطانی و استفاده بالقوه آن در درمان لنفوم، لازم است برای مشخص شدن سازوکار دقیق عملکرد آن بر روی سلول‌های سرطانی در سطح ژنتیکی، پژوهش‌های بیشتری انجام شود.

References:

- Cohen JI. Epstein-Barr virus infection. *New England Journal of Medicine*. 2000;343(7):481-92.
- Nijland ML, Kersten MJ, Pals ST, Bemelman FJ, ten Berge IJ. Epstein-Barr Virus-Positive Posttransplant Lymphoproliferative Disease After Solid Organ Transplantation: Pathogenesis, Clinical Manifestations, Diagnosis, and Management. *Transplantation direct*. 2016;2(1).
- Sakamoto K, Sekizuka T, Uehara T, Hishima T, Mine S, Fukumoto H, et al. Next-generation sequencing of miRNAs in clinical samples of Epstein-Barr virus-associated B-cell lymphomas. *Cancer medicine*. 2017;6(3):605-18.
- Hammond SM. An overview of microRNAs. *Advanced drug delivery reviews*. 2015;87:3-14.
- Lewis BP, Shih I-h, Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Burge CB. Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell*. 2003;115(7):787-98.
- Kole AJ, Swahari V, Hammond SM, Deshmukh M. miR-29b is activated during neuronal maturation and targets BH3-only genes to restrict apoptosis. *Genes & development*. 2011;25(2):125-30.
- Wang Y, Medvid R, Melton C, Jaenisch R, Bielech R. DGCR8 is essential for microRNA biogenesis and silencing of embryonic stem cell self-renewal. *Nature genetics*. 2007;39(3):380.
- Berindan-Neagoe I, Monroig PdC, Pasculli B, Calin GA. MicroRNAome genome: a treasure for cancer diagnosis and therapy. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2014;64(5):311-36.
- Taganov KD, Boldin MP, Chang K-J, Baltimore D. NF- κ B-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006;103(33):12481-6.
- Yoshino H, Yonemori M, Miyamoto K, Tatarano S, Kofuji S, Nohata N, et al. microRNA-210-3p depletion by CRISPR/Cas9 promoted tumorigenesis through revival of TWIST1 in renal cell carcinoma. *Oncotarget*. 2017;8(13):20881.
- Xia L, Zhang D, Du R, Pan Y, Zhao L, Sun S, et al. miR-15b and miR-16 modulate multidrug resistance by targeting BCL2 in human gastric cancer cells. *International journal of cancer*. 2008;123(2):372-9.
- Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, Iorio MV, Ferracin M, Shimizu M, et al. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2005;102(39):13944-9.
- Kitada S, Andersen J, Akar S, Zapata JM, Takayama S, Krajewski S, et al. Expression of apoptosis-regulating proteins in chronic lymphocytic leukemia: correlations with in vitro and in vivo chemoresponses. *Blood*. 1998;91(9):3379-89.
- Huang E, Liu R, Chu Y. miRNA-15a/16: as tumor suppressors and more. *Future oncology*. 2015;11(16):2351-63.
- Fu Q, He C, Mao Z-r. Epstein-Barr virus interactions with the Bcl-2 protein family and apoptosis in human tumor cells. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*. 2013;14(1):8-24.
- Lanzkowsky P, Lipton JM, Fish JD. *Lanzkowsky's manual of pediatric hematology and oncology*: Academic Press; 2016.
- Funch DP, Walker AM, Schneider G, Ziyadeh NJ, Pescovitz MD. Ganciclovir and acyclovir reduce the risk of post-transplant lymphoproliferative disorder in renal transplant recipients. *American Journal of Transplantation*. 2005;5(12):2894-900.
- Østensen AB, Sanengen T, Holter E, Line PD, Almaas R. No effect of treatment with intravenous ganciclovir on Epstein-Barr virus viremia demonstrated after pediatric liver transplantation. *Pediatric transplantation*. 2017;21(6):e13010.
- Piccin A, Di Pierro AM, Canzian L, Primerano M, Corvetta D, Negri G, et al. Platelet gel: a new therapeutic tool with great potential. *Blood transfusion = Trasfusione del sangue*. 2017;15(4):333-40.
- Franke AJ, Bishnoi R, Bajwa R, Skelton WP, Patel N, Slayton WB, et al. Association of allograft rejection with reduction of immunosuppression for post-transplant lymphoproliferative disorder: Analysis of a 20-year single-institutional experience. *American Society of Clinical Oncology*; 2017.
- Rezaee Khorasany A, Hosseinzadeh H. Therapeutic effects of saffron (*Crocus sativus* L.) in digestive disorders: a review. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*. 2016;19(5):455-69.
- Yao C, Liu B-B, Qian X-D, Li L-Q, Cao H-B, Guo Q-S, et al. Crocin induces autophagic apoptosis in hepatocellular carcinoma by inhibiting Akt/mTOR activity. *OncoTargets and Therapy*. 2018;Volume 11:2017-28.
- Mousavi SH, Vazifedan V, Sargolzaee J, Soleymannifard S, Fani Pakdel A. Study of crocin & radiotherapy-induced cytotoxicity and apoptosis in the head and neck cancer (HN-5) cell line. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*. 2017;16(1):230-7.
- Mollaei H, Safaralizadeh R, Babaei E, Abedini MR, Hoshyar R. The anti-proliferative and apoptotic effects of crocin on chemosensitive and

- chemoresistant cervical cancer cells. *Biomed Pharmacother.* 2017;94:307-16.
25. Zhuang X, Dong A, Wang R, Shi A. Crocetin treatment inhibits proliferation of colon cancer cells through down-regulation of genes involved in the inflammation. *Saudi Journal of Biological Sciences.* 2018;25(8):1767-71.
26. Tavakkol-Afshari J, Brook A, Mousavi SH. Study of cytotoxic and apoptogenic properties of saffron extract in human cancer cell lines. *Food and Chemical Toxicology.* 2008. ۷-۳۴۴۳:(۱۱)۴۶;
27. Rahiman N, Akaberi M, Sahebkar A, Emami SA, Tayaran-Najaran Z. Protective effects of saffron and its active components against oxidative stress and apoptosis in endothelial cells. *Microvascular research.* 2018;118:82-9.
28. Li Y, Liu S, Zhang F, Jiang P, Wu X, Liang Y. Expression of the microRNAs hsa-miR-15a and hsa-miR-16-1 in lens epithelial cells of patients with age-related cataract. *International journal of clinical and experimental medicine.* 2015;8(2):2405.
29. Yang L-h, Wang S-l, Tang L-l, Liu B, Wang L-l, Wang Z-y, et al. Universal stem-loop primer method for screening and quantification of microRNA. *PLoS One.* 2014;9(12):e115293.
30. Marques-Piubelli ML, Salas YI, Pachas C, Becker-Hecker R, Vega F, Miranda RN. Epstein-Barr virus-associated B-cell lymphoproliferative disorders and lymphomas: a review. *Pathology.* 2020;52(1):40-52.
31. Gordaliza M. Natural products as leads to anticancer drugs. *Clinical and Translational Oncology.* 2007;9(12):767-76.
32. Samarghandian S, Borji A. Anticarcinogenic effect of saffron (*Crocus sativus* L.) and its ingredients. *Pharmacognosy research.* 2014;6(2):99.
33. Gao K, Liu F, Chen X, Chen M, Deng Q, Zou X, et al. Crocetin protects against fulminant hepatic failure induced by lipopolysaccharide/D-galactosamine by decreasing apoptosis, inflammation and oxidative stress in a rat model. *Exp Ther Med.* 2019;18(5):3775-82.
34. Bakshi HA, Sam S, Feroz A, Ravesh Z, Shah GA, Sharma M. Crocin from Kashmiri saffron (*Crocus sativus*) induces in vitro and in vivo xenograft growth inhibition of Dalton's lymphoma (DLA) in mice. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2009;10(5):887-90.
35. Li X, Jiang C, Zhu W. Crocin reduces the inflammation response in rheumatoid arthritis. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2017;81(5):891-8.
36. Bakshi HA, Hakkim FL, Sam S, Javid F. Role of dietary crocin in in vivo melanoma tumor remission. *Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP.* 2017;18(3):841.
37. Hu W, Kavanagh J. Anticancer therapy targeting the apoptotic pathway. *The lancet oncology.* 2004;421:4-9.
38. Alonso-Castro AJ, Ortiz-Sánchez E, García-Regalado A, Ruiz G, Núñez-Martínez JM, González-Sánchez I, et al. Kaempferitrin induces apoptosis via intrinsic pathway in HeLa cells and exerts antitumor effects. *J Ethnopharmacol.* 2013;145(2):4۷۹-۷۶
39. Faridi N, Heidarzadeh H, Mohagheghi M-A, Bathaie SZ. BT-474 Breast Cancer Cell Apoptosis Induced by Crocin, a Saffron Carotenoid. *Basic & Clinical Cancer Research.* 2019.
40. Bathaie SZ, Bolhassani A, Tamanoi F. Chapter Four - Anticancer Effect and Molecular Targets of Saffron Carotenoids. In: Bathaie SZ, Tamanoi F, editors. *The Enzymes.* 36: Academic Press; 2014. p. 57-86.
41. Lv C-F, Luo C-L, Ji H-Y, Zhao P. [Influence of crocin on gene expression profile of human bladder cancer cell lines T24]. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi.* 2008;33(13):1612-7.
42. Hakkim L. Molecular Mechanism of Crocin Induced Caspase Mediated MCF-7 Cell Death: In Vivo Toxicity Profiling and Ex Vivo Macrophage Activation. *Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP.* 2016;1۷:۱۴۹۹
43. Mollaei H, Safaralizadeh R, Babaei E, Abedini MR, Hoshyar R. The anti-proliferative and apoptotic effects of crocin on chemosensitive and chemoresistant cervical cancer cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy.* 2017;94:307-16.

Effect of Crocin on miRNA-15a expression in EBV infected transformed B cell

Abdolreza Sotoodeh Jahromi¹, Maliheh Moradzadeh², Mohammad Kargar^{3*}
Farshid Kafilzadeh³, Marzieh Jamalidoust⁴

Received: 2020.11.08

Revised: 2020.11.15

Accepted: 2020.12.21

1. PhD student, Department of microbiology, Jahrom branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran
2. Golestan rheumatology research center, Sayad shirazi hospital, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran
3. Professor, Department of microbiology, Jahrom branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran
4. Clinical microbiology research center, Namazi hospital, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

Pars Journal of Medical Sciences, Vol.18, No.3, Fall 2020

Pars J Med Sci 2020;18(3):21-31

Abstract:

Introduction:

Despite advances in diagnosis and therapy, cancer is still the main cause of death worldwide. Crocin, the major carotenoid in saffron, exhibits potent anti-tumor effects in breast, pancreas, and gastric tumors. However, the anti-lymphoma effects of crocin are still unclear, especially in B cell lymphomas. The present study aimed to evaluate the cytotoxic effects of crocin on EBV-infected transformed B cell.

Material and Methods:

In this study, the effects of crocin on CO 88BV59-1 LCL – an Epstein-Barr-Virus (EBV) Infected Transformed B cell was examined. The cells were treated with crocin (0.2-200 μ M), for 3 days. Cell viability and apoptosis were evaluated using MTT, and flow cytometry techniques respectively. Also, miRNA-15a genes expression were determined by real-time PCR.

Results:

Crocin significantly inhibited proliferation and induced apoptosis in EBV infected cell-line in a dose and time-dependent manner ($P < 0.05$). There was no significant change in the expression of miRNA-15a3p and miRNA-15a5p in treated cells compared to untreated cells ($P > 0.05$).

Conclusions:

The results suggested that crocin can be considered for preclinical and also clinical testing in EBV-associated B cell lymphoma treatment. The results showed that due to the effect of crocin in reducing the survival and increasing apoptosis of lymphoma cells and also due to the lack of change in the expression of miRNA-15a, it can be considered as a therapeutic candidate in the treatment of EBV-associated B cell lymphoma.

Keywords: Apoptosis, B Cell Lymphoma, Crocin

* Corresponding author Email: microkargar@gmail.com