

## بررسی فعالیت تلومراز در سلول‌های سرطانی سینه تحت تیمار کروسین

فروه خسروجردی<sup>۱</sup>، سکینه کاظمی نورعینی<sup>۲</sup>، محمد نبیونی<sup>۳</sup>

<sup>۱</sup> دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران

<sup>۲</sup> استادیار گروه زیست‌شناسی، دانشگاه حکیم سبزواری، سبزوار، ایران

<sup>۳</sup> استادیار گروه زیست‌شناسی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران

نشانی نویسنده مسؤول: دانشگاه حکیم سبزواری، گروه زیست‌شناسی، دکتر سکینه کاظمی نورعینی

E-mail: kazemibio@gmail.com

وصول: ۹۰/۱۲/۱۳، اصلاح: ۹۱/۲/۹، پذیرش: ۹۱/۳/۲۰

### چکیده

**مقدمه:** زعفران به عنوان یک دارو از دیرباز مورد توجه بوده است و گزارش‌هایی از اثرات ضد سرطانی کروسین، رنگدانه اصلی زعفران وجود دارد. از آنجا که نامیرایی سلول‌های سرطانی عمدتاً ناشی از فعال شدن آنزیمی به نام تلومراز است، تأثیر کروسین بر فعالیت این آنزیم در سلول‌های آدنوکارسینومای سینه رده MCF7 مورد بررسی قرار گرفت.

**مواد و روش‌ها:** غلظت IC<sub>50</sub> کروسین پس از ۴۸ ساعت تیمار سلول‌ها با استفاده از روش MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-dophenyltetrazolium bromide) تخمین زده شد. فعالیت تلومراز در سلول‌های تیمار شده در مقایسه با سلول‌های کنترل تیمار نشده با استفاده از روش رایج تکثیر تکرارهای تلومری (TRAP) (بر اساس روش Kim, ۱۹۹۴) و نیز روش کمی real-time quantitative telomeric repeat amplification protocol (qTRAP) (بر اساس روش Hou, ۲۰۰۱) سنجش و نتایج با هم مقایسه شد.

**یافته‌ها:** غلظت‌های خیلی پایین کروسین فعالیت تلومراز را در مقایسه با سلول‌های تیمار نشده افزایش می‌دهد، ولی غلظت‌های بالاتر آن به شکل وابسته به دوز فعالیت آنزیم را کاهش می‌دهد. بر اساس روش qTRAP، فعالیت تلومراز در غلظت IC<sub>50</sub> کروسین تا ۸۵٪ نسبت به سلول‌های تیمار نشده مهار می‌گردد و روش TRAP نیز بطور کیفی این فرآیند را تأیید می‌کند.

**نتیجه‌گیری:** هر دو روش مورد استفاده پیشنهاد می‌کنند که مکانیسم ضد سرطانی کروسین در رده سلولی MCF7 احتمالاً به واسطه اثر مهار کنندگی قوی آن بر فعالیت تلومراز است. (مجله دانشگاه علوم پزشکی سبزوار، دوره ۱۹/ شماره ۳/ صص ۲۷۷-۲۶۷).

**واژه‌های کلیدی:** تلومراز، کروسین، سرطان سینه، آدنوکارسینوم

### مقدمه

سلول، توانایی غلبه بر شرایط بحرانی تکثیر سلولی را می‌بخشد. یکی از ویژگی‌های مهم سلول‌های سرطانی در مقایسه با سلول‌های سالم، قابلیت همانندسازی نامحدود آنها و به دیگر سخن "نامیرایی" می‌باشد. از مهم‌ترین

نامیرایی سلول‌های سرطانی به‌طور عمده ناشی از فعالیت آنزیم تلومراز است؛ به‌گونه‌ای که در بیش از ۹۰ درصد انواع سلول‌های سرطانی این آنزیم فعال شده و به

از فعالیت تلومراز مشاهده شده است (۵). تحقیقات نشان می‌دهد که سطح فعالیت تلومراز با پیشرفت سرطان ارتباط دارد (۶). به بیان دیگر فعالیت تلومراز یک عامل تعیین‌کننده در نامیرایی سلول‌های سرطانی است و می‌تواند به-عنوان یک هدف مولکولی که تا حد زیادی برای سلول‌های سرطانی ویژگی دارد، مطرح باشد.

مطالعات زیادی نشان داده‌اند که مهار تلومراز می‌تواند روی بقای زیستی سلول‌های سرطانی تأثیر گذارد (۷،۸). امروزه مهار تلومراز به‌عنوان یک راهکار امیدوارکننده در درمان سرطان به روش‌های مختلفی از جمله الیگونوکلوئوتیدهای آنتی سنس (۹)، ریبوزیم‌ها (۱۰)، RNA مداخله‌گر (۱۱) و مهارکننده‌های مولکولی کوچک (۱۲) بسیار مورد توجه قرار گرفته است.

گزارش‌های متعددی از اثرات ضد سرطانی و ضد توموری کروسین در *in vivo* و *in vitro* وجود دارد (۱۳،۱۴،۱۵). کروسین یک تترارپنوتیید حاوی دو بخش قندی جنتیوبیوز است که به‌واسطه باندهای استری به یک کروسیتین متصل شده‌اند. این ترکیب از مهم‌ترین متابولیت‌های موجود در زعفران است که باعث رنگ قرمز آن می‌شود و اثرات دارویی مختلفی از آن مشاهده شده است (۱۶). هدف پژوهش حاضر مطالعه اثرات احتمالی کروسین بر رشد و به‌عبارت دیگر نامیرایی سلول‌های سرطانی می‌باشد. بنابراین از رده سلولی آدنوکارسینومای سینه انسانی، MCF7، به‌عنوان یک مدل کشت سلولی استفاده نموده و فعالیت تلومراز در آن تحت تیمار کروسین مورد سنجش قرار گرفته است.

### مواد و روش‌ها

کشت سلول: سلول‌های MCF7 در فلاسک‌های DMEM High Glucose with ۷۵cm<sup>2</sup> در محیط Glutamin (شرکت PAA، اتریش) حاوی ۱۰ درصد سرم (FBS (Fetal Bovin Serum gold) (شرکت PAA، اتریش) و ۱ درصد (Penicilin Streptomycin solution)

عوامل محدودکننده تعداد همانندسازی‌های قابل انجام در سلول‌های طبیعی بخش‌های انتهایی کروموزوم‌های خطی به نام تلومر (Telomer) می‌باشد (۱). آنزیم‌های DNA پلیمرز نمی‌توانند در ناحیه تلومر انتهایی ۳' کروموزوم‌ها را به‌طور کامل همانندسازی کنند. در نتیجه در هر تقسیم سلولی کروموزوم‌های دختری در حدود ۵۰ تا ۲۰۰ جفت باز در انتهای ۳' خود نسبت به نسل قبلی کوتاه‌تر می‌شوند (۲). از آن‌جا که تلومرها نقش مهمی در کنترل سرعت تقسیم سلولی و فرآیند پیری (Aging) ایفا می‌نمایند، هنگامی که فرآیند کوتاه شدن تلومر به حد خطرناک و تهدید توالی‌های رمزگردان برسد، باعث پیری و مرگ طبیعی سلول (Senescence) و یا القای آپوپتوزیس می‌گردد (۲،۳).

در سلول‌های نامیرا مشکل کوتاه شدن بیش از حد طول تلومر به‌طور عمده بر اثر فعالیت آنزیمی به‌نام تلومراز (Telomerase) برطرف می‌شود. تلومراز انسانی یک ریبونوکلوپروتئین است که از چندین زیرواحد شامل یک واحد آنزیمی با فعالیت رونویسی معکوس (hTERT)، یک بخش RNA که الگویی برای گسترش تلومر فراهم می‌کند (hTR) و TEP1 پروتئینی که تصور می‌شود مربوط به اتصال پروتئین و RNA است، تشکیل شده است (۴). این آنزیم یک رونوشت بردار معکوس (Reverse Transcriptase) می‌باشد که با استفاده از زیر واحد hTR خود به‌عنوان الگو، تکرارهای پشت سرهم شش نوکلئوتیدی TTAGGG را به انتهای ۳' کروموزوم‌ها افزوده و قطعات از دست رفته انتهای کروموزوم‌ها در هر تقسیم سلولی را جبران می‌کند؛ و بدین‌وسیله از ادامه روند کوتاه شدن تلومرها جلوگیری نموده، فرایند مرگ طبیعی سلولی را متوقف می‌سازد. تلومراز به‌طور معمول فقط در سلول‌های بنیادی، سلول‌های رده زایا و سلول‌های رویانی بیان می‌شود و در بسیاری از بافت‌ها و سلول‌های سوماتیک در طول تکامل جنینی خاموش می‌گردد؛ ولی در ۹۰-۸۵ درصد کل سلول‌های سرطانی انسان سطح بالایی

گیری شد (۱۹). سپس فعالیت تلومراز استخراج شده به دو روش TRAP مرسوم و (qTRAP) Real Time Quantitative TRAP سنجیده شد.

### روش Real Time Quantitative TRAP

مقداری معادل  $0.5 \mu\text{g}$  پروتئین از عصاره استخراج شده از هر یک از نمونه سلول‌های MCF7 تیمار شده و یا کنترل برای اندازه‌گیری فعالیت تلومراز به روش Quantitative real time TRAP assay استفاده شد. حجم مخلوط واکنشی به کار رفته که به عصاره تلومرازی امکان فعالیت آنزیمی می‌دهد، ۲۵ میکرولیتر شامل  $12.5 \mu\text{l}$  Real Time PCR Rotor gene SYBR Green Kit 2x و ۵ پیکومول پرایمر TS ( $3' \text{AATCCGTCGAGCAGATT}$ ) و ۵ پیکومول پرایمر ACX ( $4\text{'-CCCTTA}$ ) به مخلوط واکنشی اضافه نموده و محصول فعالیت آنزیمی تلومراز پس از دناتورسیون در ۹۵ درجه ۵ دقیقه با ۴۰ سیکل شامل ۹۵ درجه ۱۵ ثانیه، ۵۲ درجه ۱۵ ثانیه و ۷۲ درجه ۱۵ ثانیه تکثیر شد. در این تست از دو کنترل استفاده شد: یک کنترل مثبت با استفاده از عصاره سلولی حاوی  $0.5 \mu\text{g}$  پروتئین از سلول‌های MCF7 غیر تیمار و یک کنترل منفی که یک مخلوط واکنشی همانند کنترل مثبت بود که در آن آنزیم با جوشاندن غیرفعال شده بود. چهار نمونه استاندارد نیز با تکرارهای دوتایی هر یک مخلوط واکنشی شامل عصاره استخراجی تلومراز از سلول‌های غیر تیمار که به نسبت‌های ۰، ۱:۵، ۱:۲۵، ۱:۱۲۵ رقیق شده بودند، همانند دیگر نمونه‌ها تمام مراحل آزمایش را طی کرده و برای آنالیز داده‌ها استفاده شد (۲۰). فعالیت تلومراز برای هر غلظت کروسیین در سه آزمایش مستقل و هر یک حداقل با سه تکرار منطقی اندازه‌گیری شد.

### روش TRAP مرسوم: در سنجش متدوال TRAP

از روشی که قبلاً گزارش شده است (۲۱) با اندکی تغییرات استفاده شد. محصول فعالیت آنزیمی تلومراز طی مدت ۲۰ دقیقه در حجم  $25 \mu\text{l}$  حاوی  $0.25$  میکروگرم

Penstrep (100X) کشت داده شد. آنها در  $\text{CO}_2$  انکوباتور (Astec, Japan) با شرایط دمایی  $37^\circ\text{C}$  و  $5\%$   $\text{CO}_2$  درصد و ۱۰۰ درصد رطوبت رشد یافتند. محیط کشت هر ۴۸ ساعت یک بار تعویض می‌شد و سلول‌ها بعد از ۵-۶ روز با استفاده از تریپسین-EDTA ساب کالچر می‌شدند (۱۷). کروسیین خالص کریستالی از سیگما (S8381) تهیه شد و محلول ذخیره آن در الکل مطلق استفاده شد.

### آزمون سمیت: سلول‌های در حال رشد MCF7

در پلیت‌های ۹۶ خانه با  $1.04 \times 10^4$  سلول در هر خانه کشت شدند و بعد از ۲۴ ساعت، محیط کشت با محیط حاوی غلظت‌های مختلف کروسیین تعویض شد. بعد از ۴۸ ساعت سلول‌ها با PBS شسته و به مدت ۴ ساعت در محیط تازه شامل  $0.5 \text{mg/ml}$  MMT در دمای  $37^\circ\text{C}$  انکوبه شدند. سپس محیط کشت و MTT از تمام خانه‌ها تخلیه و کریستال‌های فورمازال تشکیل شده را با افزودن  $100 \mu\text{l}$  حلال آن (۱۰ g SDS در ۱۰۰ ml DMSO و ۱ اسید استیک گلاسیال) حل نموده و جذب هر چاهک به کمک دستگاه پلیت ریدر در طول موج  $570 \text{ nm}$  اندازه‌گیری شد. مقادیر جذب به صورت درصدی از کنترل‌های تیمار نشده بیان و با استفاده از نمودارهای به-دست آمده از ۵ آزمایش مستقل هر یک با حداقل ۳ بار تکرار، غلظت مهاری  $\text{IC}_{50}$  محاسبه گردید (۱۸).

### سنجش فعالیت تلومراز: سلول‌های MCF7 پس

از ۴۸ ساعت تیمار با غلظت‌های  $1/25$ ،  $2/5$  و  $3/5$  میلی‌گرم بر میلی‌لیتر کروسیین تریپسینه شده و سپس شست‌وشو با PBS سرد انجام شد. با افزودن بافر لیز حاوی تریس-کلرید  $10$  میلی‌مولار  $\text{pH}=7.5$ ، یک میلی-مولار منیزیم کلرید، یک میلی‌مولار EGTA و  $0.1$  میلی-مولار فنیل متیل سولفونیل فلورید،  $5$  میلی‌مولار بتامرکاپتواتانل،  $0.5$  درصد CHAPS و  $10$  درصد گلیسرول و به مدت ۳۰ دقیقه بر روی یخ انکوبه نموده و در  $14000 \text{ rpm}$  برای ۳۰ دقیقه سانتریفوژ شد. غلظت پروتئین استخراج شده بر اساس سنجش برادفورد اندازه-

عصاره آنزیمی تلومراز،  $0.25 \mu\text{g}$  از پرایمر TS،  $2.5 \mu\text{l}$  بافر TRAP به کمک کیت PCR universal و با اضافه کردن  $0.25 \mu\text{g}$  پرایمر ACX در دستگاه PCR (Astec, Japan) تکثیر شد. محصولات PCR را در ژل پلی اکریلامید  $12.5\%$  در بافر TBE در اختلاف پتانسیل  $400$  ولت الکتروفورز و محصولات واکنش با رنگ‌آمیزی SYBR green مشاهده شد (۲۲).

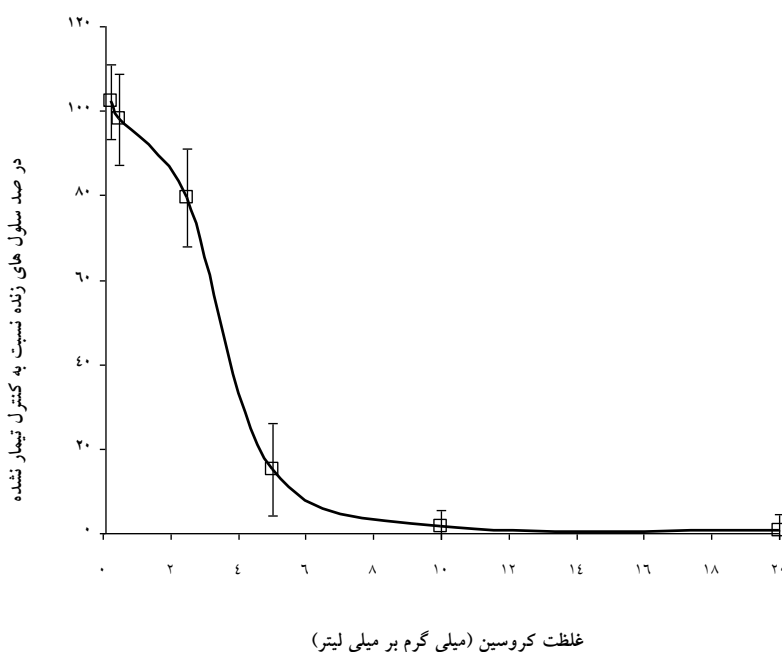
## یافته‌ها

اثر کروسین بر روی بقای زیستی سلول‌های MCF7 که با سنجش MTT بعد از ۴۸ ساعت تیمار سنجش شد، در شکل ۱ نشان داده شده است.

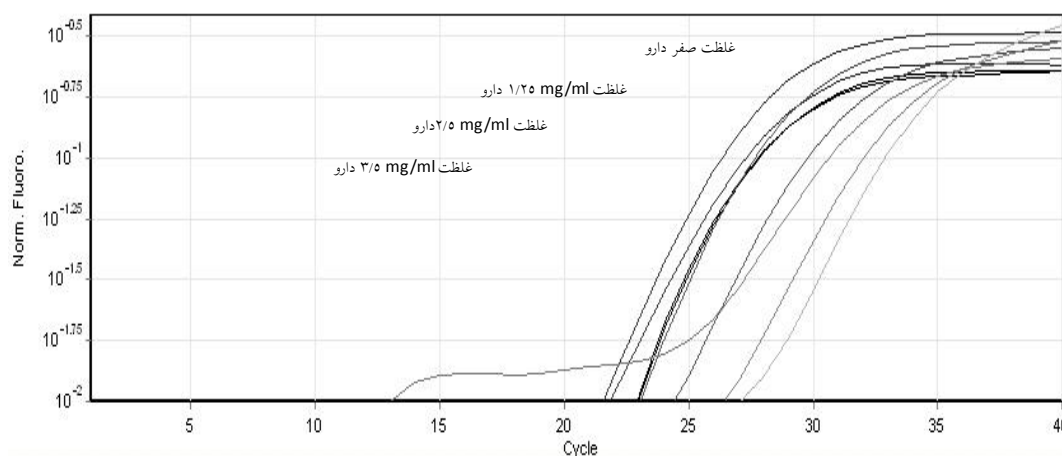
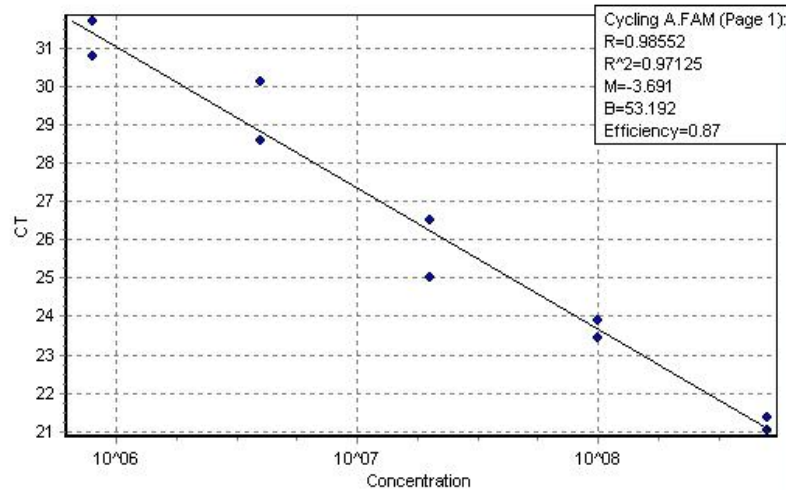
منحنی در غلظت‌های خیلی پایین یعنی حدود  $0.5$  میلی‌گرم بر میلی‌لیتر افزایش جزئی بقای زیستی سلول‌های تیمار شده را در مقایسه با سلول‌های غیر تیمار نشان می‌دهد، درحالی‌که در غلظت‌های بالاتر قابلیت زیستی متناسب با افزایش غلظت کروسین کاهش یافته است. سهم سلول‌های زنده تیمار شده با غلظت‌های

تکثیر محصول فعالیت تلومراز در عصاره‌های استخراج شده از سلول‌های کنترل و تیمار با کروسین در روش qTRAP توسط دستگاه Real Time Thermal Cycler (Corbett Research) و با استفاده از نرم‌افزار SYBR Rotor-gene green انجام شد که نتایج حاصل نشان می‌دهد با افزایش غلظت داروی مورد استفاده برای تیمار، فاز لگاریتمی منحنی مربوط دیرتر پدیدار می‌شود که ناشی از کم‌تر بودن تعداد کپی‌های تکرارهای تلومری محصول تلومراز می‌باشد (شکل ۲).

چگونگی ارتباط خطی بین تعداد کپی‌های تکرارهای تلومری و مقدار CT در منحنی استاندارد که



تصویر ۱: نمودار سنجش میزان بقای زیستی سلول‌های MCF7 تحت تیمار کروسین به روش MTT که به صورت درصدی از سلول‌های کنترل غیر تیمار بیان می‌شوند



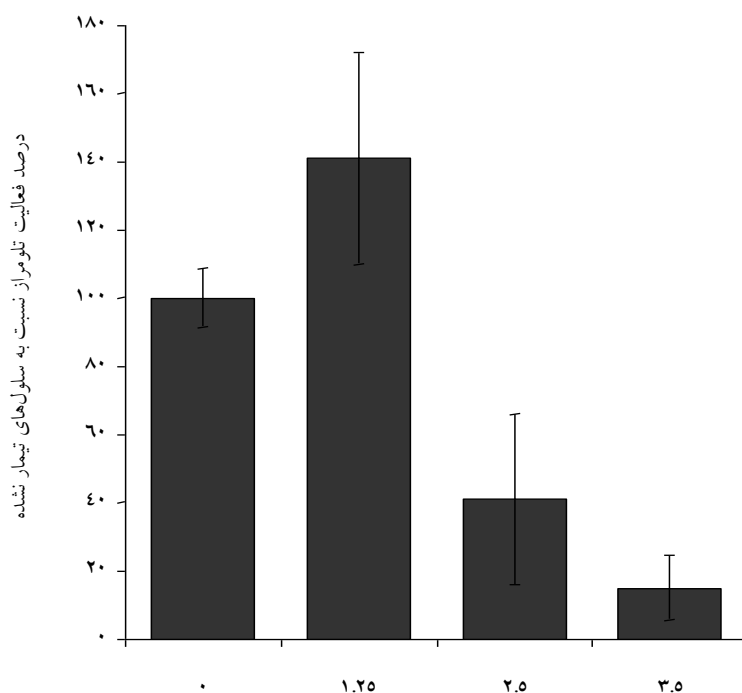
تصویر ۲: الف- نمودار شدت فلورسانس بر حسب سیکل های PCR (سمت چپ) ب- منحنی استاندارد حاصل از رفتهای پی در پی کنترل مثبت که ارتباط خطی بین تعداد کپی محصولات تلومرازی را با مقدار CT نشان می‌دهد (سمت راست)

نمونه‌های کنترل اختلاف معناداری وجود دارد ( $P=0/05$ ). محصول تکثیر شده فعالیت تلومراز در یکی از تکرارهای سنجش به روش مرسوم TRAP در شکل ۴ مشاهده می‌گردد. در هر دور فعالیت آنزیم تلومراز یک قطعه ۶ جفت بازی را به انتهای پرایمر می‌افزاید و محصول به شکل قطعاتی با تفاوت‌های ۶ جفت بازی بر روی ژل پلی‌اکریلامید از هم قابل تفکیک می‌باشند. مجموع میزان درخشانی باندهای حاوی قطعات در هریک از چاهک‌ها برآوردی از فعالیت تلومراز نمونه مربوط می‌باشد.

کاهش فعالیت تلومراز در سلول‌های تیمار شده در مقایسه با سلول‌های کنترل غیرتیمار به وضوح دیده می‌شود. فعالیت تلومراز متناسب با افزایش غلظت کروسین به‌طور قابل ملاحظه‌ای کاهش می‌یابد. باتوجه به

توسط دستگاه ترسیم شده است، در تصویر شماره ۲ (سمت راست) آورده شده است. در واقع مقادیر CT به-طور خطی با کاهش تعداد کپی تکرارهای تلومری محصول تلومراز افزایش می‌یابد. این تأییدکننده آن است که با افزایش غلظت کروسین، رشد نمایی منحنی‌ها در سیکل‌های بالاتر روی می‌دهد، به عبارت دیگر تعداد کپی تکرارهای تلومری کم‌تری تولید شده است.

منحنی تغییرات درصد فعالیت تلومراز در نمونه‌های تیمار شده در مقایسه با کنترل بر حسب غلظت کروسین باتوجه به منحنی استاندارد و تعداد کپی‌های تخمین زده شده از تکرارهای تلومری توسط دستگاه، در شکل ۳ ارائه شده است. آنالیز داده‌ها با استفاده از آزمون T نشان می‌دهد که بین فعالیت تلومراز در سلول‌های تیمار شده با غلظت‌های مختلف کروسین نسبت به



غلظت کروستین (میلی گرم بر میلی لیتر)

تصویر ۳: بررسی فعالیت تلومراز به روش Real time Quantitative TRAP assay در سلول‌های MCF7. فعالیت تلومراز سلول‌های ۴ ساعت تیمار شده با غلظت‌های مختلف کروستین نسبت به سلول‌های کنترل غیر تیمار به صورت انحراف معیار نشان داده شده است

گیاهی با اثرات دارویی، بلکه به‌عنوان عامل پیشگیری‌کننده از وقوع سرطان نیز نامبرده شده است (۱۳). مدارکی وجود دارند که نشان می‌دهند کروستین، کروسستین و مشتقات آنها، رشد برخی سلول‌های سرطانی و بدخیم را در محیط کشت مهار می‌کنند (۱۳، ۲۴). در این خصوص رشد سلول‌های سرطانی K562 و HL60 به‌طور واضحی توسط کروستین، کروسستین و دی‌متیل کروسستین مهار شده است (۲۵). در مطالعاتی دیگر این اثر روی سلول‌های سرطان سینه به‌صورتی وابسته به دوز مشاهده شده است؛ که البته مشخص شد این اثر مستقل از گیرنده استروژن در سلول‌های سرطان سینه اعمال می‌شود (۲۶).

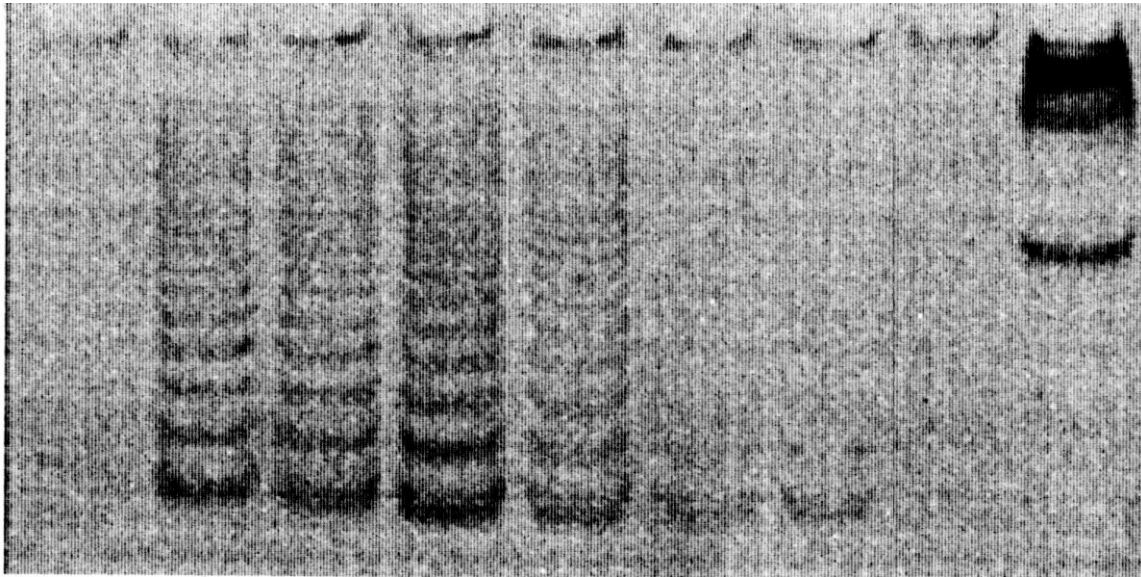
اکثر تحقیقاتی که تاکنون در این زمینه صورت گرفته است، مطالعاتی است که در مورد اثر عصاره اجزای مهم زعفران بر سوش‌های سلولی یا حیوانات آزمایشگاهی بوده است و تأثیر آنها بر ساختارهای مولکولی مورد مطالعه قرار نگرفته است.

نمونه‌های استاندارد که به‌طور متوالی به نسبت یک به پنج رقیق شده‌اند به نظر می‌رسد که فعالیت تلومراز در غلظت IC50 به‌دست آمده از طریق تست سمیت، حتی کم‌تر از ۲۰ درصد نمونه کنترل غیرتیماری بوده و تقریباً مشابه نمونه‌ای است که ۲۵ برابر رقیق شده است.

## بحث

عصاره زعفران شامل چندین ترکیب فعال از نظر داروشناسی است. ترکیبات زعفران به‌طور غیرمعمول کاروتنوئیدهای محلول در آب هستند که شامل منو و دی گلیکوزیل استرهای یک پلی‌ان دی کربوکسیلیک اسید می‌باشند. ترکیب استری دی گلیکوزیله،  $\alpha$ -کروسستین، یا کروسستین، ترکیب اصلی عصاره زعفران است (۲۳).

فعالیت ضد سرطان عصاره زعفران در مقابل طیف گسترده‌ای از تومورهای موشی و سوش‌های سلولی سرطانی در انسان گزارش و از این ترکیب نه تنها به‌عنوان



تصویر ۴: محصولات تکثیر شده فعالیت تلومراز به شکل یک لدر ۶ جفت بازی بر روی ژل ۱۲/۵٪ پلی اکریلامید الکتروفورز و با سایر گرین رنگ آمیزی شده است. از مارکر DNA با قطعات ۱۰۰ جفت بازی در انتهای سمت راست استفاده شده است

چندین مکانیسم می‌تواند در مهار فعالیت تلومراز به وسیله کروسین مطرح باشد. گزارش شده است که یکی از مکانیسم‌های عصاره زعفران و اجزای تشکیل‌دهنده آن از جمله کروسین برای فعالیت‌های ضدتوموری، مهار سنتز RNA و DNA سلولی است (۲۹، ۲۴). با توجه به این مطالعات می‌توان نتیجه گرفت که احتمالاً کروسین از طریق بر همکنش با ساختار DNA یا پروتئین‌های متصل به آن می‌تواند فرآیندهای درون سلولی مرتبط همچون همانندسازی یا رونویسی را مهار یا کنترل کند و منجر به کاهش فعالیت تلومراز گردد؛ اگر چه برای اعمال نظر قطعی نیاز به تحقیقات بیشتری می‌باشد. با این وجود داده‌های پژوهش حاضر می‌تواند این احتمال را در میان‌کنش بین زیرواحد پروتئینی تلومراز و زیرواحد RNA یی آن و یا سوبسترای DNA تک رشته‌ای آن مطرح نموده و امکان وجود اثر مختل‌کننده آن بر فعالیت تلومراز را به-عنوان یک مکانیسم احتمالی پیشنهاد نماید.

از سوی دیگر نشان داده شده است که در جایی که عصاره عمل ضد توموری را اعمال می‌کند، به‌طور طبیعی تبدیل متابولیکی کاروتنوئیدها به رتینوئیدها روی می‌دهد. علاوه بر آن بیان شده است که اثر ضد توموری کروسین ناشی از تبدیل متابولیکی آن به رتینوئید

اثرات مهارکنندگی برخی ترکیبات گیاهی از جمله بربرین (۲۷) و کلیدونین بر روی فعالیت تلومراز گزارش شده است (۲۸)؛ اما با وجود ویژگی‌های ضد توموری زعفران هیچ گزارشی در خصوص نحوه عملکرد مولکولی اجزای تشکیل‌دهنده آن در دست نیست. در این مطالعه اثر کروسین بر روی فعالیت آنزیم تلومراز به‌عنوان یک تومور مارکر و آنزیم کلیدی در نامیرایی سلول‌های سرطانی در مدل کشت سلولی رده سلول‌های MCF7 مورد بررسی قرار گرفته است. نتایج آزمایشات ما نشان داد که در سلول‌های MCF7 بعد از تیمار با کروسین فعالیت تلومراز کاهش می‌یابد. از آنجا که مقادیر مساوی پروتئین از عصاره‌های سلولی برای سنجش فعالیت آنزیم مورد استفاده قرار می‌گیرد، کاهش فعالیت مشاهده شده برای تلومراز نمی‌تواند به‌دلیل کاهش در تعداد سلول‌های مورد سنجش باشد؛ با این وجود در غلظت IC50 که در آن تنها ۵۰ درصد سلول‌ها بر اثر تیمار زنده مانده‌اند، فعالیت تلومراز بیش از ۵۰ درصد کاهش را نشان می‌دهد. گذشته از افزایش نسبی فعالیت تلومراز در سلول‌های تیمار شده با غلظت‌های پایین کروسین، اثر مهاری کروسین به-صورت وابسته به دوز بوده، با افزایش غلظت کروسین مهار قوی‌تر می‌گردد.

همچنین از آن‌جا که مطالعات نسبتاً فراگیری ویژگی‌های ضد سرطانی را برای عصاره گیاه زعفران و ترکیبات مؤثر آن از جمله کروسین گزارش نموده‌اند و از آن‌جا که تلومراز آنزیم تعیین کننده‌ای در نامیرا بودن سلول‌های سرطانی است، مهار قابل ملاحظه آن به وسیله تیمار با کروسین می‌تواند نویددهنده پیدایش ترکیبات مؤثرتری بر پایه ساختار کروسین باشد.

### تقدیر و تشکر

بدین وسیله از همکاری آزمایشگاه تحقیقاتی گروه زیست‌شناسی دانشگاه حکیم سبزواری که محل انجام این پژوهش بوده است، تشکر می‌شود. این پژوهش شامل قسمتی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد فروه خسروجردی دانشجوی رشته ژنتیک دانشگاه آزاد واحد علوم و تحقیقات می‌باشد و بخشی از هزینه‌های آن از محل طرح شماره ۱۱۳۶۱/د تحت حمایت دانشگاه حکیم سبزواری پوشش داده شده است.

(رتینوئیک اسید) اعمال می‌گردد (۳۰). از طرف دیگر گزارش شده است که چندین فاکتور هورمونی مهم از جمله ویتامین D، رتینوئیک اسید و آندروژن‌ها بر تنظیم فعالیت تلومرازی مؤثرند (۳۱). در بررسی انجام شده توسط پندینو و همکارانش مشخص شد که رتینوئیک اسید به شکل وابسته به دوز فعالیت و بیان تلومراز و طول تلومر را تنظیم منفی می‌کند (۳۲). بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت که احتمالاً کروسین با تبدیل شدن به رتینوئیک اسید بر روی فعالیت تلومراز و بیان mRNA hTERT تأثیر بگذارد و نتایج پژوهش حاضر می‌تواند با احتمال وجود چنین مکانیسمی سازگار بوده و هماهنگی داشته باشد.

علاوه بر این ارتباط بسیار قوی بین بیان تلومراز و حضور mRNA زیر واحد آنزیمی‌اش وجود دارد (۳۳)؛ به طوری که در سلول‌هایی که تلومراز در آنها فعال است، تعداد نسخه‌های mRNA hTERT بسیار زیاد است (۳۴). با توجه به این مطالعات احتمال می‌رود که کروسین فعالیت تلومراز را حداقل به صورت جزئی از طریق تنظیم رونویسی ژن hTERT مهار می‌کند.

### References

- Blackburn EH. Switching and signaling at the telomere. *Cell*. 2001; 106(6): 661-73.
- Makarov VL, Hirose Y, Longmar jp, Long G. Tails at both ends of human chromosomes suggest a C strand degradation mechanisms for telomere shortening cell. *Cell*. 1997; 88(5): 657-66.
- McElligott R, Wellinger Rj. The terminal DNA structure of mammalian chromosomes. *EMBO*. 1997; 16(12): 3705-14.
- Chang JT, Lu YC, Chen YJ, Tseng CP, Chen YL, Fang CW, et al. hTERT phosphorylation by pkc is essential for telomerase holoprotein integrity and enzyme activity in head and neck cancer cells. *Br J cancer*. 2006; 94(6): 870-878.
- Wai LK. Telomeres, Telomerase and Tumorigenesis. a review. *Med Gen*. 2004; 6(3): 19.
- Shay JW, Wright WE. Role of telomeres and telomerase in cancer. *Semin Cancer Biol*. 2011; 21(6): 349-53.
- Hahn WC, Stewart SA, Brooks MW, York SG, Eaton E, Kurachi A. et al. Inhibition of telomerase limits the growth of human cancer cells. *Nat Med*. 1999; 5(10): 1164-70.
- Hsu YH, Lin JJ. Telomere and telomerase as targets for anticancer and regeneration therapies. *Acta pharmacol Sin*. 2005; 26(5): 513-8.
- Kondo S, Kondo Y, Li G, Silverman RH, Cowell JK. Targeted therapy of human malignant glioma in a mouse model by 2-5 A antisense directed against telomerase RNA. *Oncogene*. 1998; 16(25): 3323-30.
- Nosrati M, Li S, Bagheri S, Ginzinger D, Blackburn EH, Debs RJ. et al. Antitumor activity of systemically delivered ribozymes targeting murine telomerase RNA. *Clin Cancer Res*. 2004; 10(15): 4983-90.
- Li S, Rosenberg JE, Donjacour AA, Botchkina IL, Hom YK, Blackburn EH. et al. Rapid inhibition of cancer cell growth induced by lentiviral delivery and expression of mutant -template telomerase RNA and anti-



- telomerase short-interfering RNA. *Cancer Res.* 2004; 64(14): 4833-40.
12. Damm K, Hemmann U, Garin-Chesa P, Huel N, Kauffmann I, Priepke H. et al. A highly selective telomerase inhibitor limiting human cancer cell proliferation. *EMBO J.* 2001; 20(24): 6958-68.
  13. Abdullaev F I. Cancer chemopreventive and tumoricidal properties of Saffron (*Crocus sativus*). *Exp Biol Med.* 2002; 227(1): 20- 5.
  14. Mousavi SH, Moallem SA, Mehri S, Shahsavand S, Nassirli H, Malaekheh-Nikouei B. Improvement of cytotoxic and apoptogenic properties of crocin in cancer cell lines by its nanoliposomal form. *Pharm Biol.* 2011; 49(10):1039-45.
  15. 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 Res.* 2007; 27(1A): 357-62.
  16. Ochiai T, Shimeno H, Mishima K, Iwasaki K, Fujiwara M, Tanaka H. et al. Protective effects of carotenoids from saffron on neuronal injury in vitro and in vivo. *Biochim Biophys Acta.* 2006; 1770(4): 578-84.
  17. Freshney RI. *Animal cell culture.* Oxford: IRL press Oxford; 1994
  18. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay. *J Immunol Methods.* 1983; 65(1-2): 55-63.
  19. Bollag DM, Stuart JE. *Protein methods.* New York : Wiley-Liss; 1991.
  20. Hou M, Dawei X, Byorkltolm M, Gruber A. Real-Time quantitative telomeric repeat amplification protocol Assay for the detection of telomerase activity. *Clin Chemistry.* 2001; 47(3): 519-24.
  21. Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PL, et al. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science .* 1994; 266(5193): 2011-50.
  22. Kazemi Noureini S, Ziaee AA, Rastegar-Jazii F, Yazdanbod M. Telomerase activity in Iranian patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Med J Islamic Republic Ir.* 2004; 18(2): 147-52.
  23. Schmidt M, Betti G, Hensel A. Saffron in phytotherapy: pharmacology and clinical uses. *Wien Med Wochenschr.* 2007; 157(13-14): 315-9.
  24. Nair SC, Salomi MJ, Panikkar B, Panikkar KR. Modulatory effects of the extracts of saffron and *Nigella sativa* against cisplatin induced toxicity in mice. *J Ethnopharmacol.* 1991; 31(2); 75-83.
  25. Tarantilis PA, Morjani HM, Polissiou M, Menthait M. Inhibition of growth and induction of differentiation of promyelocytic lymphoma (HL- 60) by carotenoids from *Crocus sativus*. *Anticancer Res.* 1994; 14(5A); 1913-8.
  26. Dimitra G, Fotini N, Gregoris I, Adamantia P, Karamanos P, Cordopatis P. Inhibition of breast cancer cell proliferation by style constituents of different *crocus* species. *Anticancer Res.* 2007; 27(1A); 357-62.
  27. Wu HL, Hsu CY, Liu WH, Yung BY. Berberine - induced apoptosis of human leukemia HL – 60 cells is associated with down – regulation of nucleophosmin/ B23 and telomerase activity. *Int J Cancer.* 1999; 81(6): 923-9.
  28. Kazemi Nureini S, Wink M. Transcriptional down regulation of hTERT and senescence induction in HepG2 cells by chelidonine. *World J Gastroenterol.* 2009; 15(29): 3603-10.
  29. Nair SC, Kurumboor SK, Hasegawa JH. Saffron chemoprevention in biology and medicine. *cancer Biother.* 1999 ; 10(4): 257 – 64.
  30. Hosseinpour Chermahini S, Abd Majid FA, Mohamad RS, Taghizadeh E, Salehnezhad S. Impact of saffron as an anti-cancer and anti-tumor herb. *African J Pharmacy Pharmacol.* 2010; 4(11): 834-40.
  31. Wetterau LA, Francis my , Ma L , Choen P. Insulin like growth factor 1 stimulates telomerase activity in prostate cancer cells . *J Clin Endocrinol Metab.* 2003; 88(7): 3335-6.
  32. Pendino F, Flexor M, Delhommeau F, Buet D, Lanotte M. Retinoids downregulate telomerase and telomer length in a pathway distinct from leukemia cell differentiation. *PNAS.* 2001; 98(12): 6662-7.
  33. Liao CT, Chang JTC, Wang HM, Chen IH, Lin CY, Chen TM, et al. Telomerase activity and expression of telomerase as an independent prognostic factor in head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck.* 2004; 26(6): 504 –12.
  34. Ahiyama M, Horiguchi-Yamada J, Saito S, Hoshi Y, Yamada O, Mizogucki H. Cytostatic concentrations of anticancer agents do not affect telomerase activity of leukemic cells in vitro. *Eur J Cancer.* 1999; 35(2): 309-15.

# Telomerase activity in breast cancer cells under treatment with crocin

**Khosrojerdi F., MSc**

MSc Student of Genetics, Department of Biology, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran, Iran.

**Kazemi Noureini S., Ph.D**

Assistant Professor, Department of Biology, Hakim Sabzevari University, Sabzevar, Iran.

**Nabiuni M., Ph.D**

Assistant Professor, Department of Cellular and Molecular Biology, Kharazmi University, Tehran, Iran.

Received:03/03/2012, Revised:28/04/2012, Accepted:09/06/2012

## Corresponding author:

Dr. Sakineh Kazemi Noureini,  
Department of Biology, Hakim  
Sabzevari University, Sabzevar,  
Iran.

E-mail: kazemibio@gmail.com

## Abstract

**Background:** Crocin is a major constituent of saffron, the dried stigmas of *Crocus sativus* L., which is used mainly as a herbal medicine or a food coloring agent around the world. Novel publications reporting a cancer preventive effect for crocin motivated us to evaluate telomerase activity, the main cause of immortality in cancer cells, under treatment with crocin.

**Materials and Methods:** IC<sub>50</sub> concentration of crocin was estimated in MCF-7 cell line, a breast adenocarcinoma cancer model, by MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) test after 48 hours of treatment. A conventional telomere repeat amplification protocol (TRAP) assay and a real-time quantitative telomere repeat amplification protocol (qTRAP) assay were used to estimate relative telomerase activity in crocin-treated cells in comparison with untreated control cells.

**Results:** Telomerase activity in the treated cells with different concentrations of crocin up to IC<sub>50</sub> showed an increment after administration of very low doses of crocin, whereas higher concentrations of crocin remarkably inhibited the enzyme in a dose-dependent manner. IC<sub>50</sub> values of crocin reduced by 85% in comparison with untreated control cells.

**Conclusion:** qTRAP estimations show a good correlation with the conventional assay results. Antiproliferative effect of crocin in cancer cells is probably due to strong inhibition of telomerase activity. (*Quarterly Journal of Sabzevar University of Medical Sciences, Volume 19, Number 3, pp.267-277*).

**Keywords:** Telomerase, Crocin, Breast Neoplasms, Adenocarcinoma