

فصلنامه گیاهان دارویی

Journal homepage: www.jmp.irپژوهشکده گیاهان دارویی
جهاد دانشگاهی

مقاله تحقیقاتی

اثر مهارى يك دوره تزریق نانو كپسول سیاه‌دانه بر بیان ژن سایكلین D1 در ریه رت‌های نژاد ویستار ناشی از کارسینوژن نیتروزآمین کتون مشتق از تنباکو

محمدباقر نیکزاد^{۱*}، شادمهر میردار^۲^۱ گروه ریاضی، دانشکده ریاضی دانشگاه علم و فناوری مازندران، بهشهر، ایران^۲ گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده علوم ورزشی، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران

اطلاعات مقاله

چکیده

گل‌واژگان:

چرخه سلولی

ژن سایکلین D1

سرطان ریه

نانو کپسول سیاه‌دانه

نیتروزآمین کتون

تنباکو

مقدمه: تصور بر این است که مکمل‌ها می‌توانند تا حدودی بر بافت ریه در معرض مواد سرطان‌زای دود سیگار از طریق چرخه سلولی، مؤثر باشند. سایکلین D1 ژنی است که عملکرد آن در چرخه سلولی است. **هدف:** هدف از پژوهش حاضر، تأثیر ۱۲ هفته تزریق نانو کپسول سیاه‌دانه بر بیان ژن سایکلین D1 ریه رت‌ها متعاقب کارسینوژن NNK (نیتروزآمین کتون مشتق از تنباکو) بود. **روش بررسی:** تعداد ۴۶ سر رت ویستار به پنج گروه NNK (N)، مکمل (S)، مکمل + NNK (SN)، کنترل (C) و حلال (V) تقسیم شدند. نانو کپسول سیاه‌دانه به صورت یک روز در هفته و به میزان ۱۲۵ میکروگرم بر کیلوگرم وزن بدن به صورت زیر جلدی به گروه‌های مکمل و مکمل + NNK تزریق شد. NNK و آب مقطر نیز در گروه‌های NNK و حلال به صورت زیر جلدی یک بار در هفته به میزان ۱۲/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم در مدت ۱۲ هفته تزریق شد. بیان ژن سایکلین D1 به روش Real time PCR-ABI و جهت مقایسه داده‌ها از آزمون پارامتریک آنالیز واریانس یک طرفه و تعقیبی توکی در سطح $P \leq 0/05$ استفاده شد. **نتایج:** نتایج بیانگر کاهش تغییرات نسبی ژن سایکلین D1 در گروه‌های مکمل + NNK ($P = 0/003$) و حلال ($P = 0/001$) نسبت به گروه NNK بود. این مکمل سبب کاهش تغییرات نسبی ژن سایکلین D1 در بافت ریه در معرض کارسینوژن NNK شد. **نتیجه‌گیری:** به نظر می‌رسد این مکمل می‌تواند با کاهش سایکلین D1 در روند چرخه سلولی، در کنار سایر روش‌های درمانی، در کاهش نقش کارسینوژنی NNK و کاهش تأثیرات منفی ناشی از سیگار ایفای نقش نماید.

مخفف‌ها: NNK، نیتروزآمین کتون مشتق از تنباکو؛ CDKs، کینازهای وابسته به سیکلین؛ STAT3، مبدل و فعال کننده پیام رونویسی-۳؛ NF-κB، فاکتور هسته‌ای تقویت کننده زنجیره سبک کاپا؛ TNF، فاکتور نکروز توموری؛ GAPDH، گلیسرآلدئید-۳-فسفات دهیدروژناز.

* نویسنده مسؤول: mnikzad@mazust.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۵ آذر ۱۳۹۷؛ تاریخ دریافت اصلاحات: ۲۵ بهمن ۱۳۹۷؛ تاریخ پذیرش: ۲۹ بهمن ۱۳۹۷

doi: [10.29252/jmp.19.74.118](https://doi.org/10.29252/jmp.19.74.118)© 2020. Open access. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>)

۱. مقدمه

سرطان از مهم‌ترین علل مرگ و میر رو به افزایش در جهان است. آنچه امروزه سرطان را به عنوان یک معضل بهداشتی جهانی مطرح می‌کند، رشد صعودی تعداد مبتلایان به این بیماری است. در میان انواع مختلف سرطان‌ها، سرطان ریه یکی از عمده‌ترین موارد سرطان‌ها در مردان به شمار می‌رود که حدود ۱۸ درصد کل مرگ و میرهای مرتبط با سرطان را به خود اختصاص داده است [۱]. علی‌رغم پیشرفت‌های تأثیرگذار در شناخت سازوکارهای بیماری‌زایی سرطان‌های وراثتی، می‌توان گفت که کارسینوژن‌های (Carcinogen) محیطی علت غالب شایع‌ترین سرطان‌ها هستند. از بین تأثیرات محیطی ممکن سرطان ریه، نگران‌کننده‌ترین آنها بعضی عادات شخصی مانند استعمال دخانیات است که از جمله دلایل اصلی این بیماری به شمار می‌رود [۲، ۳]. دود سیگار حاوی بیش از ۶۰ کارسینوژن است که NNK (Tobacco-specific 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone) از قوی‌ترین کارسینوژن‌ها به شمار رفته و ارتباط معنی‌داری با سرطان ریه دارد [۴]. روش‌شناسی‌های مختلف و دوزهای متفاوت NNK می‌تواند منجر به پاسخ‌های التهابی مزمن و تولید سرطان‌های ریه بدخیم در میان انواع گونه‌ها شود [۴]. چنانچه تکثیر بیش از حد سلولی می‌تواند از جمله پاسخ‌های التهابی مزمن کارسینوژن NNK باشد. تکثیر بیش از حد سلولی به عنوان یکی از ده نشانه اصلی سرطان‌ها محسوب می‌شود [۵]. انحراف ژنتیکی در چرخه تنظیمی سلول از طریق فاز G1 چرخه سلولی، اغلب در سرطان‌های انسانی دیده می‌شود و بیان بیش از حد سایکلین D1 به عنوان کنترل‌کننده فاز G1 چرخه سلولی در بخش‌های قابل توجهی از تومورها و انواع سرطان‌های انسانی مانند ریه، پاراتیروئید، پروستات، لنفوم، ملانوم و سرطان کولون مشاهده شده است که بیشتر به خاطر

القای آن از طریق سیگنال‌های انکوژنی است. بیان بیش‌ازحد این ژن ممکن است به عنوان یک محرک انکوژنی از طریق افزایش فاز G1 به S چرخه سلولی و افزایش عملکرد تنظیمی چرخه سلولی باشد [۶]. تکثیر بیش از حد این ژن، به‌عنوان تغییر کلیدی مولکولی در سرطان‌ها و پیش‌بینی مقاومت به درمان ضدهورمونی است. لذا ناهمگونی بافت، عاملی است که در اثر بیان این ژن می‌تواند این ژن را به عنوان نشانگر زیستی مناسبی در سرطان‌ها معرفی نماید [۷]. سایکلین D1 پروتئینی است که بوسیله ژن متعلق به خانواده سایکلین کدگذاری می‌شود و عملکرد آن در چرخه سلولی است. سایکلین‌ها به عنوان تنظیم‌کننده CDKs (کیناز وابسته به سایکلین) عمل می‌کنند و در وقایع میتوزی نقش دارند. از سه نوع سایکلین D که هر یک به CDK می‌چسبند، بیان بیش از حد سایکلین D1 عمدتاً با تومورزایی و متاستاز سلولی مرتبط است. سایکلین D1 علاوه بر تنظیم CDK در چرخه سلولی در تنظیم عوامل رونویسی، انتقال چرخه سلولی، بازسازی پروتئین‌های تومورزایی و متابولیسم سلولی نیز نقش دارد. بسیاری از سیگنال‌های سرطانی موجب بیان ژن سایکلین D1 از طریق توالی مجزای DNA در ناحیه پروموتور ژن می‌شوند که می‌توان از انکوژن STAT3 (Signal transducer and activator of transcription 3) نام برد [۶]. از طرفی عوامل متعددی در کاهش عوارض ناشی از تأثیر کارسینوژن‌ها سهمیم هستند که از جمله این عوامل می‌توان به استفاده از مکمل‌های آنتی‌اکسیدانتی و ضدالتهابی مانند نیچلا ستیوا (سیاه‌دانه یا زیره سیاه) اشاره کرد که ممکن است موجب جلوگیری از پیشرفت چرخه سلولی و افزایش آپتوز در تومورها شود [۸]. به نظر می‌رسد اثرات درمانی سیاه‌دانه در انواع التهاب‌ها و سرطان‌ها شناخته شده است. اگر چه ممکن است شکل نانوی این گیاه مؤثرتر از شکل اتانولی آن در کاهش التهاب و مهار مسیرهای منتهی به تومور باشد [۹]. در مورد تأثیر نانو کپسول سیاه‌دانه بر بیان ژن سایکلین

سايكلين D1 بافت ريه رت‌هاى نژاد ويستار در پى القاي كارسينوزن NNK مورد بررسى قرار دهد.

۲. مواد و روش‌ها

پژوهش حاضر از نوع تجربى بود. تعداد ۴۶ سر رت‌هاى نژاد ويستار (Wistar Rat) بالغ با ميانگين وزنى $27/93 \pm 105/84$ گرم از مؤسسه تحقيقاتى پاستور خريدارى و به آزمایشگاه جانورى منتقل شدند. رت‌ها به صورت جداگانه در قفس‌هاى پلى كربنات شفاف (هر ۴ رت در يك قفس) تحت شرايط آزمایشگاهى (جهت تطابق فيزيولوژيك) $22 \pm 1/4$ درجه سانتى‌گراد و رطوبت نسبى $55 \pm$ (روشنایى ۶ صبح و خاموشى ۶ عصر) قرار گرفتند. غذای استاندارد پلت و آب نیز در بطرى‌هاى شیشه‌ای در اختيار رت‌ها به صورت آزاد قرار داشت. هفته اول حضور رت‌ها در آزمایشگاه، جهت سازگارى با محيط آزمایشگاه در نظر گرفته شد و سپس به صورت تصادفى به ۴ گروه ۱۰ تایی شامل گروه مكمل (S) (supplement)، گروه NNK (N) + NNK (S.N) supplement -، گروه حلال با تزريق آب مقطر (V) Vehicle و يك گروه ۶ تایی به عنوان گروه كنترل (C) تقسيم شدند. تزريق NNK در گروه S.N و گروه N، به صورت زیر جلدی يك بار در هفته، به ميزان ۱۲/۵ میلی‌گرم بر كيلوگرم وزن بدن در مدت ۱۲ هفته انجام شد و به گروه حلال نیز آب مقطر تزريق شد [۱۴]. بررسى دوزهاى مختلف NNK نشان می‌دهد در صورتی که دوز تزريقی NNK در محدوده بين ۰/۰۹ تا ۵۰ میلی‌گرم بر حسب كيلوگرم به صورت دوز تزريقی تك واحدی و يا چند بار در هفته باشد، سبب ايجاد تومورزایی و اختلال در DNA می‌شود [۱۵]. آب مقطر نیز با مقدار و شرايط مشابه به صورت يك‌بار در هفته به گروه حلال تزريق شد. دانه‌هاى گیاه سياه دانه نیز در آبان ۱۳۹۶

D1 پژوهشی يافت نشده است؛ هر چند برخى مطالعات به اثرات ضدسرطانی و مهار چرخه سلولى سياه‌دانه و تيموئينون در تومورهای سرطانی پرداخته‌اند [۱۱، ۱۰]، لذا بررسى پاسخ ضدالتهابى نانو كپسول سياه‌دانه و اثرات حفاظتی آن بر مسيرهای منتهی به تومور ناشی از چرخه سلولى مستلزم مطالعه است. به نظر می‌رسد در خلال تأثیر كارسينوزن‌ها بر بافت‌ها و مسيرهای منتهی به تومور، استفاده از مكمل‌هاى آنتى‌اكسيدانتی و ضدالتهابى مانند نانو كپسول سياه‌دانه كه ممكن است موجب جلوگیری از پيشرفت چرخه سلولى شود [۸] راهكارى مناسب باشد. اين مكمل به علت برخورداری از خاصیت ضدالتهابى، آنتى‌اكسيدانتی تركيبات آن قادر به مهار تكثير سلولى سلول‌هاى تومورى ريه [۱۲] و تنظيم كاهشى عوامل پيش التهابى و ميانجی گره‌هاى تكثير سلولى مانند Cox-2 (Cyclooxygenase), NF- κ B (nuclear factor kappa), AKT (Protein kinase B) و TNF (Tumor necrosis factor) در شرايط پاتولوژيك می‌شود [۱۳] در حالی كه اثر آن در مسير منتهی به تومور از طريق مهار بيان ژن سايكلين D1 نیاز به بررسى بيشترى است. اگر چه ممكن است سياه دانه دارای ویژگی ضدالتهابى باشد و سبب كاهش التهاب شود [۱۳]، اما اين ویژگی در مورد نانو كپسول سياه‌دانه و اثر آن بر مسيرهای منتهی به تومور چرخه سلولى از طريق كارسينوزن‌هاى محیطی بخصوص NNK روشن و واضح نیست. از سوى ديگر با توجه به يافته‌هاى يادشده مبنی بر افزايش فعاليت مسيرهای التهابى در اثر مواد كارسينوزنيك مانند NNK [۴] اين پرسش مطرح است كه آیا تزريق نانو كپسول سياه دانه همزمان با تزريق كارسينوزن NNK، بر مهار مسيرهای منتهی به تومور از طريق مهار ژن سايكلين D1 مؤثر است؟ از اينرو در پژوهش حاضر محقق كوشيده است تأثیر يك دوره تزريق نانو كپسول سياه دانه را بر بيان ژن

داری ($P \leq 0/05$) و برای مقایسه دو به دوی داده‌ها نیز از آزمون تعقیبی توکی استفاده شد. از آمار توصیفی جهت توصیف داده‌ها و برای ترسیم نمودارها از نرم‌افزار اکسل استفاده شد.

۱.۲. تهیه عصاره سیاه‌دانه

برای تهیه عصاره دانه گیاه سیاه‌دانه از روش خیساندن استفاده شد زیرا در این روش بخش عمده‌ای از ترکیبات فعال سیاه‌دانه مانند تیموکینون وارد عصاره می‌شود [۱۷] بدین‌ترتیب که ۵۵ گرم پودر سیاه‌دانه با ترازوی با دقت ۰/۰۰۱ وزن کرده و در محلول ۷۰ درصد اتانول و ۳۰ درصد آب مقطر به مدت ۷۲ ساعت خیسانده شد. در طول این مدت درب ظرف با پارافین به‌خوبی پوشانده و در دمای محیط ۲۰ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. مخلوط هر شش ساعت یک‌بار توسط میله‌ی شیشه‌ای هم زده شد. پس از گذشت مدت زمان مذکور، مخلوط از کاغذ صافی (واتمن ۴۲، آلمان) عبور داده شد و توسط روتاری مدل C-V RV8 ساخت شرکت IKA آلمان، با دمای ملایم (زیر ۶۰ درجه سانتی‌گراد) حلال آن حذف شد [۱۸].

۲.۲. تهیه نانوکپسول سیاه‌دانه

پس از آماده‌سازی عصاره هیدروالکلی سیاه‌دانه جهت نانوکپسوله کردن سیاه‌دانه از آلومین انسانی استفاده شد. آلومین سرم انسانی به صورت کپسول‌های کروی توی خالی سنتز می‌شود و می‌تواند در داخل خود ترکیباتی مانند عصاره سیاه‌دانه و یا هر ترکیب دیگری را محبوس نموده و به نقاط مورد نظر در درمان ارسال نماید. از این رو جهت آماده‌سازی نانوکپسول، ۵۰ میلی‌گرم آلومین سرم انسانی در داخل ۱ میلی‌لیتر آب با شرایط $PH = 7/4$ حل شد و ۰/۵ درصد از حجم توپین ۸۰ به نمونه اضافه شد. این محلول با سرعت ۳۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۳۰ دقیقه با استفاده از مگنت هم زده شد. سپس ۴ میلی‌لیتر اتانول به صورت

از فروشگاه گیاهان دارویی شهر بابلسر تهیه و شناسایی شد. پس از تأیید وارسته دانه گیاه سیاه‌دانه توسط کارشناس هرباریوم دانشگاه مازندران، نمونه‌ای از آن در آزمایشگاه فیزیولوژی ورزشی نگه‌داری شد. پس از تهیه نانوکپسول سیاه‌دانه، این مکمل به صورت یک روز در هفته و به میزان ۱۲۵ میکروگرم بر کیلوگرم وزن بدن به صورت زیر جلدی به گروه‌های مکمل و مکمل + NNK تزریق شد. از آنجا که شکل نانوی سیاه‌دانه برخلاف سیاه‌دانه در دوزهای مختلف ایجاد سمیت نمی‌کند، بنابراین می‌تواند در درمان شرایط پاتولوژیک همانند انواع سرطان‌ها و عوامل بیماری‌زای مختلف مورد استفاده قرار گیرد. در پژوهشی تزریق ۵۰-۱۰ میکروگرم نانوی سیاه‌دانه با تزریق ۱۰۰ میکروگرم روغن سیاه‌دانه در سلول‌های سرطانی ریه A549 مورد مقایسه قرار گرفت. نتایج نشان داد که دوزهای مختلف پایین‌نانو تفاوت معنی‌داری با دوز ۱۰۰ میکروگرم روغن سیاه‌دانه در کاهش سلول‌های سرطانی ریه دارد. ارزیابی MTT نشان داد هر چه دوز نانو به ۵۰ میکروگرم نزدیک‌تر شود، کاهش بیشتری در سلول‌های سرطانی ریه دیده می‌شود [۱۶].

در این پژوهش برای اولین بار از دوز ۱۲۵ میکروگرم بر کیلوگرم وزن رت‌ها استفاده شد. چهل و هشت ساعت پس از آخرین جلسه تمرین و تزریق، موش‌ها پس از بی‌هوش شدن با محلول زایلازین (Xylazine) و کتامین (Ketamine) قربانی شدند و بافت ریه آنها بلافاصله در ازلت مایع فریز و در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. درکل فرایند پژوهش، اصول اخلاق پژوهشی، منطبق با آیین‌نامه کمیته اخلاقی پژوهش دانشگاه مازندران (MUBABOL.HRI.REC.1395.109) رعایت شد. جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار SPSS-19 و طبیعی بودن توزیع متغیرها در مراحل مختلف پژوهش از آزمون کلموگراف اسمیرنوف استفاده شد. با توجه به طبیعی بودن داده‌ها در این پژوهش، از آزمون پارامتریک آنوای یک طرفه (در سطح معنی

Thermo Scientific RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit) استفاده شد. ابتدا غلظت مطلوب cDNA با استفاده از آزمون سریال غلظت مشخص شد. سپس چرخه‌های واکنشی Real-time PCR بر روی cDNA تولیدشده جهت تکثیر این ژن با برنامه حرارتی Real-time PCR-ABI با دو دمای ۹۵ و ۶۰ درجه سانتی‌گراد راند شد [۲۰]. از GAPDH: Glyceraldehyde-3-(phosphate dehydrogenase) به عنوان ژن مرجع سایکلین D1 استفاده شد (جدول ۱). نتایج به دست آمده بر اساس فرمول پافل (Paffel formula) و نرم‌افزار Excel مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. توالی پرایمرهای استفاده‌شده برای ژن سایکلین D1 و ژن مرجع [۲۱] در جدول ۱ آمده است. برای تعیین بیان نسبی هر ژن نسبت به ژن مرجع از تفاضل داده‌های سیکل آستانه ژن هدف و ژن مرجع استفاده شد و برای تعیین میزان تغییرات ژن هدف در گروه مورد مطالعه نسبت به گروه کنترل، فرمول $2^{-\Delta\Delta CT}$ مورد استفاده قرار گرفت [۲۰].

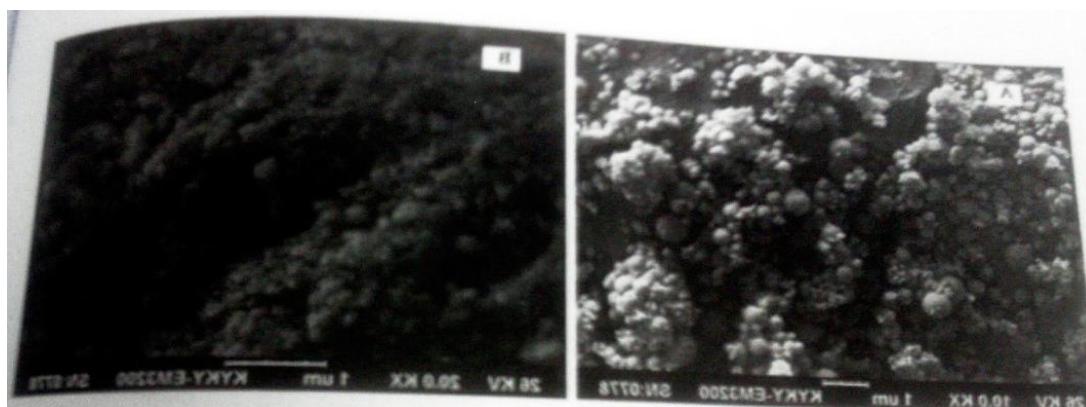
۴.۲. آنالیز داده‌ها

یافته‌های پژوهش حاضر در تحلیل واریانس یک طرفه حاکی از آن بود که بین تغییرات نسبی ژن سایکلین D1 بافت ریه رت‌های ویستار در پنج گروه تفاوت معنی‌داری ($F = 8.062, \alpha \leq 0.05, \text{Sig} = 0.00$) وجود داشت (جدول ۲).

تدریجی به محلول اضافه شد. در ادامه ۱۱۷ میکرولیتر گلو تارآلدئید به نمونه اضافه شد. این عمل تحت هم زدن ۵۰۰ دور بر دقیقه انجام شد و به مدت ۲۴ ساعت ادامه یافت [۱۹]. با اضافه شدن عصاره سیاه‌دانه، ساختار کروی باقی مانده و به علت حضور عصاره مقداری به یکدیگر می‌چسبند که این موضوع تأییدی بر حضور عصاره در درون نانوکپسول‌های سنتزی است (شکل ۱). بر این اساس میزان استحصال نانوکپسول سیاه‌دانه از ۶۰۰ میکرولیتر عصاره با وزن ۰/۵۲۲ گرم، معادل ۰/۰۲۹ گرم بود. برای بررسی صحت سنتز نانوکپسول‌های آلبومین با استفاده از روش پیشنهادی از روش میکروسکوپ الکترونی روییسی استفاده شد. نانوکپسول سیاه دانه یک روز در هفته، به مدت ۱۲ هفته و به میزان ۱۲/۵ میکروگرم بر کیلوگرم وزن بدن به صورت تزریق زیر جلدی صورت پذیرفت.

۳.۲. بررسی بیان ژن سایکلین D1

پروتکل استخراج RNA از سلول‌های بافت ریه رت‌های در معرض NNK، پس از خرد کردن و لیز بافت‌ها و لیز سلول‌ها در یک میلی‌لیتر از محلول RNX با استفاده از دستگاه هموژنایزر انجام شد. بر اساس پروتکل ترایزول (Trizol) مراحل استخراج RNA انجام شد. جهت سنتز cDNA ژن سایکلین D1 از RNAهای استخراج شده، از دستورالعمل کیت 100Reaction K1622 شرکت ترموساینتیفیک امریکا (cDNA Synthesis Kits—)



شکل ۱. تصویر نانوکپسول سیاه‌دانه زیر میکروسکوپ رویشی. قبل از بارگیری (راست) و پس از بارگیری (چپ)

جدول ۱. توالی ژن سایکلین D1 (CCND1) و ژن مرجع GAPDH (گلسیر آلدهید ۳ فسفات دهیدروژناز)

Gene	Primer Forward	Primer Reverse	NCBI
CCND1	ACAGAAGAAATGGAAGACACAG	CGGAAGGAGTTGGTCAATCTCA	ID58919
GAPDH	AAGTTCAACGGCACAGTCAAGG	CATACTCAGCACCAGCATCACC	ID24383

جدول ۲. نتایج آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه تغییرات نسبی ژن سایکلین D1 بافت ریه ($\alpha \leq 0.05$)

منابع تغییر	مجموع مجذورات	درجات آزادی	میانگین مجذورات (واریانس)	نسبت F	مقدار معنی‌داری
بین گروه‌ها	۶۷/۱۸۹	۴	۱۶/۷۹۷	۸/۰۶۲	۰/۰۰
درون گروه‌ها (خطا)	۸۵/۴۲۴	۴۱	۲/۰۸۴		
مجموع	۱۵۲/۶۱۳	۴۵			

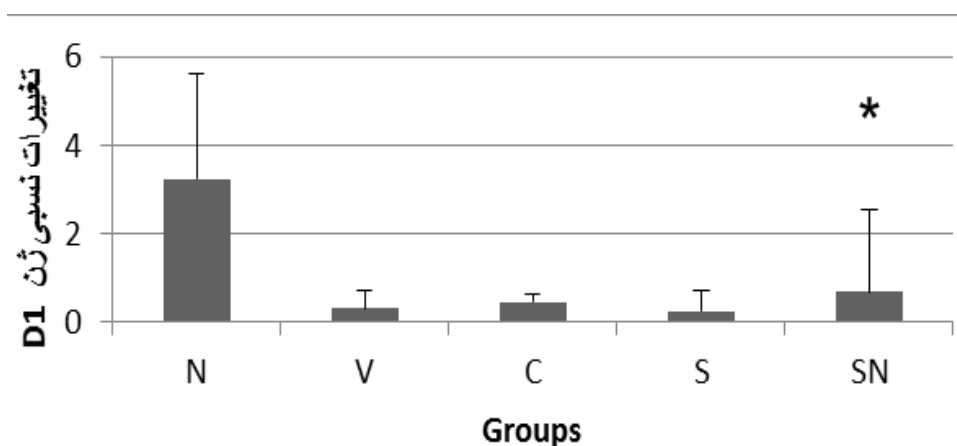
۳. نتایج

و حلال ($P = 0.976$) مشاهده نشد. نتایج این آزمون در دو گروه مکمل و کنترل نیز بیانگر عدم تفاوت معنی‌دار بین این دو گروه ($P = 0.999$) بود (جدول ۳، نمودار ۱).
از آنجا که تفاوت معنی‌داری بین گروه مکمل - NNK و گروه‌های حلال ($P = 0.976$) و مکمل ($P = 0.952$) دیده نشد، لذا می‌توان بیان نمود که کاهش تغییرات نسبی ژن سایکلین D1 در گروه مکمل - NNK ناشی از تأثیر نانوکپسول سیاه‌دانه است.

نتایج آزمون تعقیبی توکی (جدول ۳) نیز نشان داد که تفاوت معنی‌داری در تغییرات نسبی ژن سایکلین D1 بافت ریه بین گروه تزریق NNK و تزریق حلال ($P = 0.001$) وجود داشت. همچنین مقایسه بین گروه مکمل - NNK با گروه NNK نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین این دو گروه ($P = 0.003$) وجود دارد، اگر چه تفاوت معنی‌داری بین گروه مکمل - NNK و گروه‌های مکمل ($P = 0.952$)

جدول ۳. مقایسه میانگین تغییرات نسبی ژن سایکلین D1 در گروه‌های NNK، کنترل، حلال، مکمل و مکمل-NNK به روش توکی ($\alpha \leq 0.05$)

گروه	گروه‌ها	خطای معیار	Sig
NNK	حلال	۲/۹۲۷	۰/۰۰۱
مکمل-NNK	NNK	-۲/۵۴۵	۰/۰۰۳
	حلال	۰/۳۸۲	۰/۹۷۶
	مکمل	۰/۴۶۰	۰/۹۵۲
مکمل	کنترل	۰/۱۹۲	۰/۹۹۹
	حلال	-۰/۰۵۵	۱/۰۰۰

نمودار ۱. نمودار ستونی مقایسه میانگین تغییرات نسبی ژن سایکلین D1 بافت ریه در گروه‌های NNK (N)، حلال (V)، کنترل (C)، مکمل (S) و مکمل-NNK (SN). * تفاوت معنی‌دار SN با NNK ($P = 0.003$)

۴. بحث

شود. نانوکپسول سیاه‌دانه و ترکیبات آن به علت برخورداری از خاصیت ضدالتهابی و آنتی‌اکسیدانی، قادر به مهار تکثیر سلولی سلول‌های توموری ریه [۱۲] و تنظیم کاهشی عوامل پیش التهابی و میانجی‌گرهای تکثیر سلولی مانند Cox-2 (Cyclooxygenase) و NF- κ B (nuclear factor kappa) (Protein kinase B) AKT (PKB) و Cyclin D1 (Tumor necrosis factor) TNF در شرایط پاتولوژیک است [۱۳]. به نظر می‌رسد تفاوت در بیان ژن Cyclin D1 با شرایط مختلف فیزیولوژیک و پاتولوژیک مرتبط باشد. برخی معتقدند که ممکن است اثر سیاه‌دانه و عناصر اصلی آن بر مهار مسیرهای منتهی به تومور به تنهایی

مقایسه تغییرات نسبی ژن سایکلین D1 بافت ریه رت های ویستار در این پژوهش نشان داد که تزریق نانوکپسول سیاه‌دانه در بافت سالم ریه رت‌های ویستار موجب تغییرات نسبی معنی‌داری در ژن سایکلین D1 در گروه مکمل نسبت به گروه حلال نمی‌شود. اگر چه این مکمل می‌تواند از طریق سرکوب فاکتور التهابی اینترلوکین ۶ و عامل رونویسی STAT3 موجب تنظیم کاهشی بیان ژن‌های تنظیمی مسیر سیگنالینگ STAT3 در شرایط پاتولوژیک شود [۱۰] که از جمله ژن‌های این مسیر می‌توان به سایکلین D1 اشاره کرد که سبب جلوگیری از تکثیر سلولی از طریق فاز G1 به S می

مؤثر واقع نشود، بنابراين جهت اثربخشي بيشتر اين مكمّل، تجويز داروهای ضدالتهابی همراه با اين مكمّل را توصيه می کنند. چنانچه نشان داده شد که ترکيب داروی تموزولوميد (Temozolomide) و تیموکينون موجب جلوگيري از آسیب DNA از طريق توقف چرخه سلولی از فاز G2 به M و مهار بيان ژن بکلين يك (Beclin 1) می شود [۲۲].

تکثير کنترل نشده سلولی، از جمله ده شاه کليد اصلی سرطانها است، که افزايش اندازه تومور، درمان بیماری را مشکل می کند. نشان داده شده است که سياهدانه از تکثير بسياری از سلولهای سرطانی جلوگيري می کند. بر اين اساس، سياهدانه سبب وقفه چرخه سلولی از فاز G1/S می شود و با افزايش پروتئينهای P21 و P27 سبب کاهش اين مسير می شود. اين عمل منجر به کاهش رسپتورهای آندروژنی، سايکلين A و فاکتور رونويسی E2 (E2 Transcription Factor) که در انتقال فاز G1/S چرخه سلولی نقش دارند، می شود [۲۳]. اگر چه در اين پژوهش عملکرد نانوکپسول سياهدانه بر سايکلين D1 و فاز G1 به S چرخه سلولی بر اساس عملکرد اين ژن مدنظر است ولی اين مكمّل می تواند بر فازهای مختلف سلولی نيز اثرگذار باشد. چنانچه نشان داده شد که تیموکينون (اجزای اصلی سياهدانه) سبب توقف چرخه سلولی از فاز G2/M در سلولهای سرطانی سينه شده که اين عمل با افزايش سطح بيان سرکوب کننده تومور P53 و کاهش ميزان و کاهش پروتئين سايکلين B1 همراه بوده است. اين نتايج نشان می دهد که سياهدانه قادر به توقف فازهای مختلف چرخه سلولی می شود. افزايش بيان سرکوب کننده تومور P53 و فاکتور رونويسی P21 از جمله سازوکارهایی است که اين مكمّل می تواند از اين طريق سبب توقف چرخه سلولی شود [۲۴].

در روند چرخه سلولی، برخی فرآورده های پروتئينی مربوط به ژن های خاصی در تنظيم دقيق چرخه سلولی نقش های تقويت کنندگی يا مهارکنندگی چرخه را از خود نشان

می دهند. سايکلين ها و پروتئين کينازهای وابسته به سايکلين ((Cycline Dependent Protein Kinases) (CDKs)) در ارتباط با يکديگر، در فرايند ورود به مراحل متنوع چرخه سلولی به عنوان آغازگرهای اصلی برای عبور از يك مرحله به مرحله ديگر چرخه، از اهميت خاصی برخوردار هستند. گفته می شود که تقريباً در همه سرطان های انسانی سطح CDKs و سايکلين ها تنظيم افزايشی دارند. سياهدانه می تواند از طريق سيگنال های سرکوبگر رشدی موجب مهار اين دو فاکتور شود. چنانچه در سلول های سرطانی کولون انسانی، سياهدانه با کاهش فعاليت CDKs و سايکلين ها سبب توقف چرخه سلولی در فاز G1 شده است [۲۴].

بنابراين با توقف چرخه سلولی در فاز G1، مهار کننده P21 افزايش يافته و در نتيجه بيان CDK کاهش می يابد. به عبارت ديگر افزايش بيان P21 سبب بلوک CDK2، CDK4 و CDK6 و در نهايت توقف چرخه سلولی در فاز G1 می شود [۲۴]. از طرفی تغييرات نسبی ژن سايکلين D1 بافت ريه رت ها در گروه مكمّل NNK+ نسبت به گروه NNK در اين پژوهش نشان داد که تفاوت معنی داری بين اين دو گروه ($P = 0/003$) وجود دارد، در حالی که تفاوت معنی داری در مقايسه اين گروه نسبت به گروه مكمّل ($P = 0/952$) و حلال ($P = 0/976$) مشاهده نشد. اين امر بيانگر اثر نانوکپسول سياهدانه، مهار اثرگذاري NNK و مهار مسيرهایی است که NNK می تواند موجب فعال سازی آن شود. از جمله مسيرهای منتهی به توموری که NNK می تواند اثرات کارسينوژنی خود را اعمال کند می توان به مسير سيگنالینگ NF- κ B و STAT3 اشاره کرد. تکثير بيش از حد سلولی می تواند از جمله پاسخ های التهابی مزمن کارسينوژن NNK از طريق فعال سازی اين مسيرهای منتهی به تومور شود [۵]. بررسی اثرات نانوکپسول سياهدانه در اين پژوهش نشان داد که تزريق نانوکپسول سياهدانه در بافت ريه رت های ويستار قرار گرفته در معرض NNK سبب

[۲۷]. بنابراين با توجه به تأثير نانوكپسول سياه‌دانه بر کاهش تغييرات نسبى ژن سايكلىن D1 نقش مؤثر نانوكپسول سياه دانه در فعاليت چرخه سلولى بافت ريه در معرض NNK از اهميت خاصى برخوردار است. از اين رو تنظيم كاهشى سايكلىن D1 از مسير سيگنالينگ JAK-STAT3 مى‌تواند توانايى نانوكپسول سياه‌دانه را در کاهش توقف سلولى در فاز G1 به S توجه نمايد و درنهايت تأثير بازدارنده‌هاى متنوعى نظير P21, P53 و ... را نيز نبايد از نظر دور داشت كه اثربخشي نانوكپسول سياه‌دانه بر اين بازدارنده‌ها موجب تنظيم كاهشى سايكلىن D1 شده و ممكن است در اثر اين کاهش، سرعت عبور از مرحله G1 به S چرخه سلولى نيز در سلول‌هاى قرار گرفته در معرض NNK کاهش يابد. لازم به ذكر است كه اغلب سلول‌ها بعد از مرحله‌ى تقسيم وارد مرحله‌ى G1 مى‌شوند. سنتز و جمع‌آورى RNA، آنزيم‌ها و پروتين‌هاى تنظيمى سنتز DNA، از جمله اعمال سلول در اين مرحله است [۲۸]. بر اين اساس با توجه به عملکرد سايكلىن D1 به عنوان آغازگرهاى اصلى براى عبور از يك مرحله به مرحله ديگر (فاز G1 به S) در چرخه سلولى، نقش مهارى نانوكپسول سياه‌دانه در بافت‌هاى در معرض مواد سرطانى كه سرعت چرخه سلولى در اين بافت‌ها افزايش مى‌يابد، از اهميت خاصى برخوردار است.

۵. نتيجه‌گيرى

با توجه به يافته‌هاى اين پژوهش مبنى بر مهار ژن سايكلىن D1 به عنوان كنترل كننده چرخه سلولى در فاز G1 به S از طريق نانو كپسول سياه‌دانه با دوزهاى معين، به نظر مى‌رسد بتوان از نقش ضدالتهابى و ضدتكثيرى اين مكمل، در مهار برخى مسيرهاى منتهى به تومور، در بيمارى‌هاى التهابى سود جست.

كاهش تغييرات نسبى ژن سايكلىن D1 شده است. از جمله دلايل کاهش اين تغييرات نسبى مى‌توان به کاهش و بلوك عامل التهابى IL-6 و فسفوريلاسيون STAT3 اشاره كرد. کاهش IL-6 مى‌تواند موجب فسفوريلاسيون STAT3 شده و درنهايت سبب تنظيم كاهشى ژن‌هاى فرودست در چرخه سلولى از جمله سايكلىن D1 شود [۲۵]. از آنجا كه فسفوريلاسيون STAT3 نقشى اساسى در تكثير و بقاى سلولى از طريق سايكلىن D1 بازى مى‌كند، بنابراين با توجه به کاهش فعاليت ژن سايكلىن D1 از طريق نانوكپسول سياه دانه در رت‌هاى ويستار در معرض كارسينوژن NNK، مى‌توان بيان كرد كه نانوكپسول سياه‌دانه مى‌تواند از طريق سيگنالينگ STAT3 موجب بلوك و يا کاهش سطح IL-6 و STAT3 شده و درنهايت سبب کاهش فعاليت ژن سايكلىن D1 شود. اثر نانوكپسول سياه‌دانه بر اين مسير سيگنالينگ مى‌تواند به سازوكارهاى چندگانه‌اى مربوط باشد كه سبب سرکوب فعاليت اين مسير سيگنالينگ و در نتيجه کاهش فعاليت ژن سايكلىن D1 شود. همكارى بين تيروزين كيناز JAK و Src نيز از جمله سازوكارهاى است كه مى‌تواند سبب فسفوريلاسيون STAT3 شده و قطع ارتباط آن مى‌تواند منجر به کاهش فسفوريلاسيون STAT3 شود [۲۵]. از ديگر سازوكارهاى تأثير سياه‌دانه بر سيگنالينگ JAK-STAT3 و بيان سايكلىن D1 مى‌توان به بيان پروتين تيروزين فسفاتازها (PTPase, protein tyrosine phosphatase) اشاره كرد. انواع پروتين تيروزين فسفاتازها مى‌توانند در سيگنالينگ منفى اين مسير نقش داشته باشند. يكي از اين تيروزين فسفاتاز SH-PTP2 است كه از طريق تعديل عملکرد IL-6 سبب سيگنالينگ منفى اين مسير مى‌شود [۲۶]. چنانچه همسو با يافته‌هاى اين پژوهش نشان داده شد كه تحريك بيان پروتين SH-PTP2 در سلول‌هاى سرطانى با تنظيم كاهشى فسفوريلاسيون STAT3 و به تبع آن کاهش بيان سايكلىن D1 مرتبط است

مشارکت نویسندگان

هر دو نویسنده به نسبت مساوی در طراحی، جمع‌آوری اطلاعات، نوشتن، ویرایش و تحلیل آماری این مقاله سهیم بوده‌اند.

تقدیر و تشکر

تشکر و قدردانی خود را از گروه فیزیولوژی ورزشی دانشگاه مازندران بخصوص جناب آقای دکتر شادمهر میردار اعلام نمایم.

تضاد منافع

این مقاله فاقد هر گونه تضاد منافع است.

منابع

1. Jemal A and et al. Global cancer statistics. *CA: A Cancer J. Clinicians* 2011; 61 (2): 69-90.
2. Vargas, AJ and CC. Harris, Biomarker development in the precision medicine era: lung cancer as a case study. *Nature Reviews Cancer*. 2016; 16(8): 525-37.
3. Miller A and et al. Differential involvement of gp130 signalling pathways in modulating tobacco carcinogen-induced lung tumorigenesis. *Oncogene* 2015; 34(12): 1510-9.
4. Ge G.-Z, T.-R. Xu and C. Chen. Tobacco carcinogen NNK-induced lung cancer animal models and associated carcinogenic mechanisms. *ABBS*. 2015; 47(7): 477-87.
5. Moses C and et al. Hallmarks of cancer: the CRISPR generation. *European Journal of Cancer* 2018; 93: 10-8.
6. Fu M and et al. Minireview: Cyclin D1: normal and abnormal functions. *Endocrinol*. 2004; 145(12): 5439-47.
7. Burandt E and et al. Cyclin D1 gene amplification is highly homogeneous in breast cancer. *Breast Cancer* 2016; 23(1): 111-9.
8. Koka PS and et al. Studies on molecular mechanisms of growth inhibitory effects of thymoquinone against prostate cancer cells: role of reactive oxygen species. *Experimental Biology and Medicine* 2010; 235(6): 751-60.
9. Sayed AAR and M Morcos. Thymoquinone decreases AGE induced NF B activation in proximal tubular epithelial cells. *Phytotherapy Res*. 2007; 21(9): 898-9.
10. Li F, Rajendran P and Sethi G. Thymoquinone inhibits proliferation, induces apoptosis and chemosensitizes human multiple myeloma cells through suppression of signal transducer and activator of transcription 3 activation pathway. *British J. Pharmacol*. 2010; 161(3): 541-54.
11. Attoub S and et al. Thymoquinone as an anticancer agent: evidence from inhibition of cancer cells viability and invasion in vitro and tumor growth in vivo. *Fundamental & Clinical Pharmacol*. 2013; 27(5): 557-69.
12. Roepke M and et al. Lack of p53 augments thymoquinone-induced apoptosis and caspase activation in human osteosarcoma cells. *Cancer Biology & Therapy* 2007; 6(2): 160-9.
13. Sethi G, Ahn KS and Aggarwal BB. Targeting nuclear factor- B activation pathway by thymoquinone: role in suppression of antiapoptotic gene products and enhancement

- of apoptosis. *Molecular Cancer Res.* 2008; 6(6): 1059-70.
14. Lao Y and et al. Formation and accumulation of pyridyloxobutyl DNA adducts in F344 rats chronically treated with 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone and enantiomers of its metabolite, 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol. *Chemical Research in Toxicol.* 2007; 20(2): 235-45.
15. Maertens LA and et al. Formation and distribution of NNK metabolites in an isolated perfused rat lung. *Drug Metabolism and Disposition* 2010; 38(5): 752-60.
16. Manju S and et al. Antibacterial, antibiofilm and cytotoxic effects of *Nigella sativa* essential oil coated gold nanoparticles. *Microbial Pathogenesis* 2016; 91: 129-35.
17. Burits M and Bucar F. Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. *Phytotherapy Res.* 2000; 14(5): 323-8.
18. Al-Ghamdi MS. Protective effect of *Nigella sativa* seeds against carbon tetrachloride-induced liver damage. *The American J. Chinese Medicine* 2003; 31(05): 721-8.
19. Maryam K, Shakeri S and Kiani K. Preparation and in vitro investigation of antigastric cancer activities of carvacrol-loaded human serum albumin nanoparticles. *IET Nanobiotechnol.* 2015. 9(5): 294-9.
20. Zhao L and Wang W. miR-125b suppresses the proliferation of hepatocellular carcinoma cells by targeting Sirtuin7. *International J. Clinical and Experimental Medicine* 2015; 8(10): 18469.
21. Sayers EW and et al. GenBank. *Nucleic Acids Res.* 2018; 47 (D1): D94-D99.
22. Khazaei M and Pazhouhi M. Temozolomide-Mediated Apoptotic Death Is Improved by Thymoquinone in U87MG Cell Line. *Cancer Investigation* 2017; 35(4): 225-36.
23. Kaseb, AO and et al. Androgen receptor- and E2F-1-targeted thymoquinone therapy for hormone-refractory prostate cancer. *Cancer Res.* 2007; 67(16): 7782-8.
24. Gali-Muhtasib HU and et al. Molecular pathway for thymoquinone-induced cell-cycle arrest and apoptosis in neoplastic keratinocytes. *Anti-Cancer Drugs* 2004; 15(4): 389-99.
25. Schneider-Stock R and et al. Thymoquinone: fifty years of success in the battle against cancer models. *Drug Discovery Today* 2014; 19(1): 18-30.
26. Ohtani T and et al. Dissection of signaling cascades through gp130 in vivo: reciprocal roles for STAT3-and SHP2-mediated signals in immune responses. *Immunity* 2000; 12(1): 95-105.
27. Dergarabetian E and et al. Thymoquinone induces apoptosis in malignant T-cells via generation of ROS. *Front Biosci (Elite Ed)*. 2013, 5: p: 706-19.
28. Wang JD and Levin PA. Metabolism, cell growth and the bacterial cell cycle. *Nature Reviews Microbiol.* 2009; 7(11): 822-7.

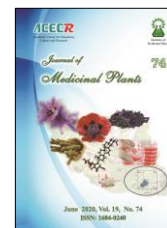
How to cite this article: Nikzad MB, Mirdar Sh. Inhibitory effects of *Nigella sativa* nano-capsule on the expression of cyclin d1 in the lungs of wistar rats exposed to nicotine-derived nitrosamine ketone. *Journal of Medicinal Plants* 2020; 19(74): 118-128. doi: 10.29252/jmp.19.74.118



Institute of
Medicinal Plants

Journal of Medicinal Plants

Journal homepage: www.jmp.ir



Research Article

Inhibitory effects of *Nigella sativa* nano-capsule on the expression of cyclin D1 in the lungs of wistar rats exposed to nicotine-derived nitrosamine ketone

Mohammadbagher Nikzad^{1,*}, Shadmehr Mirdar²

¹ Department of Mathematics, University of Science and Technology of Mazandaran, Iran

² Department of Exercise Physiology, Faculty of Physical Education and Sport Sciences, University of Mazandaran, Babolsar, Iran

ARTICLE INFO

Keywords:

Cell cycle

Cyclin D1 gene

Lung cancer

Nicotine

Nitrosamine Ketone

Nigella sativa nano-capsule

ABSTRACT

Background: Researchers argue that supplements are somewhat capable of influencing the lung tissue exposed to smoking carcinogens through cell cycle. Cyclin D1 is a gene involved in cell cycle. **Objective:** This study aimed to investigate the effects of 12-week injection of *Nigella sativa* nano-capsule on the expression of Cyclin D1 of the lung tissue of the rats receiving exposure to Nicotine-Derived Nitrosamine Ketone. **Methods:** 46 Wistar rats were assigned into five groups: NNK, Supplement, and Supplement, + NNK, Control and Vehicle group. 125 µg/kg body weight of *Nigella sativa* nano-capsule supplement was injected subcutaneously into the Supplement and Supplement NNK groups once a week. NNK and Vehicle groups received a weekly dose of 12.5 mg/kg NNK and distilled water for 12 weeks through subcutaneous injection. After isolating the lung tissue, the expression of the Cyclin D1 gene was measured using Real Time PCR-ABI. One-way ANOVA parametric analysis and Tukey post hoc test were used to analyze the data at the significant level of $P \leq 0.05$. **Results:** According to the results, the expression of Cyclin 1 gene was relatively reduced in Supplement NNK ($P = 0.003$) and Vehicle ($P = 0.001$) groups in comparison to the NNK group. Nevertheless, no significant difference was observed among the Supplement, Vehicle, and Control groups. We believe that *Nigella sativa* nano-capsule supplement reduced the relative changes of Cyclin 1 in the lung tissues exposed to carcinogen NNK. **Conclusion:** Apparently, this supplement is capable of reducing Cyclin 1 level in cell cycle; hence, it can reduce the carcinogenic effects of NNK and the negative effects of smoking among other therapeutic methods.

Abbreviations: NNK, Nicotine-derived nitrosamine ketone; CDKs, Cyclin-dependent kinase; STAT3, Signal transducer and activator of transcription 3; NF-KB, Tumor necrosis factor; TNF, Tumor necrosis factor; GAPDH, Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

* Corresponding author: mnikzad@mazust.ac.ir

doi: [10.29252/jmp.19.74.118](https://doi.org/10.29252/jmp.19.74.118)

Received 6 December 2018; Received in revised form 14 February 2019; Accepted 18 February 2019

© 2020. Open access. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>)