

فصلنامه گیاهان دارویی

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

مقاله تحقیقاتی

اثر مهاری یک دوره تزریق نانو کپسول سیاه‌دانه بر بیان ژن سایکلین 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، مدول و فعال کننده پیام رونویسی-۳؛ NF- κ B، 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

الفای 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 نیچلاستیوا (سیاه‌دانه یا زیره سیاه) اشاره کرد که ممکن است موجب جلوگیری از پیشرفت چرخه سلولی و افزایش آپوپتوز 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 پي القاي كارسينوژن 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 آزمایشگاهی (جهت تطابق فيزيولوژيک) $1/4 \pm 22$ درجه سانتى‌گراد و رطوبت نسبى $55 \pm$ درصد و چرخه روشنایی-تاريكى ۱۲ ساعته (روشنایی ۶ صبح و خاموشی 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 تايى شامل گروه مكمل (S) (supplement)، گروه NNK (N) مکمل + NNK (S.N) supplement - و NNK، گروه حلال با تزريق آب مقطر (V) Vehicle و يك گروه ۶ تايى به عنوان گروه كنترل (C) تقسيم شدند. تزريق NNK در گروه S.N و گروه N، به صورت زير جلدی يك بار در هفته، به ميزان ۱۲/۵ ميلي‌گرم 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 مى‌دهد در صورتى كه دوز تزريقى NNK در محدوده بين ۰/۰۹ تا ۵۰ ميلي‌گرم بر حسب كيلوگرم به صورت دوز تزريقى تك واحدی و يا چند بار در هفته باشد، سبب ايجاد تومورزاى و اختلال در DNA مى‌شود [۱۵]. آب مقطر نیز با مقدار و شرايط مشابه به صورت يك‌بار در هفته به گروه حلال تزريق شد. دانه‌هاى گياه سياه دانه نیز در آبان ۱۳۹۶

D1 پژوهشى يافت نشده است؛ هر چند برخى مطالعات به اثرات ضدسرطانى و مهار چرخه سلولى سياه‌دانه و تيموكينون در تومورهاى سرطانى پرداخته‌اند [۱۱، ۱۰]، لذا بررسى پاسخ ضدالتهابى نانو كپسول سياه‌دانه و اثرات حفاظتى آن بر مسيرهاى منتهى به تومور ناشى از چرخه سلولى مستلزم مطالعه است. به نظر مى‌رسد در خلال تأثير كارسينوژن‌ها بر بافت‌ها و مسيرهاى منتهى به تومور، استفاده از مكمل‌هاى آنتى‌اكسيدانتى و ضدالتهابى مانند نانو كپسول سياه‌دانه كه ممكن است موجب جلوگيرى از پيشرفت چرخه سلولى شود [۸] راهكارى مناسب باشد. اين مكمل به علت برخوردارى از خاصيت ضدالتهابى، آنتى‌اكسيدانتى تركيبات آن قادر به مهار تكثير سلولى سلول‌هاى تومورى ريه [۱۲] و تنظيم كاهشى عوامل پيش التهابى و ميانجى گره‌هاى تكثير سلولى مانند Cox-2 (Cyclooxygenase), Protein) AKT , (nuclear factor kappa) NF- κ B TNF (Tumor necrosis factor) و (PKB) (kinase B در شرايط پاتولوژيک مى‌شود [۱۳] در حالى كه اثر آن در مسير منتهى به تومور از طريق مهار بيان ژن سايكلين D1 نياز به بررسى بيشترى است. اگر چه ممكن است سياه دانه داراى ويژگى ضدالتهابى باشد و سبب كاهش التهاب شود [۱۳]، اما اين ويژگى در مورد نانو كپسول سياه‌دانه و اثر آن بر مسيرهاى منتهى به تومور چرخه سلولى از طريق كارسينوژن‌هاى محيطى بخصوص NNK روشن و واضح نيست. از سوى ديگر با توجه به يافته‌هاى يادشده مبنى بر افزايش فعاليت مسيرهاى التهابى در اثر مواد كارسينوژنيك مانند NNK [۴] اين پرسش مطرح است كه آيا تزريق نانو كپسول سياه دانه همزمان با تزريق كارسينوژن NNK، بر مهار مسيرهاى منتهى به تومور از طريق مهار ژن سايكلين D1 مؤثر است؟ از اينرو در پژوهش حاضر محقق كوشيده است تا تأثير 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] بدین ترتیب که ۵۵ گرم پودر سیاه‌دانه با ترازوی با دقت $0/001$ 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 20 تا 25 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 60 درجه سانتی‌گراد) حلال آن حذف شد [۱۸].

۲.۲. تهیه نانو کپسول سیاه‌دانه

پس از آماده‌سازی عصاره هیدروالکلی سیاه‌دانه جهت نانو کپسوله 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 نانو کپسول، 50 میلی‌گرم آلومین سرم انسانی در داخل 1 میلی‌لیتر آب با شرایط $PH = 7/4$ حل شد و $0/5$ درصد از حجم توپین 80 به نمونه اضافه شد. این محلول با سرعت 300 دور بر دقیقه به مدت 30 دقیقه با استفاده از مگنت هم زده شد. سپس 4 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 نانو کپسول سیاه‌دانه، این مکمل به صورت یک روز در هفته و به میزان 125 میکروگرم بر کیلوگرم وزن بدن به صورت زیر جلدی به گروه‌های مکمل و مکمل + NNK تزریق شد. از آنجاکه شکل نانو 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 $50-10$ میکروگرم نانو سیاه‌دانه با تزریق 100 میکروگرم روغن سیاه‌دانه در سلول‌های سرطانی ریه A549 مورد مقایسه قرار گرفت. نتایج نشان داد که دوزهای مختلف پایین نانو تفاوت معنی‌داری با دوز 100 میکروگرم روغن سیاه‌دانه در کاهش سلول‌های سرطانی ریه دارد. ارزیابی MTT نشان داد هر چه دوز نانو به 50 میکروگرم نزدیک‌تر شود، کاهش بیشتری در سلول‌های سرطانی ریه دیده می‌شود [۱۶].

در این پژوهش برای اولین بار از دوز 125 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 ازت مایع فریز و در دمای -70 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 سريال غلظت مشخص شد. سپس چرخه‌هاى واكنشى Real-time PCR بر روى cDNA توليدشده جهت تكثير اين ژن با برنامه حرارتى Real-time PCR-ABI با دو دماى ۹۵ و ۶۰ درجه سانتى‌گراد راند شد [۲۰]. از GAPDH: Glyceraldehyde-3-(phosphate dehydrogenase) به عنوان ژن مرجع سايكلين D1 استفاده شد (جدول ۱). نتايج به دست آمده بر اساس فرمول پافل (Paffel formula) و نرم‌افزار Excel مورد تجزيه و تحليل قرار گرفت. توالى پرايمرهاى استفاده شده براى ژن سايكلين D1 و ژن مرجع [۲۱] در جدول ۱ آمده است. براى تعيين بيان نسبي هر ژن نسبت به ژن مرجع از نفاصل داده‌هاى سيكل آستانه ژن هدف و ژن مرجع استفاده شد و براى تعيين ميزان تغييرات ژن هدف در گروه مورد مطالعه نسبت به گروه كنترل، فرمول $-\Delta\Delta CT$ ۲ مورد استفاده قرار گرفت [۲۰].

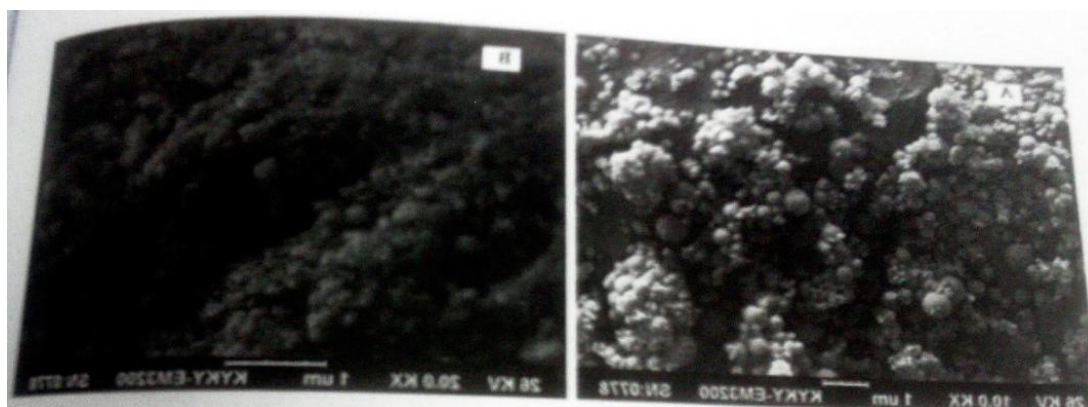
تدريجى به محلول اضافه شد. در ادامه ۱۱۷ ميكروليتر گلوٲارآلدهيد به نمونه اضافه شد. اين عمل تحت هم زدن ۵۰۰ دور بر دقيقه انجام شد و به مدت ۲۴ ساعت ادامه يافت [۱۹]. با اضافه شدن عصاره سياه‌دانه، ساختار كروى باقى مانده و به علت حضور عصاره مقدارى به يكديگر مى چسبند كه اين موضوع تايبدى بر حضور عصاره در درون نانوكپسول‌هاى سنتزى است (شكل ۱). بر اين اساس ميزان استحصال نانوكپسول سياه‌دانه از ۶۰۰ ميكروليتر عصاره با وزن ۰/۵۲۲ گرم، معادل ۰/۰۲۹ گرم بود. براى بررسى صحت سنتز نانوكپسول‌هاى آلبومين با استفاده از روش پيشنهادهى از روش ميكروسكوپ الكترونى رويشى استفاده شد. نانوكپسول سياه دانه يك روز در هفته، به مدت ۱۲ هفته و به ميزان ۱۲/۵ ميكروگرم بر كيلوگرم وزن بدن به صورت تزريق زير جلدى صورت پذيرفت.

۳.۲. بررسى بيان ژن سايكلين D1

پروتكل استخراج RNA از سلول‌هاى بافت ريه رت هاى در معرض NNK، پس از خرد كردن و ليز بافت‌ها و ليز سلول‌ها در يك ميلي‌ليتر از محلول RNX با استفاده از دستگاه هموژنايزر انجام شد. بر اساس پروتكل ترايزول (Trizol) مراحل استخراج RNA انجام شد. جهت سنتز cDNA ژن سايكلين D1 از RNAهاى استخراج شده، از دستورالعمل كيت 100Reaction K1622 شركت ترموساينتيفيك امريكا (—cDNA Synthesis Kits

۴.۲. آناليز داده‌ها

يافته‌هاى پژوهش حاضر در تحليل واريانس يك طرفه حاكى از آن بود كه بين تغييرات نسبي ژن سايكلين D1 بافت ريه رت‌هاى ويستار در پنج گروه تفاوت معنى‌دارى ($F = ۸/۰۶۲, \alpha \leq ۰/۰۵, Sig = ۰/۰۰$) وجود داشت (جدول ۲).



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			

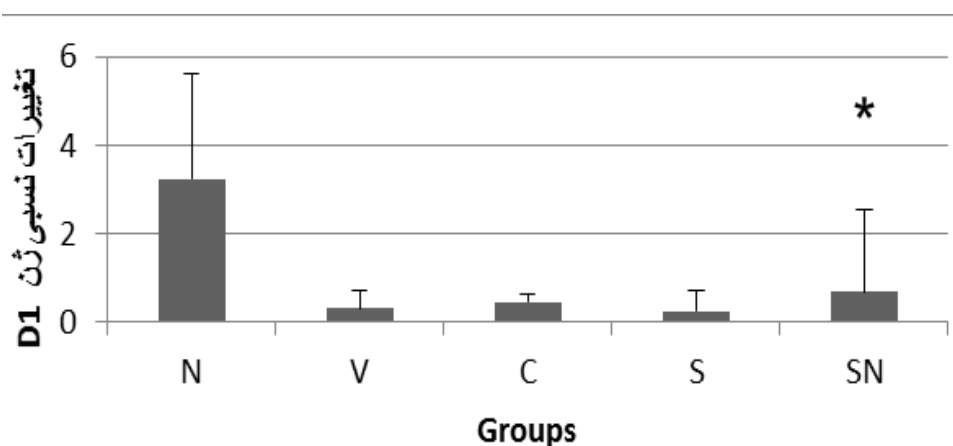
۳. نتایج

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 کاهش عوامل پیش التهابی و میانجی‌گرهای تکثیر سلولی مانند Cox-2 (Cyclooxygenase) و NF- κ B (nuclear factor kappa B) (Protein kinase B) AKT (PKB) در شرایط Tumor necrosis factor (TNF) و Cyclin D1 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 کاهش 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

مى دهند. سايكلينها و پروتئين كينازهاى وابسته به سايكليين ((Cycline Dependent Protein Kinases) (CDKs)) در ارتباط با يكديگر، در فرايند ورود به مراحل متنوع چرخه سلولى به عنوان آغازگرهاى اصلى براى عبور از يك مرحله به مرحله ديگر چرخه، از اهميت خاصى برخوردار هستند. گفته مى شود كه تقريباً در همه سرطانهاى انساني سطح CDKs و سايكلينها تنظيم افزايشى دارند. سياهدانه مى تواند از طريق سيگنالهاى سرکوبگر رشدى موجب مهار اين دو فاکتور شود. چنانچه در سلولهاى سرطاني كولون انساني، سياهدانه با کاهش فعاليت CDKs و سايكلينها سبب توقف چرخه سلولى در فاز G1 شده است [24]. بنا بر اين با توقف چرخه سلولى در فاز G1، مهار كننده P21 افزايش يافته و در نتيجه بيان CDK كاهش مى يابد. به عبارت ديگر افزايش بيان P21 سبب بلوك CDK2، CDK4 و CDK6 و در نهايت توقف چرخه سلولى در فاز G1 مى شود [24]. از طرفى تغييرات نسبي ژن سايكليين D1 بافت ريه رت ها در گروه مكمل NNK+ نسبت به گروه NNK در اين پژوهش نشان داد كه تفاوت معنى دارى بين اين دو گروه ($P = 0/003$) وجود دارد، در حالى كه تفاوت معنى دارى در مقايسه اين گروه نسبت به گروه مكمل ($P = 0/952$) و حلال ($P = 0/976$) مشاهده نشد. اين امر بيانگر اثر نانوكپسول سياهدانه، مهار اثر گذارى NNK و مهار مسيرهايى است كه NNK مى تواند موجب فعال سازى آن شود. از جمله مسيرهايى منتهى به تومورى كه NNK مى تواند اثرات كارسينوژنى خود را اعمال كند مى توان به مسير سيگنالينگ NF- κ B و STAT3 اشاره كرد. تكثير بيش از حد سلولى مى تواند از جمله پاسخهاى التهابى مزمن كارسينوژن NNK از طريق فعال سازى اين مسيرهايى منتهى به تومور شود [5]. بررسى اثرات نانوكپسول سياهدانه در اين پژوهش نشان داد كه تزريق نانوكپسول سياهدانه در بافت ريه رت هاى ويستار قرار گرفته در معرض NNK سبب

مؤثر واقع نشود، بنا بر اين جهت اثربخشى بيشتر اين مكمل، تجويز دارو هاى ضد التهابى همراه با اين مكمل را توصيه مى كنند. چنانچه نشان داده شد كه تركيب داروى تموزولوميد (Temozolomide) و تيموكينون موجب جلوگيرى از آسيب DNA از طريق توقف چرخه سلولى از فاز G2 به M و مهار بيان ژن بكليين يك (Beclin 1) مى شود [22]. تكثير كنترل نشده سلولى، از جمله ده شاه كلید اصلی سرطانها است، كه افزايش اندازه تومور، درمان بيمارى را مشكل مى كند. نشان داده شده است كه سياهدانه از تكثير بسيارى از سلولهاى سرطاني جلوگيرى مى كند. بر اين اساس، سياهدانه سبب وقفه چرخه سلولى از فاز G1/S مى شود و با افزايش پروتئينهاى P21 و P27 سبب کاهش اين مسير مى شود. اين عمل منجر به کاهش رسپتورهاي آندروژنى، سايكليين A و فاکتور رونويسى E2 (E2 Transcription Factor) كه در انتقال فاز G1/S چرخه سلولى نقش دارند، مى شود [23]. اگر چه در اين پژوهش عملکرد نانوكپسول سياهدانه بر سايكليين D1 و فاز G1 به S چرخه سلولى بر اساس عملکرد اين ژن مدنظر است ولى اين مكمل مى تواند بر فازهاى مختلف سلولى نيز اثر گذار باشد. چنانچه نشان داده شد كه تيموكينون (اجزای اصلی سياهدانه) سبب توقف چرخه سلولى از فاز G2/M در سلولهاى سرطاني سينه شده كه اين عمل با افزايش سطح بيان سرکوب كننده تومور P53 و کاهش ميزان و کاهش پروتئين سايكليين B1 همراه بوده است. اين نتايج نشان مى دهد كه سياهدانه قادر به توقف فازهاى مختلف چرخه سلولى مى شود. افزايش بيان سرکوب كننده تومور P53 و فاکتور رونويسى P21 از جمله سازوكارهايى است كه اين مكمل مى تواند از اين طريق سبب توقف چرخه سلولى شود [24]. در روند چرخه سلولى، برخى فرآوردههاى پروتئينى مربوط به ژن هاى خاصى در تنظيم دقيق چرخه سلولى نقش هاى تقويت كنندگى يا مهار كنندگى چرخه را از خود نشان

[۲۷]. بنابراین با توجه به تأثیر نانوکپسول سیاه‌دانه بر کاهش تغییرات نسبی ژن سایکلین D1 نقش مؤثر نانوکپسول سیاه‌دانه در فعالیت چرخه سلولی بافت ریه در معرض NNK از اهمیت خاصی برخوردار است. از این رو تنظیم کاهشی سایکلین D1 از مسیر سیگنالینگ JAK-STAT3 می‌تواند توانایی نانوکپسول سیاه‌دانه را در کاهش توقف سلولی در فاز G1 به S توجیه نماید و در نهایت تأثیر بازدارنده‌های متنوعی نظیر P21, P53 و ... را نیز نباید از نظر دور داشت که اثربخشی نانوکپسول سیاه‌دانه بر این بازدارنده‌ها موجب تنظیم کاهشی سایکلین D1 شده و ممکن است در اثر این کاهش، سرعت عبور از مرحله G1 به S چرخه سلولی نیز در سلول‌های قرار گرفته در معرض NNK کاهش یابد. لازم به ذکر است که اغلب سلول‌ها بعد از مرحله‌ی تقسیم وارد مرحله‌ی G1 می‌شوند. سنتز و جمع‌آوری RNA، آنزیم‌ها و پروتئین‌های تنظیمی سنتز DNA، از جمله اعمال سلول در این مرحله است [۲۸]. بر این اساس با توجه به عملکرد سایکلین D1 به عنوان آغازگرهای اصلی برای عبور از یک مرحله به مرحله دیگر (فاز G1 به S) در چرخه سلولی، نقش مهارى نانوکپسول سیاه‌دانه در بافت‌های در معرض مواد سرطانی که سرعت چرخه سلولی در این بافت‌ها افزایش می‌یابد، از اهمیت خاصی برخوردار است.

۵. نتیجه‌گیری

با توجه به یافته‌های این پژوهش مبنی بر مهار ژن سایکلین D1 به عنوان کنترل‌کننده چرخه سلولی در فاز G1 به S از طریق نانو کپسول سیاه‌دانه با دوزهای معین، به نظر می‌رسد بتوان از نقش ضدالتهابی و ضدتکثیرى این مکمل، در مهار برخی مسیرهای منتهی به تومور، در بیماری‌های التهابی سود جست.

کاهش تغییرات نسبی ژن سایکلین D1 شده است. از جمله دلایل کاهش این تغییرات نسبی می‌توان به کاهش و بلوک عامل التهابی IL-6 و فسفوریلاسیون STAT3 اشاره کرد. کاهش IL-6 می‌تواند موجب فسفوریلاسیون STAT3 شده و در نهایت سبب تنظیم کاهشی ژن‌های فرودست در چرخه سلولی از جمله سایکلین D1 شود [۲۵]. از آنجا که فسفوریلاسیون STAT3 نقشی اساسی در تکثیر و بقای سلولی از طریق سایکلین D1 بازی می‌کند، بنابراین با توجه به کاهش فعالیت ژن سایکلین D1 از طریق نانوکپسول سیاه‌دانه در رت‌های ویستار در معرض کارسینوژن NNK، می‌توان بیان کرد که نانوکپسول سیاه‌دانه می‌تواند از طریق سیگنالینگ STAT3 موجب بلوک و یا کاهش سطح IL-6 و STAT3 شده و در نهایت سبب کاهش فعالیت ژن سایکلین D1 شود. اثر نانوکپسول سیاه‌دانه بر این مسیر سیگنالینگ می‌تواند به سازوکارهای چندگانه‌ای مربوط باشد که سبب سرکوب فعالیت این مسیر سیگنالینگ و در نتیجه کاهش فعالیت ژن سایکلین D1 شود. همکاری بین تیروزین کیناز JAK و Src نیز از جمله سازوکارهایی است که می‌تواند سبب فسفوریلاسیون STAT3 شده و قطع ارتباط آن می‌تواند منجر به کاهش فسفوریلاسیون STAT3 شود [۲۵]. از دیگر سازوکارهای تأثیر سیاه‌دانه بر سیگنالینگ JAK-STAT3 و بیان سایکلین D1 می‌توان به بیان پروتئین تیروزین فسفاتازها (PTPase, protein tyrosine phosphatase) اشاره کرد. انواع پروتئین تیروزین فسفاتازها می‌توانند در سیگنالینگ منفی این مسیر نقش داشته باشند. یکی از این تیروزین فسفاتاز SH-PTP2 است که از طریق تعدیل عملکرد IL-6 سبب سیگنالینگ منفی این مسیر می‌شود [۲۶]. چنانچه همسو با یافته‌های این پژوهش نشان داده شد که تحریک بیان پروتئین SH-PTP2 در سلول‌های سرطانی با تنظیم کاهشی فسفوریلاسیون STAT3 و به تبع آن کاهش بیان سایکلین D1 مرتبط است

مشاركت نويسندگان

هر دو نويسنده به نسبت مساوى در طراحي، جمع‌آورى اطلاعات، نوشتن، ويرايش و تحليل آمارى اين مقاله سهيم بوده‌اند.

تقدير و تشكر

تشكر و قدردانى خود را از گروه فيزيولوژى ورزشى دانشگاه مازندران بخصوص جناب آقاى دكتر شادمهر ميردار اعلام نمايم.

تضاد منافع

اين 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 tumourigenesis. *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.

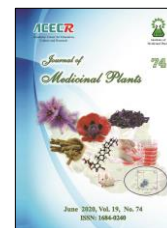
How to cite this article: Nikzad MB, Mirdar Sh. Inhibitory effects of *Nigella sativa* nano-capsule on the expression of cyclin d1 in the lungs of wistar rats exposed to nicotine-derived nitrosamine ketone. *Journal of Medicinal Plants* 2020; 19(74): 118-128. doi: 10.29252/jmp.19.74.118



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/>)