



تأثیر کروسین زعفران و دوکسوروبیسین بر ژن‌های مسیر سیگنالینگ آپوپتوز سلولی (PTEN/AKT1) در رده سلولی سرطان اپیدرموئید انسان (KB)

فرشته نیک فطرت: کارشناسی ارشد ژنتیک، گروه ژنتیک مولکولی، واحد اهر، دانشگاه آزاد اسلامی، اهر، ایران
سعید قربان: استادیار، گروه ژنتیک مولکولی، واحد اهر، دانشگاه آزاد اسلامی، اهر، ایران (* نویسنده مسئول) s_ghorbian@iau-ahar.ac.ir

چکیده

کلیدواژه‌ها

دوکسوروبیسین،
کروسین،
PTEN،
AKE،
سلول سرطان KB

زمینه و هدف: سرطان دهان ششمین سرطان شایع در جهان بوده و دومین سرطان کشنده است. یکی از راه‌های اصلی درمان این سرطان شیمی‌درمانی و ایمونوتراپی است. اما برخی از تومورها بعد از این که تحت تاثیر شیمی درمانی قرار گرفتند، احتمال عود مجدد آنها وجود دارد. بسیاری از دانشمندان اعتقاد دارند مصرف انتی اکسیدانت‌ها همزمان با مصرف شیمی دارو، ممکن است اثرات دارو را خنثی نمایند. بنابراین هدف از این مطالعه بررسی تاثیر کروسین زعفران بر عملکرد ضد سرطانی داروی دوکسوروبیسین بروی ژن‌های مسیر سیگنالینگ آپوپتوز سلولی (PTEN/AKT1) در رده سلولی سرطان اپیدرموئید انسان (KB) می باشد.

روش کار: سپس با استفاده از روش MTT assay تکثیر و یا مرگ سلولی در تیمار با کروسین و داروی دوکسوروبیسین مورد بررسی قرار گرفت. تست DAPI و DNA Ladder برای نشان دادن آپوپتوز سلولی انجام شد. پس از استخراج RNA تام و تهیه cDNA، میزان تغییرات بیان ژن‌های مرتبط با رشد و آپوپتوز سلولی (PTEN/AKT1) به روش Real-time PCR مورد سنجش قرار گرفت.

یافته‌ها: بررسی ما نشان داد که دوکسوروبیسین دارای اثر مهارتی بر روی سلول‌های سرطان دهان بوده، و توانایی القا ژن PTEN و نیز مهار بیان ژن AKT1 را دارد. علاوه بر این نتایج نشان داد که استفاده همزمان از کروسین و داروی دوکسوروبیسین تأثیر دارو را افزایش داده است.

نتیجه گیری: کروسین زعفران می تواند علاوه بر اثرات مستقیم انتی اکسیدانتی، اثرات ضد سرطانی هم بصورت سینرژیک با داروی دوکسوروبیسین بر روی رده سلول سرطانی KB داشته باشد.

تعارض منافع: گزارش نشده است.

منبع حمایت کننده: دانشگاه آزاد واحد اهر

شیوه استناد به این مقاله:
Nikfetrat F, Ghorbian S. Saffron crocin and doxorubicin apoptotic effect on the cellular signaling pathway genes (PTEN / AKT1) on human epidermoid cancer cells (KB). Razi J Med Sci. 2020;27(5):197-209.

*انتشار این مقاله به صورت دسترسی آزاد مطابق با **CC BY-NC-SA 3.0** صورت گرفته است.



Original Article

Saffron crocin and doxorubicin apoptotic effect on the cellular signaling pathway genes (PTEN / AKT1) on human epidermoid cancer cells (KB)

Fereshteh Nikfetrat, MSc, Department of Molecular Genetics, Ahar Branch, Islamic Azad University, Ahar, Iran

Saeid Ghorbian, Assistant Professor, Department of Molecular Genetics, Ahar Branch, Islamic Azad University, Ahar, Iran

(* Corresponding author) s_ghorbian@iau-ahar.ac.ir

Abstract

Background: Oral cancer is the sixth most common cancer in the world and the second deadliest cancer. One of the main ways to treat this cancer is chemotherapy and immunotherapy. However, some tumors may recur after being treated with chemotherapy. Many scientists believe that using antioxidants at the same time as chemotherapy may counteract the effects of drugs. To date, several therapeutic effects of saffron have been revealed, which are mainly related to effects on the antioxidant and anti-inflammatory properties of saffron. Doxorubicin is a tetracycline antibiotic that has anti-neoplastic activity and is considered as anti-cancer agents in chemotherapy in the treatment of cancer. The phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10 (PTEN) is a tumor suppressor gene, which involved in regulating the cell cycle and may consider as the target of many cancer drugs. The AKT Serine/Threonine Kinase 1 (AKT1) gene encodes the enzyme serine/threonine kinase, which a crucial role in the transmission of cell growth signals, possibly acting through the IGF1 receptor. Oral cancer is one of the most common cancers. saffron crocin and doxorubicin have a great effect on the prevention and treatment of cancer with an increase in the expression of apoptotic genes. However, assessment of the effects of saffron crocin with doxorubicin on the cell signaling pathway of the AKT1 and PTEN genes in the human oral epidermoid (KB) cancer cell line is necessary. Therefore, the aim of this study was to evaluate the effect of saffron crocin along with doxorubicin chemistry on the apoptotic cell signaling pathway (PTEN / AKT1) in human oral epidermoid (KB) cancer cell line.

Methods: In this case-control study, firstly, the KB cell line obtained from the Pasteur Institute Cell Bank of Iran, cultured in RPMI-1640 medium which containing 10% fetal bovine serum (FBS) and 100 mg/ml of the antibiotics penicillin and streptomycin, then incubated under 5% carbon dioxide at 37 ° C. Some KB cells were cultured in each well (12,000 to 10,000 cells per well) and after 24 hours, then controlled wells and an appropriate amount of doxorubicin was added to the each of wells. After time, the medium inside the wells was discarded and each well was replaced with 200 µl of fresh medium and 50 µl of MTT solution (2 mg / ml dissolved in PBS). Untreated cells were used as controls. The dishes were incubated at 37 ° C for 4 hours in the dark. Cell proliferation or death of cells treated with crocin and doxorubicin were evaluated using 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay. 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) and DNA-ladder assays were also performed to demonstrate the cell apoptosis. To extract RNA, the cells were lysed by trisol and transferred into DNase/RNase-free microtubes. RNA is converted to cDNA by the reverse transcriptase enzyme. M-MLV Reverse Transcriptase (made by Thermo Fisher) was applied for cDNA synthesis. The quality and quantity of RNA was evaluated with a 260/280 nm UV spectrophotometer (Nano Drop ND-1000, Thermo Fisher Scientific, USA). After total RNA extraction and cDNA synthesis, the expression changes of PTEN / AKT1-associated growth and apoptotic genes were assessed using real-time

Keywords

Doxorubicin,
Crocin,
PTEN,
AKT,
Cell line KB

Received: 10/06/2020

Published: 15/08/2020

PCR. The PTEN / AKT gene expression changes in the treated samples compared to the control sample, which was normalized by the GAPDH gene and calculated using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. All the statistical work was carried out using the SPSS (version 22, IBM, USA), the values of $p < 0.001$ were considered to be statistically significant.

Results: To evaluate the cytotoxic effect of doxorubicin and to find IC50 in KB cells, MTT assay was performed triplicate for each cell. The results showed that the IC50 in the KB cell for 24 h was about 40 Mm. After treatment with 40 μ M doxorubicin and 1000 μ M saffron crocin on cancer cells, the cells moved towards apoptosis for 24 hours and did not show an inhibition role by crocin on drug function. Our finding revealed that doxorubicin has an inhibitory effect on oral cancer cells, and it is capable of inducing proapoptotic gene (*PTEN*) as well as inhibiting *AKT1* gene expression. The use of crocin had no significant effect on doxorubicin inhibition. The results also showed that combined use of this natural antioxidant with drug chemistry significantly increased the effects of the drug.

Conclusion: Our results showed that doxorubicin has cytotoxicity effects on oral cancer cells (KB). The crocin showed a synergistic effect on effectiveness. Crocin not only has anti-cancer and antioxidant effects but can both reduce the chemotherapeutic side effects of the drug and increase anti-cancer effects. Saffron Crocin as a natural antioxidant can have both antioxidant and anti-cancer effects synergistically with doxorubicin on Human Epidermoid Cancer Cells (KB).

Conflicts of interest: None

Funding: Islamic Azad University Branch Ahar

Cite this article as:

Nikfetrat F, Ghorbian S. Saffron crocin and doxorubicin apoptotic effect on the cellular signaling pathway genes (PTEN / AKT1) on human epidermoid cancer cells (KB). Razi J Med Sci. 2020;27(5):197-209.

***This work is published under CC BY-NC-SA 3.0 licence.**

مقدمه

سرطان‌ها از دلایل مهم مرگ و میر در جهان محسوب می‌شوند. طبق آمار منتشر شده در سال ۲۰۰۸، دوازده میلیون و هفتصد هزار مورد جدید سرطان در جهان شناسایی شده و در همین سال هفت میلیون و ششصد هزار مرگ ناشی از سرطان رخ داده است. سرطان دومین علت مرگ و میر در جهان پس از بیماری‌های قلبی و عروقی به شمار می‌آید و سرطان دهان ششمین سرطان شایع آقایان و پانزدهمین سرطان شایع در میان خانم‌ها است که شامل تومورهای لب، زبان، لثه، کف دهان، کام سخت و نرم، لوزه‌ها و غدد بزاقی می‌باشد (۱). آسیب DNA بوسیله رادیواکتیوها به طور قابل اهمیتی در توسعه سرطان‌ها موثر بوده، عوامل کاهش دهنده‌ی شکل‌گیری آن‌ها می‌بایستی مخاطره‌ی سرطان را تقلیل دهند. نقش آنتی‌اکسیدان در پیشگیری و درمان سرطان‌ها توسط مطالعات بسیاری گزارش شده‌اند (۵-۲). آنتی‌اکسیدان‌ها در منابع مختلفی از غذاها یافت می‌شوند، می‌توانند در برابر سرطان‌ها اثر محافظتی داشته باشند. آنتی‌اکسیدان‌ها با کاهش رادیکال‌های آزاد در بدن، در پیشگیری از انواع سرطان‌ها نقش مهمی دارند (۲،۵،۶). پرکاربردترین بخش زعفران، چه برای مصرف روزانه غذایی و یا مصرف درمانی، کلاله آن است. ارزش درمانی کلاله خشک شده زعفران به علت وجود سه متابولیت ثانویه اصلی به نام‌های کروسین محلول در آب (مونوگلوکوزیل یا دیگلوکوزیلپلیاناسترها) و مشتقات آن که مسئول رنگ قرمز زعفران هستند، پیکروکروسین که مسئول طعم تلخ زعفران است و سافرانال که مسئول عطر و بوی زعفران است، می‌باشد (۷). تاکنون اثرات درمانی زیادی از زعفران در مطالعات دیده شده است که عمده این اثرات مفید را به خواص آنتی‌اکسیدانی و ضد التهابی عصاره زعفران و اجزای فعال تشکیل دهنده آن نسبت می‌دهند (۸). دوکسوروبیسین یک آنتی‌بیوتیک از دسته آنتراسیکلین است که دارای فعالیت آنتی‌نئوپلاستیک بوده و در درمان سرطان یکی از فعالترین عوامل ضد سرطان در شیمی‌درمانی است (۹). زمینه ژنتیکی و محیطی از عوامل ایجاد سرطان‌ها در انسان می‌باشند. مطالعات بیانگر آن است اتیولوژی سرطان دهان چند عاملی بوده

و طی یک فرایند چند مرحله‌ای رخ می‌دهد. مسلماً تغییرات و آسیب‌های وارده، DNA را تحت تأثیر قرار داده و آن را ناپایدار می‌سازد. لذا تغییرات ژنتیکی و چند شکلی ناشی از آن می‌تواند اثر گسترده‌ای در حساسیت و گسترش سرطان دهان داشته باشد (۱۰). پروتئوآنکوژن‌ها (ژن‌های توده‌زا پیش از جهش) در حالت طبیعی مسئول تنظیم تقسیم برای رشد سلول‌ها می‌باشند. هنگامی که جهش ژنتیکی پیدا می‌کنند، به نام آنکوژن نامگذاری می‌شوند و بیان ژنی آن‌ها خیلی بالاست. هومئوستازی در بافت طبیعی، توسط یک روند سیار تنظیم شده‌ی تکثیر سلولی (متعادل با مرگ سلولی) حفظ می‌شود. در صورت عدم تعادل، چه در مرحله‌ی تکثیر سلولی و چه در مرحله‌ی مرگ سلولی یک حالت سرطانی به وجود می‌آید. آنکوژن‌ها و ژن‌های سرکوبگر تومور، نقش مهمی در این فرایند ایفا می‌کنند، زیرا تکثیر یا مرگ سلولی را تنظیم می‌کنند (۱۱). *PTEN* روی کروموزوم ۱۰ در موقعیت q23.31 قرار دارد که به عنوان یک ژن سرکوب کننده تومور از طریق اثر پروتئین فسفاتاز آن عمل می‌کند. این فسفاتاز در تنظیم چرخه سلولی دخیل است و سلول‌ها را از رشد و تقسیم بیش از حد به سرعت جلوگیری می‌کند و هدف بسیاری از داروهای سرطانی است (۱۲-۱۵). *AKT1* روی کروموزوم ۱۴ در موقعیت q32.33 قرار دارد که این ژن آنزیم کینازهای سرین/ترونین را کد می‌کند. *AKT1* برای انتقال سیگنال‌های پیشرفته رشد بسیار مهم است، به احتمال زیاد از طریق گیرنده IGF1 عمل می‌کند (۱۶-۱۸). بنابراین از آنجایی که سرطان دهان یکی از شایعترین سرطان‌ها بوده و کروسین زعفران و دوکسوروبیسین در پیشگیری و درمان آن تأثیر زیادی داشته و باعث افزایش بیان ژن‌های آپوپتوز می‌شود، پس بررسی تأثیرات کروسین زعفران همراه با دوکسوروبیسین بر مسیر سیگنالینگ سلولی ژن *PTEN* و *AKT1* در رده‌ی سلول‌های سرطانی اپیدرمیید دهان انسان (KB) لازم و ضروری می‌باشد. بنابراین هدف از این پژوهش تأثیر کروسین زعفران به همراه شیمی‌درمانی دوکسوروبیسین بر مسیر سیگنالینگ سلولی آپوپتوز (*PTEN/ AKT1*) در رده سلول‌های سرطانی اپیدرمیید دهان انسان (KB) می‌باشد.

روش کار

تهیه محیط کشت RPMI1640: ابتدا مقدار ۵۲/۵۰۰ گرم از پودر RPMI1640 وزن و داخل ارلن پنج لیتری ریخته شد. سپس ۱ گرم بیکربنات سدیم، به آنها اضافه گردید و با آب دیونیزه حجم را به ۴ لیتر رسانده و خوب بهم زده شد. سپس pH محیط را با دستگاه pH متر اندازه گیری میکنیم. pH بایستی ۷/۲ تا ۷/۴ باشد. در صورتیکه pH از این محدوده خارج بود، توسط سود و اسید HCl آنرا کالیبر میکنیم. سپس یک لیتر دیگر آب دیونیزه به محیط کشت اضافه شده سپس محیط کشت را توسط دستگاه پمپ ایجاد فشار مثبت با فیلتر ۰/۲۲ میکرون زیر اتاقک هود بیولوژیک تحت شرایط کاملاً استریل فیلتر نموده و سپس داخل شیشه استریل تخلیه می‌کنیم. این محیط را در یخچال ۴ درجه سانتیگراد نگهداری می‌شود.

محیط کشت کامل نیز به صورت ۱۰٪ تهیه شد. بدین صورت که به ازای هر ۹۰ میلی لیتر محیط کشت ۱۰ میلی لیتر سرم FBS و ۱۰۰ میکرولیتر آنتی‌بیوتیک اضافه گردید.

تست MTT (Microculture Tetrazolium Test): اثر آزمایش MTT که یک روش رنگ‌سنجی است که بر اساس احیا شدن و شکسته شدن کریستال‌های زرد رنگ تترازولیوم با فرمول شیمیایی، 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide به وسیله آنزیم سوکسینات دهیدروژناز و تشکیل کریستال‌های آبی انجام می‌شود. ابتدا تعداد مناسبی از سلول‌هایی KB در هر یک از چاهک‌ها کشت داده می‌شوند (۱۲۰۰۰ تا ۱۰۰۰۰ سلول در هر چاهک) بعد از ۲۴ ساعت چاهک‌ها کنترل شده و مقدار مناسبی از دوکسوروبیسین به چاهک‌ها افزوده می‌شود. پس از هر زمان انکوباسیون محیط داخل چاهک‌ها دور ریخته شده و هر خانه با ۲۰۰ میکرو لیتر محیط تازه و ۵۰ میکرو لیتر محلول MTT (۲ میلی گرم در میلی لیتر حل شده در PBS) جایگزین می‌شود. سلول تیمار نشده به عنوان کنترل به کار برده شدند. سپس پلیت‌ها به مدت ۴ ساعت دیگر در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و در تاریکی انکوبه شدند. پس از آن، محلول MTT با ۲۰۰ میکرو لیتر DMSO به همراه ۲۵ میکرو لیتر بافر سورنسون (گلایسین ۰/۱ M، NaCl ۰/۱ M دارای

pH=10.5 بهینه شده با ۱ M NaOH) جایگزین گردید. سپس پلیت‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد شیک (shake) گردیدند. سرانجام تراکم نوری (OD) در طول موج ۵۷۰ نانومتر توسط دستگاه الیزا ریدر خوانده شد. زیست‌پذیری سلولی نسبی به صورت زیر:

$$100 \times \frac{\text{نمونه ها A570}}{\text{کنترل A570}}$$

محاسبه گردید. کل آزمایش به صورت سه تکرار انجام شد (۲۰-۱۹). به ازای هر ۱ میلی لیتر حجم، ۲ میلی گرم پودر MTT را در بافر PBS حل کرده و با محیط به حجم رسانده شد. (غلظت محلول حاصل: 2mg/ml).

رنگ آمیزی DAPI: برای این رنگ‌آمیزی، سلول‌های سرطانی در پلیت‌های ۶ خانه کشت داده شدند و با غلظت مختلف دوکسوروبیسین تیمار شدند. بعد از گذشت ساعت‌های مختلف محیط کشت موجود در هر خانه به آرامی تخلیه گردید و ۲ بار هر کدام به مدت ۵ دقیقه با PBS ۳۷ درجه سانتیگراد شستشو شد. در مرحله بعدی PBS تخلیه شد و سلول‌ها به مدت ۱۰ دقیقه با پارافرمالدهید ۴٪ (۵۰۰ میکرولیتر برای هر خانه) در دمای اتاق فیکس گردیدند. سپس پارافرمالدهید تخلیه و ۲ بار با PBS شسته شد. برای نفوذپذیر کردن سلول‌ها، سلول‌ها را با محلول ترائیتون X100 ۰/۱٪ (۵۰۰ میکرولیتر برای هر خانه) به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه کردیم. محلول ترائیتون تخلیه و ۲ بار به مدت ۵ دقیقه با PBS شستشو شدند. در ادامه برای رنگ‌آمیزی هسته، سلول‌ها را با رنگ DAPI به غلظت ۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر (۳۰۰ میکرولیتر برای هر خانه) و به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه کردیم. سپس ۲ بار هر بار به مدت ۵ دقیقه با PBS شستشو دادیم و در نهایت زیر میکروسکوپ ایمونوفلورسنت بررسی کردیم.

استخراج RNA: به منظور استخراج RNA، سلول‌ها توسط ترائیزول لیز شدند. به طور خلاصه، ابتدا سلول‌های تیمار شده تحت تأثیر بافر ترائیزول لیز شدند. لیزات سلولی حاصله به داخل میکروتیوب‌های DNase/RNase-free منتقل شدند و ۵ دقیقه در دمای محیط انکوبه شدند. سپس ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم به میکروتیوب اضافه شد و در دور ۱۲۰۰۰

RNA استخراج شده، cDNA سنتز شود. RNA توسط آنزیم رونوشت بردار معکوس (reverse transcriptase) به cDNA تبدیل می شود. برای این منظور از آنزیم M-MLV Reverse Transcriptase ساخت شرکت Thermo Fisher استفاده شد. ابتدا به یک میکروتیوب استریل و nuclease-free ۱ میکرولیتر از total RNA با غلظت ۱۰/۵ $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ، ۱ میکرولیتر از پرایمر oligo dT و ۱ میکرولیتر از آب RNase-free، اضافه گردید. سپس میکروتیوب به مدت ۵ دقیقه در دمای 65°C قرار داده و سپس روی یخ قرار گرفت. همزمان مواد 5X Reaction Buffer به مقدار ۴ میکرولیتر، RiboLock RNase Inhibitor به مقدار ۰/۵ میکرولیتر، dNTP Mix به مقدار ۱ میکرولیتر و Reverse Transcriptase به مقدار ۱ میکرولیتر در یک میکروتیوب nuclease-free دیگر ریخته شدند. در نهایت محتویات میکروتیوب دوم به میکروتیوب اول اضافه شده و ۶۰ دقیقه در دمای 42°C ، ۱۰ دقیقه در دمای 70°C ، در دستگاه thermal cycler قرار داده شد. در نهایت نمونه های cDNA سنتز شده در فریز 70°C - قرار داده شدند.

طراحی پرایمر: پرایمر مورد استفاده با نرم افزار Oligo 7 طراحی و سپس توسط شرکت بیونر سنتز شدند.

تحلیل آماری: محاسبه ی سیکل آستانه (CT) برای هر نمونه انجام شد. میزان بیان در هر نمونه برای ژن های *PTEN/AKT* و *GAPDH* با استفاده از مقدارهای CT محاسبه شد. بیان ژن نسبت به بیان ژن *GAPDH* اندازه گرفته و در واقع نرمالیزه شد. مقادیر نرمالیزه (واحد نسبی) توسط کالیبراتور داخلی (نمونه های کنترل هر آزمایش) استاندارد سازی شدند. مقدار تغییر یافته بیان ژن *PTEN/AKT* در نمونه های تیمار شده نسبت به نمونه ی کنترل که به وسیله ی

rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. در مرحله بعد مایع رویی دور ریخته شد و به آن ایزوپروپانول ۷۰٪ اضافه شد. سپس تیوپ ها به مدت یک شبانه روز در دمایی 70°C - نگهداری شده، در روز بعد تیوپ ها را به مدت ۱۰ دقیقه و در 12000 rpm دور سانتریفیوژ کرده و سپس مایع رویی را دور ریخته، رسوب را در دمای محیط خشک گردید. در انتها رسوب حاصل در ۲۵ میکرولیتر آب تیمار شده با DEPC حل گردید. مقدار RNA استخراج شده به روش نوری و با استفاده از دستگاه NanoDrop (Wilmington, DE, USA) اندازه گیری و کیفیت RNA حاصله با روش الکتروفورز روی ژل مورد ارزیابی قرار گرفت. نمونه RNA بعداً برای سنتز cDNA مورد استفاده قرار گرفت.

به منظور بررسی کیفیت RNA های استخراج شده، ۵ نمونه به صورت راندوم بر روی ژل آگارز، الکتروفورز شدند. بدین منظور ابتدا ژل ۲٪ ساخته شد و نمونه ها پس از بسته شدن ژل بر روی ژل لود شدند و به مدت ۱ ساعت در ولتاژ ۸۰ V الکتروفورز شدند. برای تهیه ژل، ۲ گرم پودر آگارز را وزن کرده و با ۱۲۰ سی سی بافر TAE در یک بالن ته صاف به حجم رسانده شد. محلول حاصل تا ذوب شدن کامل پودر و شفاف شدن محلول حرارت داده شد. بعد از آنکه دمای ژل مذاب به نزدیک ۷۵ درجه رسید مقدار ۵ میکرولیتر رنگ سایبرگرین به آن اضافه گردید و خوب به هم زده شد تا رنگ به طور یکنواخت در ژل پخش شود. سپس ژل مذاب بر روی کاست ریخته شد. به منظور ایجاد چاهک مخصوص لود کردن نمونه بر روی ژل از شانه های مخصوص قبل از ریختن مایع ژل در کاست بهره گرفته شد.

سنتز cDNA: جهت اندازه گیری میزان تغییرات بیان ژن به روش Real-time PCR بایستی از نمونه DNA استفاده شود. بدین منظور می بایست از روی نمونه

جدول ۱- پرایمرهای مورد استفاده در Real Time – PCR

نام ژن	دما (درجه سانتیگراد)	توالی پرایمر
<i>GAPDH</i>	۶۳	F: 5'-AAGCTCATTTCCTGGTATGACAACG-3' R: 5'-TCTTCCTCTTGTGCTCTTGCTGG-3'
<i>PTEN</i>	۶۰	F: 5'-TCCCAGTCAGAGGCGCTATG-3' R: 5'-CACAAACTGAGGATTGCAAG-3'
<i>AKT1</i>	۵۴	F: 5'-CATCACACCACCTGACCAAT-3' R: 5'-CTCAAATGCACCCGAGAAAT-3'

جدول ۲- برنامه ترموسایکلر

مرحله	دما (درجه سانتیگراد)	زمان	تعداد سیکل
فعال سازی اولیه	۹۴	۱۰ دقیقه	۱
جداسازی	۹۴	۱۵ ثانیه	
اتصال و جذب نوری	۶۳-۶۰-۵۴	۳۰ ثانیه	۴۰
طویل سازی	۷۲	۲۵ ثانیه	
طویل سازی نهایی	۷۲	۵ دقیقه	۱

بدون تیمار قطعه قطعه شده و سلول ها وارد فاز آپوپتوز شدند.

نتایج بررسی میزان بیان ژن های آپوپتوز و زنده مانی با استفاده از Q-PCR:

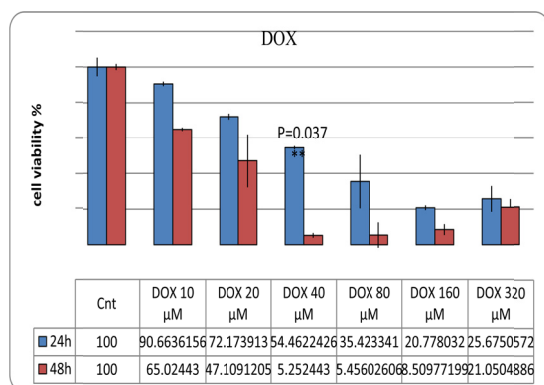
۱- تعیین کیفیت RNA استخراج شده از نمونه های

میزان بیان ژن *GAPDH* نرمالیزه شده است، با استفاده از روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ محاسبه شد. فرمول های محاسبات به شرح ذیل است:

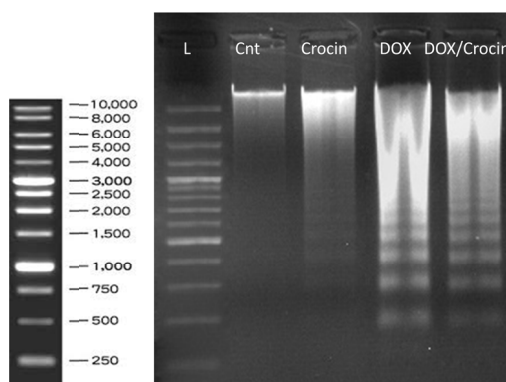
$$\Delta CT = CT_{\text{target}} - CT_{\text{reference}}$$

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT_{\text{test sample}} - \Delta CT_{\text{control sample}}$$

$$\text{Relative expression: } 2^{-\Delta\Delta CT}$$



شکل ۱- نمودار مربوط به سیتوتوکسیسیتی دوکسوروبیسین بر علیه سرطان دهان. حدقل سمسیت دوکسوروبیسین به منظور آپوپتوز سلول های سرطانی حدود ۴۰ میکرو لیتر بدست آمد.



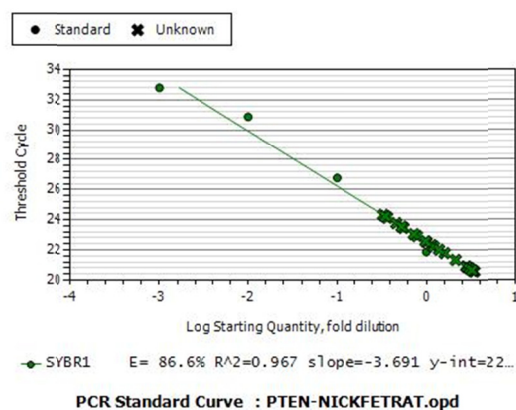
شکل ۲- ایجاد DNA Ladder به واسطه مرگ سلول ها در اثر آپوپتوز. در نمونه کنترل قطعه قطعه شدن مشاهده نمی شود اما در تیمار دوکسوروبیسین بعلت القا آپوپتوز قطعه قطعه شدن DNA دیده می شود. همچنین مقدار کمی قطعه قطعه شدن در تیمار کروسین هم مشاهده می گردد. و اینکه کروسین و دوکسوروبیسین اثر هم افزایی نشان دادند.

یافته ها

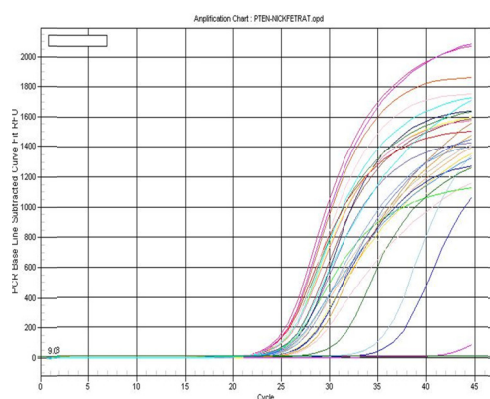
نتایج تست MTT: برای بررسی اثر سیتوتوکسیک دوکسوروبیسین و یافتن IC_{50} در سلول های KB تست MTT انجام گرفت، این تست سه بار برای هر یک از سلول ها تکرار شد. نتایج حاصل از آزمون MTT برحسب غلظت به صورت نمودار به دست آمد. نتایج نشان داد که IC_{50} در سلول KB برای ۲۴ ساعت در حدود ۴۰ میکرومولار می باشد (شکل ۱).

نتایج تست DNA Ladder: پس از بدست آوردن IC_{50} دارو پلیت حاوی سلول توسط این میزان غلظت دوباره به مدت ۲۴ ساعت تیمار شد و پس از استخراج DNA، در ژل آگارز ۱٪ در مجاورت لدر ۱ kb الکتروفورز شده و نتایج آن در دستگاه ژل داک و زیر نور UV مشاهده گردید که به قرار زیر می باشد (شکل ۲).

تاثیر دارو بر آپوپتوز سلول های سرطانی: پس از تیمار دوکسوروبیسین به مقدار ۴۰ میکرومولار و کروسین زعفران به مقدار ۱۰۰۰ میکرومولار بر روی سلول های سرطانی به مدت ۲۴ ساعت سلول ها به سمت آپوپتوز حرکت نمودند و هیچ گونه مهاری توسط کروسین بر عملکرد دارو دیده نشد. شکل ۳ تصویر برداری میکروسکوپ نوری سلول های سالم و آپوپتوز یافته را نشان داده است. همچنین با استفاده از رنگ DAPI که هسته سلول را رنگ آمیزی می کند، نشان داده شد هسته سلول ها در تیمار همزمان کروسین و دوکسوروبیسین به شدت بیشتر از هسته سلول های



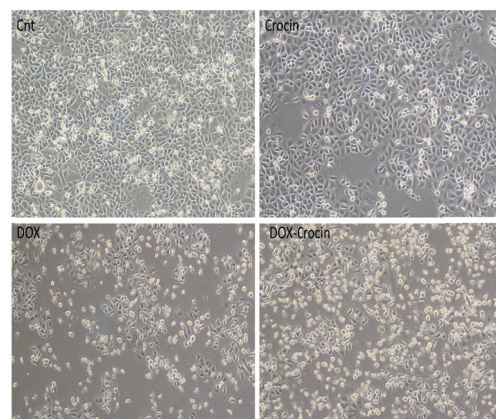
شکل ۵- منحنی استاندارد Realtime PCR. این منحنی نشانی بر این موضوع است که همراه با افزایش غلظت cDNA ها، نمونه‌های با غلظت‌های بیشتر در سیکل‌های پاینتری به حد آستانه رسیده‌اند و چون همه عوامل جز مقدار cDNA ها در نمونه‌ها ثابت است، مشخص می‌گردد که C_T های حاصل شده فقط به غلظت cDNA ها بستگی داشته که نشان دهنده صحت کار می‌باشد.



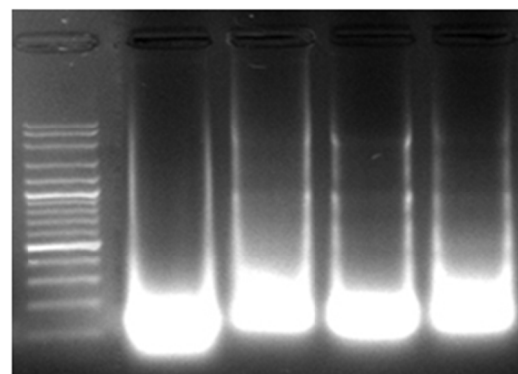
شکل ۶- منحنی تکثیر Real time PCR. برای هر تیمار آزمایش سه بار تکرار شد و نیز ۶ نمونه با رقت‌سازی بعنوان استاندارد تکثیر شدند. همانطور که در شکل دیده می‌شود، C_T نمونه‌ها تقریباً بین ۱۸ تا ۲۲ می‌باشد و نیز پیک‌های سیگموئیدی که نشان از تکثیر بدون اختلال واکنش می‌باشد.

قرار گرفته شده است، پروتئین BAX است. این پروتئین دارای نقش آپوپتوتیک است که بیان آن سبب القا آپوپتوز شده و عامل مهار تکثیر سلول است. پروتئین تولید شده توسط ژن *PTEN* پروآپوپتوز بوده و پروتئین تولیدی توسط *AKT* دارای اثرات ضد آپوپتوزی می‌باشد که در این تحقیق مورد مطالعه قرار گرفت.

نتیجه آنالیز داده‌های Q-PCR نشان داد هیچ تغییر معنی‌داری در تغییر بیان ژن *akt* وجود نداشت. اگر چه کمتر شدن میزان بیان آن مورد انتظار بود. با وجود آن



شکل ۳- تصویر میکروسکوپی سلول‌های تیمار شده و تیمار نشده



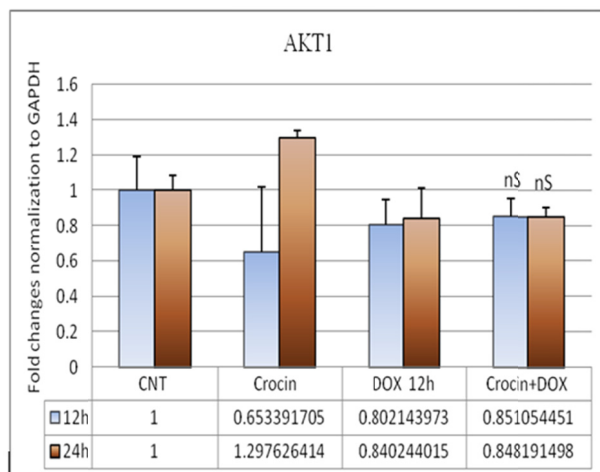
شکل ۴- نتیجه الکتروفورز در ژل آگارز RNA

سلول سرطانی KB: کیفیت RNA استخراج شده از طریق الکتروفورز ارزیابی شد. در این مرحله بعد از استخراج RNA تعداد ۵ نمونه به مقدار ۵ میکرولیتر در ژل ۲٪ الکتروفورز با استفاده از لدر ۵۰bp الکتروفورز شد و نمونه‌ها را در زیر نور UV در دستگاه ژل‌داک مشاهده شد. شکل ۴ نتیجه این الکتروفورز را نشان می‌دهد.

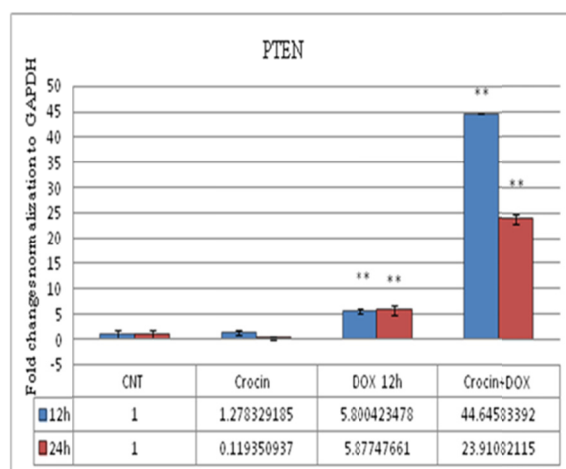
۲- انجام Q-PCR و آنالیز داده‌ها: پروتئین *PTEN* یک پروتئین کلیدی در مسیر آپوپتوز است این پروتئین در واقع یک پروتئین آنتی‌آپوپتوتیک است که افزایش بیان و فعالیت آن سبب مهار مسیرهای داخلی و خارجی آپوپتوز شده واز سوی دیگر عامل القای تکثیر و بقای سلول است. مهار و کاهش عملکرد این پروتئین تاثیر بسزایی در مهار سلول‌های سرطانی دارد و سبب هدایت سلول‌ها به سمت آپوپتوز می‌شود. از پروتئین‌های دیگری که بیان ژن آن مورد بررسی

بسیار بیشتر در تیمار همزمان دوکسو با کروسین بدست آمد. جدول ۳ نتایج تجزیه داده های Real Time PCR و معنی دار بودن تغییر بیان ژن های مورد مطالعه را نشان داده است.

ممکن است با فسفریلاسیون و نه با تغییر بیان این پروتئین در داخل سلول تنظیم گردد. اگرچه ژن *PTEN* در تیمار سلول ها با شیمی دارو افزایش پیدا نموده است اما نتایج نشان داد افزایش



شکل ۷- میزان بیان ژن *AKT1*، در مدت زمان ۱۲ و ۲۴ ساعت در نمونه های سلول KB که تحت تیمارهای مختلف قرار داشتند. تمامی آزمایشها سه بار تکرار شد و $P \text{ value} < 0.05$ معنی دار (*) در نظر گرفته شد. هیچ تغییر معناداری در بیان ژن *AKT1* دیده نشد.



شکل ۸- میزان بیان ژن *PTEN*، مدت زمان ۱۲ ، ۲۴ ساعت در نمونه های سلول KB که تحت تیمارهای مختلف قرار داشتند. تمامی آزمایشات سه بار تکرار شد و $P \text{ value} < 0.05$ معنی دار (**) در نظر گرفته شد. تغییر معناداری در بیان ژن *PTEN* دیده شد.

جدول ۳- تجزیه داده های CT با استفاده از نرم افزار REST

Gene	Type	Reaction Efficiency	Expression	Std. Error	95% C.I.	P(H1)	Result
GAPDH	REF	0.9931	1.000				
<i>PTEN</i> (48h, DOX-Cro)	TRG	0.98	23.91	0.001 - 1.031	0.001 - 832.013	0.022	UP
<i>AKT1</i>	TRG	1.0231	0.85	0.950 - 1.109	0.916 - 1,631,558.273	0.174	ns

Legend:

P(H1) - Probability of alternate hypothesis that difference between sample and control groups is due only to chance.

TRG - Target

REF - Reference

بحث و نتیجه گیری

سرطان یک مشکل کلینیکی جدی است که صدمات اقتصادی و اجتماعی زیادی به سیستم سلامت وارد می‌کند. این بیماری همچنین پس از بیماری‌های قلبی-عروقی به عنوان دومین بیماری مرگبار در کشورهای در حال پیشرفت می‌باشد. با وجود این که تکنیک‌های تشخیص مولکولی پیشرفت بسیاری داشته‌اند، هنوز هم بیماری سرطان میلیون‌ها نفر را در سراسر جهان درگیر کرده است. در این میان سرطان دهان ششمین عامل مرگ و میر ناشی از سرطان در کشورهای در حال توسعه می‌باشد (۲۱). امروزه سه روش رایج برای درمان سرطان دهان وجود دارد که شامل شیمی-درمانی، جراحی و رادیوتراپی می‌باشد که هر کدام با عوارضی که دارند، کیفیت زندگی و بقای این بیماران را تحت تاثیر قرار می‌دهند. در کنار این درمان‌ها بسیاری از بیماران از درمان‌های جایگزین و کمکی به همراه این روش‌ها جهت تسکین بیماری و عوارض ناشی از درمان‌ها استفاده می‌کنند مانند انٹی‌اکسیدانت تراپی (۲۲).

بسیاری از سرطان‌ها در طی درمان با داروهای شیمی‌درمانی نسبت به اثرات درمانی داروی مصرفی، مقاوم می‌شوند. تومورها ممکن است به طور ذاتی و قبل از شیمی‌درمانی به داروها مقاوم باشند یا در طول درمان با داروها این مقاومت را کسب کنند. علاوه بر این، در فرآیند کسب مقاومت، تومور ممکن است به طیف وسیعی از درمان‌ها مقاومت نشان دهد که همین عامل در نهایت منجر به شکست درمان بیش از ۹۰ درصد بیماران سرطانی در مرحله متاستاز می‌شود (۲۳). به نظر می‌رسد که تغییرات ژنتیکی تومور و نیز متفاوت بودن ساختار ژنتیکی بیماران، تغییرات اپی‌ژنتیکی و عوامل محیطی تومور، همگی در مکانیسم پیچیده‌ی مقاومت به داروی سرطانی نقش دارند (۲۴). از آنجایی که بافت سرطانی اجتماعی از سلول‌های مختلف می‌باشد، معمولاً در یک بافت سرطانی شیمی‌درمانی شده، بیش از یک مکانیسم در مقاومت دارویی موثر می‌باشد. این مکانیسم‌ها به صورت مجزا از یکدیگر و یا به صورت هم‌افزایی منجر به مقاومت دارویی می‌شوند که در آن سلول به انواع داروهایی که از

نظر ساختار و مکانیسم متفاوت از یکدیگرند، مقاوم می‌شود و در نتیجه مقاومت به چندین دارو حاصل می‌شود (۲۳).

گزارشات زیادی نشان داده است مصرف انٹی‌اکسیدانت‌ها تاثیر مثبتی در کاهش مقاومت دارویی نسبت به شیمی‌دارو دارند. خانم ایلقمی و همکاران در سال ۲۰۱۹ به خوبی مصرف انٹی‌اکسیدانت‌ها در کاهش مقاومت دارویی و همچنین کاهش اثرات جانبی دارو بصورت سیستماتیک از تحقیقات مختلف در طی مقاله‌ای توضیح داده است (۲۲) اما پیشنهاد داده است که این تحقیقات کافی نیست و باید تحقیقات بیشتر در این مورد انجام بگیرد. بهمین تحق حاضر در مورد نقش کروسین زعفران در کاهش مقاومت دارویی دوکسوروبیسین در سلول‌های سرطانی دهان می‌باشد. شیمی‌دارویی که در این تحقیق جهت بررسی اثرات ضد سرطانی انتخاب شده دوکسوروبیسین نام دارد و مروری بر مقالات منتشره نشان می‌دهد که این دارو با وجود استفاده روتین مقاومت دارویی پیدا کرده است. از این دارو جهت درمان انواع تومورها بویژه تومورهای خوش خیم دهان و زخم‌های التهابی ناشی از شیمی‌درمانی که در دهان ایجاد شده و ... توصیه شده است. همچنین در این پایان‌نامه انٹی‌اکسیدانتی گیاهی بنام کروسین مشتق شده از زعفران نیز مورد استفاده قرار گرفت.

برای رسیدن به این هدف، سلول‌های سرطانی دهان، KB بررسی شدند. در ابتدا سلول‌ها در معرض دارو قرار گرفتند و بررسی اثرات سایتوتوکسیک اولین قدم جهت بررسی بیولوژیک سلول‌ها شناخته شده است. تست بررسی پرولیفراسیون سلولی، MTT یک روش راحت و کمی جهت بررسی پاسخ جمعیت سلولی به فاکتورهای خارجی فراهم می‌کند. جهت انجام این تست، غلظت‌های مختلف عصاره در زمان‌های ۱۲ و ۲۴ ساعت روی سلول‌ها قرار داده شدند. همانطور که در بخش نتایج آورده شده است تفاوت قابل توجهی بین بقای سلولی نمونه کنترل و سلول‌هایی که در برابر دارو و کروسین قرار گرفتند در رده سلولی نرمال KB وجود داشت.

جهت بررسی اولیه تاثیر دوکسو و اثرات تیمار همزمان کروسین بر رده‌های سلولی تست DNA ladder انجام

باشد) ۲۷) اما در مطالعه ما هیچ افزایش و کاهش در این ژن نداشتیم. مقدم و همکاران در سال ۲۰۱۳ در مقاله ای تحت عنوان، بررسی اثربخشی دوکسوروبیسین در تکثیر اثربخشی نشانگرهای MCM3 و Ki-67 عنوان کردند، دوکسوروبیسین یکی از فعالترین عوامل ضد سرطان در شیمی درمانی می باشد) ۲۸). و در مطالعه ما نیز اثر ضد سرطانی دوکسوروبیسین ثابت شد. در تحقیقی تحت عنوان بررسی اثر سمی کروسین بر رده سلولی MDA-MB-468 بر اساس القای آپوپتوز و تغییرات نشانگرهای تنش شبکه آندوپلاسمی و اتوفازی توسط حیدرزاده و همکارانش در سال ۹۶ صورت گرفت به این نتیجه رسیدند که کروسین به صورت وابسته به دوز و زمان، موجب مرگ رده سلولی MDA-MB-468 شد (۲۹). در مطالعه ای که توسط وضیفیدان و همکارانش در سال ۲۰۱۷ بر روی بررسی سمیت سلولی و آپوپتوز ناشی از رادیوتراپی در سرطان سینه و سرطان گردن (HN-5) انجام شد، این پژوهش نشان داد که کروسین می تواند در سلول های بدخیم HN-5 در یک زمان و از طریق وابستگی به غلظت سلول کاهش یابد. همچنین کروسین حساسیت پرتوی و مرگ سلولی را افزایش می دهد (۳۰). بنابراین استفاده از کروسین نه تنها اثر داروی دوکسو را کاهش نمی دهد، بلکه افزایش می دهد.

نتایج ما نشان داد که داروی دوکسوروبیسین دارای اثرات سایتوتوکسیسیته روی سلول های سرطانی دهان، KB می باشد و کروسین نیز در اثر بخشی آن اثر سینرژتیکی دارد. کروسین نه تنها اثر ضد سرطانی و آنتی اکسیدانتی دارد بلکه می تواند همزمان هم اثر جانبی شیمی دارو را کاهش دهد و هم اثر ضد سرطانی آن را افزایش دهد.

تقدیر و تشکر

این مطالعه برگرفته از پایان نامه کارشناسی ارشد ژنتیک با کد مصوب ۹۷۱۰۱۰ و تحت حمایت معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد واحد اهر می باشد. بدین وسیله از تمام افرادی که در این پژوهش یاری رساندند کمال تشکر و قدردانی را می نمایند.

شده است. در این تست با استفاده از الگوی Ladder می توان وجود آپوپتوز را بررسی کرد. با بار گذاری DNA استخراج شده از سلول های KB که ۲۴ ساعت در برابر درو قرار گرفته اند بر روی ژل آگارز الکتروفورز، قطعات DNA بررسی شد.

جهت مطالعه مکانیسم اثر دارو و کروسین بر روی سلول های سرطانی دهان KB از متد RT-PCR استفاده شد که ژن های مهمی شامل تعدادی ژن های کلیدی که در آپوپتوز نقش دارند استفاده شد. از جمله ژن های منتخب در این مطالعه، *PTEN*، *AKT1* می باشد که نقش مهمی در پاتوژنز نئوپلاسم دارند. افزایش سریع در سطح پروتئین *AKT1* سبب میانجی گری پاسخ های مختلف سلولی شامل القا *GI* و بازسازی DNA آسیب دیده و مهار آپوپتوز می باشد (۲۴).

ژن های دیگری نیز جهت بررسی مسیر آپوپتوز مورد مطالعه قرار گرفتند. از میان این گروه ژن ها برخی در تنظیم *pro-apoptotic (PTEN)* یا *anti-apoptotic (MAPK)* اثر دارند. در واقع نسبت پرو و آنتی در هر سلول نشانه های بقا یا آپوپتوز را ظاهر کند (۲۵) یک ژن از هر زیر گروه انتخاب شد و جهت بیان mRNA آنالیز شد. ژن *PTEN* از گروه *pro-apoptotic* انتخاب شد در سلول هایی که بیان ژن *PTEN* افزایش یابد به معنی ورود سلول به مسیر آپوپتوز می باشد در نتایج حاصله بیان ژن *PTEN* افزایش داشته است که نشان دهنده افزایش بیان این ژن پروآپوپتوتیک می باشد. *AKT1* که یک ژن آنتی آپوپتوتیک می باشد نیز جهت آنالیز انتخاب شد که عدم افزایش بیان این ژن حاکی از ورود سلول به مسیر آپوپتوز می باشد. نتایج این تحقیق با نتایج قبلی مطابقت دارد. بطوریکه میلاجردی و همکاران در سال ۲۰۱۵ در مقاله ای تحت عنوان، تاثیر سمیت سلولی کروسین و کروستین در سلول های نرمال و سرطانی گزارش کردند: مهمترین نقش آنها در مهار سلول های سرطانی به خاطر خاصیت آنتی اکسیدانی آنها می باشد که موجب مهار رادیکال های آزاد می شود (۲۶). جرمن و همکاران در سال ۲۰۱۴ در مقاله ای تحت عنوان، بیان پروتئین COX-2 با استفاده از AKT از طریق مسیر NF-KB گزارش کردند: جهش در ژن AKT یکی از عامل مهم در ایجاد سرطان می

References

- Mohammadi AS, Mansouri B, Chakobidi K and baradaran B. Evaluation of the Cytotoxic Effect of Ethanolic Extract of *Agrobacteria officinalis* on Oral Cancer of KB Cell. *Urmia Med J.* July 2016; 27 (4): 257-265. [Persian]
- Pandey Sh. Vitamin C. department of biochemistry, k. g. medical university, Lucknow, 2015.
- Um Hd. bcl-2 family proteins as regulators of cancer cell invasion and metastasis: a review focusing on mitochondrial respiration and reactive oxygen species. *Oncotarget.* 2016 Feb 2;7(5):5193-203.
- Dosunmu Y and Owusu-Apenten R. Effects of Ascorbic Acid, Dehydroascorbic Acid and Methotrexate on Breast Cancer Cell Viability. *J Appl Life Sci Int.* 2017;14(2).
- Murugan K and Lyer V. Antioxidant and Antiproliferative Activities of Marine Algae, *Gracilaria edulis* and *Enteromorpha lingulata*, from Chennai Coast. *Int J Cancer Res.* January 2012; 8(1):15-26.
- Yin Yin Ch. Antioxidant and antiproliferative activities of several marine organisms from the west coast of Malaysia. Faculty of Medicine University of Malaya Kuala Lumpur, 2016.
- BJavadi B, Sahebkar A, and Emami SA. A Survey on Saffron in Major Islamic Traditional Medicine Books. *Iran J Basic Med Sci.* 2013;16:1-11. [in Persian]
- Milajerdi A, Djafarian K, Hosseini B. The toxicity of saffron (*Crocus sativus* L.) and its constituents against normal and cancer cells. *J Nutr Intermed Metab.* 2016. [Persian]
- Carvalho C, Santos RX, Cardoso S, Correia S, Oliveira PJ, Santos MS, et al. Doxorubicin: The Good, the Bad and the Ugly Effect. *Curr Med Chem.* 2009, 16: 3267-3285.
- Sijmons R. Clinical Genetics of Cancer. *Hered Cancer Clin Pract.* 2018;16(1):A1.
- Emery. Elements of medical genetics. 2017.
- Asoudeh-Fard A, Barzegari A, Dehnad A Bastani S, Golchin A and Omid Y. *Lactobacillus plantarum* induces apoptosis in oral cancer KB cells through upregulation of PTEN and downregulation of MAPK signaling pathways. *BioImpacts.* 2017; 7(3):193-198. [Persian]
- Demiray A, Akca H, and Urganci B. The Effect of PTEN on Apoptosis in NSCLC Cell Line. *Proceedings.* 2018,2(25),1562.
- Yamada KM and Araki M. Tumor suppressor PTEN: modulator of cell signaling, growth, migration and apoptosis. *J Cell Sci.* 2001 Jul;114(Pt 13):2375-82.
- Wu ZX, Li D, Song TB and Zhang XT. Overexpression of PTEN Suppresses Growth and Induces Apoptosis by Inhibiting the Expression of Survivin in Bladder Cancer Cells. *Tumor Biol.* February 2007; 28(1):9-15 .
- Sangawa A, Shintani M, Yamao N Kamoshida Sh. Phosphorylation status of Akt and caspase-9 in gastric and colorectal carcinomas. *Int J Clin Exp Pathol.* 2014; 7(6): 3312–3317 .
- Kim GY, Park SY, Jo A, Kim M, Leem SH, Jun WJ, et al. Gecko proteins induce the apoptosis of bladder cancer 5637 cells by inhibiting Akt and activating the intrinsic caspase cascade. *BMB Rep.* 2015;48(9):531-6.
- St-Germain ME, Gagnon V, Parent S, Asselin E. Regulation of COX-2 protein expression by Akt in endometrial cancer cells is mediated through NF-kappaB/IkappaB pathway. *Mol Cancer.* 2004;3:7. Published 2004 Mar 11.
- Hamzelooghdam M, Esmaili S, Fotoohi F, Naghibi F, Pirani A, Hajimehdipoor H. In vitro evaluation for cytotoxic activity of three *Ferula* species. *Int J Pharm Sci Res.* 2013 Jul 1;4(7):2673-6.
- Tsai CH, Yang ChW, Wang JY, Tsai YF, Tseng LM, King KL, et al. Timosaponin AIII suppresses hepatocyte growth factor-induced invasive activity through sustained ERK activation in breast cancer MDA-MB-231 cells. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2013;2013:421051.
- Kademani D. Oral cancer. In *Mayo Clinic Proceedings.* 2007: Elsevier.
- Ilghami R, Barzegari A, Mashayekhi MR, Letourneur D, Crepin M, Pavon-Djavid G. The conundrum of dietary antioxidants in cancer chemotherapy. *Nutr Rev.* 2020;78(1):65-76.
- Coley HM. Mechanisms and strategies to overcome chemotherapy resistance in metastatic breast cancer. *Cancer Treat Rev.* 2008;34(4):p. 378-390.
- Kabraji S, Sole X, Huang Y, Bango C, Sgroi D, Loda M, Ramaswamy S. AKT1 low quiescent cancer cells in ductal carcinoma in situ of the breast. *NPJ Breast Cancer.* 2019 Mar 21;5(1):1-3.
- Lee YR, Chen M, Lee JD, Zhang J, Lin SY, Fu TM, et al. Reactivation of PTEN tumor suppressor for cancer treatment through inhibition of a MYC-WWP1 inhibitory pathway. *Science.* 2019 May 17;364(6441):eaau0159.
- Milajerdi M, Haghghatdoost F, Azadbakht L. Saffron (*Crocus sativus* L.) and its Crocin and Crocetin toxicity against normal and tumor cells: A systematic review. *J Clin Excell.* 2017. [Persian]
- St-Germain ME, Gagnon V, Parent S, Asselin E. Regulation of COX-2 protein expression by Akt in endometrial cancer cells is mediated through NF-kB/IkB pathway. *Mol Cancer.* 2004 Dec;3(1):7.
- Etemad-Moghadam S, Fouladdel S, Azizi E and Alaeddini M. In vitro study on the effect of doxorubicin on the proliferation markers MCM3 and Ki-67. *J BUON.* 2013 Oct-Dec;18(4):1062-8.

[Persian]

29. Heydarzadeh H, Batayee SA, Abron SA, Mohaghegh M. Evaluation of the toxic effect of crocin on MDA-MB-468 cell line based on apoptosis induction, and changes of endoplasmic reticulum and autophagy stress markers. *Biol Injur Res.* Winter 1396; 20 (4): 51-37. [Persian]

30. Vazifedan V, Mousavi S H, sargolzaei J, Soleymanifard Sh, Fani Pakdel A. Crocin promotes apoptosis of human skin cancer cells by inhibiting the JAK/STAT pathway. *Exp Ther Med.* 2018Dec; 16(6): 5079-5084. [Persian]