کارواکرول و درمان سرطان: اثر کارواکرول در القای آپوپتوز در سلول‌های سرطان سینه

آیت مرادی پور[۱]، حسن داریوش نژاد[۲*]، چنگیز احمدی‌زاده[۳]، حامد اسمعیل لشگریان[۴]

۱-دانشجوی دکتری، گروه ژنتیک مولکولی، واحد اهر، دانشگاه آزاد اسلامی، اهر، ایران

۲-استادیار، گروه بیوتکنولوژی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، خرم‌آباد، ایران

۳-استادیار، گروه ژنتیک مولکولی، واحد اهر، دانشگاه آزاد اسلامی، اهر، ایران

۴-دانشیار، گروه بیوتکنولوژی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، خرم‌آباد، ایران

یافته / دوره ۲۵ / شماره ۳ / پاییز ۱۴۰۲ / مسلسل ۹۷

چکیده

دریافت مقاله: ۱۴۰۲/۳/۱۲ پذیرش مقاله: ۱۴۰۲/۷/۵

مقدمه: کارواکرول یک ترکیب فنلی مونوترپنیک طبیعی است که دارای فعالیت‌های بیولوژیکی با کاربردهای درمانی است و هدف از این مطالعه بررسی اثر آپوپتوتیک کارواکرول بر روی سلول‌های سرطان سینه انسان، رده MDA-MB-231 بود.

مواد و روش‌ها: پس از آماده‌سازی و کشت سلول‌های MDA-MB-231، مقدار IC50 کارواکرول روی سلول‌ها با روش MTT assay ارزیابی و سپس القای آپوپتوز در رده سلولی تیمار شده با غلظت‌های مختلف کارواکرول با رنگ‌آمیزی DAPI مشاهده شد. برای بررسی میزان بیان ژن‌های Bax، P53 و Bcl-2 در سطح mRNA از روش qPCR استفاده شد. نتایج به کمک نرم‌افزار GraphPad Prism 9 مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که سمیت سلولی کارواکرول در برابر سلول‌های سرطانی MDA-MB-231 در زمان‌های ۲۴ (P=۰/۰۳۴) و ۴۸ (P=۰/۰۴۱) ساعت وابسته به دُز بود. IC50 کارواکرول در زمان ۴۸ ساعت ۱۵۴٫۲ میکرومولار مشاهده شد. سلول‌های MDA-MB-231 تیمار شده با کارواکرول القای آپوپتوز را از مسیر میتوکندریال به‌واسطه افزایش بیان ژن‌های P53 و Bax و کاهش میزان بیان ژن آنتی آپوپتوز Bcl-2 نشان دادند. همچنین تعداد سلول‌های آپوپتوز شده با DNA متراکم در گروه تیمار کارواکرول به شکل معنی‌داری افزایش پیدا کرده بود (P=۰/۰۰۱).

بحث و نتیجه‌گیری: این مطالعه نشان داد که تیمار رده سلولی MDA-MB-231 با کارواکرول می‌تواند از طریق القای آپوپتوز از مسیر BAX/BCL-2، موجب مهار رشد و تکثیر آن شود. باتوجه‌به تأثیر مهاری معناداری که تیمار سلول‌ها با ترکیب کارواکرول به دنبال دارد، به نظر می‌رسد زمینه تحقیقاتی مناسبی برای بهره‌برداری از این ترکیب در کنترل و درمان سرطان سینه وجود دارد.

واژه‌های کلیدی: آپوپتوز، سرطان سینه، کارواکرول، MDA-MB-231.

*آدرس مکاتبه: خرم آباد، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، دانشکده پزشکی، گروه بیوتکنولوژی.

پست الکترونیک: dariushnejad@gmail.com

مقدمه

سرطان از بیماری‌های خطرناک برای نوع بشر و سرطان سینه دومین عامل مرگ‌ومیر در زنان است و در سال ۲۰۱۲ حدود ۵۲۲۰۰۰ نفر جان خود را به سبب سرطان سینه از دست داده‌اند (۱). از سال ۲۰۰۸، بروز سرطان سینه بیش از ۲۰٪ افزایش یافته است، درحالی‌که مرگ‌ومیر ۱۴٪ افزایش یافته است (۱). بااین‌حال، تاکنون روش درمانی مشخصی برای جلوگیری از سرطان سینه یا سایر بیماری‌های سرطانی موجود نیست (۱). در سال‌های اخیر تحقیقات عمده‌ای بر روی ترکیبات شیمیایی جداشده از گیاهان برای پیشگیری و درمان سرطان متمرکز شده است که به‌عنوان ترکیبات غیر سمی یا با سمیت ناچیز در نظر گرفته شده‌اند (۲). همچنین، ترکیبات طبیعی دارای خواص آنتی‌اکسیدانی قوی به‌عنوان یک استراتژی منطقی برای رویکردهای غذایی برای پیشگیری از سرطان در نظر گرفته شده است (۳).

کارواکرول (۲-متیل-۵-(۱-متیل اتیل)-فنول) یک ترکیب فنلی مونوترپنیک طبیعی است که بیشتر در اسانس‌های پونه کوهی (Origanumvulgare)، آویشن (Thymus vulgaris) و مرزه (Saturejahortensis) وجود دارد (۴). گزارش شده کارواکرول دارای فعالیت‌های ضدعفونی‌کننده، ضد باکتریایی، ضدویروسی و ضد قارچی است (۵). در طول سالیان اخیر به‌طور گسترده، خواص بیولوژیکی ترکیب کارواکرول مورد بررسی قرار گرفته است و گزارش شده است که دارای فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی، ضد توموری، ضد جهش‌زا، ضد ژنوتوکسیک، ضد میکروبی، ضد درد، ضد اسپاسم، ضدالتهابی، ضد رگزایی، ضد انگلی، ضد پلاکتی و محافظت از کبد است (۶،۷).

خواص ضد تکثیری کارواکرول در برابر سلول‌های سرطان ریه سلول‌های غیر کوچک (A549)، سلول‌های لوسمی میلوئیدی مزمن (K562)، سلول‌های ملانوم موشی (B16)و رده‌های سلولی سرطان دهانه رحم SiHa و HeLa گزارش شده است (۸،۹). همچنین کارواکرول در سلول‌های تیمار شده، باعث ایجاد اجسام آپوپتوتیک و افزایش تکه‌تکه‌شدن و تراکم DNA در سلول‌های سرطان سینه و فعال شدن کاسپاز-۳، برش PARP و کاهش بیان ژن Bcl-2 در رده سلولی سرطان کبد (HepG-2) می‌شوند (۱۰).

باتوجه‌به مسیر میتوکندریال در پروسه آپوپتوز که در آن تحت تأثیر عوامل شیمیایی مختلف پروتئین P53 فعال‌شده و باعث افزایش بیان در ژن‌های پرو آپوپتوز و کاهش بیان ژن‌های آنتی آپوتوتیک می‌شود (۱۱)، پروتئین P53 یک عامل رونویسی فسفو پروتئینی است که بیان بیش از ۲۵۰۰ ژن هدف را تنظیم می‌کند و در فرایندهای مختلف سلولی همچون حفظ ثبات و پایداری ژنوم، طول عمر، سوخت‌وساز و مهم‌تر از همه، سرکوب تومور نقش دارد. مطالعات نشان داده‌اند که P53 در سلول‌های سرطانی نقش مهمی در تنظیم سوخت‌وساز سلولی به‌ویژه گلیکولیز و فسفریلاسیون اکسیداتیو ایفا می‌کند. در سلول‌های سرطانی حتی در حضور اکسیژن فراوان نیز، بیشتر پیروات حاصل از گلیکولیز به‌جای فرایند تنفس سلولی وارد مسیر تخمیر می‌شود که بازده بسیار کمتری دارد. درنتیجه این سلول‌ها برای تأمین انرژی نیاز به مصرف گلوکز بالاتر و گلیکولیز هوازی بیشتری دارند (۱۲). در این مطالعه برای اولین بار سعی شد تا اثر ترکیب طبیعی کارواکرول در القای آپوپتوز از مسیر P53,BAX/BCL-2 در سلول‌های سرطان سینه رده MDA-MB-231 مورد بررسی قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

تحقیق حاضر به‌صورت مطالعه تجربی انجام گرفت و شرط ورود نمونه‌ها به مطالعه زنده‌مانی بالای ۹۵ درصد بود.

مواد شیمیایی

مایع کارواکرول با خلوص ٪۹۸ از سیگما آلدریچ آلمان تهیه شد (Cat Numb: 282197). دی متیل سولفوکسید (DMSO)، پارافُرمالدهید Merck آلمان

(Catalog No: 104005) و محیط کشت سلولی DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) و FBS (Fetal Bovine Serum)، پنی‌سیلین G، استرپتومایسین و MTT (Methyl Thiazolyl diphenyl-tetrazolium bromide) از Sigma Aldrich (Lot: MKCL9868) تهیه گردید. کیت استخراج RNA و نیز مسترمیکس سایبر گرین qPCR و همچنین کیت رنگ‌آمیزی DAPI از شرکت دنا زیست تهیه و طبق پروتکل آماده‌سازی و استفاده شد.

کشت سلول

سلول‌های MDA-MB-231 از مرکز ملی ژنتیک ایران خریداری و در محیط کشت سلولی DMEM حاوی FBS ۱۰٪ و پنی‌سیلین و استرپتومایسین به میزان ۱٪ در دما ۳۷ درجه سانتی‌گراد درون فلاسک‌های کشت سلول 25T حاوی ۵ میلی‌لیتر محیط کشت سلولی در شرایط رطوبت ۹۵٪ و CO2 ۵٪ انکوبه شدند. پس از اتصال و تکثیر سلول‌ها به صورتی که تقریباً ۹۰٪ کف فلاسک را پوشاندند سلول‌ها تریپسینه و جهت انجام تیمار به پلیت‌های متناسب با نوع آزمایش انتقال داده شدند.

بررسی میزان سمیت سلولی کارواکرول: تکنیک MTT assay

برای بررسی اثر سمیت سلولی کارواکرول بر سلول‌های سرطان سینه از تکنیک MTT assay استفاده شد. بدین ترتیب که تعداد ۱۰۳× ۵ سلول MDA-MB-231 در هریک از چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه کشت شد و بعد از ۲۴ ساعت که سلول‌ها در شرایط مناسب کشت سلول، به کف چاهک‌ها چسبید، محیط رویی خارج و سلول‌ها تحت تیمار غلظت‌های مختلفی از کارواکرول (۰ تا ۱۲۰۰ µM) قرار گرفتند و پس از بازه‌های زمانی ۲۴ و ۴۸ ساعته به‌صورت تکرارهای ۳تایی، محلول MTT با غلظت ۵۰۰ mg/L به سلول‌ها اضافه شد و بعد از ۴ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی‌گراد جهت حل کردن کریستال‌های فورمازان، ۱۰۰ میکرو لیتر DMSO به هر چاهک اضافه شد و جذب نوری هر یک به کمک الایزا ریدر (Stat Fax 3200) در طول‌موج ۵۷۰ nM اندازه‌گیری و با کمک نرم‌افزار GraphPad Prism 9 میزان زنده‌مانی سلول‌ها در هر یک از تیمارها نسبت به گروه کنترل (بدون تیمار) و همچنین IC50 کارواکرول اندازه‌گیری شد (۹).

بررسی میزان القا آپوپتوز: DAPI Staining

برای بررسی القا آپوپتوز، سلول‌های MDA-MB-231 به مدت ۴۸ ساعت با محیط‌های کشت حاوی غلظت‌های مختلف از کارواکرول درون پلیت ۲۴ چاهکی کشت داده شدند، سپس محیط رویی هر چاهک تخلیه و سلول‌ها با PBS به‌آرامی شست‌وشو داده شدند. با کمک پارافرمالدهید ۴٪ درصد به مدت ۱۰ دقیقه سلول‌ها فیکس و با استفاده از رنگ DAPI 1:1000 سلول‌ها رنگ‌آمیزی شد. برای بررسی زنده‌مانی سلول‌ها میزان نفوذ فلورسانت هر چاهک با نرم‌افزار Image J اندازه‌گیری شد و جهت شمارش تعداد سلول‌های آپوپتوز شده به‌صورت اتفاقی برای هر چاهک ۱۵ منطقه (با ابعاد 1mm2) انتخاب و سلول‌ها شمارش شد. سلول‌ها با ویژگی‌های هسته متراکم، چروکیده، قطعه‌قطعه‌شده و شدت فلورسانت بالا به‌عنوان سلول آپوپتوز شده در نظر گرفته شدند.

بررسی میزان بیان کمی ژن‌ها: استخراج RNA و qRT-PCR

پس از تیمار سلول‌های MDA-MB-231 با غلظت‌های مختلف از کارواکرول (۴۰۰،۳۵۰،۳۰۰،۲۵۰،۲۰۰،۱۵۰،۱۰۰ میکرومولار) در بازه زمانی ۴۸ ساعت، جهت بررسی میزان بیان ژن‌های P53 ,Bcl-2 و Bax در مقایسه با گروه درمان‌نشده استخراج RNA با استفاده از کیت شرکت ROJE (Lot: 505922021210700) طبق پروتکل کیت انجام گرفت و کیفیت - کمیت هر نمونه به کمک نانودراپ در

طول‌موج ۲۶۰/۲۳۰ و ۲۸۰/۲۶۰ نانومتر بررسی گردید. مقدار ۲۰ نانوگرم در میلی‌لیتر از RNA استخراج‌شده برای تهیه cDNA (VERER. Lot:CS0050) در هر واکنش استفاده و از مسترمیکس سایبر گرین (VERNER. Lot:RPM38) به کمک پرایمرهای اختصاصی برای هر یک از ژن‌های موردمطالعه و ژن β-actin به‌عنوان ژن کنترل داخلی در بررسی میزان بیان ژن‌ها به کمک روش qRT-PCR و با استفاده از ترموسایکلر QIAquant 96 اندازه‌گیری شد (جدول ۱).

جدول ۱. توالی پرایمرهای مورد استفاده در qPCR

نام ژن	توالی آغازگر پیرو	توالی آغازگر پیشرو	طول محصول (bp)
TP53	5’-AGGCCTTGGAACTCAAGGAT-3’	5’-AGGCCTTGGAACTCAAGGAT-3’	۱۴۰
Bcl-2	5’-GATGACTTCTCTCGTCGCTA-3’	5’-GATCAGCTCGGGCACTTTAGTG-3’	۷۳
Bax	5’-GATCAGCTCGGGCACTTTAGTG-3’	5’-CGTGGTTGCCCTCTTCTACTTT-3’	۲۲۹
β-actin	5’-GTAGTTTCGTGGATGCCACA-3’	5’-GATGACTTCTCTCGTCGCTA-3’	۱۳۱

آنالیز آماری

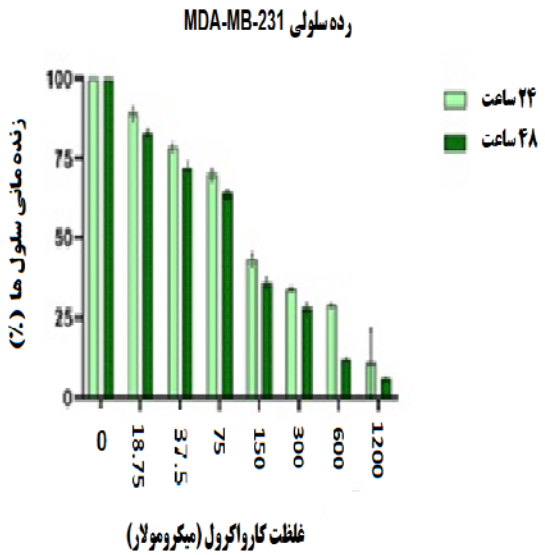
همه آزمایش‌ها در سه تکرار انجام شد. استفاده از آزمون کلموگروف - اسمیرنوف نشان داد که داده‌ها از توزیع نرمال پیروی می‌کنند تجزیه‌وتحلیل‌های آماری با نرم‌افزار GraphPad Prism 9 انجام شد و نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار گزارش شد. تفاوت‌های آماری با استفاده از آزمون t-زوجی ارزیابی و مقدار $P < ۰/۰۵$ به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد. هر گروه به‌صورت جداگانه با گروه کنترل مقایسه شده است.

یافته‌ها

ارزیابی اثر سمیت کارواکرول به روش assay MTT

زنده‌مانی سلول‌های MDA-MB-231 تحت تأثیر غلظت‌های ۰ تا ۱۲۰۰ میکرومولار کارواکرول با استفاده از روش MTT assay در دو بازه زمانی ۲۴ و ۴۸ ساعت مورد ارزیابی قرار گرفت.

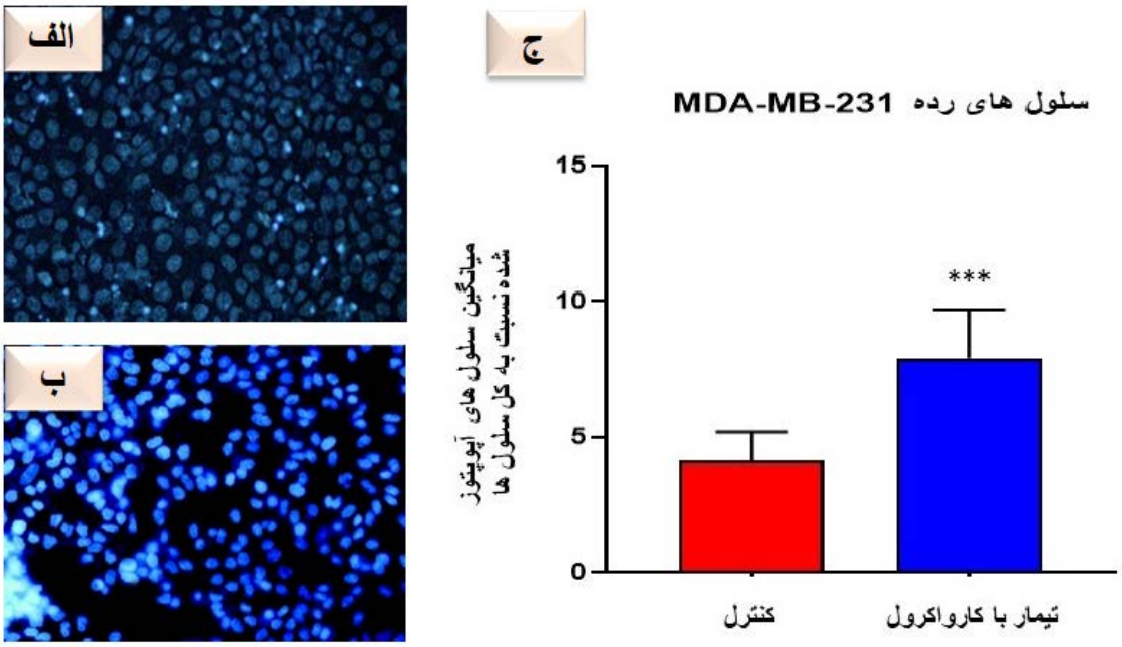
اثر سمیت سلولی کارواکرول بر روی سلول‌های MDA-MB-231 ارزیابی گردید و نتایج حاصل نشان داد که در هر دو زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت، کارواکرول موجب کاهش زنده‌مانی در سلول‌های MDA-MB-231 به‌صورت وابسته به دُز می‌گردد. میزان IC50 کارواکرول در بازه ۲۴ ساعت برابر با ۱۷۸/۵ میکرومولار و در بازه ۴۸ ساعت برابر با ۱۵۴/۲ میکرومولار محاسبه گردید. زنده‌مانی ۲۴ و ۴۸ ساعته‌ی سلول‌های MDA-MB-231 نشان داد که اثر سمیت سلولی کارواکرول مخصوصاً در دُزهای بالاتر وابسته به زمان نیز است (شکل-۱).



شکل ۱. زنده‌مانی سلول‌های MDA-MB-231 تیمار شده با غلظت‌های مختلف از کارواکرول در بازه‌های زمانی ۲۴ و ۴۸ ساعت (میله خطا نشان‌دهنده انحراف معیار است).

ارزیابی قابلیت القا آپوپتوز توسط کارواکرول با رنگ‌آمیزی DAPI

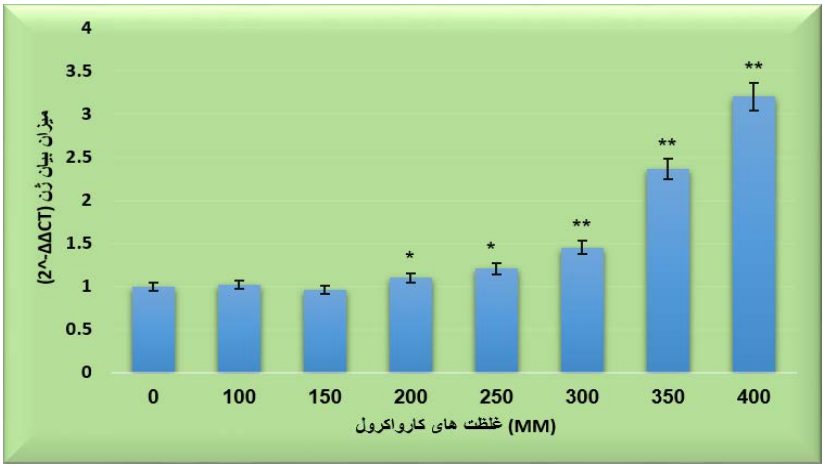
قابلیت القا آپوپتوز توسط کارواکرول در سلول‌های MDA-MB-231 نیز با استفاده از رنگ‌آمیزی DAPI به کمک میکروسکوپ اینورت فلورسانت بررسی گردید (شکل ۲). سلول‌ها به مدت ۴۸ ساعت تحت تیمار غلظت IC50 کارواکرول (۱۵۴/۲ میکرومولار) قرار گرفتند. این امر سبب ایجاد تغییرات مورفولوژیکی نظیر چروکیدگی، گرد شدن، قطعه‌قطعه‌شدن کروماتین، برآمدن غشا و همچنین پررنگ شدن رنگ آبی فلورسنت در مورد سلول‌های آسیب‌دیده شد که به‌عنوان سلول‌های آپوپتوز شده در نظر گرفته شد که این موارد در گروه کنترل به شکل معنی‌داری به نسبت سلول‌های سالم کمتر مشاهده گردید(P=۰/۰۰۱) (شکل ۲).



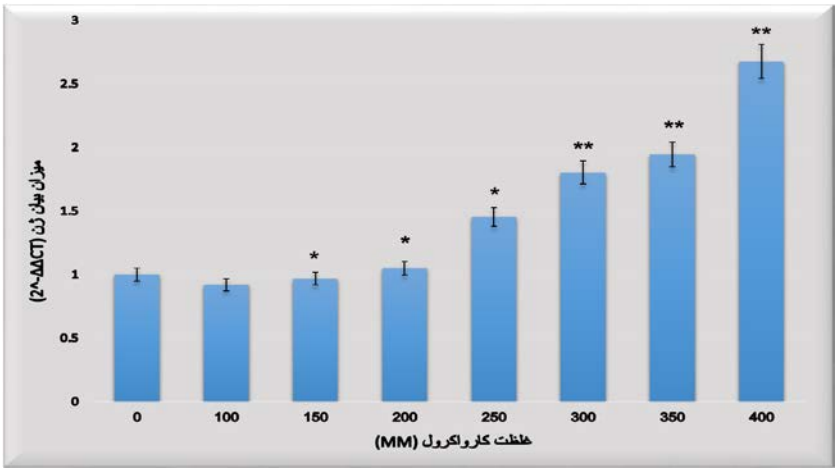
شکل ۲. بررسی میزان القا آپوپتوز در سلول‌های MDA-MB-231 در دو گروه کنترل (الف) و تیمار با IC50 کارواکرول (ب) در بازه زمانی ۴۸ ساعت با استفاده از رنگ‌آمیزی DAPI ج) میانگین تعداد سلول‌های آپوپتوز شده نسبت به کل (P < ۰/۰۱). (میله خطا نشان‌دهنده انحراف معیار است).

ارزیابی میزان بیان ژن‌های مرتبط با آپوپتوز

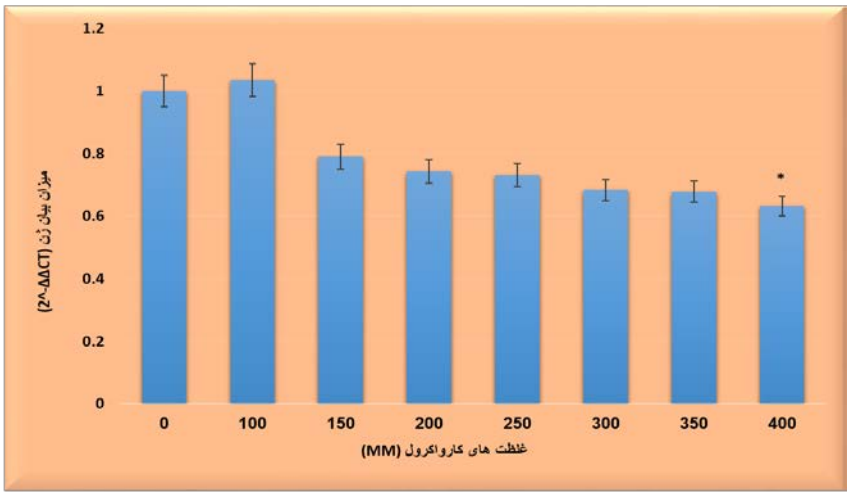
بررسی بیانی ژن‌های مرتبط با آپوپتوز (Bax ،Bcl-2 و P53) در سلول‌های MDA-MB-231 به کمک تکنیک qRT-PCR مورد مطالعه قرار گرفت. بیان ژن β-actin به‌عنوان کنترل داخلی برای مقایسه در بیان mRNA ژن‌های مرتبط با آپوپتوز استفاده شد. تیمار سلول‌های MDA-MB-231 با کارواکرول در غلظت IC50 (۱۵۴/۲ میکرومولار) به مدت ۴۸ ساعت، میزان بیان رونوشت‌های mRNA ژن P53 را افزایش داده است. تیمار با کارواکرول در غلظت ۱۵۴/۲ میکرومولار و بالاتر نشان داد که میزان بیان ژن‌های P53 و Bax در سلول‌های MDA-MB-231 در مقایسه با گروه کنترل (بدون تیمار) به شکل معنی‌داری افزایش‌یافته است (P=۰/۰۴۴)، همچنین سلول‌های تیمار شده با کارواکرول کاهش تنظیم mRNA ژن Bcl-2 را مخصوصاً در غلظت‌های بالاتر به‌صورت وابسته به دُز در نقطه زمانی ۴۸ ساعت نشان دادند (P=۰/۰۳۸) (شکل ۳-۵).



شکل ۳. بیان ژن P53 در ردهٔ سلولی MDA-MB-231 تحت تیمار با غلظت‌های مختلف از کارواکرول در بازه زمانی ۴۸ ساعت. با افزایش غلظت کارواکرول، میزان بیان ژن P53 به صورت معنی داری نسبت به گروه کنترل افزایش پیدا کرد (P < ۰/۰۱) (میله خطا نشان‌دهنده انحراف معیار است).**



شکل ۴. بیان ژن Bax در ردهٔ سلولی MDA-MB-231 تحت تیمار با غلظت‌های مختلف از کارواکرول در بازه زمانی ۴۸ ساعت. در غلظت های ۱۵۰، ۲۵۰ تا ۴۰۰ از کارواکرول، افزایش بیان در ژن Bax نسبت به گروه کنترل به صورت معنی داری دیده شد (*P <۰/۰۵ وP <۰/۰۱) (میله خطا نشان‌دهنده انحراف معیار است).**



شکل ۵. بیان ژن Bcl-2 در ردهٔ سلولی MDA-MB-231 تحت تیمار با غلظت‌های مختلف از کارواکرول در بازه زمانی ۴۸ ساعت. تنها در غلظت ۴۰۰µM از کارواکرول، در میزان بیان ژن BCL-2 تفاوت معنی داری نسبت به گروه کنترل مشاهده شد (*P <۰/۰۵) (میله خطا نشان‌دهنده انحراف معیار است).

بحث و نتیجه‌گیری

امروزه برای درمان سرطان از روش‌های مختلفی همچون شیمی‌درمانی و رادیوتراپی استفاده می‌شود. در طی سال‌های اخیر اگرچه پیشرفت عمده‌ای در راهکارهای درمانی سرطان ایجاد شده است؛ اما تاکنون درمان قطعی برای این بیماری معرفی نشده است؛ لذا تلاش برای یافتن راهکارهای درمانی و نیز ترکیبات دارویی جدید برای درمان سرطان همچنان ادامه دارد (۱۳).

در تحقیق حاضر اثر کارواکرول در القا آپوپتوز بر روی سلول‌های سرطان سینه رده‌ی MDA-MB-231 مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل نشان‌دهنده اثر سمیت ترکیب کارواکرول، بر روی رده‌ی سلولی MDA-MB-231بود. یکی از مکانیسم‌های سایتوتوکسیته ترکیبات ضد سرطان، القای آپوپتوز است؛ لذا در تحقیق حاضر القای آپوپتوز توسط کارواکرول در سلول‌های موردمطالعه با استفاده از روش‌های مختلف بررسی شد. روش اول ارزیابی مستقیم آپوپتوز با استفاده از رنگ‌آمیزی DAPI بود که نشان داد کارواکرول موجب افزایش معنادار سلول‌های آپوپتوتیک می‌شود و از طرفی بیان سه ژن دخیل در آپوپتوز شامل Bax، P53 و Bcl2 نیز در سطح mRNA با تکنیک qRT-PCR ارزیابی گردید. نتایج حاصل از بررسی بیان ژن نشان داد که بیان ژن‌های Bax و P53 به‌عنوان ژن‌های پرو آپوپتوتیک در سلول‌های تیمار شده به شکل معنی‌داری نسبت به گروه کنترل افزایش می‌یابد درحالی‌که در ژن Bcl2 به‌عنوان ژن آنتی آپوپتوتیک کاهش بیان mRNA دیده شد که این کاهش بیان ژن در غلظت‌های بالاتر کارواکرول به شکل معنی‌داری نشان داده شد.

سرطان سینه شایع‌ترین سرطان در میان زنان ایرانی است که شیوع آن در دهه‌های اخیر روبه افزایش است. از عوامل مؤثر در بروز سرطان سینه می‌توان به مهار ژن‌های سرکوبگر تومور، افزایش بیان پروتوانکوژن‌ها، تغییر بیان ژن‌های دخیل در ترمیم DNA، ناپایداری کروموزومی، فعال‌شدن تلومراز و همچنین تغییرات اپی‌ژنتیکی اشاره نمود. به دلیل نقش اساسی آپوپتوز و مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلولی در کنترل تقسیم سلول‌ها، داروهای ارائه‌شده جدید ترجیحاً باید بتوانند آپوپتوز را در سلول‌های سرطانی القا نمایند (۱۴).

باتوجه‌به نقش اساسی آپوپتوز در کنترل هموستاز، آپوپتوز راه‌حل‌هایی را برای درمان‌های ضد سرطانی فراهم کرده و تاکنون ترکیبات بسیاری گزارش‌شده‌اند که از طریق القا آپوپتوز اثرات ضد سرطانی آنها مشخص شده است. بنا به این گفته امروزه یکی از استراتژی‌های هوشمندانه و جالب که حتی در شیمی‌درمانی سرطان نیز موردتوجه قرار گرفته است، مداخلات ترکیبات طبیعی است که به‌صورت بالقوه از طریق مسیر میتوکندریال یا به‌واسطه توانایی تخریب ژنوم در سلول‌های سرطانی خاصیت القا آپوپتوز را داشته باشند (۱۵،۱۶).

در راستای این پژوهش؛ مطالعات بسیاری به بررسی اثر کارواکرول در سلول‌های سرطانی پرداختند:

لی و همکاران زنده‌مانی سلولی و آپوپتوز را در رده‌های سلولی سرطان سینه BT-483 ، BT-474، MCF-7، MDA-MB-231، وMDA-MB-453 تیمار شده با کارواکرول را به ترتیب با استفاده از روش CCK-8و ELISA تعیین کردند. TRPM7در رده‌های سلولی MDA-MB-231و MCF-7 توسط کارواکرول مهار شد. عملکرد TRPM7 در سلول‌هایMDA-MB-231 ، MCF-7و HEK293 با وسترن‌بلات، پچ - کلمپ و روش کوئنچ فوراً-۲ مورد آزمایش قرار گرفت. نتایج نشان داد که کارواکرول زنده ماندن سلول‌های سرطان سینه را باقدرت متفاوت مهار می‌کند. در غلظت ۲۰۰ میکرومولار، MDA-MB-231 حساس‌ترین و MCF-7 کمترین

حساسیت را به کارواکرول نشان داد. در غلظت‌های بیشتر از ۲۰۰ میکرومولار، آپوپتوز به‌طور چشمگیری القا شد. کارواکرول عملکردهای TRPM7 را در MDA-MB-231، MCF-7 و HEK293 مهار کرد. کارواکرول در ۲۰۰ میکرومولار سلول‌ها را در فاز G1/G0 افزایش داد و سلول‌ها را در فاز S و G2/M با تنظیم برخی پروتئین‌های سیکلین در MDA-MB-231 کاهش داد. این مطالعه نشان داد که کارواکرول سلول‌های سرطان سینه را با تنظیم چرخه سلولی سرکوب می‌کند (۱۷).

در تحقیق حاضر نیز زنده‌مانی سلول‌های MDA-MB-231تحت تأثیر غلظت‌های ۰ تا ۱۲۰۰ میکرومولار کارواکرول ارزیابی شد و مشخص گردید که سمیت کارواکرول وابسته به دُز و در غلظت‌های بالاتر (۴۰۰µM ≤) وابسته به زمان است. همچنین میزان IC50 در تیمارهای ۲۴ و ۴۸ ساعته در رده‌ی سلولی MDA-MB-231 به ترتیب ۱۷۸/۵ و ۱۵۴/۲ میکرومولار محاسبه گردید. ما نیز در این تحقیق همسو با نتایج پژوهش لی دریافتیم که کارواکرول موجب القای آپوپتوز می‌گردد چراکه ارزیابی بیان ژن‌ها با تکنیک qRT-PCR نشان‌دهنده افزایش بیان ژن‌های پرو آپوپتوتیک Bax و P52و کاهش بیان ژن آنتی آپوپتوتیک Bcl2 بود. این یافته‌ها با رنگ‌آمیزی DAPI نیز تأیید گردید.

ماری و همکاران به بررسی نقش کارواکرول در تعدیل سیگنالینگ PI3K/AKT که در پاتوژنز سرطان سینه دخیل است (۱۸)، با استفاده از سلول‌های MCF-7 پرداختند. سنجش MTT و لاکتات دهیدروژناز در سلول‌های تیمار شده با دُزهای مختلف کارواکرول (۲۵۰-۰ پیکومول بر لیتر) در مقاطع زمانی مختلف (۲۴ و ۴۸ ساعت) انجام شد. رویدادهایی مانند توقف چرخه سلولی و آپوپتوز نیز توسط آنالیز فلوسایتومتری مشاهده شد و بیان p-Rb، cyclin D1، کیناز وابسته به سیکلین ۴ (CDK4)، CDK6، Bax، Bcl-2، PI3K/p-AKT توسط ایمونوبلات آنالیز شد. نتایج حاصل نشان داد که کارواکرول با IC50 معادل ۲۰۰ میکرومول در لیتر در ۲۴ و ۴۸ ساعت زنده‌مانی سلولی را به‌طور معنی‌داری کاهش داد. مهم‌تر از همه، افزایش قابل‌توجهی در تجمع فاز G0 / G1 پس از تیمار با کارواکرول در سلول‌های MCF-7 وجود داشت. کاهش قابل‌توجه در بیان پروتئین‌های p-Rb، cyclin D1، CDK4 و CDK6 نشان‌دهنده توقف چرخه سلولی بود. علاوه بر این، تیمار کارواکرول به طور قابل‌توجهی بیان پروتئین‌های PI3K/p-AKT را مهار کرد که منجر به القای آپوپتوز باواسطه کاهش Bcl-2 و افزایش بیان پروتئین Bax شد (۱۹). در تحقیق حاضر نیز به طور مشابهی مشاهده گردید که کارواکرول با تغییر بیان ژن‌های Bax، P53 و Bcl-2 موجب القای آپوپتوز از مسیر میتوکندریال در سلول‌های MDA-MB-231 می‌شود.

اعضای خانواده Bcl-2 نقش مهمی در تنظیم Transduction آپوپتوزی دارند که به سه زیرخانواده شامل پروتئین‌های آنتی آپوپتوتیک (Bcl-2، BclXL، BclW، MCL1 و BFL1/A1)، پروتئین‌های Only BH3 (Bad، Bim، Noxa و Puma9) و همچنین پروتئین‌های پرو آپوپتوتیک (Bax و Bak) تقسیم می‌شوند. اساساً همه اعضای خانواده Bcl-2 عملکردهای مشخص و مشترکی دارند ازجمله آنکه با دیگر اعضای خانواده Bcl-2 دایمر تشکیل می‌دهند، با اتصال پروتئین در تنظیم همئوستازی میتوکندری نقش دارند و به تشکیل منفذ غشای خارجی میتوکندری کمک می‌نمایند (۲۰،۲۱).

این مطالب با یافته‌های تحقیق حاضر و تحقیقات مشابه که تغییر بیان ژن‌های Bax، P53 و Bcl-2 را تحت تأثیر کارواکرول گزارش کرده‌اند هم‌راستا است. به نظر می‌رسد که یکی از مکانیسم‌های عمل کارواکرول در القای آپوپتوز و ایجاد سمیت در سلول‌های سرطانی، تغییر بیان ژن‌های آپوپتوزی است.

شاید بتوان چنین گفت که باتوجه به مطالب گزارش‌شده و همچنین یافته‌های این تحقیق، به نظر می‌رسد که یکی از مکانیسم‌های عمل کارواکرول در القای آپوپتوز و ایجاد سمیت در سلول‌های سرطانی، تغییر بیان ژن‌های آپوپتوزی و القا مسیر میتوکندریال آپوپتوز هست.

در تحقیق حاضر اثر سایتوتوکسیسیته کارواکرول بر رده‌ی سلولی MDA-MB-231 بررسی گردید. نتایج حاصل نشان‌دهنده سمیت ترکیب کارواکرول برای رده سلولی مورد مطالعه بود. به نظر می‌رسد که رده سلولی MDA-MB-231 حساسیت در برابر کارواکرول داشت. رنگ‌آمیزی DAPI نشان داد که کارواکرول، موجب القای آپوپتوز در سلول‌های MDA-MB-231 می‌گردد. در ارزیابی بیان ژن‌های Bcl-2، Bax و P53 نیز نشان داده شد که بیان آن‌ها تحت تأثیر ترکیب کارواکرول تغییر می‌یابد. به‌طورکلی این نتایج نشان می‌دهند که استفاده از کارواکرول می‌تواند اثربخشی قابل‌توجهی در درمان سلول‌های سرطانی داشته باشد و شاید با مطالعات بیشتر در این زمینه، در آینده از کارواکرول به‌عنوان یک داروی کمکی در کنار داروهای شیمی‌درمانی سرطان جهت کاهش اثرات جانبی داروها و کاهش طول دوره پروسه‌های درمانی بیماران مبتلابه سرطان یادکرد.

تشکر و قدردانی

با گرامیداشت یاد و خاطره مرحوم دکتر علی نظر صالح نیا مؤسس شرکت داروسازی خرمان که با راهنمایی‌های ارزشمندشان ما را در ارتقای کیفیت و انجام این تحقیق یاری نمودند، این مقاله مستخرج از رساله دکترای تخصصی ژنتیک مولکولی به کد رساله ۲۲۰۴۸۰۴۵۱۶۷۲۳۹۹۱۸۸۳۹۴ است.

تعارض منافع

نویسندگان اظهار می‌دارند که هیچ‌گونه تعارض منافعی در پژوهش حاضر وجود ندارد.

حمایت مالی

این مطالعه بدون هیچ حمایت مالی انجام پذیرفت.

مشارکت نویسندگان

حسن داریوش نژاد، طراحی علمی و گردآوری، تجزیه‌وتحلیل و تفسیر داده‌ها. آیت مرادی پور، تهیه پیش‌نویس و اصلاح نوشتار اولیه. چنگیز احمدی‌زاده، مشاوره در تست های مولکولی و تأیید نهایی نسخه مقاله نگارش شده. حامد اسمعیل لشگریان، کمک در انجام آزمایشات مولکولی و تایید نهایی نسخه نگارش شده.

ملاحظات اخلاقی و درج کد اخلاق

این پژوهش مورد تأیید کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی لرستان (IR.LUMS. REC.1399.034) قرار گرفت.

References

1. Al-Fatlawi AA, Ahmad A. Cytotoxicity and pro-apoptotic activity of Carvacrol on human breast cancer cell line MCF-7. World Journal of Pharmaceutical Sciences. 2014:1218-23.
2. Ghamari N, Radak M, Sisakhtnezhad S. Molecular Studying the effect of simultaneous treatment of Thymoquinone and Cobalt (II) chloride on the expression of genes involved in self-renewal, proliferation, migration and DNA methylation in breast cancer line MCF7 and normal fibroblastic cell line HDF. Cell and Tissue Journal. 2022;13(3):200-14.
3. Maiuolo J, Gliozzi M, Carresi C, Musolino V, Oppedisano F, Scarano F, et al. Nutraceuticals and cancer: Potential for natural polyphenols. Nutrients. 2021;13(11):3834.
4. Costa MF, Durço AO, Rabelo TK, Barreto RdSS, Guimarães AG. Effects of Carvacrol, Thymol and essential oils containing such monoterpenes on wound healing: A systematic review. Journal of Pharmacy and Pharmacology. 2019;71(2):141-55.
5. Kachur K, Suntres Z. The antibacterial properties of phenolic isomers, Carvacrol and thymol. Critical reviews in food science and nutrition. 2020;60(18):3042-53.
6. Becer E, Mutlu Altundag E, Başer KHC, Vatansever HS. Cytotoxic activity and antioxidant effects of Origanum onites essential oil and its two major contents, Carvacrol and p-Cymene on human colorectal (HCT116) and hepatocelluler carcinoma (HepG2) cell lines. Journal of Essential Oil Research. 2022;34(6):514-23.
7. Amara I, Timoumi R, Annabi E, Ben Othmène Y, Abid-Essefi S. The protective effects of thymol and Carvacrol against di (2-ethylhexyl) phthalate-induced cytotoxicity in HEK-293 cells. Journal of Biochemical and Molecular Toxicology. 2022;36(8):e23092.
8. Fatima K, Luqman S, Meena A. Carvacrol arrests the proliferation of hypopharyngeal carcinoma cells by suppressing ornithine decarboxylase and hyaluronidase activities. Frontiers in Nutrition. 2022;9.
9. Elbe H, Yigitturk G, Cavusoglu T, Baygar T, Ozgul Onal M, Ozturk F. Comparison of ultrastructural changes and the anticarcinogenic effects of thymol and Carvacrol on ovarian cancer cells: which is more effective? Ultrastructural pathology. 2020;44(2):193-202.
10. Khan F, Pandey P, Maqsood R, Upadhyay TK. Anticancer effects of Carvacrol in in vitro and in vivo models: a comprehensive review. Biointerface Res Appl Chem. 2023;13(3):290-303.
11. Sanaei M, Kavoosi F. Effect of valproic acid on the class i histone deacetylase 1, 2 and 3, tumor suppressor genes p21WAF1/CIP1 and p53, and intrinsic mitochondrial apoptotic pathway, Pro-(Bax, Bak, and Bim) and anti-(Bcl-2, Bcl-xL, and Mcl-1) apoptotic genes

expression, cell viability, and apoptosis induction in hepatocellular carcinoma hepg2 cell line. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention. 2021;22(S1):89-95.
12. Hafner A, Bulyk ML, Jambhekar A, Lahav G. The multiple mechanisms that regulate p53 activity and cell fate. Nature reviews Molecular cell biology. 2019;20(4):199-210.
13. Sun Y-S, Zhao Z, Yang Z-N, Xu F, Lu H-J, Zhu Z-Y, et al. Risk factors and preventions of breast cancer. International journal of biological sciences. 2017;13(11):1387.
14. Waks AG, Winer EP. Breast cancer treatment: a review. Jama. 2019;321(3):288-300.
15. Carneiro BA, El-Deiry WS. Targeting apoptosis in cancer therapy. Nature reviews Clinical oncology. 2020;17(7):395-417.
16. Jan R. Understanding apoptosis and apoptotic pathways targeted cancer therapeutics. Advanced pharmaceutical bulletin. 2019;9(2):205.
17. Li L, He L, Wu Y, Zhang Y. Carvacrol affects breast cancer cells through TRPM7 mediated cell cycle regulation. Life sciences. 2021;266:118894.
18. Meng Y, Wang W, Kang J, Wang X, Sun L. Role of the PI3K/AKT signalling pathway in apoptotic cell death in the cerebral cortex of streptozotocin-induced diabetic rats. Experimental and therapeutic medicine. 2017;13(5):2417-22.
19. Mari A, Mani G, Nagabhishek SN, Balaraman G, Subramanian N, Mirza FB, et al. Carvacrol promotes cell cycle arrest and apoptosis through PI3K/AKT signaling pathway in MCF-7 breast cancer cells. Chinese journal of integrative medicine. 2021;27:680-7.
20. Gupta I, Sareyeldin RM, Al-Hashimi I, Al-Thawadi HA, Al Farsi H, Vranic S, et al. Triple negative breast cancer profile, from gene to microRNA, in relation to ethnicity. Cancers. 2019;11(3):363.
21. Caulfield SE, Davis CC, Byers KF. Olaparib: a novel therapy for metastatic breast cancer in patients with a BRCA1/2 mutation. Journal of the advanced practitioner in oncology. 2019;10(2):167.

Carvacrol and Cancer Treatment: The Effect of Carvacrol in Inducing Apoptosis of Breast Cancer Cells

Moradipour A[1], Dariushnejad H[2]*, Ahmadizadeh Ch[3], Esmaeil Lashgarian H [4]

1. Ph.D. Student, Department of Molecular Genetics, Ahar Branch, Islamic Azad University, Ahar, Iran

2. Assistant Professor, Department of Medical Biotechnology, Faculty of Medicine, Lorestan University of Medical Sciences, Khoramabad, Iran, dariushnejad@gmail.com

3. Assistant Professor, Department of Molecular Genetics, Ahar Branch, Islamic Azad University, Ahar, Iran

4. Associate Professor, Department of Medical Biotechnology, Faculty of Medicine, Lorestan University of Medical Sciences, Khoramabad, Iran

Received: *2023/6/2* Accepted: *2023/9/27*

Abstract

Background: Carvacrol is a natural monoterpene phenolic compound that has biological activities with therapeutic applications, and this study aimed to investigate the apoptotic effect of Carvacrol on the human breast cancer cell line MDA-MB-231.

Materials and Methods: After the preparation and cultivation of MDA-MB-231 cells, the IC50 value of Carvacrol on the cells was evaluated by the MTT assay method, and then the induction of apoptosis in the cell line treated with different concentrations of Carvacrol was observed by DAPI staining. The qPCR method was used to check the expression levels of Bax, P53, and Bcl-2 genes at the mRNA level. The results were analyzed using GraphPad Prism 9 software.

Results: The results showed that the cytotoxicity of Carvacrol against MDA-MB-231 cancer cells was dose-dependent at 24 (P=0.034) and 48 (P=0.041) hours. The IC50 of Carvacrol at 48 h was 154.2 μM. The MDA-MB-231 cells treated with Carvacrol showed induction of apoptosis from the mitochondrial pathway by increasing the expression of P53 and BAX genes and decreasing the expression of the anti-apoptotic Bcl-2 gene. In addition, the number of apoptotic cells with dense DNA increased significantly in the Carvacrol treatment group (P=0.001).

Conclusion: This study showed that treatment of the MDA-MB-231 cell line with Carvacrol can inhibit its growth and proliferation through the induction of apoptosis from the BAX/BCL-2 pathway. Considering the significant inhibitory effect of the treatment of cells with the Carvacrol compound, it seems that there is a suitable research field for using this compound in the control and treatment of breast cancer.

Keywords: Apoptosis, Breast Cancer, Carvacrol, MDA-MB-231.

Citation: Moradipour A, Dariushnejad H, Ahmadizadeh Ch, Esmaeil Lashgarian H. Carvacrol and Cancer Treatment: The Effect of Carvacrol in Inducing Apoptosis of Breast Cancer Cells. Yafte. 2023; 25(3):1-12.