



# 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

Ghamari N<sup>a</sup>, Radak M<sup>a</sup>, Sisakhtnezhad S<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Biology, Faculty of Science, Razi University, Kermanshah, Iran, [s.sisakhtnezhad@razi.ac.ir](mailto:s.sisakhtnezhad@razi.ac.ir)

## Original Article

Use your device to scan and read the article online



Citation: 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. Journal of Cell and Tissue. 2022;13(3):200-214.

<https://10.52547/JCT/13.3.200>

## KEYWORDS

Thymoquinone, Cobalt (II) chloride, Gene expression, Breast cancer, Wound healing

## ABSTRACT

**Aim:** Nowadays, much attention is paid to the effects of natural factors on physiological and pathological processes in human body. In this regard, lack of oxygen or hypoxia is one of the crucial biological factors involved in various physiological processes such as wound healing and pathological processes such as cancer. Moreover, it is very important to find natural compounds affecting the characteristics and functions of cells. Thymoquinone (TQ) is a natural compound derived from certain plants such as *Nigella Sativa*. It has many biopharmacological effects, including anti-bacterial, anti-oxidant, anti-inflammatory, anti-diabetic, anti-aging, anti-cancer, etc. Given the biopharmacological properties of TQ and the importance of hypoxia as an important factor affecting physiological and pathological processes, this study was designed to investigate the effect of TQ under cobalt (II) chloride-mediated hypoxia on breast cancer and wound healing by evaluating the expression of *SOX2*, *CDK4*, *c-MET*, and *DNMT1* genes in a breast cancer cell line (MCF7) and a normal fibroblastic cell line (HDF) that treated with these compounds.

**Materials and Methods:** In the present study, after the cultivation of MCF7 and HDF cell lines, each of the cells were divided into two groups. The treatment group was treated simultaneously with 500 ng/ml of TQ and 100  $\mu$ M of cobalt (II) chloride for 24 h and the control group was only treated with cobalt (II) chloride. After incubation time, total RNA extraction, DNase I treatment, and cDNA synthesis were carried out and finally, the expression of target genes was examined by real-time PCR assay. In this study, relative threshold method was used to determine the amount of gene expression changes, and SPSS

\* Corresponding author. Tel.: +98-8334274545; Fax: +98-8334274545  
E-mail address: [s.sisakhtnezhad@razi.ac.ir](mailto:s.sisakhtnezhad@razi.ac.ir)

DOI: <https://10.52547/JCT/13.3.200>

Received: Feb 18, 2022; Received in revised form: Jun 25, 2022; Accepted: Jun 26, 2022

Original Article

© Author



software and Student's t-test statistical method were used to find the significance of gene expression changes in the treated groups compared to the controls.

**Results:** The results showed that simultaneous treatment of MCF7 cells with TQ and cobalt (II) chloride significantly ( $P < 0.05$ ) reduced the expression of *CDK4*, *c-MET*, and *DNMT1* genes at about 4.35-, 1.89-, and 2.08-fold, respectively, compared to the control group. However, the treatment of MCF7 cells caused a limited increase in the expression of *SOX2* at about 1.14-fold, which was not significant according to the significance level of  $\geq 1.5$ . Moreover, simultaneous treatment of HDF cells with TQ and cobalt (II) chloride significantly increased *c-MET* gene expression by about 1.86-fold. In addition, the treatment of HDF cells caused a slight increase in the expression of *CDK4* at about 1.26-fold, which was not significant according to the significance level of  $\geq 1.5$ . Also, the expression of *SOX2* and *DNMT1* genes has decreased at about 1.28- and 1.32-fold in the treatment group compared to the control group, which were as not significant according to the significance level of  $\geq 1.5$ .

**Conclusion:** Overall, it can be concluded that TQ under cobalt (II) chloride-mediated hypoxia may inhibit breast cancer by inhibiting the expression of genes involved in proliferation and migration. In addition, due to the important role of fibroblasts in the wound healing process, TQ may help wound healing under hypoxic conditions by increasing the migration potential of fibroblast cells.



## مطالعه مولکولی اثر تیمار همزمان تیموکوئینون و کلرید کبالت (II) بر بیان برخی ژن‌های دخیل در خودنوزایی، تکثیر، مهاجرت و متیلاسیون DNA در رده‌ی سلولی MCF7 سرطان سینه و رده‌ی سلولی فیبروبلاستی طبیعی HDF

نکیسا قمری<sup>۱</sup>، مهران رادک<sup>۱</sup>، سجاد سی سخت‌نژاد<sup>۲\*</sup>

<sup>۱</sup> کارشناسی ارشد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران.

<sup>۲</sup> استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران. [s.sisakhtnezhad@razi.ac.ir](mailto:s.sisakhtnezhad@razi.ac.ir)

چکیده	واژگان کلیدی
<p><b>هدف:</b> امروزه توجه زیادی به اثرات عوامل طبیعی بر فرآیندهای فیزیولوژیک و پاتولوژیک در بدن انسان می‌شود. در این ارتباط، کمبود اکسیژن (هایپوکسی) یکی از فاکتورهای زیستی حیاتی دخیل در انواع فرآیندهای فیزیولوژیک مانند ترمیم زخم و نیز فرآیندهای پاتولوژیک مانند سرطان است. همچنین، امروزه یافتن ترکیبات طبیعی مؤثر بر رفتارها و عملکردهای سلول‌های بسیار مهم می‌باشد. تیموکوئینون یک ترکیب طبیعی مشتق شده از برخی گیاهان مانند سیاه دانه است. این ترکیب دارای اثرات بیوفارماکولوژیک بسیار زیادی، شامل اثرات ضد باکتری، ضد اکسیدانی، ضد التهاب، ضد دیابت، ضد پیری، ضد سرطان و غیره است. با توجه به خواص بیوفارماکولوژیک تیموکوئینون و اهمیت هایپوکسی به‌عنوان یک فاکتور مهم مؤثر بر فرآیندهای فیزیولوژیک و پاتولوژیک، این مطالعه به‌منظور بررسی اثر همزمان تیموکوئینون و کلرید کبالت (II) بر سرطان سینه و ترمیم زخم از طریق ارزیابی بیان ژن‌های <i>c-MET</i>, <i>CDK4</i>, <i>SOX2</i> و <i>DNMT1</i> در یک رده سلولی سرطان سینه (MCF7) و یک رده سلولی فیبروبلاستی طبیعی (HDF) طراحی شد.</p> <p><b>مواد و روش‌ها:</b> در مطالعه حاضر، پس از کشت رده‌های سلولی MCF7 و HDF، هر یک از سلول‌ها به دو گروه تقسیم شدند. گروه تیمار که به‌طور هم‌زمان با غلظت ۵۰۰ ng/ml از تیموکوئینون و ۱۰۰ μM از کلرید کبالت (II) و گروه کنترل که صرفاً تحت تیمار با کلرید کبالت (II) به‌مدت ۲۴ ساعت قرار گرفتند. پس از گذشت زمان انکوباسیون، استخراج RNA کل، تیمار DNase I، سنتز cDNA و در نهایت بررسی بیان ژن‌های هدف در سطح mRNA با روش Real-time PCR انجام شد. در این مطالعه برای تعیین میزان تغییرات بیان ژن‌ها، از روش آستانه‌ی نسبی و برای بررسی معنادار بودن تغییرات بیان ژن‌ها در نمونه‌های تیمار نسبت به کنترل، از نرم‌افزار SPSS و روش آماری Student's t-test استفاده شد. <b>نتایج:</b> نتایج نشان داد که تیمار هم‌زمان سلول‌های MCF7 با تیموکوئینون و کلرید کبالت (II) باعث کاهش معنی‌دار (<math>P &lt; 0.05</math>) بیان ژن‌های <i>c-MET</i>, <i>CDK4</i> و <i>DNMT1</i> به ترتیب در حدود ۴/۳۵،</p>	<p>تیموکوئینون، کلرید کبالت (II)، بیان ژن، سرطان سینه، ترمیم زخم</p> <p>تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۱/۲۹</p> <p>تاریخ بازنگری: ۱۴۰۱/۰۴/۰۴</p> <p>تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۴/۰۵</p>

۱/۸۹ و ۲/۰۸ برابر، نسبت به گروه کنترل می‌شود. با این حال، تیمار سلول‌های MCF7 باعث افزایش محدود بیان *SOX2* در حدود ۱/۱۴ برابر شد، که با توجه به سطح معناداری بزرگتر مساوی ۱/۵، کاهش بیان آن معنادار نبود. همچنین، تیمار هم‌زمان سلول‌های HDF با تیموکوتینون و کلرید کبالت (II) باعث افزایش معنی‌دار بیان ژن *c-MET* در حدود ۱/۸۶ شد. به‌علاوه، تیمار سلول‌های HDF باعث افزایش محدود بیان *CDK4* در حدود ۱/۲۶ برابر شد، که با توجه به سطح معناداری بزرگتر مساوی ۱/۵، کاهش بیان آن معنادار نبود. همچنین، بیان ژن‌های *SOX2* و *DNMT1* در مقایسه گروه تیمار نسبت به گروه کنترل به ترتیب در حدود ۱/۲۸ و ۱/۳۲ برابر کاهش بیان داشته است که با توجه به سطح معناداری بزرگتر مساوی ۱/۵، کاهش بیان هیچ‌کدام معنادار نبوده است. نتیجه‌گیری: در مجموع می‌توان نتیجه گرفت که تیموکوتینون تحت شرایط هایپوکسی ناشی از کلرید کبالت (II) از طریق مهار بیان ژن‌های دخیل تکثیر و مهاجرت ممکن است باعث مهار سرطان سینه شود. همچنین، با توجه به نقش مهم فیبروبلاست‌ها در فرآیند ترمیم زخم، تیموکوتینون ممکن است تحت شرایط هایپوکسی از طریق افزایش پتانسیل مهاجرت سلول‌های فیبروبلاستی به ترمیم زخم کمک نماید.

## ۱- مقدمه

کمبود اکسیژن (هایپوکسی) یکی از شرایط زیستی مهم و موثر بر انواع فرآیندهای فیزیولوژیک مانند ترمیم زخم و نیز فرآیندهای پاتولوژیک مانند سرطان است (۱، ۲). سرطان یک مشکل بهداشت عمومی و یکی از عوامل عمده مرگ و میر در سراسر جهان است. فرآیندهای پیچیده چند مرحله‌ای و تجمع تدریجی تغییرات ژنتیکی و اپی‌ژنتیکی در پروتئوکوزن‌ها و ژن‌های مهارکننده تومور در ایجاد این بیماری نقش دارد. در حقیقت، عوامل استرس‌زای خارج و داخل سلولی منجر به ناپایداری ژنتیکی و اپی‌ژنتیکی و در نتیجه به هم خوردن تنظیم رفتارها و عملکردهای سلولی به‌ویژه رشد و تکثیر، مرگ سلولی و در نهایت تشکیل تومور می‌شوند (۳). علاوه بر نقش عوامل موتاژن و غیرموتاژن خارج و داخل سلولی در ناپایداری ژنتیکی و اپی‌ژنتیکی و در نتیجه تغییر رفتارها و عملکردهای سلولی و ایجاد سرطان، هایپوکسی نیز نقش بسیار حیاتی در پیشرفت تومور و گسترش سلول‌های سرطانی به سایر نقاط بدن دارد. در حقیقت، افزایش اندازه‌ی تومور باعث کاهش اکسیژن و استرس به سلول‌های قرار گرفته در مرکز تومور و تولید و ترشح فاکتورهای التهابی و پرو‌آنژیوژنیک جهت القای شروع رگ‌زایی به داخل تومور می‌شود (۴). رگ‌های ایجاد شده از طریق تسریع تبادل مواد توسط سلول‌های توموری، باعث افزایش رشد و تکثیر سلول‌های توموری و نیز متاستاز آن‌ها به سایر نقاط بدن می‌شود (۴، ۵). علاوه بر نقش هایپوکسی در پیشرفت تومور و گسترش سلول‌های سرطانی، اهمیت هایپوکسی در فرآیندهای ترمیم زخم نیز طی مطالعات متعدد به اثبات رسیده است (۶، ۷).

امروزه انسان‌ها درگیر انواع مختلفی از آسیب‌های بدنی و بیماری‌های مختلف از جمله سرطان‌ها هستند. در این میان، سرطان سینه شایع‌ترین نوع سرطان و دومین عامل اصلی مرگ و میر زنان در سراسر جهان است (۸). خوشبختانه بیش از ۹۰ درصد از سرطان‌های سینه در زمان تشخیص، متاستاتیک نیستند. بنابراین می‌توان راه‌کارهای درمانی ممکن را برای مهار گسترش و عود مجدد تومورها به کار گرفت. متأسفانه امروزه بسیاری از سرطان‌ها را زمانی تشخیص می‌دهند که تومورها قابل مشاهده و لمس ایجاد شده باشد. اولین راه‌کار سنتی مقابله با تومور ایجاد شده، جراحی و برداشتن تومور است. اما مشکل

اساسی در اغلب سرطان‌ها که درمان کامل آن‌ها را به چالش کشده است، متاستاز سلول‌های توموری به سایر نقاط بدن می‌باشد. بنابراین، معمولاً پس از جراحی و حذف توده‌ی توموری، بسته به نوع سرطان و درجه پیشرفت آن، روش‌های دیگری اعم از شیمی درمانی یا رادیوتراپی یا ترکیبی از این دو روش برای حذف سلول‌های متاستاتیک احتمالی موجود در بدن استفاده می‌شود (۹). متاسفانه استفاده از روش‌های سنتی در درمان سرطان، عوارض جانبی ناخواسته بر سلول‌ها، بافت‌ها و ارگان‌های سالم بدن دارد، بنابراین محققان به دنبال راه‌کارهای درمانی موثرتر و هدفمند برای از بین بردن مستقیم سلول‌های سرطانی بدون اثر بر سلول‌های طبیعی هستند.

استفاده از ترکیبات شیمیایی طبیعی که بتوانند اهداف مولکولی مشخصی را در سلول‌ها هدف قرار دهند و بر رفتار و عملکردهای سلولی موثر باشند، نقش بسیار مهمی در درمان آسیب‌ها و بیماری‌های مختلف به‌ویژه ترمیم زخم‌ها و درمان سرطان دارند. گیاهان دارویی یکی از منابع بسیار غنی از ترکیبات شیمیایی طبیعی هستند که کاربردهای زیادی در حیطه‌های مختلف به‌ویژه درمان سرطان دارند. در این ارتباط، سیاه‌دانه (*Nigella Sativa*) یکی از گیاهان مورد توجه می‌باشد. بررسی‌های متعدد حاکی از آن می‌باشند که سیاه‌دانه سرشار از انواع مختلفی از ترکیب شیمیایی طبیعی با قابلیت‌های بیوفارماکولوژیک بسیار مهم هستند. گزارش شده است که تیموکوئینون اصلی‌ترین ترکیب زیست‌فعال موجود در روغن و عصاره سیاه‌دانه است. این ترکیب با اثر بر انواع مختلفی از اهداف مولکولی، طیف گسترده‌ای از خواص بیوفارماکولوژیک را نشان می‌دهد. از نظر عملکردی، تیموکوئینون دارای اثرات آنتی‌اکسیدانسی، ضدالتهابی، تقویت‌کننده‌ی سیستم ایمنی، ضد میکروبی و ضد توموری می‌باشد، بنابراین مطالعات متعدد گزارش می‌دهند که این ترکیب دارای اثرات درمانی گسترده بر علیه بیماری‌های مختلف به‌ویژه سرطان است. در این رابطه نشان داده شده است که تیموکوئینون باعث توقف چرخه‌ی سلولی، القای آپوپتوزیس، مهار رگ‌زایی و متاستاز می‌شود (۱۰-۱۳). همچنین، مطالعات زیادی پیرامون اثر تیموکوئینون بر مهاجرت سلولی و نیز در درمان زخم انجام شده است (۱۴، ۱۵).

علی‌رغم مطالعات گسترده در زمینه اثرات بیوفارماکولوژیک تیموکوئینون تحت شرایط طبیعی، تاکنون هیچ مطالعه‌ای در رابطه با اثر این ترکیب بر بیان ژن‌ها و رفتارها و عملکردهای سلولی و مولکولی تحت شرایط هایپوکسی طبیعی یا القاء شده تحت شرایط فیزیولوژیک و پاتولوژیک گزارش نشده است. با توجه به اهمیت بسیار زیاد هایپوکسی به عنوان یک فاکتور زیستی تنظیم‌کننده‌ی اساسی در پیشرفت تومور و گسترش سلول‌های سرطانی و نیز پتانسیل بیوفارماکولوژیک بالقوه‌ی تیموکوئینون در مهار سلول‌های سرطان سینه و نیز القای ترمیم زخم، بنابراین این مطالعه به‌منظور بررسی اثر همزمان شرایط هایپوکسی القاء شده توسط کلرید کبات (II) و تیموکوئینون بر سرطان سینه و ترمیم زخم از طریق ارزیابی بیان ژن‌های دخیل در خودنوزایی، تکثیر، مهاجرت و متیلاسیون DNA در یک رده‌ی سلولی سرطان سینه (MCF7) و یک رده‌ی سلولی فیبروبلاستی طبیعی انسانی (HDF) پس از تیمار با این ترکیبات طراحی شد.

## ۲- مواد و روش‌ها

**کشت رده‌های سلولی:** در این مطالعه سلول‌های سرطانی رده‌ی MCF7 و نیز رده‌ی سلولی فیبروبلاستی طبیعی انسانی HDF از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه شد و در شرایط استاندارد کشت سلولی شامل ۵ درصد دی‌اکسید کربن، ۹۰ درصد رطوبت و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌منظور رسیدن به تراکم مناسب انکوبه شدند. محیط کشت سلولی DMEM-F12 (گیبکو، اسکاتلند) غنی شده با ۱۰ درصد سرم جنین گاو (گیبکو، اسکاتلند) و آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین و استرپتومایسین (IX) (بایواید، ایران) جهت کشت این سلول‌ها مورد استفاده قرار گرفت. فلاسک‌ها هر روز از نظر رنگ و شفافیت محیط کشت، میزان رشد، تراکم، ریخت‌شناسی سلول‌ها و آلودگی‌های باکتریایی و قارچی با استفاده از میکروسکوپ فاز معکوس مورد بررسی

قرار گرفتند و تقریباً هر دو روز یکبار محیط کشت سلول‌ها تعویض شد. در ادامه و پس از آن که سلول‌ها به تراکم مناسب رسیدند، طبق پروتکل استاندارد از آن‌ها زیرکشت (پاساژ) تهیه شد. بخشی از سلول‌های MCF7 و HDF تهیه شده فریز شدند و بخشی نیز برای آزمایشات بعدی در کشت نگه‌داری و استفاده شدند.

#### **تهیه محلول‌های تیموکوئینون و کلرید کبالت (II):** در این مطالعه ترکیب تیموکوئینون از شرکت سیگما تهیه شد.

برای استفاده از محلول تیموکوئینون، غلظت ذخیره این ترکیب (50 mg/ml) به صورت تازه تهیه و پس از رقیق‌سازی مورد استفاده قرار گرفت. با توجه به اینکه تیموکوئینون یک ترکیب حساس به نور و غیرقطبی است، برای تهیه محلول ذخیره‌ی آن، مقدار مناسبی از تیموکوئینون وزن و تحت شرایط تاریکی در حلال دی متیل سولفوکساید حل شد. برای تیمار سلول‌ها در آزمایشگاه، محلول ذخیره‌ی تیموکوئینون به کمک محیط کشت بدون سرم با غلظت مناسب رقیق‌سازی شد. با توجه به مطالعات قبلی تیم ما در زمینه استفاده از تیموکوئینون برای تیمار سلول‌های بنیادی مزانشیمی (۱۶) و نیز مطالعات قبلی در رابطه با تیمار سلول‌های MCF7 با تیموکوئینون (۱۷، ۱۸)، در مطالعه حاضر برای تیمار سلول‌های MCF7 و HDF از غلظت نهایی 500 ng/ml استفاده شد. همچنین، در این مطالعه کلرید کبالت (II) ساخت شرکت مرک آلمان برای ایجاد هایپوکسی در سلول‌های سرطانی MCF7 و HDF کشت داده شده، خریداری و مورد استفاده قرار گرفت. با توجه به مطالعات متعدد قبلی در زمینه تایید نقش محدوده‌ی غلظتی 100-200  $\mu$ M کلرید کبالت (II) در ایجاد هایپوکسی در کشت‌های سلولی و بیشترین تاثیر بر تکثیر و مهاجرت سلول‌های MCF7 (22-19)، بنابراین در این مطالعه از غلظت 100  $\mu$ M برای ایجاد شرایط هایپوکسی ضمن تیمار تیموکوئینون در کشت‌های سلولی MCF7 و HDF استفاده شد.

#### **گروه‌های مورد مطالعه و تیمار همزمان با تیموکوئینون و کلرید کبالت (II):** برای تیمار همزمان سلول‌ها با

تیموکوئینون و کلرید کبالت (II)، ابتدا سلول‌های MCF7 و HDF در فلاسک T25 کشت داده شدند. پس از رسیدن سلول‌ها به تراکم مناسب حدود 75 درصد، فلاسک‌های کشت سلول MCF7 و HDF به دو گروه تقسیم شدند. گروه کنترل که شامل کشت‌های سلول MCF7 و سلول HDF که صرفاً تحت تیمار کلرید کبالت (II) (100  $\mu$ M) و در نتیجه در شرایط هایپوکسی قرار گرفتند و گروه تیمار که شامل کشت‌های سلول MCF7 و سلول HDF که همزمان با هر دو ترکیب تیموکوئینون (ng/ml 500) و کلرید کبالت (II) (100  $\mu$ M) تیمار شدند. در این مطالعه اثر همزمان تیمار تیموکوئینون و کلرید کبالت (II) بر بیان ژن‌های هدف، 24 ساعت پس از تیمار مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه 3 تکرار مستقل برای هر گروه استفاده شد.

#### **بررسی بیان ژن‌های هدف:** پس از گذشت زمان تیمار و انکوبه شدن سلول‌های (24 ساعت) با کلرید کبالت (II) و

تیموکوئینون، RNA کل نمونه‌ها با استفاده از کیت مخصوص خریداری شده از شرکت دنازیست (کیت استخراج RNA ستونی؛ S-1020) از گروه‌های کنترل و تیمار استخراج شد. به منظور تایید استخراج RNA و بررسی کیفیت آن‌ها، از تکنیک الکتروفورز بر روی ژل آگارز 1 درصد استفاده شد. جهت استفاده از RNAs استخراج شده برای بررسی بیان ژن‌های هدف (SOX2، c-MET، CDK4 و DNMT1) در نمونه‌های تیمار نسبت به کنترل، ابتدا آلودگی‌های ژنومی احتمالی موجود در نمونه‌های RNA، با استفاده از آنزیم DNase I تهیه شده از شرکت فرمنتاز و مطابق دستورالعمل آن حذف شدند. پس از حذف آلودگی‌های ژنومی، بر اساس دستورالعمل کیت سنتز cDNA (شرکت تاکارا، ژاپن)، cDNA نمونه‌های کنترل و تیمار ساخته شد. در ادامه صحت سنتز cDNA با استفاده از روش PCR و پرایمرهای اختصاصی (جدول 1) برای ژن‌های مورد بررسی تایید شد. نهایتاً cDNA‌های سنتز شده برای بررسی کمی بیان ژن‌ها در سطح رونوشت mRNA توسط Real-time PCR مورد استفاده قرار گرفتند. جهت انجام واکنش‌های Real-time PCR از کیت سایبرگرین شرکت تاکارا و پرایمرهای اختصاصی

طراحی شده توسط نرم افزار Allele ID برای ژن‌های مورد مطالعه، طی واکنش‌های ۱۰ میکرولیتری و برنامه دمایی و زمانی سه مرحله‌ای شامل مرحله واسرشت‌سازی (۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۵ ثانیه)، مرحله اتصال (۶۰ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ ثانیه) و مرحله گسترش (۷۲ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ ثانیه) استفاده شد. در این مطالعه، از ژن *GAPDH* به عنوان استاندارد و کنترل داخلی برای بررسی بیان ژن‌ها استفاده شد. همچنین برای بررسی ژن‌ها در هر یک از نمونه‌های تیمار و کنترل، در هر مرحله از انجام Real-time PCR دو تکرار تکنیکی در نظر گرفته شد.

جدول ۱: لیست پرایمرها مورد استفاده در واکنش‌های PCR و Real-time PCR.

طول قطعه تکثیر	توالی	کد دسترسی	نام آغازگر
۱۴۳	5'-GGGCTCTCCAGAACATCATCC-3' 5'-ACGGCAGGTCAGGTCCAC-3'	NM_002046.7	<i>GAPDH</i>
۱۰۳	5'-TTGCATCGTTCACCGAGATC-3' 5'-CTGGTAGCTGTAGATTCTGGCCA-3'	NM_000075.3	<i>CDK4</i>
۱۷۷	5'-GCCCCGTAGCCCTGGAAACAAAG-3' 5'-AGAGATGCCTGCTTGGTGAATC-3'	NM_001130823.3	<i>DNMT1</i>
۱۳۳	5'-TGCAGCGCGTTGACTTATTCATGG-3' 5'-GAAACCACAACCTGCATGAAGCGA-3'	NM_001127500.3	<i>c-MET</i>
۱۲۴	5'-CCCACCTACAGCATGTCTACTC-3' 5'-TGGAGTGGGAGGAAGAGGTAAC-3'	NM_003106.4	<i>SOX2</i>

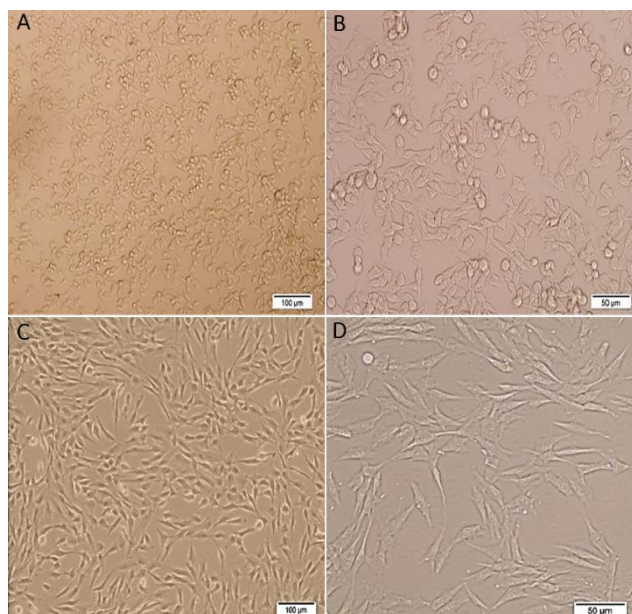
### ۳- آنالیز آماری

جهت آنالیز داده‌های Real-time PCR، روش آستانه‌ی نسبی استفاده شد. این روش برای مقایسه بیان ژن‌ها کاربرد دارد و به عبارتی تفاوت نسبی بیان بین دو یا چند نمونه را تعیین می‌کند (۲۳). در این مطالعه، با استفاده از روش آستانه‌ی نسبی، داده‌های مربوط به تغییرات بیان ژن‌های *DNMT1*، *c-MET*، *CDK4*، *SOX2* در سطح رونویسی برای هر دو گروه کنترل و تیمار آنالیز و تغییرات بیان ژن‌ها در نمونه‌های تیمار نسبت به کنترل بیشتر یا برابر با ۱/۵ به عنوان سطح معنی‌دار در نظر گرفته شدند (۱۶، ۲۴، ۲۵). همچنین جهت مقایسه‌ی بیان ژن‌ها و بررسی معنی‌دار بودن تغییرات بیان در سلول‌های MCF7 نسبت به HDF از نرم افزار SPSS و روش آماری Student's t-test (برای تعیین اختلاف معناداری میانگین‌های دو گروه) استفاده شد. کلیه داده‌ها به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار بیان شدند و مقدار  $p < 0.05$  به عنوان سطح معنی‌دار جهت یافتن تفاوت‌های معنی‌دار در نظر گرفته شد.

### ۳- نتایج

#### کشت سلول‌های رده سرطانی MCF7 و رده فیبروبلاستی طبیعی HDF

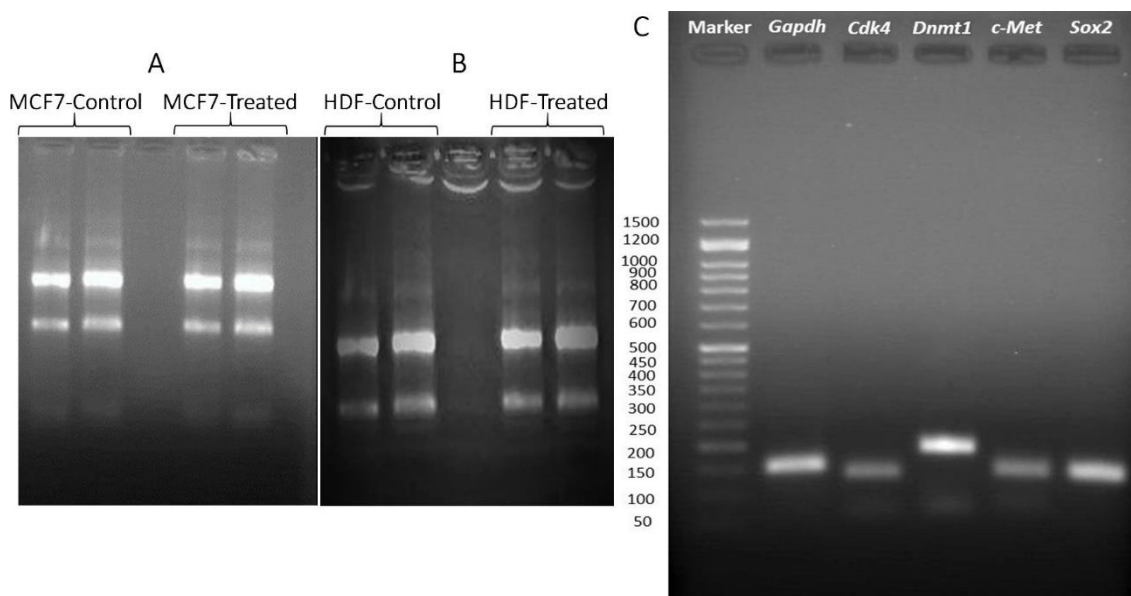
رده‌ی سلولی MCF7 سرطان سینه و سلول‌های رده‌ی فیبروبلاستی طبیعی HDF پس از انتقال به آزمایشگاه کشت سلول، در شرایط مناسب تا رسیدن به تراکم حدود ۷۵ درصد کشت شدند. پس از رسیدن سلول‌ها به تراکم لازم از سلول‌های مذکور زیر کشت تهیه شد و سلول‌ها جهت انجام مطالعات بعدی در شرایط استاندارد آزمایشگاهی نگهداری شدند. شکل ۱ نشان‌دهنده‌ی تراکم و ریخت‌شناسی طبیعی سلول‌های MCF7 و HDF در شرایط کشت می‌باشد.



شکل ۱: کشت رده‌ی سلولی MCF7 سرطان سینه (تصویر A بزرگ‌نمایی  $\times 100$  و تصویر B بزرگ‌نمایی  $\times 50$ ) و رده‌ی فیبروبلاستی طبیعی HDF (تصویر C بزرگ‌نمایی  $\times 100$  و تصویر D بزرگ‌نمایی  $\times 50$ ).

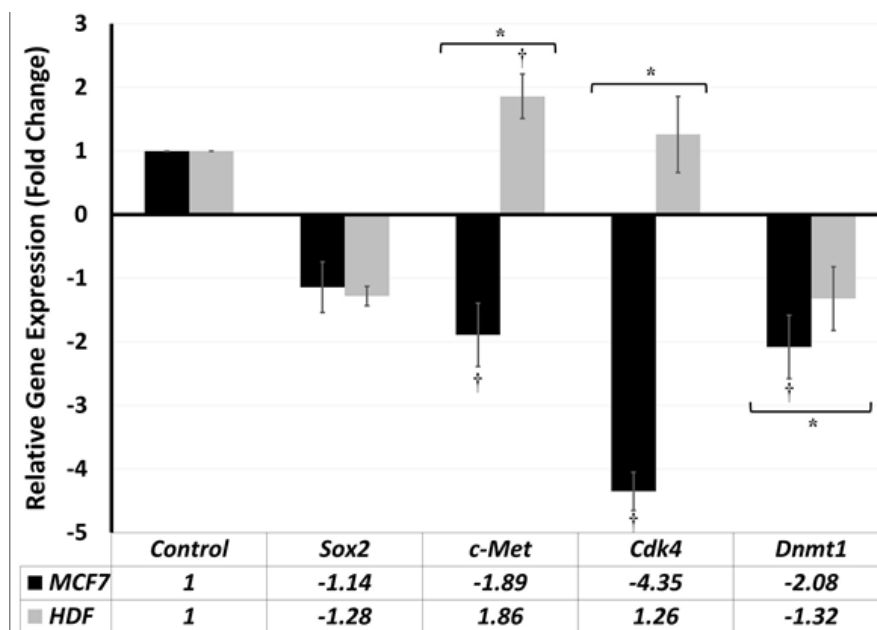
#### تیمار سلول‌ها، استخراج RNA و سنتز cDNA

پس از کشت سلول‌های سرطانی رده‌ی MCF7 و رده‌ی سلولی HDF و رسیدن سلول‌ها به تراکم مناسب، فلاسک‌های کشت سلول مربوط به هر نوع سلول به دو گروه تقسیم شدند و به مدت ۲۴ ساعت تحت تیمار با کلرید کبالت (II) به‌تنهایی (گروه کنترل) و یا تیمار همزمان با دو ترکیب تیموکوئینون و کلرید کبالت (II) (گروه تیمار) قرار گرفتند. در نهایت جهت بررسی اثر تیمار اعمال شده بر سلول‌ها، تغییرات بیان ژن‌های *SOX2*، *c-MET*، *CDK4* و *DNMT1* در نمونه‌های تیمار در مقایسه با نمونه‌های کنترل بررسی شد. پس از گذشت مدت زمان تعیین شده برای تیمار، از همه‌ی نمونه‌های کنترل و تیمار برای هر دو نوع سلول MCF7 و HDF استخراج RNA کل انجام شد. تایید استخراج RNA و نیز تایید کیفیت RNAs استخراج شده با کمک الکتروفورز بر روی ژل آگاروز ۱ درصد انجام شد. تصویر ژل الکتروفورز RNAs استخراج شده از برخی نمونه‌های سلولی MCF7 در شکل ۲-A و از برخی نمونه‌های سلولی HDF در شکل ۲-B ارائه شده است. در ادامه به‌منظور سنتز cDNA، آلودگی‌های ژنومی احتمالی از نمونه‌های RNA حذف شد و در نهایت سنتز cDNA انجام شد. تایید سنتز cDNA از نمونه‌ها به‌کمک روش PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی برای ژن‌های مورد مطالعه (*SOX2*، *c-MET*، *CDK4* و *DNMT1*) و نیز GAPDH به‌عنوان کنترل داخلی در مطالعات بعدی آنالیز بیان انجام شد. تصویر مربوط به ژل الکتروفورز محصولات سنتز شده طی واکنش‌های PCR برای ژن‌های مورد مطالعه در شکل ۲-C ارائه شده است.



شکل ۲: RNAs کل استخراج شده از گروه‌های کنترل و تیمار سلول سرطانی MCF7 (A) و سلول فیبروبلاستی طبیعی HDF (B) بر روی ژل آگاروز ۱ درصد. ژل الکتروفورز مربوط به محصولات ژنی تکثیر شده طی واکنش‌های PCR برای ژن‌های *SOX2*، *CDK4*، *c-MET* و *DNMT1* (C) بر روی ژل آگاروز ۲ درصد.

**بررسی کمی بیان ژن‌ها در نمونه‌های تیمار نسبت به کنترل:** در این مطالعه، اثر تیمار همزمان کلرید کبالت (II) و تیموکوئینون بر بیان ژن‌های *SOX2*، *CDK4*، *c-MET* و *DNMT1* در سلول‌های رده‌ی MCF7 سرطان سینه و رده‌ی سلولی فیبروبلاستی طبیعی انسانی HDF در سطح رونوشت mRNA بررسی شد. آنالیز داده‌های حاصل از واکنش‌های Real-time PCR برای سلول‌های MCF7 در گروه تیمار (کلرید کبالت (II) و تیموکوئینون) نسبت به گروه کنترل (کلرید کبالت (II)) حاکی از آن است که بیان تمامی ژن‌های مورد مطالعه شامل *SOX2*، *CDK4*، *c-MET* و *DNMT1* در بازه‌ی زمانی ۲۴ ساعت، کاهش یافته است که این کاهش با توجه به در نظر گرفتن سطح معنی‌داری بزرگتر یا برابر با ۱/۵، برای ژن‌های *CDK4* (۴/۳۵ برابر)، *c-MET* (۱/۸۹ برابر) و *DNMT1* (۲/۰۸ برابر) معنادار بوده که در شکل ۳ با علامت (\*) مشخص شده‌اند، اما برای ژن *SOX2* (۱/۱۴ برابر) معنی‌دار نبود. همچنین، بررسی داده‌های حاصل از واکنش‌های بررسی بیان ژن در سلول‌های رده فیبروبلاستی طبیعی HDF در گروه تیمار (کلرید کبالت (II) و تیموکوئینون) نسبت به گروه کنترل (کلرید کبالت (II)) نشان داد که بیان ژن‌های *CDK4* و *c-MET* به ترتیب به میزان ۱/۲۶ و ۱/۸۶ افزایش داشته است که با در نظر گرفتن سطح معنی‌داری ۱/۵، افزایش بیان ژن *c-MET* معنادار بوده، اما افزایش بیان *CDK4* معنی‌دار نمی‌باشد. به علاوه، در بازه‌ی زمانی مذکور، بیان ژن‌های *SOX2* و *DNMT1* در مقایسه گروه تیمار نسبت به گروه کنترل به ترتیب به میزان ۱/۲۸- و ۱/۳۲- کاهش بیان داشته است که با توجه به سطح معنی‌داری بزرگتر مساوی ۱/۵، کاهش بیان هیچ‌کدام معنی‌دار نبوده است.



شکل ۳: مقایسه نسبی بیان ژن‌های مورد مطالعه، در گروه‌های تیمار (کلرید کبالت (II) و تیموکوئینون) و کنترل (کلرید کبالت (II)) در بازه‌ی زمانی ۲۴ ساعت. سطح معنی‌دار برای بیان ژن‌ها در نمونه‌های تیمار نسبت به نمونه‌های کنترل به صورت تغییر بیان بیشتر مساوی ۱/۵ در نظر گرفته شد و با † در نمودار مشخص شده است. همچنین تفاوت بیان بین ژن‌ها در سلول‌های MCF7 نسبت به سلول‌های HDF با سطح  $p < 0.05$  تعیین شد و در شکل به صورت یک ستاره (\*) نشان داده شده است. داده‌های به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار ارائه شده است.

از سوی دیگر، آنالیز داده‌های بیانی با استفاده از نرم افزار آماری برای مقایسه‌ی بیان ژن‌های هدف در دو نوع سلول MCF7 و HDF حاکی از آن است که تفاوت معنی‌داری بین بیان ژن‌های *CDK4* و *c-MET* در این دو نوع سلول وجود دارد. در شکل ۳ اختلاف‌های معنی‌دار ( $P < 0.05$ ) بیان ژن‌ها بین دو نوع سلول MCF7 و HDF با یک ستاره (\*) نشان داده شده است. در این مطالعه تیمار کلرید کبالت (II) و تیموکوئینون بر بیان ژن *SOX2* در هر دو سلول کاهش بود، اما اختلاف معنی‌داری بین بیان این ژن در مقایسه دو سلول وجود ندارد. همچنین، نتایج نشان می‌دهند که علی‌رغم افزایش بیان این دو ژن در سلول‌های HDF تیمار شده با کلرید کبالت (II) و تیموکوئینون، اما بیان آن‌ها در سلول‌های MCF7 تیمار شده به شدت کاهش یافته است. همچنین مقایسه بیان ژن *DNMT1* در دو سلول حاکی از آن است که اثر تیمار کلرید کبالت (II) و تیموکوئینون بر هر دو نوع سلول باعث کاهش بیان این ژن شده است، اما این کاهش برای سلول MCF7 تیمار شده نسبت به سلول HDF بیشتر بوده و تفاوت معنی‌داری بین بیان این ژن بین دو سلول وجود داشت.

#### ۴- بحث

در مطالعه حاضر اثر تیمار همزمان کلرید کبالت II و تیموکوئینون بر بیان ژن‌های دخیل در *SOX2*، *CDK4*، *c-MET* و *DNMT1* در رده سلولی MCF7 سرطان سینه و رده سلولی فیبروبلاستی طبیعی HDF در سطح رونوشت mRNA بررسی شد. مطالعات گسترده نشان داده‌اند که این ژن‌ها به ترتیب در القای فرایند خودنوزایی (۲۶، ۲۷)، تکثیر (۲۸)، مهاجرت (۲۹) و متیلاسیون DNA (۳۰) نقش دارند. نتایج این مطالعه نشان داد که بیان تمامی ژن‌های مذکور در بازه‌ی زمانی ۲۴ ساعت در سلول‌های MCF7 تیمار شده به صورت همزمان با کلرید کبالت II و تیموکوئینون نسبت به سلول‌های کنترل تیمار شده با

صرفاً کلرید کبالت (II) کاهش یافته است. این در حالی است که این کاهش برای ژن‌های *CDK4*، *c-MET* و *DNMT1* معنادار، اما برای ژن *SOX2* نسبت به نمونه کنترل معنادار نمی‌باشد. در پژوهش حاضر، همچنین اثر همزمان کلرید کبالت (II) و تیموکوتینون بر بیان ژن‌های *SOX2*، *CDK4*، *c-MET* و *DNMT1* در سلول‌های فیبروبلاستی طبیعی HDF بررسی شد. سلول‌های فیبروبلاستی یکی از سلول‌های پیرامونی عمده در بسیاری از بافت‌ها به ویژه بافت‌های پیوندی و نیز در کتام (نیچ) تومورها هستند (۳۱، ۳۲). بنابراین در این مطالعه رده‌ی سلولی فیبروبلاستی HDF به‌عنوان سلول کنترل طبیعی در کنار سلول سرطانی MCF7 برای ارزیابی اثر تیمار همزمان کلرید کبالت (II) و تیموکوتینون مورد استفاده قرار گرفت. نتایج آنالیز بیان ژن‌ها در سلول‌های HDF تیمار شده با کلرید کبالت (II) و تیموکوتینون نسبت به سلول‌های کنترل صرفاً تیمار شده با کلرید کبالت (II) حاکی از آن است که تیمار همزمان با این دو ترکیب صرفاً باعث افزایش معنی‌دار بیان ژن *c-MET* در سلول‌ها شده است. چندین راه‌کار جهت شبیه‌سازی شرایط هایپوکسی در آزمایشگاه و کشت سلول وجود دارد. یکی از این راه‌کارها، استفاده از ترکیبات شیمیایی همانند کلرید کبالت (II) می‌باشد. در این ارتباط، مطالعات قبلی حاکی از آنند که کلرید کبالت (II) در محدوده‌ی غلظتی ۱۰۰-۲۰۰  $\mu\text{M}$  نه تنها از طریق القای فاکتور  $\text{HIF1}\alpha$  باعث ایجاد هایپوکسی در کشت‌های سلولی MCF7 شود، بلکه همچنین در این محدوده‌ی غلظتی بیشترین تاثیر را بر تکثیر و مهاجرت این سلول‌ها نیز دارد (۱۹-۲۲). بنابراین در این مطالعه نیز از غلظت ۱۰۰  $\mu\text{M}$  برای شبیه‌سازی شرایط هایپوکسی همزمان با تیمار تیموکوتینون استفاده شد. همچنین، مطالعات مختلف نشان داده‌اند که تیمار سلول‌های MCF7 با تیموکوتینون تحت شرایط معمول اکسیژن در محیط، می‌تواند اثرات ضد تکثیری، پروآپتوتیک و ضد متاستازی بر این سلول‌ها داشته باشد (۳۷-۳۳). تاکنون اثر تیموکوتینون به‌تنهایی بر بیان ژن *SOX2* در سلول‌های MCF7 گزارش نشده است، اما به‌تازگی و همکاران (۳۸) در سال گزارش دادند که تیموکوتینون در ترکیب با اِمودین (Emodin) (یک ترکیب شیمیایی طبیعی از خانواده آنتراکوئینون (Anthraquinone)) بیان ژن *SOX2* را در سلول‌های تیمار MCF7 کاهش می‌دهد. مطالعه ما نیز حاکی از آن است که تیموکوتینون در ترکیب با کلرید کبالت (II) به‌ترتیب باعث کاهش ۱/۱۴ و ۱/۲۸ برابری بیان ژن *SOX2* در سلول‌های MCF7 و HDF نسبت به نمونه‌های کنترل می‌شود. همچنین، این نتایج نشان می‌دهد که علی‌رغم اثر کاهشی تیمار تیموکوتینون بر بیان ژن *SOX2* تحت شرایط هایپوکسی ناشی از کلرید کبالت (II)، تفاوت معنی‌داری در بیان این ژن در سلول سرطانی نسبت به سلول طبیعی پس از تیمار رخ نمی‌دهد. همچنین مشخص شد که تیمار همزمان سلول‌های سرطانی MCF7 با کلرید کبالت (II) و تیموکوتینون باعث کاهش معنی‌دار و شدید بیان ژن *CDK4* نسبت به سلول‌های طبیعی HDF می‌شود. بنابراین، در مجموع می‌توان پیشنهاد کرد که تیموکوتینون می‌تواند تحت شرایط هایپوکسی ناشی از کلرید کبالت (II) خودنوزایی و تکثیر سلول‌های سرطانی را مهار نماید. علاوه بر نقش تیموکوتینون در مهار خودنوزایی و تکثیر سلول‌های سرطانی، این ترکیب می‌تواند باعث مهار مهاجرت سلول‌های سرطانی نیز شود. در این ارتباط، شانموگام و همکارانش (۳۳) در اثر تیموکوتینون در مهار فاکتورهای رونویسی آنکوژنیک شامل *Nrf2/ARE*، *STATs*، *NF-Kb* و *Wnt/\beta*-catenin را در سلول‌های سرطان سینه تایید کردند. همچنین، آن‌ها دریافتند که این ماده می‌تواند از طریق مهار فعالیت مسیر سیگنالینگ *NF-Kb* میزان بیان ژن *CXCR4* را کاهش دهد و متاستاز به استخوان را در موش‌های دارای سرطان سینه متاستاتیک به‌میزان چشمگیری کم کند. نتایج مطالعه ما نیز نشان می‌دهد که تیموکوتینون تحت شرایط هایپوکسی می‌تواند از طریق مهار بیان ژن *c-MET* احتمالاً باعث مهار متاستاز سلول‌های سرطانی شود؛ چرا که محصول ژن *c-MET* در مهاجرت سلول‌های سرطانی نقش دارد (۲۹) و بیان این ژن در سلول‌های سرطانی MCF7 تیمار شده با کلرید کبالت (II) و تیموکوتینون نسبت به سلول‌های طبیعی HDF کاهش معنی‌داری را نشان می‌دهد. از سوی دیگر، در این مطالعه اثر تیمار تیموکوتینون در حضور کلرید کبالت (II) بر بیان ژن *DNMT1* در سلول‌های MCF7 و نیز سلول‌های HDF ارزیابی شد و نتایج حاکی از کاهش بیان این ژن در هر

دو سلول تحت تیمار بود. اما همچنان که از نتایج مشخص است بیان این ژن در سلول‌های سرطانی کاهش معنی‌داری را نسبت به سلول طبیعی نشان می‌دهد. در این رابطه، قادی و همکاران (۳۹) گزارش کردند که تیموکوئینون بیان برخی ژن‌های دخیل در تغییرات اپی‌ژنتیک مانند *DNMT1*، *G9a* و *HDAC1* را در سلول‌های رده MDA-MB-468 سرطان سینه کاهش می‌دهد. مطالعه ما نیز نشان می‌دهد که تیموکوئینون بیان ژن *DNMT1* را تحت شرایط هایپوکسی ناشی از کلرید کبالت (II) در سلول‌های سرطانی MCF7 کاهش می‌دهد و کاهش بیان این ژن نیز ممکن است از طریق اثر بر میزان متیلاسیون ژنوم بر بیان پروتوانکوژن‌ها و ژن‌ها مهارکننده‌ی تومور اثر گذار باشد. با این وجود مطالعات بیشتری در سطح سلولی و مولکولی باید جهت تایید این موضوع انجام شود.

علاوه بر نقش سلول‌های فیبروبلاست در کنام توموری و اثر بر رفتارهای و عملکردهای سلول‌های سرطانی (۳۱، ۳۲)، به طور طبیعی این سلول‌ها نقش اساسی و مهمی در بهبود زخم‌ها دارند (۴۰). در شرایط درون‌تن (*In vivo*)، سلول‌های فیبروبلاست به طور معمول در بافت پیوندی وجود داشته و در سنتز کلاژن، گلیکوزآمینوگلیکان‌ها و سایر گلیکوپروتئین‌های مهم ماتریکس خارج سلولی نظیر فیبرونکتین نقش دارند. در شرایط درون‌تن و برون‌تن (*In vitro*) سلول‌های فیبروبلاستی به موقعیت زخم مهاجرت کرده و در حضور سایتوکاین‌ها، کموکاین‌ها و دیگر مواد شیمیایی ترشح شده در محل زخم، توانایی تکثیر و ترشح پروتئین‌های مربوط به ماتریکس خارج سلولی را به دست می‌آورند. فیبروبلاست‌هایی که به محل زخم مهاجرت می‌کنند دارای لاملوپودیوم‌های بزرگی هستند که در موضع زخم گسترش می‌یابند. مطالعات نشان داده‌اند که بسیاری از فاکتورهای رشد (مانند فاکتور رشد اپیدرمی و فاکتور رشد مشتق شده از پلاکت) که در محل زخم حضور دارند به عنوان عوامل القاءکننده‌ی میتوز برای فیبروبلاست‌ها عمل می‌کنند. تحریک توسط عوامل رشد می‌تواند سرعت رشد و تکثیر فیبروبلاست‌ها را تا ۳ برابر افزایش دهد. اگرچه، به‌طور معمول مهاجرت سلولی به نواحی زخم به‌دنبال ایجاد التهاب و سپس ترشح سایتوکاین‌ها و کموکاین‌های مختلف اتفاق می‌افتد، با این حال مطالعات گسترده‌ای جهت یافتن روش‌های نوین به‌منظور بهبود سریع‌تر و هدفمند زخم‌ها انجام از گذشته تا به امروز در حال انجام است و در این میان، استفاده از گیاهان دارویی و یا ترکیبات خالص موثره در آن‌ها جهت اثر بر عملکردهای سلول‌های فیبروبلاست برای تسریع فرآیندهای ترمیم زخم از اهمیت بسیار بالایی برخوردار است (۴۱). گیاهان دارویی و ترکیبات موثره‌ی آن‌ها به دلیل دارا بودن خواص آنتی‌اکسیدانی، پتانسیل بالایی در مبارزه با رادیکال‌های آزاد (عامل اصلی در تغییرات منفی متعدد پوست) را دارند (۴۲). مطالعات زیادی پیرامون اثر تیموکوئینون بر مهاجرت سلولی و همچنین در درمان زخم انجام شده است. در این ارتباط، رضایی و همکاران (۱۶) نشان دادند که تیموکوئینون ممکن است با پیشبرد مسیرهای سیگنالینگ *c-MET* و *CXCR4* در سلول‌های بنیادی مزانشیمی جدا شده از مغز استخوان موش باعث افزایش مهاجرت این سلول‌ها در بدن موش سالم شود. همچنین، نگی و همکاران (۴۳) نشان دادند که تیموکوئینون‌هایی که به‌روی میسل لود شده‌اند سبب بسته شدن زخم در مدل موش‌های دیابتی می‌شود. اگرچه مطالعات مختلفی پیرامون اثر تیموکوئینون در درمان زخم انجام شده است، با این حال تاکنون مطالعه‌ای مبنی بر اثر تیموکوئینون بر سلول‌های فیبروبلاست در شرایط هایپوکسی القا شده با کلرید کبالت (II) گزارش نشده است. بنابراین، در پژوهش حاضر اثر هم‌زمان کلرید کبالت (II) و تیموکوئینون بر بیان ژن‌های دخیل در فرآیندهای مهم سلولی نظیر خودنوزایی، تکثیر، مهاجرت و متیلاسیون DNA در سلول‌های فیبروبلاستی طبیعی HDF در سطح رونوشت mRNA بررسی شد. همان‌گونه که قبلاً اشاره شده، تیمار هم‌زمان کلرید کبالت (II) و تیموکوئینون باعث افزایش بیان ژن‌های *CDK4* و *c-MET* در سلول‌های HDF می‌شود. این در حالی است که افزایش بیان ژن *c-MET* معنی‌دار، اما افزایش بیان *CDK4* معنادار نمی‌باشد. به‌علاوه تیمار کلرید کبالت (II) و تیموکوئینون بیان ژن‌های *SOX2* و *DNMT1* را کاهش می‌دهد، اما این کاهش بیان برای این ژن‌ها معنی‌دار نمی‌باشد.

بنابراین، می‌توان پیشنهاد داد که تیموکوتینون ممکن است تحت شرایط هایپوکسی از طریق افزایش بیان ژن *c-MET* باعث القای مهاجرت سلول‌ها شود. همچنین، علی‌رغم اینکه نتایج حاصل از مطالعه ما نشان می‌دهد که تیموکوتینون در شرایط هایپوکسی القا شده توسط کلرید کبالت (II) اثر معنی‌داری بر افزایش بیان ژن *CDK4* ندارد، اما در مطالعه‌ای که توسط الکساندر و همکاران (۴۴) انجام شد، نشان داده شد که تیموکوتینون سبب افزایش تکثیر و مهاجرت سلولی در سلول‌های فیبروبلاست رده 3T3 در شرایط برون‌تن می‌شود. بنابراین، نتایج حاصل از مطالعه ما پیشنهاد می‌کند که شرایط هایپوکسی می‌تواند اثرات بیوفارماکولوژیک تیموکوتینون را تحت تاثیر قرار دهد.

## ۵- نتیجه‌گیری

به‌طور کلی، با توجه به نتایج حاصل از پژوهش حاضر، می‌توان نتیجه گرفت که تیموکوتینون تحت شرایط هایپوکسی ممکن است از طریق مهار بیان ژن‌های دخیل در خودنوزایی، تکثیر و مهاجرت سلول‌های سرطانی سینه باعث مهار سرطان سینه شود. همچنین در این ارتباط، مهار آنزیم‌های تغییر متیلاسیون DNA و در نتیجه تغییر الگوی متیلاسیون ژنوم از اهمیت بالقوه‌ای برخوردار است. به‌علاوه، با توجه به نقش بسیار مهم فیبروبلاست‌ها در فرآیندهای ترمیم زخم، تیموکوتینون ممکن است تحت شرایط هایپوکسی از طریق افزایش پتانسیل مهاجرت سلول‌های فیبروبلاستی به ترمیم زخم کمک نماید. علی‌رغم یافته‌های این مطالعه در زمینه اثر تیموکوتینون تحت شرایط هایپوکسی القا شده توسط کلرید کبالت (II) بر سرطان سینه و ترمیم زخم، اما نیاز به مطالعات بیشتر و دقیق‌تر با استفاده از مدل‌ها و آزمون‌های سلولی و مولکولی برون‌تن و درون‌تن برای تایید نتایج این مطالعه است. بنابراین، در مجموع نتایج مطالعه حاضر چشم‌انداز اولیه و مناسبی را برای مطالعات بعدی در زمینه اثر تیموکوتینون تحت شرایط هایپوکسی بر فرآیندهای القا و پیشرفت سرطانی شدن سلول‌ها و نیز فرآیند ترمیم زخم فراهم می‌کند.

## ۶- تشکر و قدردانی

این تحقیق حاصل پایان‌نامه دانشجویان کارشناسی ارشد دانشگاه رازی می‌باشد و در آزمایشگاه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی گروه زیست‌شناسی انجام شده است و بدین‌وسیله از مسولین محترم دانشکده علوم و دانشگاه رازی به‌خاطر فراهم آوردن تجهیزات آزمایشگاهی تشکر و قدردانی می‌شود.

## ۷- منابع

1. Michiels C. Physiological and pathological responses to hypoxia. *Am J Pathol.* 2004; 164(6): 1875-82.
2. Chen PS, Chiu WT, Hsu PL, Lin SC, et al. Pathophysiological implications of hypoxia in human diseases. *J Biomed Sci.* 2020; 27(1):63.
3. Takeshima H, Ushijima T. Accumulation of genetic and epigenetic alterations in normal cells and cancer risk. *NPJ precision oncology.* 2019; 3:7.
4. Muz B, de la Puente P, Azab F, Azab AK. The role of hypoxia in cancer progression, angiogenesis, metastasis, and resistance to therapy. *Hypoxia (Auckland, NZ).* 2015; 3: 83-92.
5. Mendelsohn J, Gray JW, Howley PM, Israel Ma, et al. *The molecular basis of cancer.* Fourth Edition Ed: Elsevier Inc; 2014.
6. Hong WX, Hu MS, Esquivel M, Liang GY, et al. The role of hypoxia-inducible factor in wound healing. *Adv Wound Care.* 2014;3(5): 390-9.
7. Ruthenborg RJ, Ban JJ, Wazir A, Takeda N, et al. Regulation of wound healing and fibrosis by hypoxia and hypoxia-inducible factor-1. *Mol Cells.* 2014;37(9): 637-43.
8. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, et al. Global cancer statistics 2020: globocan estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *Ca Cancer J Clin.* 2021; 71(3): 209-49.
9. Waks AG, Winer EP. Breast cancer treatment: a review. *JAMA.* 2019; 321(3): 288-300.

10. Darakhshan S, Bidmeshki Pour A, Hosseinzadeh Colagar A, Sisakhtnezhad S. Thymoquinone And its therapeutic potentials. *Pharmacol Res.* 2015; 95-96: 138-58.
11. Kooti W, Hasanzadeh-Noohi Z, Sharafi-Ahvazi N, Asadi-Samani M, et al. Phytochemistry, pharmacology, and therapeutic uses of black seed (*Nigella Sativa*). *Chin J Nat Med.* 2016; 14(10): 732-45.
12. Amin B, Hosseinzadeh H. Black cummin (*Nigella Sativa*) and its active constituent, thymoquinone: an overview on the analgesic and anti-inflammatory effects. *Planta Med.* 2016; 82(1-2): 8-16.
13. Yimer EM, Tuem KB, Karim A, Ur-Rehman N, et al. *Nigella sativa* L. (Black cummin): A promising natural remedy for wide range of illnesses. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2019; 2019: 1528635.
14. Selçuk CT, Durgun M, Tekin R, Yolbas L, et al. Evaluation of the effect of thymoquinone treatment on wound healing in a rat burn model. *J Burn Care Res.* 2013; 34(5): E274-81.
15. Sallehuddin N, Nordin A, Bt Hj Idrus R, Fauzi MB. *Nigella sativa* and its active compound, thymoquinone, accelerate wound healing in an in vivo animal model: a comprehensive review. *Int J Environ Res Public Health.* 2020; 17(11).
16. Rezaei N, Sardarzadeh T, Sisakhtnezhad S. Thymoquinone promotes mouse mesenchymal stem cells migration in vitro and induces their immunogenicity in vivo. *Toxicol Applied Pharmacol.* 2020; 387: 114851.
17. Motaghd M, Al-Hassan FM, Hamid SS. Cellular responses with thymoquinone treatment in human breast cancer cell line MCF-7. *Pharmacognosy Res.* 2013; 5(3): 200-6.
18. Bashmail HA, Alamoudi AA, Noorwali A, Hegazy GA, et al. Thymoquinone synergizes gemcitabine anti-breast cancer activity via modulating its apoptotic and autophagic activities. *Sci Rep.* 2018; 8(1): 11674.
19. Li Q, Ma R, Zhang M. Cocl(2) Increases The expression of hypoxic markers hif-1 $\alpha$ , vegf and cxcr4 in breast cancer MCF-7 cells. *Oncol Let.* 2018; 15(1): 1119-24.
20. Zhang M, Gao CE, Chen WL, Tang YY, et al. Opposite response to hypoxia by breast cancer cells between cell proliferation and cell migration: a clue from microrna expression profile. *Oncol Let.* 2018; 15(3): 2771-80.
21. Rana NK, Singh P, Koch B. Cocl(2) simulated hypoxia induce cell proliferation and alter the expression pattern of hypoxia associated genes involved in angiogenesis and apoptosis. *Biol Res.* 2019; 52(1): 12.
22. Barrak NH, Khajah MA, Luqmani YA. Hypoxic environment may enhance migration/penetration of endocrine resistant MCF7-derived breast cancer cells through monolayers of other non-invasive cancer cells in vitro. *Sci Rep.* 2020; 10(1): 1127.
23. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative c(t) method. *Nature Protoc.* 2008; 3(6): 1101-8.
24. Chauhan V, Howland M, Greene HB, Wilkins RC. Transcriptional and secretomic profiling of epidermal cells exposed to alpha particle radiation. *Open Biochem J.* 2012; 6: 103-15.
25. Barham C, Fil D, Byrum SD, Rahmatallah Y, et al. RNA-Seq analysis of spinal cord tissues from hPFN1(G118V) transgenic mouse model of ALS at pre-symptomatic and end-stages of disease. *Sci Rep.* 2018; 8(1): 13737.
26. Fong H, Hohenstein KA, Donovan PJ. Regulation of self-renewal and pluripotency by Sox2 in human embryonic stem cells. *Stem Cells (Dayton, Ohio).* 2008; 26(8): 1931-8.
27. Novak D, Hüser L, Elton JJ, Umansky V, et al. Sox2 in development and cancer biology. *Semin Cancer Biol.* 2020 ;67(Pt 1): 74-82.
28. Baker SJ, Reddy EP. Cdk4: a key player in the cell cycle, development, and cancer. *Gene Cancer.* 2012; 3(11-12): 658-69.
29. Zhang Y, Xia M, Jin K, Wang S, et al. Function of the c-met receptor tyrosine kinase in carcinogenesis and associated therapeutic opportunities. *Mol Cancer.* 2018; 17(1):45.
30. Wong KK. Dnmt1: a key drug target in triple-negative breast cancer. *Semin Cancer Biol.* 2021; 72:198-213.
31. Bussard KM, Mutkus L, Stumpf K, Gomez-Manzano C, et al. Tumor-associated stromal cells as key contributors to the tumor microenvironment. *Breast Cancer Res.* 2016; 18(1):84.
32. Liu T, Zhou L, Li D, Andl T, et al. Cancer-associated fibroblasts build and secure the tumor microenvironment. *Front Cell Dev Biol.* 2019; 7:60.
33. Shanmugam MK, Ahn KS, Hsu A, Woo CC, et al. Thymoquinone inhibits bone metastasis of breast cancer cells through abrogation of the Cxcr4 signaling axis. *Front Pharmacol.* 2018; 9: 1294.
34. Qadi SA, Hassan MA, Sheikh RA, Baothman OA, et al. Thymoquinone-induced reactivation of tumor suppressor genes in cancer cells involves epigenetic mechanisms. *Epigenet Insights.* 2019; 12:2516865719839011.
35. El-Far AH, Tantawy MA, Al Jaouni SK, Mousa SA. Thymoquinone-chemotherapeutic combinations: new regimen to combat cancer and cancer stem cells. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 2020; 393(9): 1581-98.

36. Bashmail HA, Alamoudi AA, Noorwali A, Hegazy GA, et al. Thymoquinone enhances paclitaxel anti-breast cancer activity via inhibiting tumor-associated stem cells despite apparent mathematical antagonism. *Molecules* (Basel, Switzerland). 2020; 25(2).
37. Adinew GM, Taka E, Mochona B, Badisa RB, Mazzio EA, Elhag R, et al. Therapeutic potential of thymoquinone in triple-negative breast cancer prevention and progression through the modulation of the tumor microenvironment. *Nutrients*. 2021; 14(1).
38. Bhattacharjee M, Upadhyay P, Sarker S, Basu A, et al. Combinatorial therapy of thymoquinone and emodin synergistically enhances apoptosis, attenuates cell migration and reduces stemness efficiently in breast cancer. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*. 2020; 1864(11): 129695.
39. Qadi SA, Hassan MA, Sheikh RA, Baothman OA, et al. Thymoquinone-induced reactivation of tumor suppressor genes in cancer cells involves epigenetic mechanisms. *Epigenet Insights*. 2019; 12:2516865719839011.
40. Desjardins-Park HE, Foster DS, Longaker MT. Fibroblasts and wound healing: an update. *Regen Med*. 2018; 13(5): 491-5.
41. Addis R, Cruciani S, Santaniello S, Bellu E, et al. Fibroblast proliferation and migration in wound healing by phytochemicals: evidence for a novel synergic outcome. *Int J Med Sci*. 2020; 17(8): 1030-42.
42. Michalak M. Plant-derived antioxidants: significance in skin health and the ageing process. *Int J Mol Sci*. 2022; 23(2).
43. Negi P, Sharma G, Verma C, Garg P, et al. Novel thymoquinone loaded chitosan-lecithin micelles for effective wound healing: development, characterization, and preclinical evaluation. *Carbohydr Polym*. 2020; 230:115659.
44. Alexander HR, Syed Alwi SS, Yazan LS, Zakarial Ansar FH, et al. Migration and proliferation effects of thymoquinone-loaded nanostructured lipid carrier (Tq-Nlc) and thymoquinone (Tq) on in vitro wound healing models. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2019; 2019: 9725738.