



Scan online to view this article

Evaluation of Exosomes Extracted from AGS Cells Treated with Nano Coumarin Effect on the Induction of the External Apoptotic Pathway in Drug-Resistant Gastric Cancer Cells

Narges Rajabvand, Mohammad Zaefizadeh*, Hashem Yaghoubi

Department of Biology, Ardabil Branch, Islamic Azad University, Ardabil, Iran

Abstract

Aim and Background: Gastric cancer is one of the most common gastrointestinal cancers in the world, Iran and Ardabil. The used of exosomes for drug packaging to inhibition of drug-resistant of cancer cells is a new method. This study aimed to evaluate of extraction exosome of the AGS cell line to inhibit of MKN45 cell line.

Materials and Methods: Exosomes in concentration LC50 and LC75 nano coumarins were extracted from supernatants of cultured AGS cells using Exosome Isolation Kit and confirmed by DLS, and their effect was applied to drug-resistant MKN45 cells. Inhibition test (MTT) and expression of Caspase 8, Caspase 9, BCL2, Bax, and P53 genes were measured.

Results: The results showed that the extraction of exosome with concentration LC75 From AGS on MKN45 in addition to the concentration-dependent inhibitory role of impact on a significant change in gene expression Caspase 8, BCL₂, and P53.

Conclusion: Increased expression of genes Caspase 8, BCL₂, and P53 in exosome treatment at LC75 level indicate induction of apoptosis from the external pathway by exosomes in resistant cells, as evidenced by the decrease in the expression of miR-21 oncomir and the increase in miR-34a in the exosome contents.

Key Words: Exosome, Drug-resistant cell line, Apoptosis, External pathway of apoptosis, Gene expression, Iau Science.

Corresponding author:

Department of Biology, Ardabil Branch, Islamic Azad University, Ardabil, Iran

Email: Mzaefi@gmail.com





برای مشاهده این مقاله به صورت آنلاین اسکن کنید

ارزیابی اثر آگزوزوم‌های استخراج شده از سلول‌های AGS تیمار شده با نانوکومارین بر القا مسیر خارجی آپوپتوز در سلول‌های سرطانی معده مقاوم به دارو نرگس رجب‌وند، محمد ضعیفی‌زاده*، هاشم یعقوبی

گروه زیست‌شناسی، واحد اردبیل، دانشگاه آزاد اسلامی، اردبیل، ایران

چکیده

سابقه و هدف: سرطان معده یکی از شایع‌ترین سرطان‌های گوارش در جهان، ایران و اردبیل است. استفاده از آگزوزوم‌ها برای بسته‌بندی دارو، پتانسیل خوبی برای مهار سلول‌های سرطانی مقاوم به دارو می‌باشد. این پژوهش با هدف بررسی اثر آگزوزوم‌های استخراج شده از سلول‌های سرطانی رده AGS تحت تأثیر نانوکومارین بر روی مهار رده مقاوم MKN45 انجام شد.

مواد و روش‌ها: آگزوزوم‌ها در غلظت LC50 و LCY5 نانوکومارین از سوپرناتانت سلول‌های کشت شده AGS با استفاده از Exosome Isolation Kit استخراج و با DLS تایید شدند و تأثیر آن در سلول‌های رده MKN45 مقاوم به دارو اعمال گردید. تست مهار (MTT) و بیان ژن‌های Caspase 1، Caspase 9، BCL2، Bax و P53 اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که آگزوزوم‌های استخراج شده از AGS تحت تیمار نانوکومارین با غلظت LCY5 بر روی رده مقاوم به دارو MKN45 علاوه بر نقش مهاری، تأثیر معنی‌داری در تغییر میزان بیان ژن‌های Caspase 1، BCL2 و P53 داشته است.

نتیجه‌گیری: افزایش بیان ژن‌های Caspase 1، BCL2 و P53 در تیمار اعمال آگزوزوم‌ها در سطح LCY5 نشان دهنده القای آپوپتوز از مسیر خارجی توسط آگزوزوم در سلول‌های مقاوم است و به‌طوری‌که میزان کاهش بیان انکومیر 21-miR و افزایش 34a-miR در محتویات آگزوزوم آن را به اثبات می‌رساند.

واژه‌های کلیدی: آگزوزوم، رده مقاوم به دارو، آپوپتوز، مسیر خارجی آپوپتوز، بیان ژن، Iau Science.

مقدمه

یکی از انواع مهم بیماری سرطان، سرطان معده است که در جهان به‌عنوان چهارمین سرطان شایع و دومین عامل مرگ بر اثر سرطان مطرح است (۱). سرطان معده به‌عنوان یکی از شایع‌ترین انواع سرطان، با مرگ و میر ۷۸۳۰۰۰ نفر در سال ۲۰۱۸ در جهان گزارش شده است (۲). ۵۰ درصد

نویسنده مسئول:

گروه زیست‌شناسی، واحد اردبیل، دانشگاه آزاد اسلامی، اردبیل، ایران

پست الکترونیکی: Mzaefi@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۳/۰۸

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۴/۰۶

سرطان‌های شایع در ایران مربوط به دستگاه گوارش است و در این بین سرطان معده بیش‌ترین شیوع را دارا است (۳). هم‌چنین بالاترین میزان بروز سرطان معده در ایران، از استان اردبیل گزارش گردیده است (۱).

عفونت با هلیکوباکتری پیلوری شایع‌ترین عفونت بیماری‌زا است که باعث ایجاد سرطان معده می‌شود (۴). بروز و علت سرطان معده علاوه بر عفونت رایج هلیکوباکتر پیلوری با عوامل متعددی مرتبط است. عوامل مرتبط با محیط و زیستگاه، مانند مصرف لبنیات تخمیری، رژیم‌های غذایی پر نمک و مصرف سیگار، در افزایش خطر ابتلا به سرطان معده نقش دارند (۲).

می‌توان به اکسی کنتنیل کومارین‌ها، پرنیل کومارین‌ها و مشتقات پرنیله کومارین‌ها به نام ۷-*farnesyloxycoumarin umbelliprenin* و هم‌چنین *feruloylumbelliprenin* که یکی از سزکوئی‌ترین کومارین‌ها از ریشه گیاه *Ferula szowitziana* است، اشاره کرد. این ترکیب‌های دارای اثرهای ضدسرطانی بسیاری از جمله فعال‌سازی آپوپتوز و مهار تکثیرسلولی هستند (۱۳). به‌عنوان مثال، کومارین و متابولیت فعال آن، ۷-هیدروکسی کومارین، مهار رشد (سیتواستاتیک) را در رده‌های سلول سرطانی بدخیم انسانی، مانند A۵۴۹ (ریه)، ACHN (کلیه)، H۷۲۷ (ریه)، MCF-۷ (سینه) و HL-۶۰ (لوسمی) و هم‌چنین فعالیت خود را در برابر سرطان پروستات، ملانوم بدخیم و کارسینوم سلول متاستاتیک کلیه در آزمایش‌های بالینی نشان داده‌اند. سنتز مشتق کومارین (RKS۲۶۲) می‌تواند از تکثیر سلول‌های سرطانی جلوگیری کند. یکی دیگر از مشتقات کومارین به نام (۳-methylbutanoyl)-coumarin (۳-۶-*۵,۷-dihydroxy-۴-methyl* سلول‌های سرطانی جلوگیری کرد (۱۴).

اگزوزوم‌ها به‌عنوان نانو وزیکول برای انتقال ژن و دارودرمانی مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۵). اگزوزوم‌ها نوعی وزیکول خارج سلولی هستند که از اندوزوم‌هایی با اندازه ۳۰ تا ۱۵۰ نانومتر و چگالی ویژه ۱/۱۳-۱/۲۱ g/mL منشاء می‌گیرند (۱۶).

اگزوزوم‌ها دارای توانایی‌های منحصر به‌فرد در انتقال RNA و پروتئین‌ها هستند. آن‌ها واسطه‌های مهم ارتباطات بین سلولی و تنظیم‌کننده‌های سلولی هستند و ویژگی‌های تغییر یافته آن‌ها در بسیاری از بیماری‌ها مانند سرطان نشان می‌دهد که اگزوزوم‌ها برای اهداف تشخیصی و درمانی اهمیت دارند (۱۷). اگزوزوم‌ها به‌طور طبیعی توانایی انتقال نوکلئیک اسید را از یک سلول به سلول دیگر دارند، سیستم ایمنی میزبان را فعال نمی‌کنند، می‌توانند به‌طور اختصاصی به هدف متصل شوند و سمیتی ایجاد نکنند، بنابراین برای ژن درمانی بسیار مناسب هستند (۱۸).

اگزوزوم‌ها در آزمایش‌های بالینی پتانسیل زیادی برای درمان سرطان نشان داده‌اند و نسل بعدی نانوپلتفرم‌ها با کاربردهای درمانی پیشرفته محسوب می‌شوند (۱۹). تاکنون از اگزوزوم‌ها برای مهار سلول‌های سرطانی معده (۲۰،۲۱)، سرطان روده بزرگ (۲۰،۲۲)، سرطان پانکراس (۲۰،۲۳)،

یکی از مشکلات عدیده در درمان سلول‌های سرطانی مقاومت دارویی سلول‌های سرطانی در برابر داروهای مورد استفاده برای درمان است. سلول‌های سرطانی در بسیاری موارد نسبت به دوزهای دارویی ضد سرطان مقاومت نشان می‌دهند و این مسأله باعث عدم موفقیت تأثیرگذاری داروها برای از بین بردن سلول‌های سرطانی در روی نمونه‌های انسانی شده است. در سرطان معده دو رده سلول‌های آدنوکارسینومای معده (AGS) و MKN۴۵ ایزوله شده‌است (۵). که رده MKN۴۵ برای داروهای ضد سرطانی مقاومت بیش‌تری را نشان می‌دهد.

تا به‌حال روش‌های درمانی جراحی، شیمی درمانی، پرتو درمانی و ژن درمانی روش‌های کافی و کارآمد برای مهار سرطان نبوده است (۶،۷). با توجه به مشکلاتی مانند سمیت سلولی و مقاومت دارویی، تحقیقات متعددی برای کشف و توسعه داروهای ضد سرطان مؤثر در حال انجام است. در سال‌های اخیر، محققان بر روی فعالیت ضد سرطانی مواد با منابع گیاهی از جمله کومارین‌ها به‌دلیل فعالیت بیولوژیکی بالا و سمیت کم آن‌ها تمرکز کرده‌اند (۸).

کومارین‌ها که به‌عنوان ۱،۲-benzopyrone یا ۸-lactone-*o*-hydroxycinnamic acid شناخته می‌شوند، از یک گروه بزرگ مشتقات فنولیک ساخته شده‌اند که در گیاهان یافت می‌شوند. این گروه متشکل از حلقه‌های benzene و pyrone هستند (۱). کومارین و مشتقات آن از لحاظ زیستی بسیار فعال هستند. تعداد زیادی از مطالعه‌ها با تمرکز بر خواص دارویی و درمانی کومارین‌ها مطرح کرده‌اند که این ترکیب‌ها به‌علت اثر ضد باکتریایی (۹)، ضد انعقادی و گشادکنندگی عروق (۱۰)، ضد فشار خون و ضد التهاب و ضد پوکی استخوان (۱۱)، مهار لیپوکسیژناز و سیکلواکسیژناز (۱۲)، ضد جهش‌زایی، مهار اکسیژن فعال و ضد توموری (۱) دارای اهمیت زیستی هستند.

مطالعه Küpeli Akkol و همکاران (۸) در سال ۲۰۲۰ نشان داده که کومارین‌ها به‌طور معمول در درمان سرطان پروستات، کارسینوم سلول کلیه و لوسمی استفاده می‌شوند. کومارین‌ها و مشتقات آن نه تنها در پزشکی بالینی به‌عنوان عوامل ضد سرطانی مطرح است، بلکه توانایی مقابله با عوارض جانبی ناشی از پرتودرمانی را دارند.

در همین راستا از ترکیب‌های جدید با خاصیت ضد سرطان کومارین‌ها به‌عنوان خانواده بزرگی از ترکیب‌های طبیعی

۵۷۰ نانومتر توسط میکروپلیت خوان ELISA اندازه گیری شد.

$$\text{Viability (\%)} = \frac{\text{absorbance of experiment well}}{\text{absorbance of control well}} \times 100$$

(%) میزان زنده مانی = جذب هر چاهک کنترل / جذب هر چاهک آزمایش × ۱۰۰

استخراج اگزوزوم سلولی

پس از اعمال غلظت LC۵۰ و LC۷۵ نانوکومارین در رده سلولی AGS از محیط کشت (سوپرناتانت) آن اگزوزومها استخراج شد. جهت استخراج اگزوزوم سلولی از کیت استخراج اگزوزوم (Exosome Isolation Kit) شرکت AnaCell (ایران) طبق پروتکل مربوطه استفاده شد. برای اثبات اگزوزوم استخراجی از روش Dynamic Light Scattering (DLS) و وسترن بلات برای پروتئین CD۹ انجام شد.

جداسازی RNA و سنتز cDNA

RNA کل از سلولهای تحت تیمار غلظت LC۵۰ و LC۷۵ نانوکومارین از رده سلولی AGS با استفاده از کیت RNX-Plus استخراج شد. هم چنین اگزوزومهای استخراج شده محیط کشت رده AGS در سطح غلظت LC۵۰ و LC۷۵ نانوکومارین استخراج و بر روی MKN۴۵ اعمال شد و پس از اعمال اگزوزومها از سلولهای MKN۴۵ با استفاده از RNX-Plus، RNX کل استخراج شد. هم چنین miRNAها با استفاده از کیت miRNeasy Mini مطابق دستورالعمل سازنده (Qiagen، آلمان) استخراج شد. خلوص RNA استخراج شده توسط Nanodrop بررسی شد. سنتز DNA مکمل (cDNA) روی RNA کل با استفاده از پرایمرهای اختصاصی Stem-Loop انجام شد. سپس RNA با ترانس کریپتاز معکوس، dNTP، بافر واکنش و پرایمرهای stem-loop اختصاصی miRNA مخلوط شد. این مخلوط به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۱۶ درجه سانتی گراد و سپس ۳۰ دقیقه در دمای ۴۲ درجه سانتی گراد انکوبه شد. برای غیرفعال کردن آنزیم در مرحله آخر، واکنش در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه انکوبه شد تا به cDNA برسد. محتوای cDNA در هر لوله واکنش تنها شامل ۳ نوع cDNA است: *miR-۲۱*، *miR-۳۴a* و *U6*. توالی پرایمر در جدول ۱ نشان داده شده است.

سرطان ریه (۲۰،۲۴)، سرطان سلول کبدی (HCC) (۲۰،۲۵) و سرطان پستان (۲۰،۲۶) استفاده شده است.

اگزوزومهای استخراج شده از سلولهای توموری می تواند رشد تومور را سرکوب کند یا پاسخ ایمنی و فعال شدن ماکروفاژها و سلولهای کشنده طبیعی را ممانعت نماید (۱۶). اگزوزومها وسیله ای مناسب برای تحویل miRNAها یا RNAهای مداخله گر کوچک (siRNA) به سلولهای گیرنده برای کمک به تنظیم سطح بیان ژنهای مربوطه، به ویژه انکوژن ها، که اهداف بالقوه در درمان تومور در نظر گرفته می شوند، در نظر گرفته می شوند (۲۷).

هدف از این پژوهش بررسی اثر اگزوزومهای استخراج شده از رده سلولی AGS تحت تیمار غلظت LC۷۵ نانوکومارین بر روی مهار رده سلولی مقاوم به داروی MKN۴۵ و بررسی بیان ژنهای مسیر خارجی آپوپتوز و نیز *miR-۲۱* و *miR-۳۴a* است.

مواد و روش ها

کشت سلولی و عامل فیتوشیمیایی

رده سلولهای سرطانی معده AGS و MKN۴۵ از بانک سلول ملی ایران (NCBI؛ انستیتو پاستور ایران) خریداری شد. سلولهای AGS و MKN۴۵ در محیط کشت RPMI۱۶۴۰ با ۱۰ درصد سرم جنین گاو و پن استپ ۱٪ در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد در انکوباتور اتمسفر مرطوب حاوی ۵ درصد CO₂ کشت داده شدند (۵). کومارین مورد استفاده در این پژوهش از شرکت Sigma-Aldrich تهیه شد.

سنجش بقای سلولی

برای تعیین اثر کومارین بر زنده ماندن سلولی، سنجش (MTT) ۲،۵-diphenyl tetrazolium bromide (۲-yl) -۳-(۴،۵-dimethylthiazol) انجام شد. سلولهای رده AGS با تراکم ۸×۱۰^۳ سلول در چاهک در پلیت های ۹۶ خانه ای کشت شدند و با ده غلظت سریالی کومارین (بین ۰ تا ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی لیتر) به مدت ۴۸ ساعت تیمار شدند. رنگ MTT (۰/۵ میلی گرم در میلی لیتر؛ Sigma-Aldrich) سپس به چاهکها اضافه شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲ تا ۴ ساعت انکوبه شد. بلورهای فورمازان با افزودن دی متیل سولفوکسید (DMSO)؛ (۲۰۰ μL/well) حل شدند و چگالی نوری در طول موج

پرایمرها	توالی پرایمرها (۳-۵')
forward <i>A Caspase</i>	AAGTGCCCTTCCCTTGCTG
reverse <i>A Caspase</i>	GCAGAAAGTCAGCCTCATCC
forward <i>4 Caspase</i>	AAAGTTGTGCGAAGCCAACCC
reverse <i>4 Caspase</i>	GACTCACGGCAGAAGTTCAC
forward <i>rBCL</i>	TGTGGCCTTCTTTGAGTTCG
reverse <i>rBCL</i>	CCTACCAGCTCCGTTATC
<i>Bax</i> forward	AGATCATGAAGACAGGGGCC
<i>Bax</i> reverse	CCAATGTCCAGCCCATGATG
forward $\Delta 2P$	AGGTTGGCTCTGACTGTACC
reverse $\Delta 2P$	GATTCTTCTCTGTGCGC
forward <i>rGAPDH</i>	AAGAACACTACCCACCCACA
reverse <i>rGAPDH</i>	ATTCAGAGCATAGCGCATA
forward <i>pΔ-rmiR</i>	CCCCTAGCTTATCAGACTGATG
Universal reverse - <i>rmiR</i>	GTGCAGGGTCCGAGGT
forward <i>pΔ-pU</i>	GCTTCGGCAGCACATACTAAAAAT
reverse <i>pΔ-pU</i>	CGCTTCACGAATTGCGTGTCTAT
forward <i>a-rmiR</i>	GGGATGGCAGTGTCTTAGC
Universal reverse <i>pΔa-rmiR</i>	GTGCAGGGTCCGAGGT
SLP (Stem Loop Primer) <i>pΔ-rmiR</i>	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTGCGACTGGATACGACTCAACA
SLP (Stem Loop Primer) <i>a-rmiR</i>	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTGCGACTGGATACGACACAACCC
SLP (Stem Loop Primer) <i>pΔ-pU</i>	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTGCGACTGGATACGACAAAAATAT

SYBR Blue (SinaClon) استفاده شد. (مطابق دستورالعمل کیت MM2171 (Cat. No.))

تحلیل آماری

همه واکنش‌ها در سه تکرار اجرا شدند و تغییر فولد هر ژن با استفاده از روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ محاسبه شد. نتایج به صورت میانگین \pm SEM (خطای استاندارد میانگین) ارائه شده است. مقایسه بین چند گروه با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) با آزمون Dunnett ردیابی شد. تفاوت در $P < 0.05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد. برای تجزیه و تحلیل نتایج MTT و ترسیم نمودار از نرم‌افزار Excel 2013 و SPSS version 22/0 استفاده شد.

یافته‌ها

نانوکومارین و کومارین در نتایج آزمایشات توکسیسیته در ده غلظت سریالی بین 0 تا 1000 میکروگرم در میلی‌لیتر در دو نوع سلول AGS و MKN45 (مقاوم به 5FU) در آزمون MTT بررسی گردید. نتایج نشان داد که در هر دو سلول میزان مهار سلولی با افزایش غلظت نانوکومارین رابطه مستقیم داشت اما میزان LC50 برای AGS و MKN45 به ترتیب 232/1 و 282/11 میکروگرم در میلی‌لیتر

تجزیه و تحلیل کمی نتایج Real Time PCR برای بیان miRNA

برای انجام Real Time PCR از دستگاه Qiagen استفاده شد. برای Mic PCR qRT-PCR با استفاده از نرم‌افزار mic-PCR v1/4/0 استفاده شد. لوله‌های واکنش و لوله‌های کنترل بدون الگو (NTC¹) تحت آزمایش و آنالیز قرار گرفتند که در سه تکرار انجام شد. هر لوله واکنش حاوی 5 میکرولیتر مخلوط اصلی، 0.5 میکرولیتر پرایمر forward ویژه و 0.5 میکرولیتر پرایمر reverse در غلظت‌های 5 با 5 میکرولیتر cDNA در حجم نهایی 10 میکرولیتر بود.

برنامه دمای سایکلر حرارتی به شرح زیر بود:

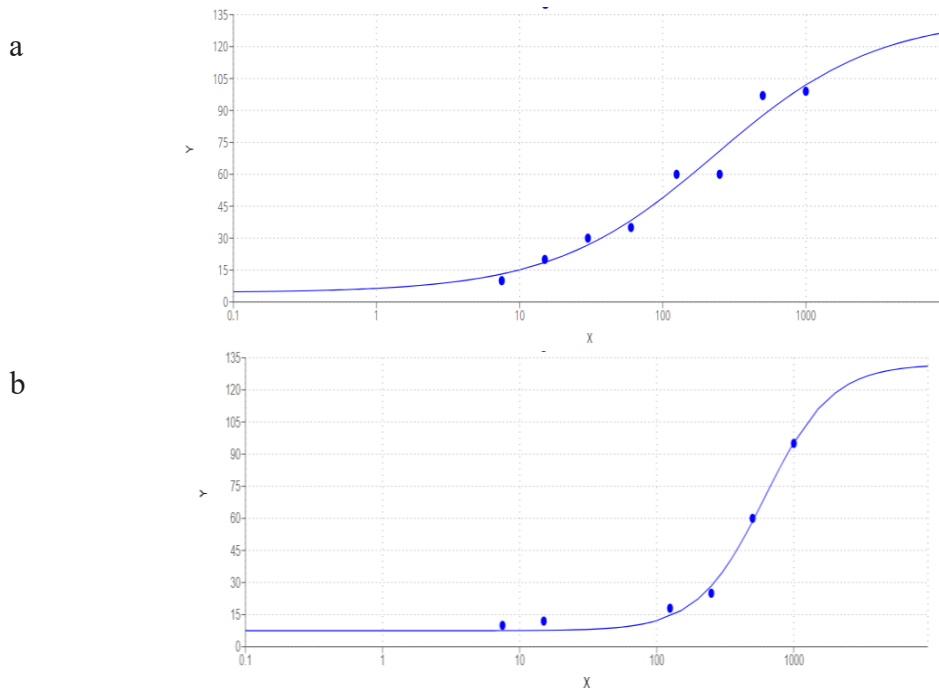
95 درجه سانتی‌گراد به مدت 15 دقیقه، ردیابی برای 40 چرخه در دمای 95 درجه سانتی‌گراد به مدت 10 ثانیه و در 60 درجه سانتی‌گراد به مدت 25 ثانیه.

مقدار هر miRNA در مقایسه با مقدار RNA هسته‌ای کوچک U6 نرمال شد. تغییر برابری هر miRNA با استفاده از روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ محاسبه شد. برای بررسی بیان ژن‌ها از کیت

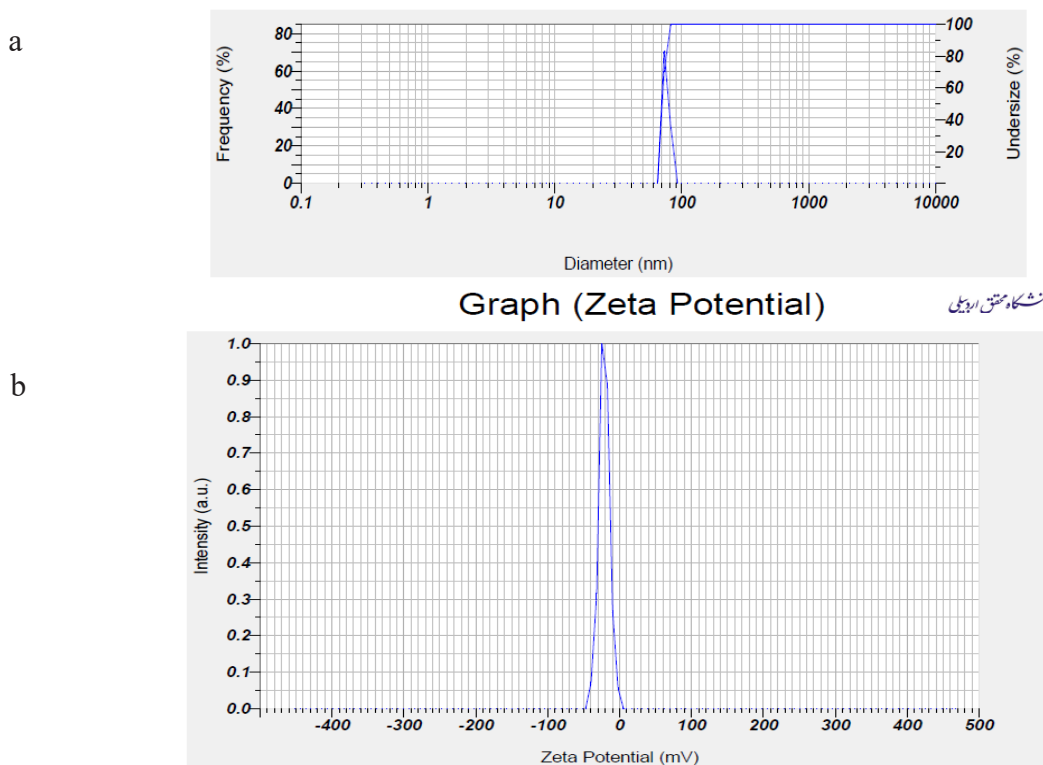
¹ Nontemplate control

اگزوزومها $71/2 \pm 3/5$ نانومتر در روش DLS (شکل 2a) بود. ضریب پایداری Zeta برابر $-21/3$ میلی‌ولت بود (شکل 2b)، که نشان دهنده پایداری اگزوزوم است.

نانوکومارین بود (شکل 1a). بدین معنی که در رده مقاوم به $5FU$ میزان غلظت برای $LC50$ بیش‌تر بود. اگزوزوم‌های محیط کشت سلول‌های AGS در غلظت نانوکومارین $LC50$ ($320/1$) و $LC75$ استخراج شد. اندازه



شکل 1. نتایج آزمایش MTT در برآورد $LC50$ برای تیمار نانوکومارین (a) و نتایج آزمایش MTT در برآورد $LC50$ برای تیمار اگزوزوم (b)



شکل 2. نمودار تایید سایز اگزوزوم در محدوده اگزوزومی تحت تیمار نانوکومارین (a) و نمودار پتانسیل زتا تحت تیمار نانوکومارین (b)

AGS برای مهار سلول‌های MKN45 در شکل 1a درج شده است که نشان می‌دهد با افزایش غلظت اگزوزوم در محیط کشت MKN45 میزان مهار سلول‌های افزایش می‌یابد.

بررسی بیان ژن‌های مختلف در سلول‌های MKN45 تحت تأثیر اگزوزوم‌ها

بیان نسبی ژن‌های مسیر آپوپتوزی در MKN45 نسبت به GAPDH تحت تیمار اگزوزوم‌ها مطالعه گردید.

جدول ۲. بیان نسبی ژن‌ها و miRNA های مختلف مورد مطالعه تحت تأثیر تیمارها (حروف نامشابه نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۰/۰۵)

تیمارها	Caspase1	Caspase9	BCL2	Bax	P53	miR-21	miR-37a
M-Ctr	1 ^d	1 ^b	1 ^d	1 ^c	1 ^c	1 ^b	1 ^c
M-Cum LC50	3/4 ^b	1/4 ^a	4/4 ^b	1/4 ^c	1/84 ^b	0/56 ^c	2/87 ^{bc}
M-Nanocum LC50	4/12 ^A	1/12 ^{ab}	5/42 ^b	1/12	2/12 ^a	0/22	3/21 ^b
M-Exo50	0/87 ^{ns}	0/45 ^c	0/97 ^d	3/87 ^a	1/07 ^c	2/11 ^b	0/49 ^d
M-Exo75	4/87 ^A	0/9187 ^b	7/87 ^a	1/07 ^c	2/87 ^a	-0/4 ^d	5/44 ^{ab}
A-Exo50	2/11 ^c	0/91 ^b	4/11 ^b	2/1 ^b	2/01 ^{ab}	3/19 ^a	4/501 ^b
A-Exo75	3/82 ^b	1/23 ^a	3/901 ^c	0/92 ^c	1/78 ^b	0/98 ^b	6/88 ^a
E-Exo50 A	-	-	-	-	-	3/23 ^a	0/67 ^{cd}
E-Exo75 A	-	-	-	-	-	-1/33 ^c	3/33 ^b
E-Ctr A	-	-	-	-	-	1 ^b	1 ^c

M-Ctr: کنترل در MKN45، M-Cum: تیمار کومارین برای MKN45، M-Nanocum: تیمار نانوکومارین برای MKN45، M-Exo50: تیمار اگزوزوم LC50 مستخرج از AGS به محیط کشت MKN45، M-Exo75: تیمار اگزوزوم LC75 مستخرج از AGS به MKN45، A-Exo50: تیمار اگزوزوم LC50 مستخرج از AGS به AGS، A-Exo75: تیمار اگزوزوم LC75 مستخرج از AGS به AGS، E-Exo50 A: اگزوزوم در شرایط LC50، E-Exo75 A: اگزوزوم در شرایط LC75 و E-Ctr A: کنترل اگزوزوم

اگزوزوم LC75 دیده شد. بقیه تیمارها به‌جز اگزوزوم LC50 در MKN45 با شاهد تفاوت معنی‌دار نداشت. حداقل بیان ژن Caspase 9 در تیمار LC50 اگزوزوم در رده سلولی MKN45 دیده شد (جدول ۲).

بیان نسبی BCL2 به‌عنوان یکی از ژن‌های القای آپوپتوز در تیمارهای مختلف معنی‌دار بود ($P_{valu} \leq 0/01$). بیان BCL2 با مصرف کومارین و نانوکومارین در سطح LC50 به‌طور معنی‌دار به‌میزان 4/4 و 5/42 برابر افزایش یافته بود. بدین معنی که کومارین اثر افزایشی در بیان ژن داشت. حداکثر افزایش بیان ژن BCL2 در رده سلولی MKN45 زمانی اتفاق افتاد که تیمار اگزوزوم LC75 در آن اعمال شده بود که به میزان 7/87 برابر بوده است. اثر افزایشی بیان ژن BCL2 به‌جز در تیمار Exo50 در رده سلولی MKN45، در بقیه تیمارها معنی‌دار بود ولی

اگزوزوم‌های استخراجی پس از تغلیظ با استفاده روش برادفورد سینکرونایز گردید و در غلظت‌های مختلف تأثیر محتویات اگزوزومی مستخرج از AGS بر مهار سلول‌های رده MKN45 به روش MTT تست و نتایج آن در شکل 1b آمده است. F در آنالیز واریانس برای غلظت‌های مختلف اگزوزوم‌های حاصل از اعمال نانوکومارین (613/13) LC50 در میزان مهار MKN45 معنی‌دار بود ($P_{valu} \leq 0/05$). همچنین اثر غلظت‌های مختلف اگزوزوم‌های مختلف حاصل از (LC75) اعمال نانوکومارین در

نتایج نشان داد (جدول ۲) بیان نسبی کاسپاز ۸ با مصرف کومارین و نانوکومارین در MKN45 افزایش بیان به‌ترتیب 3/4 و 4/12 برابری داشت. بدین معنی که کومارین و نانوکومارین اثر Upregulate در بیان ژن Caspase 1 داشت. اگزوزوم‌های استخراجی از AGS در غلظت LC50 تغییر بیان معنی‌داری در Caspase 1 نسبت به کنترل نداشت، اما در غلظت LC75 میزان بیان ژن Caspase 1 افزایش معنی‌دار 4/87 برابری داشت هرچند که با اثر نانوکومارین در بیان این ژن تفاوت معنی‌داری نداشت. اگزوزوم در غلظت LC50 و LC75 استخراج شده از AGS بررسی بیان Caspase 1 در AGS افزایش بیان به‌ترتیب 2/11 و 3/82 داشت.

نتایج آنالیز واریانس تیمارها برای بیان Caspase 9 معنی‌دار بود ($P_{valu} \leq 0/01$). میزان بیان ژن Caspase 9 حداکثر در تیمار کومارین در MKN45 به میزان 1/4 برابر و در AGS در

تیمار Exo50 در BCL2 نسبت به شاهد تفاوت معنی‌دار نداشت.

تفاوت معنی‌دار از لحاظ بیان ژن Bax نشان دهنده تفاوت در عکس اصل سلول‌ها از نظر اعمال تیمار از این لحاظ بود ($P_{\text{valu}} \leq 0/01$). مقایسه میانگین به روش دانکن نشان داد که حداکثر بیان ژن Bax در MKN45 تیمار Exo50 دیده شد. هر چند که در BCL2 این تیمار حداقل بیان را داشت. تیمار Exo50 در AGS از نظر بیان در گروه b قرار گرفته بود که معادل 2/1 برابر نسبت به شاهد افزایش بیان داشت. سایر تیمارها اختلاف آماری با شاهد از نظر بیان Bax نداشتند.

جدول 3. همبستگی بین بیان نسبی ژن‌های مورد مطالعه (** نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال 0/01)

r	Caspase 8	Caspase 9	BCL2	Bax	P53
Caspase 8	1	-0/46	-0/927**	-0/621	-0/883**
Caspase 9	-0/46	1	-0/268	-0/335	-0/328
BCL2	0/927**	-0/268	1	-0/502	0/991**
Bax	-0/621	-0/335	-0/502	1	-0/439
P53	0/883**	-0/328	0/991**	-0/439	1

P53 یکی از تومورسوپرسورهای کنترل کننده چرخه سلولی است. بیان ژن P53 در تیمارهای مختلف معنی‌دار بود ($P_{\text{valu}} \leq 0/01$). بیش‌ترین بیان در مصرف نانوکومارین و Exo75 در رده سلولی MKN45 و هرچند که با تیمار اگزوزوم LC50 در رده AGS تفاوت نداشت که از نظر آماری در رتبه a قرار گرفته بودند. اما تیمارهای نانوکومارین در رده MKN45 و Exo75 در رده سلولی AGS با افزایش بیان 1/78 و 1/84 برابری برای ژن P53 نشان داد. بیان ژن P53 در سایر تیمارها تفاوت معنی‌داری با کنترل نداشت.

های MKN45 با اعمال تیمار کومارین و نانوکومارین کاهش بیان ولی اعمال Exo50 افزایش بیان در صورتی‌که با اعمال Exo75 افزایش بیان معنی‌دار داشته است. همین روند در سلول‌های AGS نیز وجود داشت ($P_{\text{valu}} \leq 0/01$). حداکثر بیان miR-34a در رده سلولی AGS در Exo LC50 و مصرف نانوکومارین LC50 بیان آن به ترتیب 4/5 و 3/22 برابر افزایش داشت. در خود اگزوزوم‌ها میزان بیان miR-34a در LC50 کاهش و در LC75 افزایش بیان تا 3/33 برابری دیده شد (جدول 2).

بحث

نتایج آزمایش‌های ما نشان داد هم کومارین و هم نانوکومارین خاصیت مهار سلول‌های سرطانی AGS و MKN45 را داشتند (شکل 1a).

کومارین‌ها توانایی‌های ضد توموری بسیار قابل توجهی دارند و مکانیسم‌های ضد توموری متنوعی از جمله مهار کربنیک انیدراز، هدف قرار دادن مسیرهای سیگنالینگ PI3K/Akt/mTOR، القای فعال شدن پروتئین آپوپتوز سلولی، مهار مقاومت چند دارویی تومور، مهار پلی‌مریزاسیون میکروتوبول، تنظیم گونه‌های فعال اکسیژن و مهار رگزایی تومور دارند (28). Am و همکاران

همبستگی بیان ژن‌های مورد مطالعه (جدول 3) نشان داد که بین بیان ژن Caspase 8 با بیان ژن‌های P53 و BCL2 هم‌بستگی مثبت و معنی‌دار ولی با بیان ژن Caspase 9 و Bax هم‌بستگی غیر معنی‌دار معکوس داشت. Caspase 9 با هیچ کدام از ژن‌ها هم‌بستگی معنی‌دار نشان نداد. BCL2 با Caspase 8 هم‌بستگی مثبت و معنی‌دار داشت. هم‌بستگی بیان Bax با BCL2 معکوس و با هیچ‌کدام از ژن‌ها معنی‌دار نبود. P53 نیز با ژن‌های Caspase 8 و BCL2 هم‌بستگی مستقیم و معنی‌دار نشان داد.

بیان miR-21 و miR-34a در اگزوزوم‌ها و سلول‌های تحت تیمارهای مختلف در هر دو رده حساس AGS و مقاوم MKN45 (جدول 2) اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد انکومیر miR-21 در اگزوزوم LC50 بیش بیان 3/23 برابری داشت یعنی با وجود تأثیر نانوکومارین در سلول‌های AGS هم‌چنان در سلول‌های باقی مانده (50٪ زنده مانی) افزایش انکومیر در برابر آپوپتوتیک وجود دارد اما میزان آن در اگزوزوم همان رده با افزایش غلظت نانوکومارین به LC75 میزان بیان آن به 1/33- برابر رسیده است. یعنی اگزوزوم‌های حاصله به‌طور کامل بیان انکومیر را در این تیمار کاهش داده‌اند. بیان miR-21 در سلول-

را با توقف چرخه سلولی در فاز G_0/G_1 ، فاز G_2/M و تأثیر بر گلیکوپروتئین (p-gp) سلول سرطانی، از جمله سلول‌های A549، سلول‌های ACHN، سلول‌های H727، سلول‌های MCF7 و سلول‌های HL-60 سرکوب کنند (۳۲).

هیبریدهای کومارین (سه سری هیبریدهای کومارین با هیبریداسیون کومارین ۸ متوکسی با سه بخش فعال زیستی) می‌توانند بیان پروتئین‌های $Caspase$ ۳ را در رده‌های سلولی HCC و پروتئین‌های $Caspase$ ۳ و $Caspase$ ۹ در رده‌های سلولی سرطان خون را تنظیم بالا و بیان BCL_2 تنظیم پایین کرده و منجر به افزایش تنظیم سطح بیان پروتئین Bax را در رده‌های سلولی HCC و لوسمی شوند (۳۳). مطالعه‌های دیگر نشان داد که کومارین قادر است با فعال کردن مسیر میتوکندری و مسیر آپوپتوز وابسته به $Caspase$ ۳، آپوپتوز سلول‌های سرطانی دهانه رحم و روده بزرگ را برای کاهش تنظیم BCL_2 ، $BCL-xL$ و $NF-kB$ ضد آپوپتوز و تنظیم مثبت $Caspase$ ۳ برای ترویج آزادسازی سیتوکروم (cyt) C القاء کند (۳۴).

تیمار اگزوزوم‌های تولید شده از AGS در افزایش بیان ژن‌های BCL_2 و $P53$ و $Caspase$ ۱ در MKN45 شده بود. هرچند که بیان ژن‌های Bax و $Caspase$ ۹ تأثیر معنی‌دار نداشت این روند در خود سلول‌های AGS حفظ شده بود (جدول ۲).

در مطالعه Yang و همکاران تأیید گردید تیمار با اگزوزوم‌ها سطوح نسبی $Caspase$ ۳، $Caspase$ ۱، $Caspase$ ۹ و $Caspase$ -هم-چنین Bax را افزایش داده، اما سطح BCL_2 را در سلول‌های Jurkat T کاهش داد (۳۵).

Bonafede و همکاران در سال ۲۰۱۹ کاهش پروتئین‌های پرو آپوپتوز مانند $Caspase$ ۳ و Bax و افزایش پروتئین آنتی آپوپتوز BCL_2 α در سلول‌های تیمار شده با اگزوزوم‌های ASC⁴ گزارش کردند (۳۶).

مطالعه‌های اخیر نیز نقش $P53$ را در تنظیم ترشح اگزوزوم نشان داده است. از یک طرف، اگزوزوم‌ها می‌توانند پروتئین $P53$ را برای ایجاد محیطی مناسب برای تومور تثبیت کنند. از سوی دیگر، $P53$ تنظیم کننده‌های کلیدی محفظه اندوزومی را رونویسی می‌کند، بنابراین تولید و ترشح اگزوزوم را تنظیم می‌کند (۳۷).

در مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۷ گزارش کردند که ایمپراتورین (یک فوروکومارین) با مهار فسفوریلاسیون Akt، PI3K و mTOR سلول‌های آدنوکارسینومای معده انسان، خواص ضد توموری دارد (۲۹). Baghdadi و همکاران در سال ۲۰۱۸ (۳۰) از بین شش نوع ترکیب کومارین (مانسورین-A^۲، مانسورین-B، مانسورین-C، مانسورین-I، مانسورین-II و مانسورین-III) و فعالیت‌های ضد سرطانی بالقوه این ترکیبات را در برابر سرطان سینه، سرطان دهانه رحم، سرطان کولورکتال و سلول‌های سرطانی کبد، مانسورین-II و مانسورین-III مؤثرترین نوع مهاری را برای این رده‌های سلولی معرفی کردند.

نکته حائز اهمیت این که نانوکومارین سلول‌های مقاوم به R5FU MKN45 را نیز در غلظت ۲۸۲،۱۱ میکروگرم در میلی لیتر مهار کرده بود.

ترکیب برخی از انواع کومارین‌ها در تیمار با داروهای شیمی درمانی اثر سینرژیک مثبت داشتند به طوری که مانسورین-II می‌تواند اثر ضد سرطانی تاکسول را افزایش دهد. این اثر هم افزایی ممکن است مربوط به تداخل با فعالیت جریان پمپ‌های P-gp باشد (۳۰). ترکیب غلظت‌های غیر سمی سسکوئیترین کومارین (۲۰ میکرومولار) با سیس پلاتین به طور قابل توجهی سمیت سلولی سیس پلاتین را بر روی سلول‌های A2780/RCIS افزایش داد. نتایج نشان داد که کنفردیون و Samarcand بالاترین اثرهای بازدارندگی را بر جریان پمپ پروتئین مربوط به مقاومت چند دارویی دو^۳ داشتند (۳۱).

تأثیر کمپلکس نانوکومارین در مهار سول‌های سرطانی مقاوم به دارو بیشتر از خود کومارین بود. دلیل آن می‌تواند مربوط به نفوذپذیری بیش تر باشد زیرا اندازه کمپلکس مربوطه کم تر از ۴۰ نانومتر برآورده شده بود که نفوذپذیری آن به دلیل سایز کم تر، بیش تر میسر کرده بود.

تیمار کومارین و نانوکومارین باعث افزایش بیان ژن‌های $Caspase$ ۱، $Caspase$ ۹، BCL_2 ، Bax و $P53$ شده بود (جدول ۲).

گزارش شده است که مشتقات کومارین بر روی سلول‌های تومور مختلف عمل می‌کنند و از طریق کاهش بیان انکوژن یا آپوپتوز با واسطه $Caspase$ ۹ فعالیت ضد تکثیری از خود نشان می‌دهند. علاوه بر این، آن‌ها می‌توانند تکثیر سلول‌های سرطانی

² Mansorin-A

³ Pump efflux of multidrug resistance-related protein 2

⁴ Adipose stem cells

که مکانیزم مولکولی آن القای آپاپتوز از مسیر خارجی بوده است.

نتیجه گیری

اگزوزوم‌های استخراج شده از رده سلولی AGS تحت تیمار نانوکومارین در غلظت LCY5 توانست سلول‌های MKN45 مقاوم شده به دارو را مهار نماید. مکانیزم این مهار از طریق القای آپوپتوز خارجی مسیر *Caspase 1* اتفاق افتاده بود. به عبارت دیگر با اگزوزوم‌های دارای محتوی آپوپتوتیک می‌تواند مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی را القا نماید.

سپاسگزاری

این پژوهش با استفاده از پایان نامه دانشجویی با کد پایان نامه به شماره ۱۱۹۲۹۱۴۶۰۹۹۵۱۳۹۱۴۰۰۱۶۲۴۸۰۹۲۶ و کد اخلاق IR.IAU.ARDABIL.REC.1400.081 انجام شده، که از مسئولین آزمایشگاه بیوتکنولوژی در دانشکده پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی و آزمایشگاه مرکزی دانشگاه محقق کمال سپاسگزاری را داریم.

روش حاضر بیان *miR-34a* در اثر تیمار کومارین و نانوکومارین اگزوزوم حاصل از سلول‌های AGS در غلظت LCY5 % و LC50 افزایش بیان داشتیم ولی بیان *miR-21* در MKN45 در غلظت اگزوزوم LCY5 کاهش یافته بود (جدول ۳)، ولی در غلظت LC50 افزایش یافته بود. افزایش *miR-21* در اگزوزوم‌های سلول‌های بدخیمی (۳۸) و سلول‌های کولون (۳۹) گزارش شده است.

تجزیه و تحلیل بیان نسبی *miRNA* اگزوزومی سرم در مطالعه Maeda و همکاران در سال ۲۰۲۰ (۴۰) نشان داد که بیماران OC⁵ در مراحل اولیه سطوح بالاتری از *miR-34a* اگزوزومی نسبت به بیماران در مرحله پیشرفته داشتند. *miR-34a* به معمولی کاهش می‌یابد و با مهار بیان *c-Met*، مهاجرت و تهاجم تومور را سرکوب می‌کند.

هم‌چنین شواهدی وجود دارد مبنی بر این که *P53* که به عنوان یک سرکوب کننده تومور عمل می‌کند و خانواده *miR-34* را فعال می‌کند (۴۰).

exomiR-34a یا *miR-34a* پوشش داده شده با اگزوزوم، می‌تواند به طور مؤثر از غشای سلولی عبور کند و بیان ژن تارگت *BCL2* را کاهش دهد. درمان با *exomiR-34a* رشد سلول‌های سرطانی پانکراس را به طور قابل توجهی مهار کرد و نانوذرات هم‌چنین از طریق تأثیر بر بیان ژن‌های مرتبط با آپوپتوز، آپوپتوز را در سلول‌های سرطانی القا کردند. *exomiR-34a* می‌تواند رشد سرطان پانکراس را در شرایط *In vitro* و *In vivo* مهار کند (۴۱). اگزوزوم‌ها به عنوان حامل برای مولکول‌های کوچک RNA درمان قابل توجهی برای سرطان را به خود جلب کرده‌اند. به عنوان مثال Nam و همکاران در سال ۲۰۲۰ بیان داشتند، *miRNA-134* که از طریق اگزوزوم به سلول‌های سرطان پستان تحویل داده می‌شود، از تکثیر سلول‌های تومور جلوگیری می‌کند و حساسیت آن‌ها را به داروهای ضد شوک حرارتی پروتئین ۹۰ (Hsp90) افزایش می‌دهد (۴۲). Zhao و همکاران در سال ۲۰۲۲ (۴۳) در مطالعه‌ای مهار تومورزایی را از طریق *miRNA* های اگزوزوم توجیه نمودند.

بنابراین محتویات اگزوزوم حاصل از غلظت بالای مهاری کومارین (۳۲۰، ۱) LCY5 با توجه به تجمع *miR-34a* و کاهش *miR-21* و نیز احتمال وجود کومارین در داخل اگزوزوم می‌تواند برای مهار سلول‌های سرطانی مقاوم به دارو مورد استفاده قرار گیرد

⁵ Ovarian cancer

1. Fouman-Ajirlou P, Ahmadizadeh C, Zaeifizadeh M. The effect of combination of *Lactobacillus reuteri* and Coumarin on the inhibition of gastric cancer cells, AGS cell line. *KAUMS Journal (FEYZ)*. 2020 Apr 10;24(2):122-32.
2. Kim SM, Vetrivel P, Ha SE, Kim HH, Kim JA, Kim GS. Apigetrin induces extrinsic apoptosis, autophagy and G2/M phase cell cycle arrest through PI3K/AKT/mTOR pathway in AGS human gastric cancer cell. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 2020 Sep 1;83:108427.
3. Fani Pakdel A, Elyasi S, Kooshiar MM, Jannati Yazdan Abad M, Marouzi A, Asgarian M. Identification and analysis of adverse drug reactions associated with colorectal and gastric cancer chemotherapy in hospitalized patients. *Med. J. Mashhad Univ. Med. Sci*. 2018;61(2):921-30.
4. Sexton RE, Al Hallak MN, Diab M, Azmi AS. Gastric cancer: a comprehensive review of current and future treatment strategies. *Cancer Metastasis Rev*. 2020 Dec;39(4):1179-203.
5. Dejamfekr M, Khaleghian A. Antioxidant properties of vanadium complexes and their anticancer effects on human gastric cancer cell line MKN45. *Koomesh*. 2019 Apr;21(2):331-9.
6. Baxevanis CN, Perez SA, Papamichail M. Cancer immunotherapy. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci*. 2009 Aug 1;46(4):167-89.
7. McCracken M, Olsen M, Chen Jr MS, Jemal A, Thun M, Cokkinides V, Deapen D, Ward E. Cancer incidence, mortality, and associated risk factors among Asian Americans of Chinese, Filipino, Vietnamese, Korean, and Japanese ethnicities. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2007 Jul;57(4):190-205.
8. K peli Akkol E, Gen Y, Karpuz B, Sobarzo-Sánchez E, Capasso R. Coumarins and coumarin-related compounds in pharmacotherapy of cancer. *Cancers*. 2020 Jul;12(7):1959.
9. Taebi S, Nosrati M. Evaluation of anti-bacterial activity and biofilm inhibition of *Satureja Khuzestanica* Jamzad against *Streptococcus Mutans*. *Journal of Arak University of Medical Sciences*. 2017 Feb 10;19(11):26-38.
10. Irfan A, Rubab L, Rehman MU, Anjum R, Ullah S, Marjana M, Qadeer S, Sana S. Coumarin sulfonamide derivatives: An emerging class of therapeutic agents. *Heterocycl. Commun*. 2020 Jan 1;26(1):46-59.
11. Zhang SY, Meng L, Gao WY, Song NN, Jia W, Duan HQ. Advances on biological activities of coumarins. *Zhongguo Zhong yao za zhi= Zhongguo zhongyao zazhi= China journal of Chinese materia medica*. 2005 Mar 1;30(6):410-4.
12. Tavolari S, Bonafe M, Marini M, Ferreri C, Bartolini G, Brighenti E, Manara S, Tomasi V, Laufer S, Guarnieri T. Licofelone, a dual COX/5-LOX inhibitor, induces apoptosis in HCA-7 colon cancer cells through the mitochondrial pathway independently from its ability to affect the arachidonic acid cascade. *Carcinogenesis*. 2008 Feb 1;29(2):371-80.
13. Babaei E, Ghojaie M, Aas Z, Hosseinpour Feizi M. Evaluation of the Anti-cancer Effect of Nano-based Compound of Farnesiferol C on Cancerous Gastric Cell Lines. *Journal of Police Medicine*. 2015;4(2):141-6.
14. Perumalsamy H, Sankarapandian K, Veerappan K, Natarajan S, Kandaswamy N, Thangavelu L, Balusamy SR. In silico and in vitro analysis of coumarin derivative induced anticancer effects by undergoing intrinsic pathway mediated apoptosis in human stomach cancer. *Phytomedicine*. 2018 Jul 15;46:119-30.
15. Munagala R, Aqil F, Jeyabalan J, Gupta RC. Bovine milk-derived exosomes for drug delivery. *Cancer letters*. 2016 Feb 1;371(1):48-61.
16. Kakarla R, Hur J, Kim YJ, Kim J, Chwae YJ. Apoptotic cell-derived exosomes: messages from dying cells. *Experimental & Molecular Medicine*. 2020 Jan;52(1):1-6.

17. Johnsen KB, Gudbergsson JM, Skov MN, Pilgaard L, Moos T, Duroux M. A comprehensive overview of exosomes as drug delivery vehicles—endogenous nanocarriers for targeted cancer therapy. *Biochimica Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*. 2014 Aug 1;1846(1):75-87.
18. Jahangard Y, Moradi A, Mowla SJ. Exosomes: Characteristics, Function, and Clinical Aspects. *Modan Journal of Biotechnology*. 2019 Mar 10;10(1):159-64.
19. Kim H, Kim EH, Kwak G, Chi SG, Kim SH, Yang Y. Exosomes: cell-derived nanoplateforms for the delivery of cancer therapeutics. *Int. J. Mol. Sci*. 2020 Dec 22;22(1):14.
20. Sinha D, Roy S, Saha P, Chatterjee N, Bishayee A. Trends in research on exosomes in cancer progression and anticancer therapy. *Cancers*. 2021 Jan;13(2):326.
21. Yoon JH, Ashktorab H, Smoot DT, Nam SW, Hur H, Park WS. Uptake and tumor-suppressive pathways of exosome-associated GKN1 protein in gastric epithelial cells. *Gastric Cancer*. 2020 Sep;23(5):848-62.
22. Zaharie F, Muresan MS, Petrushev B, Berce C, Gafencu GA, Selicean S, Jurj A, Cojocneanu-Petric I, Lisencu CI, Pop LA, Pileczki V. Exosome-carried microRNA-375 inhibits cell progression and dissemination via Bcl-2 blocking in colon cancer. *J Gastrointest Liver Dis*. 2015 Dec 1;24(4):435-43.
23. Shi H, Li H, Zhen T, Dong Y, Pei X, Zhang X. The potential therapeutic role of exosomal microRNA-520c derived from normal fibroblasts in pancreatic cancer. *Molecular Therapy-Nucleic Acids*. 2020 Jun 5;20:373-84.
24. Jeong K, Yu YJ, You JY, Rhee WJ, Kim JA. Exosome-mediated microRNA-497 delivery for anti-cancer therapy in a microfluidic 3D lung cancer model. *Lab Chip*. 2020;20(3):548-57.
25. Chen W, Quan Y, Fan S, Wang H, Liang J, Huang L, Chen L, Liu Q, He P, Ye Y. Exosome-transmitted circular RNA hsa_circ_0051443 suppresses hepatocellular carcinoma progression. *Cancer letters*. 2020 Apr 10;475:119-28.
26. Pakravan K, Babashah S, Sadeghizadeh M, Mowla SJ, Mossahebi-Mohammadi M, Ataei F, Dana N, Javadi M. MicroRNA-100 shuttled by mesenchymal stem cell-derived exosomes suppresses in vitro angiogenesis through modulating the mTOR/HIF-1 α /VEGF signaling axis in breast cancer cells. *Cellular oncology*. 2019 Oct;40(5):457-70.
27. Kamerkar S, LeBleu VS, Sugimoto H, Yang S, Ruivo CF, Melo SA, Lee JJ, Kalluri R. Exosomes facilitate therapeutic targeting of oncogenic KRAS in pancreatic cancer. *Nature*. 2017 Jun;546(7659):498-503.
28. Wu Y, Xu J, Liu Y, Zeng Y, Wu G. A review on anti-tumor mechanisms of coumarins. *Frontiers Oncology*. 2020 Dec 4;10:2720.
29. Am JU, Gong W, Su Y, Mou ZB. Imperatorin shows selective antitumor effects in SGC-7901 human gastric adenocarcinoma cells by inducing apoptosis, cell cycle arrest and targeting PI3K/Akt/m-TOR signaling pathway. *J BUON*. 2017 Nov 1;22(6):1471-6.
30. Baghdadi MA, Al-Abbasi FA, El-Halawany AM, Aseeri AH, Al-Abd AM. Anticancer profiling of coumarins and related O-naphthoquinones from *Mansonia gagei* against solid tumor cells in vitro. *Molecules*. 2018 May;23(5):1020.
31. Kasaian J, Mosaffa F, Behravan J, Masullo M, Piacente S, Iranshahi M. Modulation of multidrug resistance protein 2 efflux in the cisplatin resistance human ovarian carcinoma cells A2780/RCIS by sesquiterpene coumarins. *Phytother. Res*. 2016 Jan;30(1):84-9.
32. Wang H, Yao M, Xu W. The antitumor effects of mitochondria-targeted 6-(nicotinamide) methyl coumarin. *Open Life Sciences*. 2016 Jan 1;11(1):542-51.
33. Wu Y, Xu J, Liu Y, Zeng Y, Wu G. A review on anti-tumor mechanisms of coumarins. *Frontiers Oncology*. 2020 Dec 4;10:2720.

34. Wang Y, Li CF, Pan LM, Gao ZL. 7, 8-Dihydroxycoumarin inhibits A549 human lung adenocarcinoma cell proliferation by inducing apoptosis via suppression of Akt/NF- κ B signaling. *Exp. Ther. Med.* 2013 Jun 1;5(6):1770-4.
35. Yang L, Wu X, Wang D, Luo C, Chen L. Renal carcinoma cell-derived exosomes induce human immortalized line of Jurkat T lymphocyte apoptosis in vitro. *Urol. Int.* 2013;91(3):363-9.
36. Bonafede R, Brandi J, Manfredi M, Scambi I, Schiaffino L, Merigo F, Turano E, Bonetti B, Marengo E, Ceconi D, Mariotti R. The anti-apoptotic effect of ASC-exosomes in an in vitro ALS model and their proteomic analysis. *Cells.* 2019 Sep;8(9):1087.
37. Zhao H, Wang Q, Wang X, Zhu H, Zhang S, Wang W, Wang Z, Huang J. Correlation between RAB27B and p53 expression and overall survival in pancreatic cancer. *Pancreas.* 2016 Feb;45(2):204.
38. Monfared H, Jahangard Y, Nikkiah M, Mirnajafi-Zadeh J, Mowla SJ. Potential therapeutic effects of exosomes packed with a miR-21-sponge construct in a rat model of glioblastoma. *Frontiers in Oncology.* 2019:782.
39. Sun LH, Tian D, Yang ZC, Li JL. Exosomal miR-21 promotes proliferation, invasion and therapy resistance of colon adenocarcinoma cells through its target PDCD4. *Sci. Rep.* 2020 May 19;10(1):1-8.
40. Maeda K, Sasaki H, Ueda S, Miyamoto S, Terada S, Konishi H, Kogata Y, Ashihara K, Fujiwara S, Tanaka Y, Tanaka T. Serum exosomal microRNA-34a as a potential biomarker in epithelial ovarian cancer. *J. Ovarian Res.* 2020 Dec;13(1):1-9.
41. Zuo L, Tao H, Xu H, Li C, Qiao G, Guo M, Cao S, Liu M, Lin X. Exosomes-coated miR-34a displays potent antitumor activity in pancreatic cancer both in vitro and in vivo. *Drug Des., Dev. Ther.* 2020;14:3495.
42. Nam GH, Choi Y, Kim GB, Kim S, Kim SA, Kim IS. Emerging prospects of exosomes for cancer treatment: from conventional therapy to immunotherapy. *Adv. Mater.* 2020 Dec;32(51):2002440.
43. Zhao K, Li X, Shi Y, Lu Y, Qiu P, Deng Z, Yao W, Wang J. Exosomes in the tumor microenvironment of cholangiocarcinoma: current status and future perspectives. *J. Transl. Med.* 2022 Dec;20(1):1-4.

