NCMBJ
Research article

New Cell Mol Biotech
j.13/50 , 2023

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, BCL,2, 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.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-13]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1402.13.50.4.4]

Corresponding author:
Department of Biology, Ardabil Branch, Islamic Azad University, Ardabil, Iran
Email: Mzaefi@gmail.com

مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی مولکولی
دوره ۱۳ - شماره ۵۰ - بهار ۱۴۰۲
NCMBJ
مقاله پژوهشی

برای مشاهده این مقاله به صورت آنلاین اسکن کنید

ارزیابی اثر اگزوزوم‌های استخراج شده از سلول‌های AGS تیمار شده با نانوکومارین بر القا مسیر خارجی آپوپتوز در سلول‌های سرطانی معده مقاوم به دارو

نرگس رجب وند، محمد ضعیفی زاده*، هاشم یعقوبی

گروه زیست شناسی، 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 اگزوزوم‌ها برای بسته‌بندی دارو، پتانسیل خوبی برای مهار سلول‌های سرطانی مقاوم به دارو می‌باشد. این پژوهش با هدف بررسی اثر اگزوزوم‌های استخراج شده از سلول‌های سرطانی رده AGS تحت تأثیر نانوکومارین بر روی مهار رده مقاوم MKN۴۵ انجام شد.

مواد و روش‌ها: اگزوزوم‌ها در غلظت LC۵۰ و LC۷۵ 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 MKN۴۵ مقاوم به دارو اعمال گردید. تست مهار (MTT) و بیان ژن‌های *Caspase ۸*، *Caspase ۹*، *BCL ۲*، *Bax* و *P۵۳* اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که اگزوزوم‌های استخراج شده از AGS تحت تیمار نانوکومارین با غلظت LC۷۵ بر روی رده مقاوم‌به داروی MKN۴۵ علاوه‌بر نقش مهاری، تأثیر معنی‌داری در تغییر میزان بیان ژن‌های *Caspase ۸*، *BCL ۲* و *P۵۳* داشته است.

نتیجه‌گیری: افزایش بیان ژن‌های *Caspase ۸*، *BCL ۲* و *P۵۳* در تیمار اعمال اگزوزوم‌ها در سطح LC۷۵ نشان دهنده القای آپوپتوز از مسیر خارجی توسط اگزوزوم در سلول‌های مقاوم است و به‌طوری‌که میزان کاهش بیان انکومیر *miR-۲۱* و افزایش *miR-۳۴a* در محتویات اگزوزوم آن را به اثبات می‌رساند.

واژه‌های کلیدی: اگزوزوم، 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 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 هلیکوباکترپیلوری شایع‌ترین عفونت بیماری‌زا است که باعث ایجاد سرطان معده می‌شود (۴). بروز و علت سرطان معده علاوه‌بر 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).

نویسنده مسئول:
گروه زیست شناسی، واحد اردبیل، دانشگاه آزاد اسلامی، اردبیل، ایران
پست الکترونیکی: Mzaefi@gmail.com
تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۳/۰۸
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۴/۰۶

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-13]
[DOR: 20.1001.1.22285458.1402.13.50.4.4]

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 نسبت‌به 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 توجه‌به 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 benzopyrone-۱،۲ یا lactone-۸-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)، مهارلیپوکسیژناز و سیکلواکسیژناز (۱۲)، ضد جهش‌زایی، مهار اکسیژن فعال و ضدتوموری (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 می‌توان به اکسی کنتنیل کومارین‌ها، پرنیل کومارین‌ها و مشتقات پرنیله کومارین‌ها به نام ۷-farnesyloxycoumarin umbelliprenin و هم‌چنین فارنسیفرول C که یکی از سزکوئی‌ترپن کومارین‌ها از ریشه گیاه Ferula szowitziana است، اشاره کرد. این ترکیب-های 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 به‌نام ۶-(۳-methylbutanoyl)-coumarin-۵،۷-dihydroxy-۴-methyl با القای آپوپتوز از رشد 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 g/mL ۱/۱۳-۱/۲۱ منشاء می‌گیرند (۱۶).

اگزوزوم‌ها دارای توانایی‌های منحصر به‌فرد در انتقال RNA و پروتئین‌ها هستند. آن‌ها واسطه‌های مهم ارتباطات بین سلولی و تنظیم کننده‌های 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)،

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-13]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1402.13.50.4.4]

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

اگزوزوم‌های استخراج شده از سلول‌های توموری می‌تواند رشد تومور را سرکوب کند یا پاسخ ایمنی و فعال شدن ماکروفاژها و سلول‌های کشنده طبیعی را ممانعت نماید (۱۶). اگزوزوم‌ها وسیله‌ای مناسب برای تحویل miRNA ها یا RNA های مداخله‌گر کوچک (siRNA) به سلول‌های گیرنده برای کمک به تنظیم سطح بیان ژن‌های مربوطه، به‌ویژه انکوژن‌ها، که اهداف بالقوه در درمان تومور در نظر گرفته می‌شوند، در نظر گرفته می‌شوند (۲۷).

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

مواد و روش‌ها

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 سانتی‌گراد در انکوباتور اتمسفر مرطوب حاوی ۵ درصد CO_2 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 ۳-(۴،۵-dimethylthiazol-۲-yl)-۲،۵-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) انجام شد. سلول‌های رده AGS با تراکم ۸×۱۰^۳ سلول در چاهک در پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای کشت شدند و با ده غلظت سریالی کومارین (بین ۰ تا ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) به‌مدت ۴۸ ساعت تیمار شدند. رنگ MTT (۰/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر؛ Sigma-Aldrich) سپس به چاهک‌ها اضافه شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲ تا ۴ ساعت انکوبه شد. بلورهای فورمازان با افزودن دی‌متیل‌سولفوکسید (DMSO؛ ۲۰۰µL/well) حل شدند و چگالی نوری در طول موج ۵۷۰ نانومتر توسط میکروپلیت خوان ELISA اندازه‌گیری شد.

Viability (%) = absorbance of experiment well / absorbance of control well × 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 $CD_۹$ 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. هم‌چنین 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. هم‌چنین 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 به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۱۶ درجه سانتی‌گراد و سپس ۳۰ دقیقه در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. برای غیرفعال کردن آنزیم در مرحله آخر، واکنش در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت 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 U۶. توالی پرایمر در جدول ۱ نشان داده شده است.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-13]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1402.13.50.4.4]

جدول ۱. پرایمرهای Stem-Loop خاص سنتز cDNA و توالی پرایمرهای Real Time-PCR

پرایمرها	توالی پرایمرها (`۳-`۵)
	AAGTGCCCTTCCCTTGCTG
forward ۸ *Caspase*	GCAGAAAGTCAGCCTCATCC
reverse ۸ *Caspase*	AAAGTTGTCGAAGCCAACCC
forward ۹ *Caspase*	GACTCACGGCAGAAGTTCAC
reverse ۹ *Caspase*	TGTGGCCTTCTTTGAGTTCG
forward ۲*BCL*	CCTACCCAGCCTCCGTTATC
reverse ۲*BCL*	AGATCATGAAGACAGGGGCC
Bax forward	CCAATGTCCAGCCCATGATG
Bax reverse	AGGTTGGCTCTGACTGTACC
forward ۵۳*P*	GATTCTCTTCCTCTGTGCGC
reverse ۵۳*P*	AAGAACACTACCCACCCACA
forward ۲*GAPDH*	ATTTCAGAGCATAGCGCATA
reverse ۲*GAPDH*	CCCGCTAGCTTATCAGACTGATG
forward *p۵-۲۱miR*	GTGCAGGGTCCGAGGT
Universal reverse -۲۱*miR*	GCTTCGGCAGCACATATACTAAAAT
forward *p۶-۶U*	CGCTTCACGAATTTGCGTGTCAT
reverse *p۶-۶U*	GGGATGGCAGTGTCTTAGC
forward *a-۳۴miR*	GTGCAGGGTCCGAGGT
Universal reverse *p۵a--۳۴miR*	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACTCAACA
SLP (Stem Loop Primer) *p۵--۲۱miR*	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACACAACC
SLP (Stem Loop Primer) *a-۳۴miR*	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACAAAAATAT
SLP (Stem Loop Primer) *p۶-۶U*	

تجزیه و تحلیل کمی نتایج Real Time PCR برای بیان miRNA

برای انجام Real Time از دستگاه Qiagen استفاده شد. Mic PCR برای qRT-PCR با استفاده از نرم‌افزار mic-PCR v۱/۴/۰ استفاده شد. لوله‌های واکنش و لوله‌های کنترل بدون الگو (NTC[1]) تحت آزمایش و آنالیز قرار گرفتند که در سه تکرار انجام شد. هر لوله واکنش حاوی ۵ میکرولیتر مخلوط اصلی، ۰,۵ میکرولیتر پرایمر forward ویژه و ۰/۵ میکرولیتر پرایمر reverse در غلظت‌های pmol ۵ با ۰/۵ میکرولیتر cDNA در حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر بود.

برنامه دمای سایکلر حرارتی به شرح زیر بود:
۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۵ دقیقه، ردیابی برای ۴۰ چرخه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ ثانیه و در ۶۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۵ ثانیه.

مقدار هر miRNA در مقایسه با مقدار RNA هسته‌ای کوچک U۶ نرمال شد. تغییر برابری هر miRNA با استفاده از روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ محاسبه شد. برای بررسی بیان ژن‌ها از کیت SYBR Blue (SinaClon) استفاده شد. (مطابق دستورالعمل کیت (Cat. No.: MM۲۱۷۱

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 ± 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 $P <$ ۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد. برای تجزیه و تحلیل نتایج MTT و ترسیم نمودار از نرم‌افزار Excel ۲۰۱۳ و SPSS version ۲۲/۰ استفاده شد.

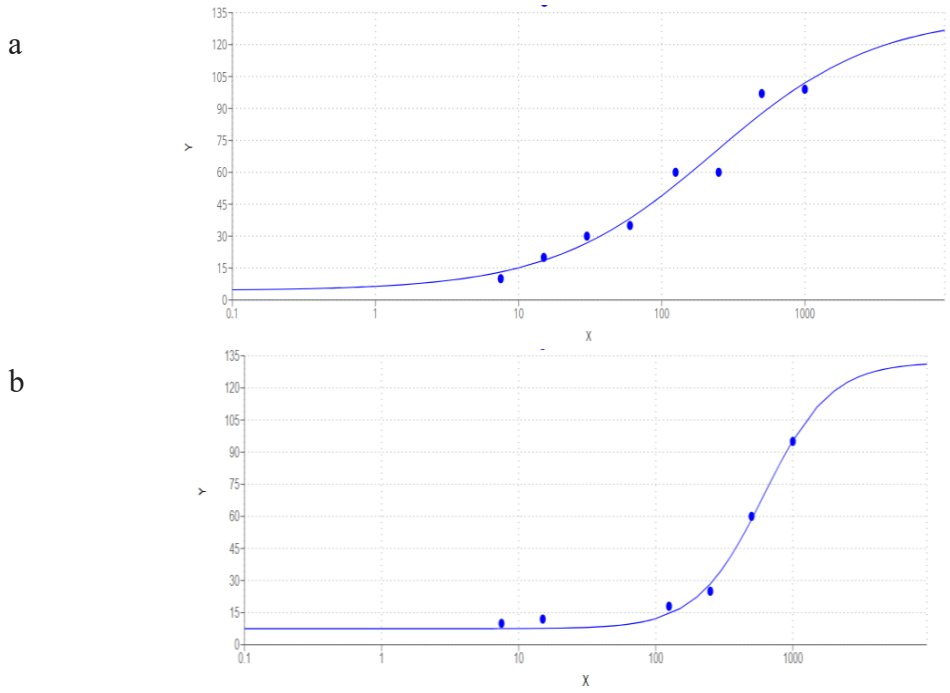
یافته‌ها

نانوکومارین و کومارین در نتایج آزمایشات توکسیسیتی در ده غلظت سریالی بین ۰ تا ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر در دو نوع سلول AGS و MKN۴۵ (مقاومبه 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 LC۵۰ برای AGS و MKN۴۵ به‌ترتیب ۲۳۲/۱ و ۲۸۲/۱۱ میکروگرم در میلی‌لیتر

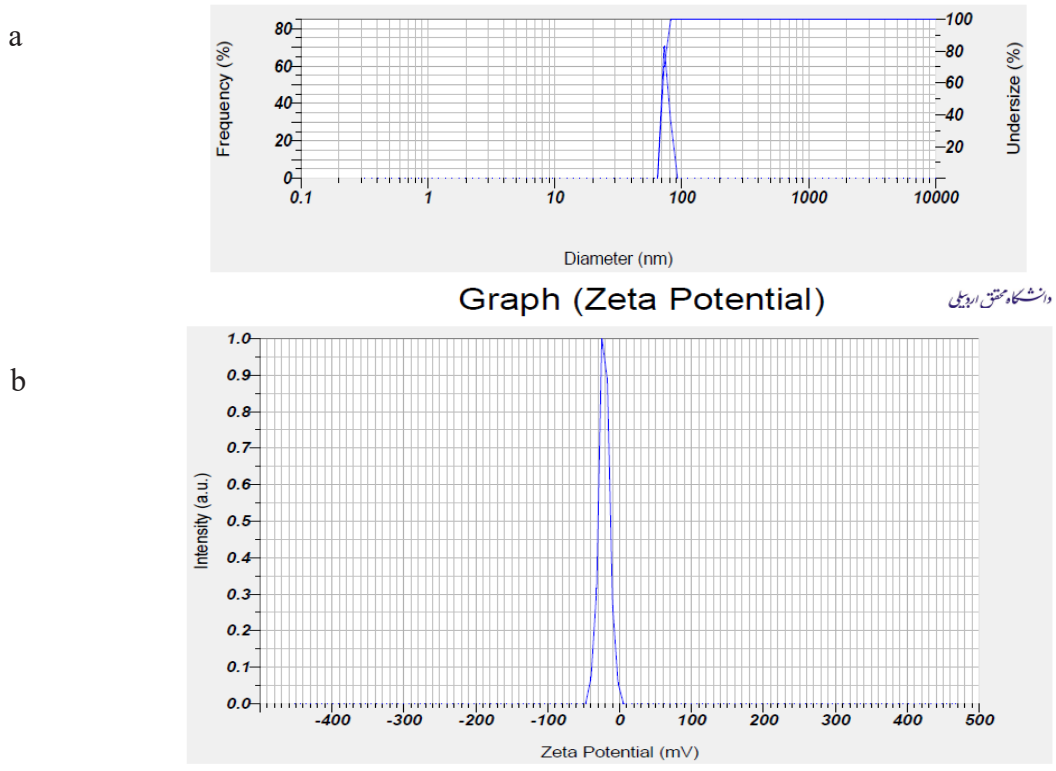
[1] Nontemplate control

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-13]
[DOR: 20.1001.1.22285458.1402.13.50.4.4]

نانوکومارین بود (شکل 1a). بدین معنی که در رده مقاوم‌به 5FU میزان غلظت برای LC۵۰ بیش‌تر بود. اگزوزوم‌های محیط کشت سلول‌های AGS در غلظت نانوکومارین (۲۳۲/۱) LC۵۰ و (۳۲۰/۱) LC۷۵ استخراج شد. اندازه اگزوزوم‌ها ۳/۵ ± ۷۱/۲ نانومتر در روش DLS (شکل 2a) بود. ضریب پایداری Zeta برابر ۲۱/۳- میلی‌ولت بود (شکل 2b)، که نشان دهنده پایداری اگزوزوم است.



شکل ۱. نتایج آزمایش MTT در برآورد LC۵۰ برای تیمار نانوکومارین (a) و نتایج آزمایش MTT در برآورد LC۵۰ برای تیمار اگزوزوم (b)



شکل ۲. نمودار تایید سایز اگزوزوم در محدوده اگزوزومی تحت تیمار نانوکومارین (a) و نمودار پتانسیل زتا تحت تیمار نانوکومارین (b)

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-13]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1402.13.50.4.4]

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 MKN۴۵ به روش MTT تست و نتایج آن در شکل b ۱ آمده است. F در آنالیز واریانس برای غلظت‌های مختلف اگزوزوم‌های حاصل از اعمال نانوکومارین (۶۱۳/۱۳) LC۵۰ در میزان مهار MKN۴۵ معنی دار بود ($P_{valu} \leq$ ۰/۰۵). هم‌چنین اثر غلظت‌های مختلف اگزوزوم‌های مختلف حاصل از (LC۷۵) اعمال نانوکومارین در AGS برای مهار سلول‌های MKN۴۵ در شکل a۱ درج شده است که نشان می‌دهد با افزایش غلظت اگزوزوم در محیط کشت MKN۴۵ میزان مهار سلول‌های افزایش می‌یابد.

بررسی بیان ژن‌های مختلف در سلول‌های MKN۴۵ تحت تأثیر اگزوزوم‌ها

بیان نسبی ژن‌های مسیر آپوپتوزی در MKN۴۵ نسبت‌به GAPDH۲ 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	*Caspase۸*	*Caspase۹*	*BCL۲*	*Bax*	*P۵۳*	*miR-۲۱*	*miR-۳۴a*
M-Ctr	۱^{d}	۱^{b}	۱^{d}	۱^{c}	۱^{c}	۱^{b}	۱^{c}
M-Cum LC۵۰	۳/۴^{b}	۱/۴^{a}	۴/۴^{b}	۱/۴^{c}	۱/۸۴^{b}	۰/۵۶^{c}	۲/۸۷^{bc}
M-Nanocum LC۵۰	۴/۱۲^{A}	۱/۱۲^{ab}	۵/۴۲^{b}	۱/۱۲	۲/۱۲^{a}	۰/۲۲	۳/۲۲^{b}
M-Exo۵۰	۰/۸۷^{ns}	۰/۴۵^{c}	۰/۹۷^{d}	۳/۸۷^{a}	۱/۰۷^{c}	۲/۱۱^{b}	۰/۴۹^{d}
M-Exo۷۵	۴/۸۷^{A}	۰/۹۱۸۷^{b}	۷/۸۷^{a}	۱/۰۷^{c}	۲/۸۷^{a}	-۰/۴^{d}	۵/۴۴^{ab}
A-Exo۵۰	۲/۱۱^{c}	۰/۹۱^{b}	۴/۱۱^{b}	۲/۱^{b}	۲/۰۱^{ab}	۳/۱۹^{a}	۴/۵۰۱^{b}
A-Exo۷۵	۳/۸۲^{b}	۱/۲۲^{a}	۳/۹۰۱^{c}	۰/۹۲^{c}	۱/۷۸^{b}	۰/۹۸^{b}	۶/۸۸^{a}
E-Exo۵۰ A	-	-	-	-	-	۳/۲۳^{a}	۰/۶۷^{cd}
E-Exo۷۵ A	-	-	-	-	-	-۱/۳۳^{c}	۳/۳۳^{b}
E-Ctr A	-	-	-	-	-	۱^{b}	۱^{c}

M-Ctr: کنترل در MKN۴۵، M-Cum: تیمار کومارین برای MKN۴۵، M-Nanocum: تیمار نانوکومارین برای MKN۴۵، M-Exo۵۰: تیمار اگزوزوم LC۵۰ مستخرج از AGS به محیط کشت MKN۴۵، M-Exo۷۵: تیمار اگزوزوم LC۷۵ مستخرج از AGS به MKN۴۵، A-Exo۵۰: تیمار اگزوزوم LC۵۰ مستخرج از AGS به AGS، A-Exo۷۵: تیمار اگزوزوم LC۷۵ مستخرج از AGS به AGS، E-Exo۵۰ A: اگزوزوم در شرایط LC۵۰، E-Exo۷۵ A: اگزوزوم در شرایط LC۷۵ و E-Ctr A: کنترل اگزوزوم

نتایج نشان داد (جدول ۲) بیان نسبی کاسپاز ۸ با مصرف کومارین و نانوکومارین در MKN۴۵ افزایش بیان به‌ترتیب ۳/۴ و ۴/۱۲ برابری داشت. بدین معنی که کومارین و نانوکومارین اثر Upregulate در بیان ژن *Caspase ۸* داشت. اگزوزوم‌های استخراجی از AGS در غلظت LC۵۰ تغییر بیان معنی‌داری در *Caspase ۸* نسبت‌به کنترل نداشت، اما در غلظت LC۷۵ میزان بیان ژن *Caspase ۸* افزایش معنی‌دار ۴/۸۷ برابری داشت هرچند که با اثر نانوکومارین در بیان این ژن تفاوت معنی‌داری نداشت. اگزوزوم در غلظت LC۵۰ و LC۷۵ استخراج شده از AGS بررسی بیان *Caspase ۸* در AGS افزایش بیان به‌ترتیب ۲/۱۱ و ۳/۸۲ داشت.

نتایج آنالیز واریانس تیمارها برای بیان *Caspase ۹* معنی‌دار بود ($P_{valu} \leq$ ۰/۰۱). میزان بیان ژن *Caspase ۹* حداکثر در تیمار کومارین در MKN۴۵ به میزان ۱/۴ برابر و در AGS در اگزوزوم LC۷۵ دیده شد. بقیه تیمارها به‌جزء اگزوزوم LC۵۰ در MKN۴۵ با شاهد تفاوت معنی‌دار نداشت. حداقل بیان ژن *Caspase ۹* در تیمار LC۵۰ اگزوزوم در رده سلولی MKN۴۵ دیده شد (جدول ۲).

بیان نسبی *BCL۲* به‌عنوان یکی از ژن‌های القای آپوپتوز در تمیارهای مختلف معنی‌دار بود ($P_{valu} \leq$ ۰/۰۱). بیان *BCL۲* با مصرف کومارین و نانوکومارین در سطح LC۵۰ به‌طور معنی‌دار به‌میزان ۴/۴ و ۵/۴۲ برابر افزایش یافته بود. بدین معنی که کومارین اثر افزایشی در بیان ژن داشت. حداکثر افزایش بیان ژن *BCL۲* در رده سلولی MKN۴۵ زمانی اتفاق افتاد که تیمار اگزوزوم LC۷۵ در آن اعمال شده بود که به میزان ۷/۸۷ برابر بوده است. اثر افزایشی بیان ژن *BCL۲* به‌جزء در تیمار Exo۵۰ در رده سلولی MKN۴۵، در بقیه تیمارها معنی‌دار بود ولی

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-13]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1402.13.50.4.4]

تیمار Exo۵۰ در *BCL۲* 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 ($P_{valu} \leq ۰/۰۱$). مقایسه میانگین به روش دانکن نشان داد که حداکثر بیان ژن *Bax* در MKN۴۵ در تیمار Exo۵۰ دیده شد. هر چند که در *BCL۲* این تیمار حداقل بیان را داشت. تیمار Exo۵۰ در AGS از نظر بیان در گروه b قرار گرفته بود که معادل ۲/۱ برابر نسبت‌به شاهد افزایش بیان داشت. سایر تیمارها اختلاف آماری با شاهد از نظر بیان *Bax* نداشتند.

P۵۳ یکی از تومورساپرسورهای کنترل کننده چرخه سلولی است. بیان ژن *P۵۳* در تیمارهای مختلف معنی‌دار بود ($P_{valu} \leq ۰/۰۱$). بیش‌ترین بیان در مصرف نانوکومارین و Exo۷۵ در رده سلولی MKN۴۵ و هرچند که با تیمار اگزوزوم LC۵۰ در رده AGS تفاوت نداشت که از نظر آماری در رتبه a قرار گرفته بودند. اما تیمارهای نانوکومارین در رده MKN۴۵ و Exo۷۵ در رده سلولی AGS با افزایش بیان ۱/۸۴ و ۱/۷۸ برابری برای ژن *P۵۳* نشان داد. بیان ژن *P۵۳* در سایر تیمارها تفاوت معنی‌داری با کنترل نداشت.

جدول ۳. همبستگی بین بیان نسبی ژن‌های مورد مطالعه (** نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۰/۰۱)

r	*Caspase۸*	*Caspase۹*	*BCL۲*	*Bax*	*P۵۳*
Caspase ۸	۱	-۰/۰۴۶	۰/۹۲۷**	-۰/۶۲۱	۰/۸۸۳**
Caspase ۹	-۰/۴۶	۱	-۰/۲۶۸	-۰/۳۳۵	-۰/۳۲۸
BCL۲	۰/۹۲۷**	-۰/۲۶۸	۱	-۰/۵۰۲	۰/۹۹۱**
Bax	-۰/۶۲۱	-۰/۳۳۵	-۰/۵۰۲	۱	-۰/۴۳۹
P۵۳	۰/۸۸۳**	-۰/۳۲۸	۰/۹۹۱**	-۰/۴۳۹	۱

هم‌بستگی بیان ژن‌های مورد مطالعه (جدول ۳) نشان داد که بین بیان ژن *Caspase ۸* با بیان ژن‌های *P۵۳* و *BCL۲* هم‌بستگی مثبت و معنی‌دار ولی با بیان ژن *Caspase ۹* و *Bax* هم‌بستگی غیر معنی‌دار معکوس داشت. *Caspase ۹* با هیچ کدام از ژن‌ها هم‌بستگی معنی‌دار نشان نداد. *BCL۲* با *Caspase ۸* و *P۵۳* هم‌بستگی مثبت و معنی‌دار داشت. هم‌بستگی بیان *Bax* با *BCL۲* معکوس و با هیچ‌کدام از ژن‌ها معنی‌دار نبود. *P۵۳* نیز با ژن‌های *Caspase ۸* و *BCL۲* هم‌بستگی مستقیم و معنی‌دار نشان داد.

بیان *miR-۲۱* و *miR-۳۴a* در اگزوزوم‌ها و سلول‌های تحت تیمارهای مختلف در هر دو رده حساس AGS و مقاوم MKN۴۵ (جدول ۲) اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد انکومیر *miR-۲۱* در اگزوزوم LC۵۰ بیش بیان ۳/۲۳ برابری داشت یعنی با وجود تأثیر نانوکومارین در سلول‌های AGS هم‌چنان در سلول‌های باقی مانده (۵۰٪ زنده مانی) افزایش انکومیر در برابر آپوپتوتیک وجود دارد اما میزان آن در اگزوزوم همان رده با افزایش غلظت نانوکومارین به LC۷۵ میزان بیان آن به ۱/۳۳- برابر رسیده است. یعنی اگزوزوم‌های حاصله به‌طور کامل بیان انکومیر را در این تیمار کاهش داده‌اند. بیان *miR-۲۱* در سلول‌های MKN۴۵ با اعمال تیمار کومارین و نانوکومارین کاهش بیان ولی اعمال Exo۵۰ افزایش بیان در صورتی‌که با اعمال Exo۷۵ افزایش بیان معنی‌دار داشته است. همین روند در سلول‌های AGS نیز وجود داشت ($P_{valu} \leq ۰/۰۱$). حداکثر بیان *miR-۳۴a* در رده سلولی AGS در Exo LC۵۰ و مصرف نانوکومارین LC۵۰ بیان آن به‌ترتیب ۴/۵ و ۳/۲۲ برابر افزایش داشت. در خود اگزوزوم‌ها میزان بیان *miR-۳۴a* در LC۵۰ کاهش و در LC۷۵ افزایش بیان تا ۳/۳۳ برابری دیده شد (جدول ۲).

بحث

نتایج آزمایش‌های ما نشان داد هم کومارین و هم نانوکومارین خاصیت مهاری سلول‌های سرطانی AGS و MKN۴۵ را داشتند (شکل ۱a).

کومارین‌ها توانایی‌های ضد توموری بسیار قابل توجهی دارند و مکانیسم‌های ضد توموری متنوعی از جمله مهار کربنیک انیدراز، هدف قرار دادن مسیرهای سیگنالینگ PI۳K/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 (۲۸). Am و همکاران

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-13]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1402.13.50.4.4]

در مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۷ گزارش کردند که ایمپراتورین (یک فوروکومارین) با مهار فسفوریلاسیون PI۳K، Akt و mTOR در سلول‌های آدنوکارسینومای معده انسان، خواص ضد توموری دارد (۲۹). Baghdadi و همکاران در سال ۲۰۱۸ (۳۰) از بین شش نوع ترکیب کومارین (مانسورین-A[2]، 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 این‌که نانوکومارین سلول‌های مقاوم به R۵FU MKN۴۵ 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 به‌طوری‌که 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 سسکوئی ترپن کومارین (۲۰ میکرومولار) با سیس پلاتین به‌طور قابل توجهی سمیت سلولی سیس پلاتین را بر روی سلول‌های A۲۷۸۰/RCIS افزایش داد. نتایج نشان داد که کنفردیون و Samarcand بالاترین اثرهای بازدارندگی را بر جریان پمپ پروتئین مربوط به مقاومت چند دارویی دو[3] داشتند (۳۱).

تأثیر کمپلکس نانوکومارین در مهار سول‌های سرطانی مقاوم‌به دارو بیشتر از خود کومارین بود. دلیل آن می تواند مربوط به نفوذپذیری بیش‌تر باشد زیرا اندازه کمپلکس مربوطه کم‌تر از ۴۰ نانومتر برآورده شده بود که نفوذپذیری آن به‌دلیل سایز کم‌تر، بیش‌تر میسر کرده بود.

تیمار کومارین و نانوکومارین باعث افزایش بیان ژن‌های *Caspase ۸*، *Caspase ۹*، *BCL۲*، *Bax* و *P۵۳* 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. علاوه‌بر این، آن‌ها می توانند تکثیر سلول‌های سرطانی را با توقف چرخه سلولی در فاز G۰/G۱، فاز G۲/M و تأثیر بر گلیکوپروتئین p (p-gp) سلول سرطانی، از جمله سلول‌های A۵۴۹، سلول‌های ACHN، سلول‌های H۷۲۷، سلول‌های MCF۷ و سلول‌های HL-۶۰ 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 *BCL۲* 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 وابسته‌به *Caspase ۳*، آپوپتوز سلول‌های سرطانی دهانه رحم و روده بزرگ را برای کاهش تنظیم *BCL۲*، *BCL-xL* و NF-kB ضد آپوپتوز و تنظیم مثبت *Caspase ۳* برای ترویج آزادسازی سیتوکروم C (cyt) القاء کند (۳۴).

تیمار اگزوزوم‌های تولید شده از AGS در افزایش بیان ژن‌های *BCL۲* و *P۵۳* و *Caspase ۸* در MKN۴۵ شده بود. هرچند که بیان ژن‌های *Bax* و *Caspase ۹* تأثیر معنی‌دار نداشت این روند در خود سلول های AGS حفظ شده بود (جدول ۲).

در مطالعه Yang و همکاران تأیید گردید تیمار با اگزوزوم‌ها سطوح نسبی *Caspase ۳*، *Caspase ۸* و *Caspase ۹* و هم-چنین *Bax* را افزایش داده، اما سطح *BCL۲* 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 آنتی‌آپوپتوز *BCL۲ α* در سلول‌های تیمار شده با اگزوزوم‌های ASC[4] گزارش کردند (۳۶).

مطالعه‌های اخیر نیز نقش *P۵۳* را در تنظیم ترشح اگزوزوم نشان داده است. از یک طرف، اگزوزوم‌ها می‌توانند پروتئین *P۵۳* را برای ایجاد محیطی مناسب برای تومور تثبیت کنند. از سوی دیگر، *P۵۳* تنظیم کننده‌های کلیدی محفظه اندوزومی را رونویسی می‌کند، بنابراین تولید و ترشح اگزوزوم را تنظیم می‌کند (۳۷).

[2] Mansorin-A
[3] Pump efflux of multidrug resistance-related protein 2
[4] Adipose stem cells

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-13]
[DOR: 20.1001.1.22285458.1402.13.50.4.4]

روش حاضر بیان *miR-۳۴a* در اثر تیمار کومارین و نانوکومارین اگزوزوم حاصل از سلول‌های AGS در غلظت LC۷۵ % و LC۵۰ افزایش بیان داشتیم ولی بیان *miR-۲۱* در MKN۴۵ در غلظت اگزوزوم LC۷۵ کاهش یافته بود (جدول ۳)، ولی در غلظت LC۵۰ افزایش یافته بود. افزایش *miR-۲۱* 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 OC[5] در مراحل اولیه سطوح بالاتری از *miR-۳۴a* اگزوزومی نسبت‌به بیماران در مرحله پیشرفته داشتند. *miR-۳۴a* به‌معمولی کاهش می‌یابد و با مهار بیان c-Met، مهاجرت و تهاجم تومور را سرکوب می‌کند.

هم‌چنین شواهدی وجود دارد مبنی‌بر این‌که *P۵۳* که به‌عنوان یک سرکوب کننده تومور عمل می‌کند و خانواده *miR-۳۴* را فعال می‌کند (۴۰).

exomiR-۳۴a یا *miR-۳۴a* پوشش داده شده با اگزوزوم، می‌تواند به‌طور مؤثر از غشای سلولی عبور کند و بیان ژن تارگت *BCL۲* را کاهش دهد. درمان با *exomiR-۳۴a* رشد سلول‌های سرطانی پانکراس را به‌طور قابل‌توجهی مهار کرد و نانوذرات هم‌چنین از طریق تأثیر بر بیان ژن‌های مرتبط با آپوپتوز، آپوپتوز را در سلول‌های سرطانی القا کردند. *exomiR-۳۴a* می تواند رشد سرطان پانکراس را در شرایط In vitro و In vivo مهار کند (۴۱). اگزوزوم‌ها به‌عنوان حامل برای مولکول‌های کوچک RNA درمان قابل توجهی برای سرطان را به خود جلب کرده‌اند. به‌عنوان مثال Nam و همکاران در سال ۲۰۲۰ بیان داشتند، *miRNA-۱۳۴* 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 (Hsp۹۰) 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) LC۷۵ با توجه‌به تجمع *miR-۳۴a* و کاهش *miR-۲۱* و نیز احتمال وجود کومارین در داخل اگزوزوم می‌تواند برای مهار سلول‌های سرطانی مقاوم به دارو مورد استفاده قرار گیرد که مکانیزم مولکولی آن القای آپاپتوز از مسیر خارجی بوده است.

نتیجه‌گیری

اگزوزوم‌های استخراج شده از رده سلولی AGS تحت تیمار نانوکومارین در غلظت LC۷۵ توانست سلول‌های MKN۴۵ مقاوم شده به دارو را مهار نماید. مکانیزم این مهار از طریق القای آپوپتوز خارجی مسیر *Caspase ۸* اتفاق افتاده بود. به‌عبارت 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.

[5] Ovarian cancer

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-13]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1402.13.50.4.4]

منابع

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. Küpeli Akkol E, Genç 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.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-13]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1402.13.50.4.4]

17. Johnsen KB, Gudbergsson JM, Skov MN, Pilgaard L, Moos T, Duroux M. A comprehensive overview 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. Modar 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 nanoplatforms for the delive 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 progressic 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 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 Lisencu CI, Pop LA, Pileczki V. Exosome-carried microRNA-375 inhibits cell progression and disseminatic via Bcl-2 blocking in colon cancer. J Gastrointestin 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-52(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-canc 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-transmitte circular RNA hsa_circ_0051443 suppresses hepatocellular carcinoma progression. Cancer letters. 2020 A 10;475:119-28.

26. Pakravan K, Babashah S, Sadeghizadeh M, Mowla SJ, Mossahebi-Mohammadi M, Ataei F, Dana N, Java M. MicroRNA-100 shuttled by mesenchymal stem cell-derived exosomes suppresses in vitro angiogenes through modulating the mTOR/HIF-1α/VEGF signaling axis in breast cancer cells. Cellular oncology. 201 Oct;40(5):457-70.

27. Kamerkar S, LeBleu VS, Sugimoto H, Yang S, Ruivo CF, Melo SA, Lee JJ, Kalluri R. Exosomes facilita 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 gastr adenocarcinoma cells by inducing apoptosis, cell cycle arrest and targeting PI3K/Akt/m-TOR signalli 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 f coumarins and related O-naphthoquinones from Mansonia gagei against solid tumor cells in vitro. Molecule 2018 May;23(5):1020.

31. Kasaian J, Mosaffa F, Behravan J, Masullo M, Piacente S, Iranshahi M. Modulation of multidrug resistan protein 2 efflux in the cisplatin resistance human ovarian carcinoma cells A2780/RCIS by sesquiterpe 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 coumari 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.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-13]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1402.13.50.4.4]

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-κB 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, Cecconi 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, Nikkhah 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.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-13]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1402.13.50.4.4]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1402.13.50.4.4]
[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-13]