

بررسی اثرات عصاره هیدروالکلی جلبک *Sargassum ciliforium* بر رده سلولی سرطان کولون HT-29 و ارزیابی بیان ژنهای P53 و APC با روش Real time PCR

ارمغان زاهدی^۱، طاهره ناجی^{۲*} و رحیم احمدی^۳

^۱ تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم دارویی، دانشکده علوم و فناوری های نوین، گروه سلولی و مولکولی

^۲ تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم دارویی، دانشکده داروسازی، گروه علوم پایه

^۳ همدان، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد همدان، گروه فیزیولوژی

تاریخ دریافت: ۹۶/۹/۱۹ تاریخ پذیرش: ۹۶/۱۱/۲۷

چکیده

سرطان روده بزرگ سومین سرطان شایع در جهان است که با نزدیک به ۱/۴ میلیون مورد جدید در ۲۰۱۲ تشخیص داده شده است. با توجه به افزایش بروز سرطان استفاده از مولکولهای جدید شیمی درمانی مورد نیاز است. بسیاری از مطالعات و تحقیقات نشان داده که سرطان روده می تواند از طریق محصولات دریایی طبیعی که دارای مقادیر بسیاری از مواد فعال بیولوژیکی با ساختارهای شیمیایی جدید و فعالیتهای دارویی جدید هستند درمان شود. هدف از این مطالعه بررسی اثرات عصاره هیدروالکلی جلبک *Sargassum ciliforium* بر رده سلولی سرطان کولون HT-29 و ارزیابی بیان ژنهای P53 و APC با روش Real time PCR می باشد. در این پژوهش تعیین سایتوتوکسیسیته عصاره جلبک *Sargassum ciliforium* با روش MTT در ۵ غلظت مختلف ۱۰، ۱، ۰/۱، ۰/۰۱، ۰/۰۰۱ میلی گرم بر میلی لیتر و یک گروه کنترل بر روی رده های سلولی سرطان کولون HT-29 و رده سلولی نرمال کلیه جنین انسان HEK مورد بررسی قرار گرفت. آنالیز داده ها با استفاده از نرم افزار SPSS و آزمون آماری One way ANOVA انجام شد. همچنین بیان ژنهای P53 و APC به روش Real time PCR ارزیابی شد. یافته ها نشان داد که عصاره جلبک *Sargassum ciliforium* در کاهش زیستایی رده سلولی سرطان روده در انسان HT29 و ممانعت از رشد سلولهای توموری تأثیر دارد و می توان از عصاره این جلبک جهت توسعه داروهای ضد سرطانی استفاده نمود و مشخص شد که مرگ سلولی القاء شده با عصاره جلبک *Sargassum ciliforium* از طریق فعال سازی پروتئین APC می باشد.

واژه های کلیدی: سرطان روده بزرگ، رده سلولی HT-29، جلبک *Sargassum ciliforium*، ژن APC و P53، Real time PCR

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۲۳۷۰۴۶۷۶، پست الکترونیکی: tnaji2002@gmail.com

مقدمه

عوامل جدید شامل محصولات دریایی طبیعی که دارای مقادیر بسیاری مواد مؤثر بیولوژیکی هستند، موجب ایمنی و بهبود و زنده ماندن بیماران با سرطان کولورکتال شده است (۱۷و۸). مهار آپتوز در سلولهای سرطان روده بزرگ باعث افزایش رشد تومور ترویج نئوپلاستیک و مقاومت به عوامل ضد سرطان سیتوتوکسیک می شود. بنابراین

امروزه با توجه به افزایش بروز سرطان در کشورهای در حال توسعه و توسعه یافته استفاده از مولکولهای جدید شیمی درمانی مورد نیاز است (۷). به کارگیری عوامل طبیعی و مصنوعی برای جلوگیری یا متوقف کردن پیشرفت سرطانهای مهاجم اخیراً به عنوان یک رویکرد با پتانسیل عظیم شناخته شده است (۴). طی دهه گذشته

قرارداده شد و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر پنی سیلین و استرپتومایسین به محیط کشت اضافه شد و رده های سلولی در ۳۷ درجه سانتی گراد در داخل انکوباتور حاوی ۵ درصد CO₂ و ۱۰۰ درصد رطوبت کشت داده شد.

تهیه دارو(عصاره جلبک *Sargassum ciliforium*): ابتدا ۰/۱ گرم یا ۱۰۰ میلی گرم از دارو وزن شد سپس ۱ ml از PBS برداشته و به ۰/۱ گرم از پودر لیوفیلیزه از جلبک *Sargassum ciliforium* اضافه گردید و پس از ورتکس ۹ ml محیط با PBS به حجم ۱۰ ml رسانده شد سپس با فیلتر سر سرنگی ۰/۲ میکرون همان روز عصاره فیلتر شد و کاملاً خالص و یکنواخت گردید. عصاره تهیه شده تا زمان استفاده در فریزر نگهداری شد.

ارزیابی توکسیسیته عصاره به روش MTT: تعیین سایتوتوکسیسیته عصاره با روش MTT انجام شد در این روش غلظتهای ۱، ۰/۱، ۰/۰۱، ۰/۰۰۱ میلی گرم بر میلی لیتر از عصاره تهیه شد و هر یک از غلظتها به عنوان گروههای مستقل به هر چاهک از پلیت ۹۶ خانه ای از سلولهای HT-29 و HEK اضافه شد و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۵ درصد CO₂ و با رطوبت ۱۰۰ درصد انکوبه شد. سپس محیط کشت رویی را خالی کرده و رنگ MTT اضافه و پلیتها با فویل آلومینیومی پیچیده و به مدت ۴ ساعت در انکوباتور انکوبه گردید. در مرحله بعد رنگ MTT را خالی و به هر چاهک DMSO اضافه کرده و به مدت ۲۰ دقیقه در Shaker قرار داده شد تا کاملاً یکنواخت شود و سپس جذب نوری هر چاهک در طول موج ۵۷۰ نانومتر مشخص شد.

انجام Real time PCR برای رده سلولی HT₂₉ در سه روز متوالی: فلاسک حاوی محیط کشت و سلولهای HT₂₉ از انکوباتور خارج و تریپسینه شد و پس از افزودن محیط کشت سانتریفیوژ به مدت ۵ دقیقه در ۱۰۰۰ دور انجام شد. سپس به دو خانه از پلیت ۶ خانه ای به هر خانه ۹۰۰ μ محیط حاوی سلولهای HT₂₉ و ۱۰۰ μ FBS اضافه شد و ۲۴

ترکیبات فعال زیستی که باعث القای آپاپتوز در سلولهای سرطانی می شود می تواند به عنوان یک عامل درمانی مؤثر مطرح شود (۱۵). مطالعات مختلف از جلبک سارگاسوم نشان داده است که مواد بیواکتیو موجود در جلبک دارای خاصیت سیتوتوکسیک و آنتی اکسیدان است. مطالعات فراوان روی جلبک قهوه ای نشان می دهد که گلیکوپروتئین موجود در سارگاسوم دارای اثرات ضدسرطانی روی سلولهای سرطانی در کولون انسان است (۱۳ و ۱۴). با توجه به اینکه سرطان کلورکتال یکی از سرطانهای شایع در کشورهای در حال توسعه و توسعه یافته است و از طرفی تأثیرات بالقوه جلبک سارگاسوم در گونه های متعدد در بهبود و اثربخشی انواع سرطان به اثبات رسیده است. است این طرح پژوهشی با هدف بررسی اثرات عصاره جلبک *Sargassum ciliforium* در رده سلولی HT-29 در سرطان کولورکتال با روش MTT و ارزیابی بیان ژنهای P₅₃ و APC با روش Real time PCR انجام شد.

مواد و روشها

جمع آوری جلبک و تهیه عصاره: جلبک *Sargassum ciliforium* از مناطق جنوب ایران بندر لنگه جمع آوری شد. بعد شستن جلبک، به مدت ۲ هفته در دمای اتاق خشک شد و پس از تمیز کردن پودر ریز به دست آمده با میزان ۳۰۰ میلی لیتر آب دیونیزه ترکیب شد و سوسپانسیون به دست آمده را به مدت ۳ ساعت جوشانده و سپس سوسپانسیون با عبور از کاغذ صافی فیلتر شد و عصاره فیلتر شده هیدروالکلی لیوفیلیزه شد و به صورت پودر درآمد. پودر به دست آمده تا زمان استفاده در یخچال نگهداری شد.

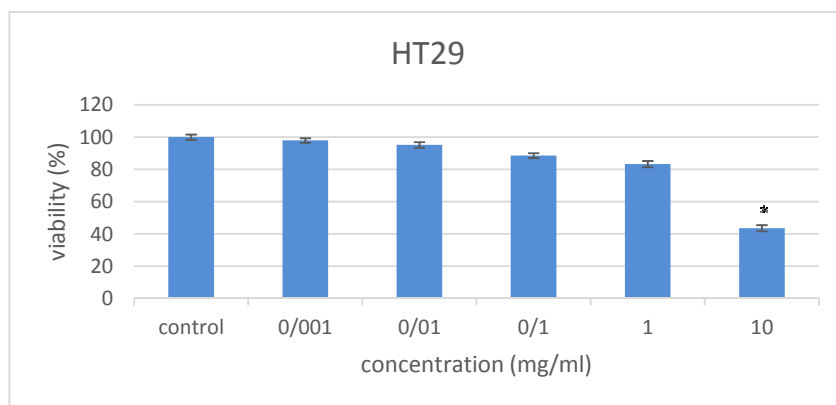
تهیه و کشت رده سلولی HT-29: رده سلولی سرطان کولون HT-29 و رده سلولی نرمال کلیه جنین انسان HEK از انستیتو پاستور ایران خریداری شد. رده سلولی HT-29 در محیط کشت DMEM به همراه سرم ۱۰ درصد FBS

دستگاه Real time PCR قرارداد شد. در این پژوهش واکنش Real time PCR در حجم نهایی ۲۰ μ ل انجام شد و دوبار تکرار گردید، غلظت پرایمرها ۱۵۰ نانومولار بود. نتایج حاصل از نحوه بیان ژنها و آنالیز بیان ژن به روش نیمه کمی با فرمول $\Delta\Delta CT$ و با نرم افزار دستگاه RealTime PCR ABI انجام شد.

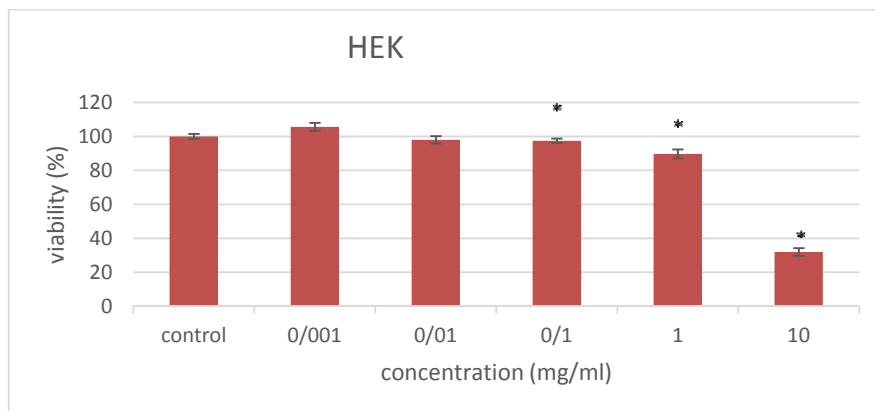
نتایج

تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS و آزمون آماری One way ANOVA انجام شد. تفاوت کمیتها در سطح $P < 0.05$ بررسی شد. علامت * در نمودار معنادارترین تفاوت را نسبت به گروه کنترل نشان می‌دهد. عصاره جلبک در رده سلولی HT-29 در غلظت ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر و در رده سلولی HEK در غلظت ۱، ۱۰، ۱/۱ میلی گرم بر میلی لیتر توکسیک بود. منحنی تکثیر که نشان دهنده انجام واکنش است و منحنی ذوب که نشان دهنده تکثیر یک محصول منفرد است توسط دستگاه Real time PCR ترسیم گردید. در این پژوهش تعیین کمی بیان ژن با فرمول $2^{-\Delta\Delta CT}$ محاسبه شد. طبق محاسبه ژن APC نسبت به کنترل افزایش بیان داشته و ژن P53 نسبت به کنترل کاهش بیان داشته است.

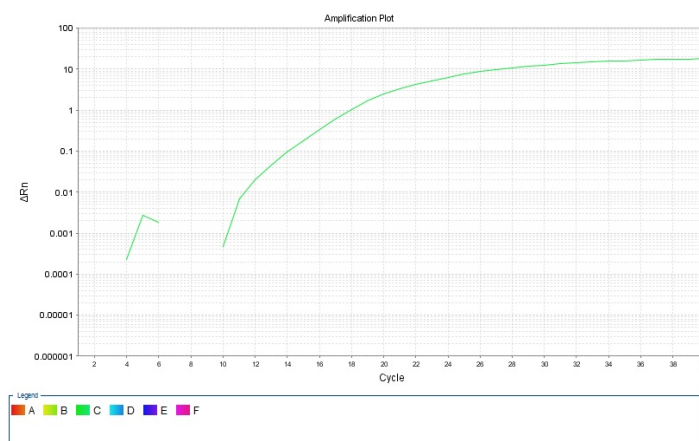
ساعت در انکوباتور قرار داده شد. پلیت ۶ خانه از انکوباتور خارج و محیط رویی تخلیه و PBS اضافه و تریپسینه گردید. محتویات خانه‌ها به ۲ میکروتیوب منتقل و به مدت ۵ دقیقه در ۱۵۰۰ دور سانتریفیوژ انجام شد. سپس ۳۰۰ μ ل بافر شستشو و ۳۰۰ μ ل اتانول افزوده و پیتاژ شد. پس از سانتریفیوژ مواد داخل ۲ میکروتیوب به ستون چرخشی منتقل شد. و ۳۰ ثانیه سانتریفیوژ در ۱۲۰۰ دور انجام شد. به ازای هر ستون چرخشی ۱۰ μ ل Dnase و ۷۰ μ ل بافر واکنش اضافه گردید و مخلوط شد. به هر ستون چرخشی ۵۰۰ μ ل بافر پاک کننده اضافه شد و انکوباسیون و سانتریفیوژ انجام گردید. سپس ۵۰۰ μ ل بافر شستشو اضافه و ۳۰ ثانیه در ۱۲۰۰ دور سانتریفیوژ انجام شد. آب Rnase free افزوده و سانتریفیوژ انجام شد. محتویات به میکروتیوب PCR منتقل و به هر کدام ۸۸ μ ل از RNA دارای پرایمر به اضافه ۱ μ ل الیگو اضافه شد و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۶۵ درجه در دستگاه PCR قرار داده شد. و بعد از دستگاه خارج کرده و ۲ دقیقه میکروتیوبها را در یخ گذاشته و بعد ۱۰ μ ل Reaction به هر کدام اضافه شد و بعد در ۲ دما داخل دستگاه ترموسایکلر گذاشته شد. دمای ۴۲ درجه به مدت ۳۰ دقیقه و دیگری در دمای ۸۵ درجه به مدت ۵ دقیقه. پس از انجام این مراحل میکروتیوبها داخل



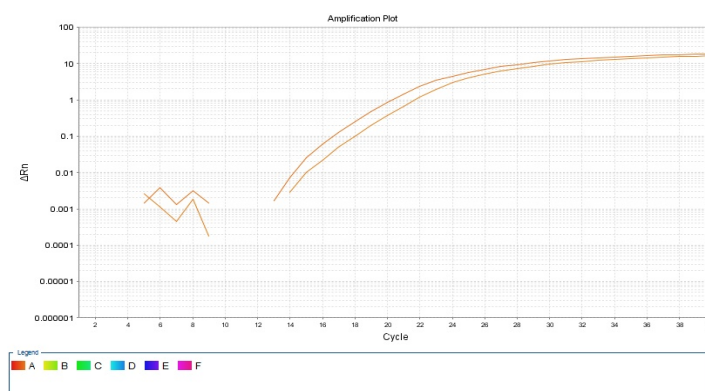
نمودار ۱- درصد زیستایی رده سلولی HT-29 تیمار شده با عصاره جلبک *Sargassum ciliforium*



نمودار ۲- درصد زیستایی رده سلولی HEK تیمار شده با عصاره جلبک *Sargassum ciliforium*



نمودار ۳- منحنی تکثیر ژن P₅₃



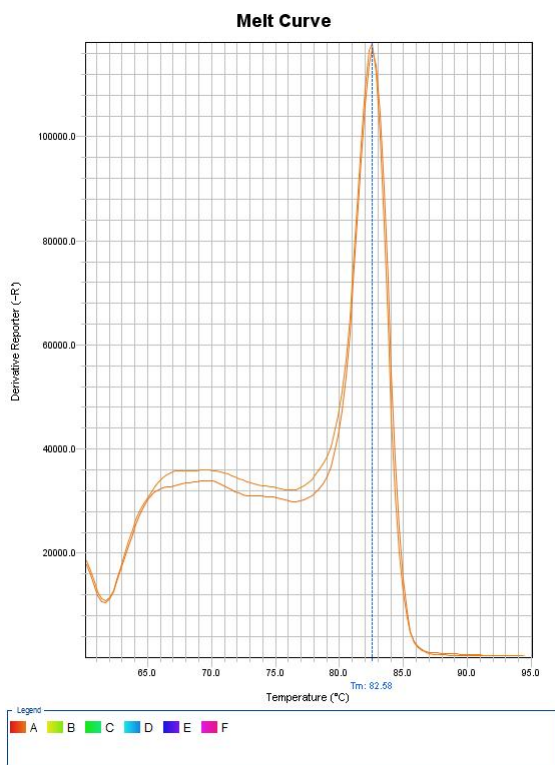
نمودار ۴- منحنی تکثیر ژن APC

بحث

حال عمومی بیماران مبتلا به سرطان را ارتقاء بخشند(۶)، ولی باوجود توسعه در مداخلات درمانی، افزایش تأثیر پذیری شیمی درمانی و کاهش اثرات منفی ناشی از آن میزان مرگ و میر بیماران مبتلا به سرطان روده بزرگ

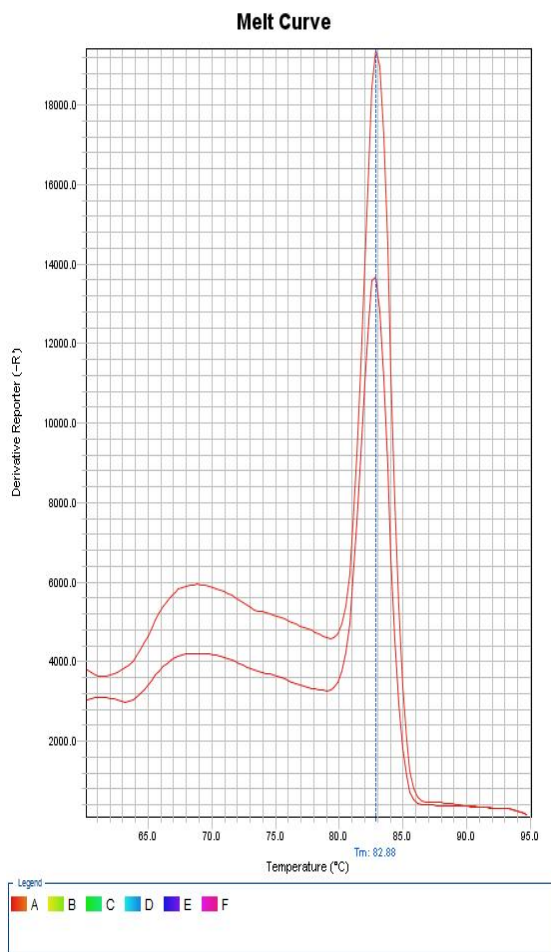
امروزه سرطان به یک بیماری همه گیر در جهان تبدیل شده است. دانشمندان در تلاش هستند تا با استفاده از روشهای متفاوت شیمی درمانی، اشعه درمانی و جراحی

همچنان بالاست (۱۲). با توجه به افزایش بروز سرطان در کشورهای در حال توسعه و توسعه یافته استفاده از مواد عصاره های گرفته شده از طبیعت به منظور القای مرگ سلولی (آپتوز) در سلولهای سرطانی یکی از رایج ترین راهکارهای درمانی است (۱۲ و ۳).

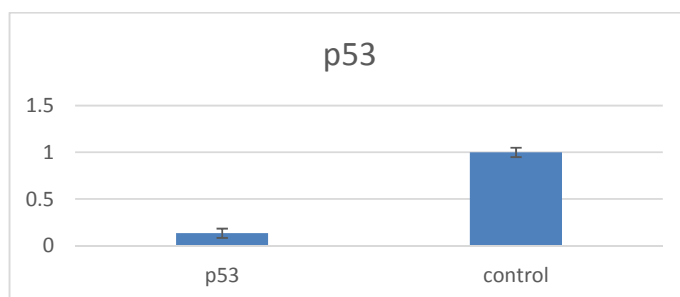


نمودار ۶- منحنی ذوب ژن P₅₃

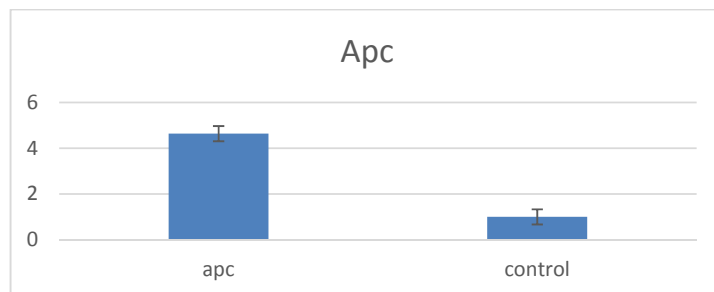
در این مطالعه اثر عصاره هیدروالکلی جلبک *Sargassum ciliforium* در درده سلولی سرطان کولون HT-29 مورد بررسی قرار گرفت. همچنین ارزیابی بیان ژنهای APC و P₅₃ با روش Real time PCR انجام شد. پیشرفتهای آینده در شاخص درمانی به افزایش حساسیت سلولهای توموری به داروهای شیمی درمانی و پرتودرمانی و کاهش اثرات مخرب آنها در بافتهای طبیعی بستگی دارد.



نمودار ۵- منحنی ذوب ژن APC



نمودار ۷- بیان ژن P₅₃



نمودار ۸- بیان ژن APC

فسفوریلاسیون اولیه بتا کتینین و گلیکوژن سنتاز کیناز ۳ بتا توانایی فسفوریلاسیون بتا کتینین برای بار دوم را دارد. این اهداف بتا کتینین برای یوبی کوئیتیناسیون و تخریب به وسیله پروتئازومهای سلولی است. و این مهار کننده ها برای جا به جایی به داخل هسته به عنوان فاکتورهای رونویسی برای تکثیر ژن عمل می کنند. APC همچنین از طریق اتصال به دومین PD2 در اثبات میکروتوبول ها نقش دارد. غیر فعال شدن APC می تواند پس از واکنش های زنجیره ای خاص در سیتوپلاسم آغاز شود (۲۰). جهش در APC اغلب در اوایل سرطانها مثل سرطان روده بزرگ رخ می دهد (۱۸). جهش در APC منجر به از دست دادن تنظیم بتا کتینین و مهاجرت سلول تغییر یافته و بی ثباتی کروموزوم می شود. حدود ۸۰ درصد سرطانهای روده بزرگ در انسان در اثر جهش ژن APC می باشد. P₅₃ به عنوان نگهبان ژنوم در حفظ ثبات ژنوم از طریق جلوگیری از جهش ژنوم نقش دارد (۱۱). ژن TP₅₃ اغلب یک ژن جهش یافته است که در حدود ۵۰ درصد از سرطانهای انسانی نقش دارد و این نشان می دهد ژن TP₅₃ نقش مهمی در جلوگیری از تشکیل سرطان دارد. پروتئینهایی که توسط TP₅₃ کد می شوند به DNA متصل شده و در تنظیم بیان ژن برای جلوگیری از جهش ژنوم نقش دارند (۹). در سلولهای عادی P₅₃ توسط تنظیم کننده منفی آن MDM₂ می شود. پس از آسیب DNA و یا تنشهای دیگر مسیرهای مختلف به تفکیک P₅₃ و کمپلکس MDM₂ منجر می شود. هنگامی که P₅₃ فعال می شود باعث توقف چرخه سلولی شده و اجازه می دهد از طریق تعمیر بقای سلول یا آپاتوز

از این رو استفاده از ترکیبات آنتی اکسیدانی با سمیت نسبتاً امن به همراه حساس کردن سلولها برای درمان بالقوه و مؤثر می باشد (۲). در سالهای اخیر پیشرفتهای قابل ملاحظه ای در تأثیر مواد فعال زیستی در کاهش خطر ابتلاء به سرطان صورت گرفته است که این ترکیبات از نظر شیمیایی و عملکرد زیستی دارای تنوع می باشند (۱۹). در این پژوهش از عصاره جلبک *Sargassum ciliforium* برای تیمار سلولهای سرطان روده بزرگ HT-29 و بررسی زیستایی آنها استفاده شده است. یکی از جهشهای شایع که در سرطان روده بزرگ غیر فعال می شود غیر فعال شدن ژن APC است و هنگامی که APC جهش نداشته باشد اغلب فعال شدن جهشها در بتا کتینین اتفاق می افتد (۱۰). جهش در APC یا بتا کتینین باید توسط جهشهای دیگر ادامه یابد تا به سمت سرطانی شدن پیش رود. با این حال حاملین جهشهای غیر فعال شدن APC خطر ابتلاء به سرطان روده بزرگ با سن حدود ۴۰ سال تقریباً ۱۰۰ درصد است (۱۶). بسیاری از جهشهایی که در ژن APC ایجاد می شود باعث تولید یک پروتئین APC کوتاه، غیرطبیعی و فاقد عملکرد می شود. این پروتئین کوتاه نمی تواند از رشد بیش از حد سلولی جلوگیری کند در نتیجه منجر به تشکیل پولیپ می شود که می تواند سرطانی شود. پروتئین APC به طور معمول با کمک گلیکوژن سنتاز کیناز ۳ آلفا یا بتا (GSK-3) و از طریق تعامل با ۲۰ اسید آمینه و تکرارهای SAMP یک کمپلکس تخریب ایجاد می کند که این مجموعه پس از ساخت قادر به اتصال به بتا کتینینها در سیتوپلاسم است. با کمک کازئین کیناز ۱ (CK₁) که حامل

P₅₃ در سطح بسیار بالایی می‌شود. علاوه بر این پروتئین P₅₃ جهش یافته باعث مهار سطح پروتئین P₅₃ می‌شود در برخی موارد جهش‌های بی‌معنی در P₅₃ باعث مختل شدن ثبات و عملکرد P₅₃ می‌شود (۲۱ و ۵). در این مطالعه اثرات عصاره هیدروالکلی جلبک *Sargassum ciliforium* بر سلول‌های سرطانی روده بزرگ رده HT-29 برای اولین بار مورد بررسی قرار گرفت و در مجموع نتایج حاصل از این آزمایش تأیید می‌کند که عصاره این جلبک دارای فعالیت توکسیک و قابلیت مهار رشد در سلول‌های سرطانی روده بزرگ رده HT-29 می‌باشد. بررسی مولکولی و ارزیابی بیان ژن‌های APC و P₅₃ به روش Real time PCR نشان داد که مرگ سلولی القاء شده با عصاره جلبک *Sargassum ciliforium* از طریق فعال‌سازی پروتئین APC و افزایش بیان ژن APC که یک ژن سرکوبگر تومور به ویژه در سرطان روده می‌باشد.

القاء شود. چگونه P₅₃ این مسیر را انتخاب می‌کند ناشناخته است. P₅₃ فعال شده و به DNA متصل می‌شود و بیان چندین ژن از جمله Micro RNA/Mir-340/C1P1/WAF₁ کد گذاری می‌شوند. (WAF₁)P₂₁ به کمپلکس (CDK₁-CDK₂-CDK₆-CDK₄)G₁ متصل می‌شود. مولکول‌های مهم برای انتقال و جا به جایی G₁ به S در چرخه فعالیت آنها را مهار می‌کند. وقتی (WAF₁)P₂₁ با کمپلکس CDK₂ همکاری می‌کند، P₅₃ جهش یافته برای مدت طولانی به DNA متصل نمی‌شود در نتیجه پروتئین P₂₁ در دسترس نخواهد بود و نمی‌تواند به عنوان یک سیگنال توقف برای تقسیم سلولی عمل کند (۱). P₅₃ در پاسخ به هزاران عامل استرس زا از جمله آسیب به DNA ناشی از UV یا عوامل شیمیایی مانند پراکسید هیدروژن، استرس اکسیداتیو، شوک اسمزی، کاهش ریونوکلئوتید و نامنظم بودن بیان انکوژن فعال می‌شود. پروتئین‌های P₅₃ جهش یافته اغلب باعث القای MDM₂ شده و باعث تجمع

منابع

- 1- Arnold, J., David, P. (2010). The P₅₃ family: a subject collection from cold spring Harbor perspectives in biology laboratory press. *Molecular cancer*, 126:273-84.
- 2- Bedi, A., et al. (1995). Inhibition of apoptosis during development of colorectal cancer. *Cancer Res*, 55:1181-1816.
- 3- Chan, E.W., et al. (2009). Effect of different methods on the antioxidant properties of leaves and tea of ginger species food chemistry. *Biomed Res*, 113:166-172.
- 4- Ferlay, J., et al. (2013). Cancer incidence and mortality worldwide. *Globo CAN, IARC Cancer Base. International Agency for Research on cancer*, 10:48-62.
- 5- Hean, B., et al. (2008). National center for Biotechnology information. United States National Institute of Health, The P₅₃ tumor suppressor protein, 56:93-98.
- 6- Hooshmand, K., Asoodeh, A. (2016). The influence of GL-9 peptide on A549 and human and animal blood cells. *Iranian J. Bio*, 29(4):463-473.
- 7- Joo, W., Visintin, I., Mor, G. (2013). Targeted cancer therapy Are the days of systemic chemotherapy numbered?. *Biomed Res*, 76:308-314.
- 8- Kim, E., Park, S., Lee, J., Park, J. (2010). Fucoidan present in brown algae induces apoptosis of human colon cancer cells. *BMC Gastroenterol*, 10:96-99.
- 9- Keck, AP., Strachan, T. (1999). *Human molecular genetics 2*, New York. Wiley cancer Genetics, 38:33-40.
- 10- Lim, S., et al. (2008). Evaluation of antioxidant activity of extract from brown seaweed *Sargassum siliquastrum*. *J. Agric Food Chem*, 50:3862-3860.
- 11- Mind, DP., Anvarian, Z., Rudiger, SG., Maurice, MM. (2011). Messing up disorder: How do missense mutations in the tumor suppressor APC lead to cancer?. *Molecular cancer*, 10:47-59.
- 12- Michael, E., et al. (2014). Colorectal cancer aguid for journalistan colorectal treatment. *Biomed Res*, 4:22-27.
- 13- Mann, J.R., Backlund, M.G., Dubois, R.N. (2005). Mechanism of disease In

- inflammatory mediators and cancer prevention. *Natclin practoncol*, 2:202-210.
- 14- Namvar, F., Mahamad, R., Baharara, J., Balnejah, S.Z., Fargahi, f., Rahman, H.S. (2013). Antioxidant antiproliferative and antiangiogenesis effects of polyphenol rich seaweed (*Sargassum muticum*). *Biomed Res*, 604-787.
- 15- Pereira, D.M., [et al]. (2011). Anti proliferative activity of meroditerpenoids isolated from the brown alga *stypodium flabelliforme* against several cancer cell. *Mar Drugs*, 9:852-862.
- 16- Smit, A.j. (2004). Medicinal and pharmaceutical uses of the seaweed natural products. *Areview. J.Applphycol*, 16:245-262.
- 17- Siegel, R., Naishadham, D., Jemal, A. (2012). *Cancer statistics. CA cancer J clin*, 62:10-29.
- 18- Stamos, J.L., Weis, W.L. (2013). The β -catenin destruction complex. *Cold spring Harbor perspective sin Biology*, 5:78-98.
- 19- Rodriguez, R., Vivas, J., Ming, B. (2012). The invasive seaweed *Sargassum filcilum* is on the move along the mexican pacific coastline. *Euoppubmed central*, 55:5-17.
- 20- Yamamoto, N., Fujihara, M. (1997). Anticancer effect of seaweed fraction and partial characterication of the polysacaccharide with Antitumor activity from *Sargassum fulvellum*. *bspn EXPMED*, 47:23-26.
- 21- Yuan, J., Luo, K., Zhang, L., Cheville, J.C., Lou, Z. (2010). Usp10 regulates P₅₃ localization and stability by deubiquitination P₅₃ *Cell*, 140:384-96.

The Effect of Hydroalcoholic extract *Sargassum ciliforium* on HT-29 colorectal cancer cell line and evaluation P₅₃ and APC genes expression By using Real time PCR Technique

Zahedi A¹, Najj T² and Ahmadi R³

¹ Dept. of Molecular and Cellular Sciences , Faculty of Advanced Sciences & Technology, Pharmaceutical Sciences Branch, Islamic Azad University, Tehran , I.R. of Iran.

² Dept. of Basic Sciences, Faculty of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, I.R. of Iran.

³ Dept. of Physiology, Islamic Azad University, Hamedan, I.R. of Iran.

Abstract

Colon cancer is the third most common cancer in the world, with nearly 1.4 million new cases diagnosed in 2012. In addition, the incidence of this disease has increased in recent years. Due to the increased incidence of cancer, the use of new chemotherapy molecules is required. Many studies have shown that intestinal cancers can be treated through natural marine products that contain a large amount of active biological substances with new chemical structures and new drug activities. The aim of this study was the effect of hydroalcoholic extract *Sargassum ciliforium* on HT-29 colorectal cell line and evaluation P₅₃ and APC genes expression by using Real time PCR Technique. In this study, we determined *Sargassum ciliforium* extract with the MTT assay at 5 different concentrations 10-1-0.1-0.01-0.001mg/ml and control group on HT-29 colorectal cancer cell line human embryonic kidney HEK were examined. Then optical density each well at wavelength 570nm it was found. Data analysis with spss software and One way Anova statistical test checked out. Also evaluation P₅₃ and APC genes expression by using Real time PCR Technique. Our result showed that extract *Sargassum ciliforium* the effect reduction on viability in human colon cancer cell line HT-29 and also prevent the growth of tumor cells. Results showed the extract *Sargassum ciliforium* had toxic effects in colon cancer cell line HT-29 and this algae extract could be used to develop anti-cancer drugs and it was shown that induced cell death with *Sargassum ciliforium*

Algae extract through is the activation of APC protein.

Key words: Colon cancer, HT-29 cell line, *Sargassum ciliforium* algae, Real time PCR, P₅₃ and APC genes