

اثر سینرژیک عصاره گیاه هندوانه ابوجهل (*Citrullus colocynthis*) و فیکوسیانیین بر القای

مرگ برنامه ریزی شده در دودمان سلولی سرطان کولون انسانی (HT-29)

مرجان اربابی^۱، حلیمه حسن پور^۲، سمیه عرب زاده^{۳*} و پروانه مقامی^۱^۱ ایران، تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی^۲ ایران، تهران، پژوهشگاه هوا فضا، وزارت علوم و تحقیقات^۳ ایران، تهران، موسسه آموزش عالی غیرانتفاعی آل طه، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی

تاریخ پذیرش: ۹۸/۷/۲۹

تاریخ دریافت: ۹۸/۵/۱

چکیده

سرطان کولون یکی از مهمترین بدخیمی‌های شایع و از عوامل عمده مرگ و میر می باشد. امروزه به استفاده از عصاره های گیاهی مانند فیکوسیانیین و عصاره هندوانه ابوجهل (*Citrullus colocynthis*) در درمان این بیماری توجه بسیاری شده است. در این مطالعه تاثیر سینرژیک عصاره *C. colocynthis* و ترکیب فیکوسیانیین بر رشد رده سلولی سرطان کولون و بیان ژنهای *caspase-8* و *Bcl2* بررسی شد. پس از تیمار رده سلولی سرطان کولون انسانی (HT-29) در زمان های (۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت) با غلظت های مختلف عصاره و فیکوسیانیین و همچنین تیمار همزمان این دو ماده، درصد سلولهای زنده با روش MTT محاسبه و بیان ژن های *caspase-8* و *Bcl2* با روش real time PCR سنجش گردید. بیشترین مهار رشد رده سلول های سرطانی پس از تیمار هر دو ماده با غلظت های بالا مشاهده گردید. تفاوت معنی داری بین زمان های مختلف تیمار تنها در غلظت های پایین (۲۰ و ۴۰ g/ml) مشاهده شد. عصاره و فیکوسیانیین به ترتیب موجب کاهش ۱۰/۲۷ و ۵/۲۲ برابری بیان ژن *Bcl2* گردید. همچنین تیمار همزمان عصاره و فیکوسیانیین با کاهش ۷/۳۱ برابری بیان این ژن همراه بود. عصاره *C. colocynthis* بیان ژن *Caspase-8* را ۳/۲ برابر افزایش داد. عصاره و ترکیب عصاره و فیکوسیانیین با افزایش قویتر بیان ژن *Caspase-8* و از طرفی فیکوسیانیین و ترکیب عصاره و فیکوسیانیین با کاهش قویتر بیان ژن *Bcl2*، سبب القاء مرگ برنامه ریزی شده در رده سلولی سرطان کولون انسانی (HT-29) شدند.

واژه های کلیدی: عصاره هندوانه ابوجهل، فیکوسیانیین، سرطان کولون، مرگ برنامه ریزی شده

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۱-۴۴۳۲۰۶۴۷، پست الکترونیکی: s.arabzadeh@aletaha.ac.ir

مقدمه

نرسیده است (۸). در درجه ۳ سرطان بر روی غدد لنفاوی تاثیر گذاشته ولی هنوز به سایر بخش های بدن متاستاز نداده است، اما در درجه ۴ سلول های سرطانی به بخش های مختلفی از بدن نظیر ریه، کلیه، و کبد متاستاز می دهند (۶). تغییر در عملکرد سرطان کولورکتال نیز بسیار متغیر بوده و به محل تومور و درجه یا مرحله بیماری بستگی دارد. درمان های رایج سرطان کولورکتال شامل

سرطان کولون یا کولورکتال به بدخیمی های سلولهای مربوط به دیواره روده بزرگ الحاق می گردد که بصورت کنترل نشده رشد و تکثیر می یابند که بسته به شدت آن به ۴ مرحله درجه بندی می شود. در نوع ۱ سرطان در دیواره داخلی روده بزرگ یا رکتوم رشد کرده ولی انتشار آن فراتر از دیواره روده بزرگ نشده است. در درجه ۲، سرطان در دیواره روده یا رکتوم رشد کرده اما به غدد لنفاوی مجاور

بالایی بوده و منجر به توقف چرخه سلولی در فاز G0/G1 می‌گردد (۶). نشان داده شده که فیکوسیاینین با القاء آپوپتوز منجر به مهار رشد، تکثیر و متاستاز سلول‌های سرطانی می‌گردد. احتمالاً فیکوسیاینین از طریق چندین مکانیسم از جمله فعال شدن *Caspase-3*، *Caspase-8* و غیرفعال کردن *Bcl2* منجر به فعال شدن مرگ برنامه ریزی شده سلولی می‌گردد. بنظر می‌رسد که فیکوسیاینین با القاء مسیر داخلی مرگ برنامه ریزی شده از طریق رهاسازی سیتوکروم c و همچنین فعالسازی *Caspase-3,8,9* نقش موثری در القاء مرگ سلول‌های سرطانی داشته باشد (۷). هدف از این مطالعه بررسی اثر سینرژیک عصاره گیاه هندوانه ابوجهل (*C. Colocynthis*) و فیکوسیاینین بر مهار رشد سلولی و القای مرگ برنامه ریزی شده سلولی با بررسی بیان ژنهای *Bcl2* و *Caspase-8* در دودمان سلولی سرطان کولون انسانی (HT-29) می‌باشد.

مواد و روشها

عصاره گیاهی: در این مطالعه از عصاره آبی گیاه هندوانه ابوجهل استفاده شد. ابتدا عصاره‌گیری گیاه با متانول انجام شد. ۵ گرم پودر خشک گیاه در ۲۰۰ میلی لیتر متانول ۸۰ درصد برای ۴۸ ساعت قرار گرفت و سپس محلول رویی با روش پرکولاسیون جدا شد. متانول عصاره تبخیر شد و عصاره خشک بدست آمد. سپس غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۵۰۰، ۲۰۰۰ و ۲۵۰۰ میکروگرم/میلی لیتر از عصاره هندوانه ابوجهل در آب دیونیزه شده و همچنین غلظت‌های ۵، ۱۰، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰ و ۲۵۰ میکروگرم/میلی لیتر از محلول فیکوسیاینین (شرکت باریج اسانس کاشان) تهیه گردید. بر اساس درصد مرگ سلولی مشاهده شده غلظت ۱۰۰ میکروگرم/میلی لیتر از هر دو تیمار به عنوان غلظت مناسب برای ادامه کار و تعیین غلظت‌های بعدی انتخاب شد. در نهایت سلولها با مقادیر ۱، ۲، ۵، ۱۰، ۲۰، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم/میلی لیتر از

درمان‌های موضعی، درمان‌های سیستمیک، جراحی، لاپاراسکوپی، شیمی‌درمانی، درمان بیولوژیک، یا پرتودرمانی می‌باشد. اگرچه این روش‌ها کمک زیادی در جلوگیری از پیشرفت بیماری دارند، اما بیشتر آنها همراه با عوارض جانبی بوده و علاوه بر هزینه بالا، ممکن است نتیجه‌ای نیز حاصل نگردد. بهمین منظور پیدا کردن یک روش مناسب‌تر و کم هزینه‌تر و بدون عارضه در جهت درمان این بیماری بسیار حائز اهمیت می‌باشد (۱۱).

هندوانه ابوجهل با نام علمی *Citrullus colocynthis* یک گیاه دارویی متعلق به خانواده کدوها می‌باشد. در طب سنتی استفاده از این گیاه در موارد ضعف اعمال روده، فلج ناحیه امعاء و احشاء، آب آوردن انساج و بیماریهای کبدی پیشنهاد شده است (۱۷). نتایج تحقیقات اخیر حاکی از آن است که عصاره تام گیاه هندوانه ابوجهل ممکن است برای مهار رشد و از بین بردن برخی از سلول‌های سرطانی مؤثر باشد (۵). مصرف گیاه هندوانه ابوجهل همراه با اشعه رادیو اکتیو دارای اثرات متوقف‌کنندگی در رشد تومورهای سرطانی می‌باشد (۱، ۳، ۶). برخی از مطالعات نیز خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی بالای عصاره هندوانه ابوجهل را نشان دادند (۹، ۱۷، ۱۸). بنابراین با توجه به بومی بودن این گیاه در ایران و همچنین خواص درمانی بسیار بالای آن در انواعی از بیماری‌ها و همچنین برخی از انواع سلول‌های سرطانی، بنظر می‌رسد که عصاره این گیاه خواص ضدسرطانی خوبی علیه سلولهای سرطانی کولورکتال داشته باشد (۲).

فیکوسیاینین (phycocyanin) نوعی رنگدانه طبیعی باخواص فلورسنت و آنتی‌اکسیدانی می‌باشد که از جلبک‌های سبز آبی، بویژه اسپیرولینا، بدست می‌آید. اخیراً مطالعات متعددی خواص درمانی فیکوسیاینین را مورد بررسی قرار دادند. تحقیقات اخیر نشان دادند که فیکوسیاینین نه تنها دارای خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی بالایی می‌باشد، بلکه دارای خواص ضدسرطانی

سلول‌های سرطانی با غلظت‌های مورد نظر تیمار شده و بیان ژن‌های *Bcl2* و *Caspase-8* نیز مورد بررسی قرار گرفت.

اندازه‌گیری بقای سلولی با استفاده از روش MTT: تخمین درصد حیات سلولی با استفاده از پروتکل استاندارد روش MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] مورد بررسی قرار گرفت. در نهایت پلیت‌ها در طول موج ۵۷۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکترومتر خوانده شد. میانگین درصد زنده مانده سلول‌ها بمنظور بررسی اثر عصاره و ترکیب فیکوسیانیین بر روی سلول‌ها مقایسه شد و درصد مرگ سلول‌ها در برابر غلظت عصاره رسم شد. درصد مرگ سلولی به شرح زیر محاسبه شد:

$$\% \text{Cytotoxicity} = 1 - \frac{(\text{OD extract treated} - \text{OD blank})}{(\text{OD control} - \text{OD blank})} \times 100$$

سیکل و با استفاده از پرایمرهای جدول شماره ۱ بیان کمی ژن‌ها بررسی گردید.

میزان سطح mRNAs هر یک از ژن‌ها به طور نسبی در مقایسه با میزان سطح mRNAs ژن *GAPDH* محاسبه گردید. به این صورت که میزان (Delta Ct = ΔCT) با استفاده از فرمول [$\Delta\text{CT} = \text{CT}(\text{target}) - \text{CT}(\text{control})$] محاسبه شد و بیان ژن با فرمول $2^{-\Delta\text{Ct}}$ مورد ارزیابی قرار گرفت.

جدول ۱- مشخصات توالی پرایمرهای مربوط به هر یک از ژن‌ها

Gene	Forward	Reverse
<i>Bcl2</i>	TTGGCCCCGTTGCTT	CGGTTATCGTACCCCGTTCTC
<i>GAPDH</i>	GAAGGTGAAGGTCGGAGTC	GAAGATGGTGATGGGATTTTC
<i>Caspase-8</i>	GGGCTTGACCACGACCTTG	CCTCCTGTCCATCAGTGCCATAG

معنی داری هریک از متغیرهای تحقیق، بین گروه‌های مختلف، از روش آنالیز واریانس یک طرفه و در صورت مشاهده تفاوت معنی دار آماری از آزمون تعقیبی توکی در آزمون ANOVA جهت تعیین محل اختلاف بین گروهی استفاده شد. سطح معنی داری برای تمام محاسبات

عصاره، فیکوسیانیین و همچنین ترکیب عصاره و فیکوسیانیین بصورت همزمان تیمار شدند.

تیمار سلول‌های HT-29 با عصاره و فیکوسیانیین: در این تحقیق از دودمان سلولی سرطان کولون (رده HT-29) استفاده گردید (انستیتو پاستور ایران). سلول‌ها در محیط DMEM و در شرایط استاندارد بمدت ۲۴ ساعت کشت داده شدند. پس از اینکه تراکم سلول‌های سرطانی به بیش از ۸۰٪ رسید، غلظت‌های مختلف عصاره و فیکوسیانیین به سلول‌ها اضافه گردید. پس از گذشت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، مرگ سلولی به روش MTT بررسی گردید تا ایده آل‌ترین غلظت از لحاظ تاثیرگذاری جهت مطالعه بعدی بر روی بیان ژن‌ها مورد بررسی قرار گیرد. پس از بدست آوردن IC_{50} غلظت‌های عصاره گیاهی، فیکوسیانیین و ترکیب عصاره و فیکوسیانیین با استفاده از نرم افزار Excel.

روش Real time PCR: میزان RNA کل از سلول‌ها با استفاده از محلول RNX-plus (SinaClon; RN7713C) استخراج شد. سپس مقدار 1 μg از RNA با استفاده از پروتکل استاندارد (شرکت فرمنتاز) به cDNA تبدیل شد. در نهایت با استفاده از کیت 1x SYBR Premix Ex Taq (Rotor II (Tli RNaseH Plus; Takara) توسط دستگاه (Gene 6000 Corbett Research, Australia) به تعداد ۴۰

آنالیزهای آماری: توصیف کمی داده‌ها با استفاده از شاخص‌های پراکنندگی مرکزی از قبیل میانگین و انحراف استاندارد انجام شد و جهت تعیین نرمال بودن توزیع داده‌ها از آزمون شاپیروویلیک و بررسی تجانس واریانس‌ها از آزمون لوین استفاده شد. هم چنین برای بررسی تغییرات

با گذشت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت از تیمار سلول‌های سرطانی با غلظت‌های مختلف عصاره، فیکوسیانین و ترکیب عصاره و فیکوسیانین، میزان مهار رشد رده سلول‌های سرطانی با افزایش غلظت تیمارها افزایش یافت، به طوری که کمترین اثر گذاری در غلظت ۱ میکروگرم/میلی لیتر و بیشترین اثر گذاری نیز در غلظت ۵۰ میکروگرم/میکرولیتر مشاهده گردید. در غلظت‌های ۱ تا ۳۰ میکروگرم/میکرولیتر فیکوسیانین و ترکیب عصاره و فیکوسیانین اثرات مهارکنندگی قویتری علیه رشد رده سلول‌های سرطانی در مقایسه با عصاره هندوانه ابوجهل از خود نشان دادند ($p < 0.05$)، این در حالی است که تفاوت معنی داری در میانگین سلول‌های مرده در غلظت‌های ۴۰ و ۵۰ میکروگرم/میلی لیتر بین سه گروه مشاهده نگردید (جدول شماره ۱، ۲، ۳).

$p < 0.05$ در نظر گرفته شد. کلیه عملیات آماری با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۰ انجام شد.

نتایج

مهار رشد سلول‌های سرطانی توسط تیمار با عصاره هندوانه ابوجهل و فیکوسیانین پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت: پس از گذشت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تفاوت معنی داری در میانگین درصد سلول‌های مرده در غلظت‌های ۱ تا ۳۰ میکروگرم/میلی لیتر از عصاره، فیکوسیانین، ترکیب عصاره و فیکوسیانین مشاهده گردید ($p < 0.05$). همچنین در میانگین IC50 هر سه تیمار نیز تفاوت معنی داری مشاهده شد ($p < 0.05$). میزان بدست آمده برای فیکوسیانین و ترکیب عصاره و فیکوسیانین آشکار کرد که فیکوسیانین و ترکیب عصاره و فیکوسیانین در مقایسه با عصاره هندوانه ابوجهل از قدرت سلول کشی بالاتری برخوردار بودند (جدول شماره ۱، ۲، ۳).

جدول ۱- مهار رشد سلول‌های سرطانی توسط تیمار غلظت‌های مختلف عصاره، فیکوسیانین، عصاره + فیکوسیانین پس از ۲۴ ساعت

غلظت (\square g/ml)	Citro (%)	Phyco (%)	Citro + Phyco (%)	مقدار p
1	5.21±1.10 ^a	14.24±2.10 ^b	11.48±2.50 ^b	0.031
2	10.84±2.31 ^a	19.13±2.81 ^b	20.09±3.60 ^b	0.042
5	25.50±4.52 ^a	48.67±3.52 ^b	41.87±3.41 ^b	0.028
10	42.93±5.91 ^a	61.85±3.71 ^b	64.08±4.72 ^b	0.027
20	56.32±5.21 ^a	75.88±4.53 ^b	82.25±6.20 ^b	0.018
30	60.47±4.81 ^a	91.39±4.21 ^b	90.12±7.31 ^b	0.021
40	88.42±3.42 ^a	96.92±3.81 ^b	96.17±6.52 ^a	0.73
50	95.86±4.83 ^a	98.72±4.61 ^a	97.66±6.22 ^a	0.68
IC50	14.2±1.12 ^a	4.98±0.48 ^b	5.1±0.32 ^b	<0.01

جدول ۲- مهار رشد سلول‌های سرطانی توسط تیمار غلظت‌های مختلف عصاره، فیکوسیانین، عصاره + فیکوسیانین پس از ۴۸ ساعت

غلظت (\square g/ml)	Citro (%)	Phyco (%)	Citro + Phyco (%)	مقدار p
1	2.01±0.85 ^a	8.56±1.12 ^b	3.52±1.01 ^a	0.044
2	25.08±3.31 ^a	19.84±2.53 ^{ab}	17.12±3.52 ^b	0.046
5	27.59±3.11 ^a	55.19±3.61 ^b	36.86±4.22 ^{ab}	0.031
10	32.02±4.22 ^a	61.63±4.70 ^b	55.89±5.12 ^b	0.017
20	53.78±4.63 ^a	73.92±4.52 ^b	82.68±4.86 ^b	0.012
30	66.67±5.51 ^a	96.68±5.01 ^b	94.66±5.52 ^b	0.014
40	92.55±4.83 ^a	95.07±5.71 ^a	97.78±5.09 ^a	0.57
50	96.07±3.85 ^a	98.49±4.85 ^a	99.30±6.10 ^a	0.42
IC50	17.4±0.5 ^a	4.72±0.34 ^b	6.02±0.85 ^b	<0.01

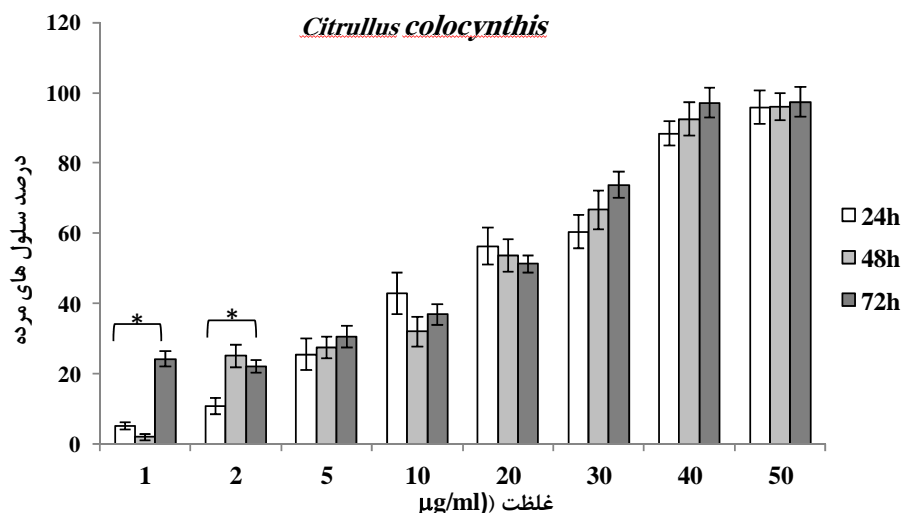
جدول ۳- مهار رشد سلول‌های سرطانی توسط تیمار غلظت‌های مختلف عصاره، فیکوسیانین، عصاره + فیکوسیانین پس از ۷۲ ساعت

غلظت (g/ml)	Citro (%)	Phyco (%)	Citro + Phyco (%)	مقدار p
1	24.20±2.20 ^a	9.44±2.21 ^b	2.20±0.21 ^c	0.014
2	22.18±1.80 ^a	26.40±2.56 ^a	13.93±2.11 ^b	0.045
5	30.61±3.10 ^a	49.40±4.11 ^b	48.49±4.11 ^b	0.036
10	36.94±2.91 ^a	60.59±3.72 ^b	60.49±4.74 ^b	0.012
20	51.24±2.53 ^a	77.18±5.10 ^b	86.53±5.23 ^b	0.017
30	73.79±3.74 ^a	91.57±4.82 ^b	96.70±6.24 ^b	0.023
40	97.16±4.22 ^a	94.87±4.54 ^a	97.43±5.75 ^a	0.48
50	97.43±4.37 ^a	98.53±5.51 ^a	98.81±6.52 ^a	0.58
IC50	19.75±0.84 ^a	5.01±0.41 ^b	5.03±0.37 ^b	<0.01

عصاره و فیکوسیانین با غلظت‌های ۱، ۲ و ۵ میکروگرم/میلی لیتر تفاوت معنی داری بین زمان‌های تیمار مشاهده گردید ($P < 0.05$) (نمودار ۳).

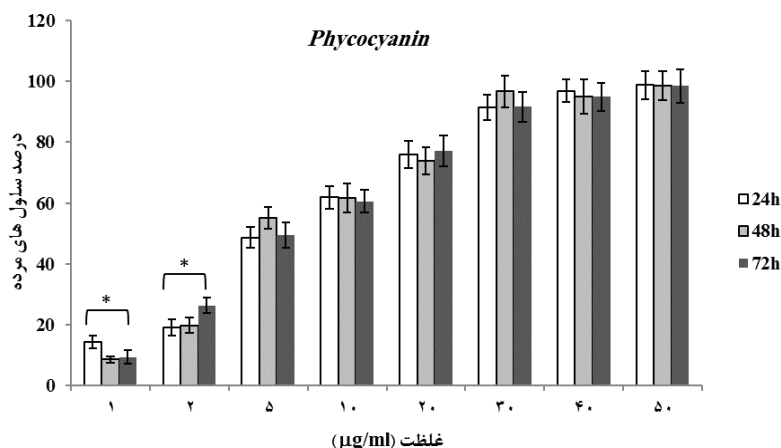
کاهش بیان ژن *Bcl2* تحت تاثیر عصاره و فیکوسیانین: نتایج حاصل از آنالیز بیان ژن در گروه تیمار نسبت به گروه کنترل نشان داد که عصاره هندوانه ابوجهل و فیکوسیانین بترتیب سبب کاهش معنی دار ۱۰/۲۷ برابری و ۵/۲۲ برابری در بیان ژن *Bcl2* رده سلول‌های سرطانی گردید ($p < 0.001$). همچنین ترکیب عصاره و فیکوسیانین نیز به طور معنی داری موجب کاهش ۷/۳۱ برابری بیان این ژن در این سلول‌ها شد ($p < 0.001$) (نمودار ۴).

اثرات غلظت‌های متفاوت عصاره هندوانه ابوجهل و فیکوسیانین بر القای مرگ سلولی: در هر سه بازه زمانی با افزایش غلظت عصاره، فیکوسیانین و ترکیب هر دو، اثر مهارکنندگی آن‌ها بر رشد سلول‌های سرطانی به طور معنی داری افزایش یافته است ($p < 0.05$). بطوری که در غلظت‌های ۱ و ۲ میکروگرم/میلی لیتر از عصاره و فیکوسیانین تفاوت معنی داری بین زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت مشاهده شد ($P < 0.05$). درحالی‌که با افزایش غلظت این تفاوت معنی داری بین مدت زمان تیمارها مشاهده نگردید. بدین معنی که افزایش غلظت اثرات زمان را کاهش داده و القای مرگ سلولی در مدت زمان کمتر با غلظت بالاتر امکان پذیر است (نمودار ۱ و ۲). تیمار سلول‌ها با ترکیب

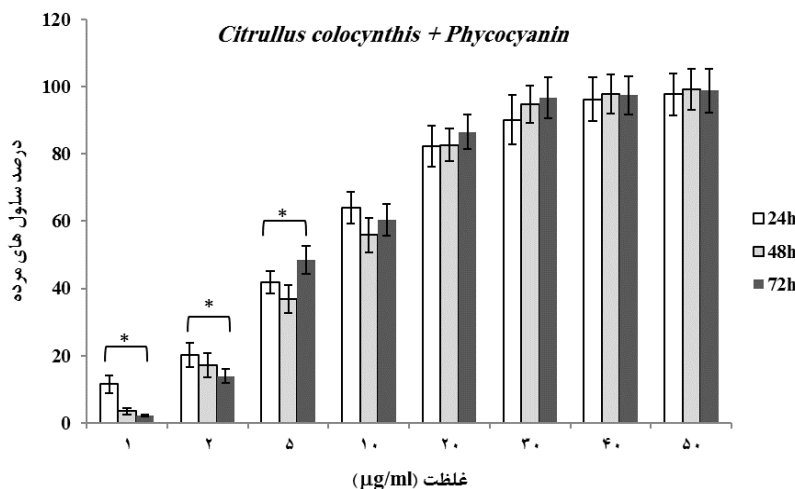


نمودار ۱- مقایسه غلظت‌های مختلف عصاره بر مهار رشد سلول‌های سرطانی پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت

* معنی داری بین سه زمان ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت

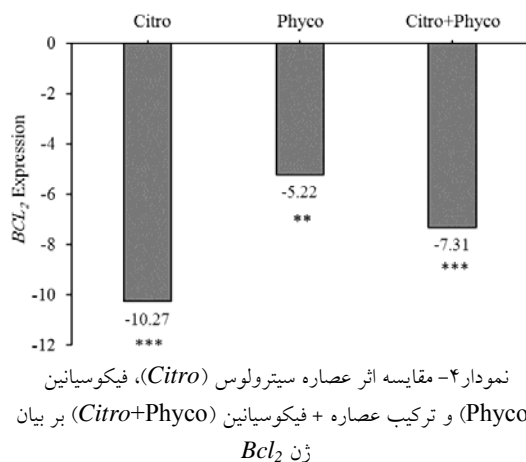


نمودار ۲- مقایسه غلظت‌های مختلف فیکوسیانین بر مهار رشد سلول‌های سرطانی پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت
*: معنی داری بین سه زمان ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت



نمودار ۳- مقایسه غلظت‌های مختلف ترکیب عصاره + فیکوسیانین بر مهار رشد سلول‌های سرطانی پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت
*: معنی داری بین سه زمان ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت

افزایش بیان ژن *Caspase-8* تحت تاثیر عصاره و فیکوسیانین: نتایج حاصل از آنالیز بیان ژن نشان داد که عصاره هندوانه ابوجهل به تنهایی سبب افزایش معنی دار ۳/۲ برابری در بیان ژن *Caspase-8* در رده سلول‌های سرطانی گروه تیمارنسبت به گروه کنترل شد ($P < 0.001$). در حالی که فیکوسیانین سبب افزایش ۱/۰۶ برابر ژن *Caspase-8* در رده سلول‌های سرطانی گردید، اما این تفاوت از لحاظ آماری معنی دار نبود. در این سلول‌ها ترکیب عصاره و فیکوسیانین نیز بیان این ژن را ۳/۲۹ برابر افزایش داد ($P < 0.001$) (نمودار ۵).

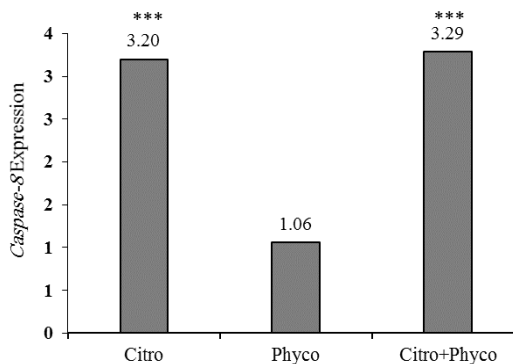


نمودار ۴- مقایسه اثر عصاره سیترولوس (*Citro*)، فیکوسیانین (*Phyco*) و ترکیب عصاره + فیکوسیانین (*Citro+Phyco*) بر بیان ژن *Bcl2*
*: معنی داری نسبت به گروه کنترل

ریزی شده سلول می‌باشد. فیکوسیاین اثرات ضدسرطانی خود را از طریق القای مرگ برنامه ریزی شده سلولی، مرگ سلول‌های اتوفازیک بر سلول‌های سرطانی پانکراس اعمال می‌کند (۱۲). فیکوسیاین همچنین منجر به توقف چرخه سلولی در مرحله G2/M، مرگ برنامه ریزی شده سلولی و مرگ سلول اتوفازیک در سلول‌های PANC-1 می‌شود. بدین ترتیب فیکوسیاین به عنوان یک عامل بالقوه‌ی ضد سرطان مطرح گردید (۱۲، ۲۲). نتایج حاصل از یک مطالعه نشان داد که فیکوسیاین می‌تواند بطور چشم‌گیری منجر به القاء مرگ برنامه ریزی شده سلولی، توقف چرخه سلولی، سرکوب مهاجرت سلولی، ممانعت از تکثیر و توانایی تشکیل کلونی سلول‌های NSCLC از طریق تنظیم چندین ژن کلیدی شود (۷). نتایج حاصل از مطالعه ما نیز در راستای مطالعات قبلی بوده و توانایی فیکوسیاین را در القای مرگ رده سلول‌های سرطان کولون گزارش کرد.

اخیراً محققین نشان دادند که فیکوسیاین سبب القاء فعالسازی ژنهای پیش‌آپتوزی و کاهش بیان ژنهای ضد آپتوزی و نهایتاً تسریع انتقال پیام مرگ سلولی در سلول‌های سرطانی HeLa می‌گردد. تجویز فیکوسیاین منجر به فعالسازی انواعی از Caspase‌ها از جمله Caspase-2,3,6,8,9,10 در سلول‌های سرطانی می‌گردد که نشان دهنده القاء فرآیند مرگ برنامه ریزی شده سلولی وابسته به Caspase در سلول‌های سرطانی می‌باشد. همچنین تیمار سلول‌های سرطانی HeLa با فیکوسیاین سبب القاء آزاد سازی سیتوکروم C از بخش غشاء داخلی میتوکندری به داخل سیتوزول و القاء مرگ برنامه ریزی شده سلولی می‌شود (۱۳، ۱۹، ۲۲، ۲۳-۲۷).

در این پژوهش از حلال قطبی متانول برای عصاره‌گیری گیاه هندوانه ابوجهل استفاده شد. مطالعات، استفاده از حلال‌های مختلف را برای عصاره‌گیری گیاه هندوانه ابوجهل نشان دادند که از جمله آن استفاده از حلال



نمودار ۵. مقایسه اثر عصاره سیترولوس (Citro)، فیکوسیاین (Phyco) و ترکیب عصاره + فیکوسیاین (Citro+Phyco) بر بیان ژن Caspase-8

*: معنی داری نسبت به گروه کنترل

بحث

امروزه رویکردهای جدید در درمان سرطان استفاده از عصاره‌ها و ترکیبات گیاهی می‌باشد که عوارض جانبی کمتر و قابل دسترس‌تر می‌باشند. تاکنون تحقیقات زیادی به اثرات ضد سرطانی عصاره‌های گیاهی در سلول‌های مختلف اشاره کرده‌اند که هر یک از طریق مسیرهای مولکولی متفاوتی موجب مهار رشد، پیشرفت و متاستاز سلول‌های سرطانی می‌گردند (۱۹، ۴، ۲۲). محققین نشان دادند که تیمار سلول‌های سرطان رحم با ترکیب فیکوسیاین منجر به کاهش چشمگیری در تعداد سلول‌های زنده سرطانی می‌شود (۱۲). همچنین فیکوسیاین سبب القاء بیان پروتئین Fas و ICAM-1 و کاهش بیان Bcl2 می‌گردد (۱۲). تاکنون مطالعات حاکی از نقش ضد سرطانی فیکوسیاین در بسیاری از سرطان‌ها از جمله سرطان ریه، پانکراس و کولون می‌باشد (۸، ۱۲، ۲۶). در مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۸ نشان داده شد که اثر ضد سرطانی فیکوسیاین از طریق مسیر MAPK القا می‌شود (۱۰). نتایج تحقیق ما مشخص کرد که فیکوسیاین از طریق القاء بیان ژن Caspase-8 و کاهش بیان ژن Bcl2 سبب کاهش درصد سلول‌های زنده رده سلولی سرطان کولون می‌گردد. این نتایج دال بر نقش فیکوسیاین در القاء فرآیند مرگ برنامه

Colocynthis بر سلول‌های سرطان پستان MCF-7 در نتیجه افزایش بیان ژن *Caspase-3* نیز گزارش شده است (۵).

در مطالعه ای اثر ضد تکثیری عصاره‌ی هیدروالکی *Citrullus Colocynthis* بر سلول‌های MCF-7 و AGS گزارش شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها نشان داد که بعد از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تفاوت معنی‌داری در میزان زنده ماندن سلول‌های سرطانی وجود دارد. آن‌ها گزارش کردند که احتمالاً اثر سیتوتوکسیک اعمال شده ناشی از عصاره به واسطه‌ی القای مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی بوده است. در نهایت تحقیقات بیشتری در زمینه تاثیر عصاره *Citrullus Colocynthis*، بعنوان یک عامل بالقوه‌ی شیمی‌درمانی علیه سلول‌های MCF-7 و AGS بر سلول‌های سرطانی مورد نیاز است (۲۱).

با توجه به نقش اساسی پروتئین *Bcl2* در مهار مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی و نقش *Caspase-8* در القاء مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی و نتایج بدست آمده از تحقیق کنونی و تحقیقات قبلی می‌توان اظهار داشت که ترکیب فیکوسیاینین و همچنین عصاره هندوانه ابوجهل دارای خواص بالایی در مهار تکثیر رده سلول‌های سرطان کولون داشته و این اثرات احتمالاً از طریق فعالسازی انواعی از *Caspase* ها، کاهش بیان *Bcl2*، آزادسازی سیتوکروم C از غشاء میتوکندری و نهایتاً القاء مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی صورت می‌پذیرد. اما اثبات این موضوع نیازمند مطالعات بیشتر در سطح پروتئین است.

کلروفروم برای استخراج عصاره از برگ‌های گیاه سیتروولوس کولوسیتینیس بود که سطح بالایی از ممانعت از رشد سلول‌های سرطانی را بدون آسیب به DNA نشان داد (۱۴). همچنین استفاده از حلال‌های اتیل استات، استون و متانول، بیشترین تاثیر را در کاهش رادیکال DPPH آزاد پایدار نشان داد (۱۴). این تحقیقات بیانگر اثرات آنتی‌اکسیدانی عصاره برگ این گیاه و نهایتاً کاهش احتمال ایجاد سرطان می‌باشند.

با بررسی اثر عصاره هندوانه ابوجهل نتایج مشابهی بر سلول‌های MCF-7 و HepG-2 نیز گزارش شده است. در این مطالعه نشان داده شد که عصاره هندوانه ابوجهل سبب کاهش معنی‌دار تعداد سلول‌های سرطانی MCF-7 و HepG-2 در یک مسیر وابسته به غلظت می‌گردد. این اثرات حتی پس از ۲۴ تا ۷۲ ساعت پس از تیمار نیز مشهود بود. بنابراین محققین استفاده از این عصاره را به عنوان جایگزینی برای درمان سرطان پیشنهاد کردند (۱۵).

در مطالعه‌ی پیشرو عصاره هندوانه ابوجهل به واسطه‌ی کاهش بیان ژن *Bcl2* و از طرفی افزایش بیان *Caspase-8* منجر به القاء مرگ برنامه‌ریزی شده رده سلول‌های سرطانی کولون شد. کاهش درصد سلول‌های سرطانی زنده در سلول‌های تیمار شده با عصاره این میوه در مقایسه با گروه کنترل نیز مشاهده گردید. علاوه بر این نتایج Real-time PCR نیز نشان داد که بیان ژن *Caspase-8* در ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از تیمار با عصاره به طور قابل توجهی افزایش یافته است. اثرات مشابهی از عصاره‌ی میوه *Citrullus*

منابع

- 1- Arnold, M., Sierra, M.S., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., Bray, F. 2017. Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. *Gut*, 66(4), 683-691.
- 2- Barghamdi, B., Ghorat, F., Asadollahi, K., Sayehmiri, K., Peyghambari, R., Abangah, G. 2016. Therapeutic effects of *Citrullus colocynthis* fruit in patients with type II diabetes: A clinical trial study. *Journal of pharmacy & bioallied sciences*, 8(2), 130.
- 3- Basha, O.M., Hafez, R.A., El-Ayouty, Y.M., Mahrous, K.F., Bareedy, M.H., Salama, A.M. 2008. C-Phycocyanin inhibits cell proliferation and may induce apoptosis in human HepG2 cells. *Egypt J Immunol*, 15(2), 161-167

- 4- Choori, M., Boozarpour, S., moradi, A., Jorjani, E. 2018. Investigation of POU5F1 and NANOG gene expression in colon cancer cell line (Caco-2) treated by dendrosomal nano-curcumin. J cell Mol Med. 31(3), 394-406.
- 5- Davoodi, R., Najafi, S., Mazaheri, M. 2015. Effect of Hydro Alcoholic Extract of Citrullus Colocynthis fruit on Caspase 3 gene expression in MCF-7 breast cancer cell line. SSU_Journals, 23(5), 508-518.
- 6- Fleming, M., Ravula, S., Tatishchev, S.F., Wang, H.L. 2012. Colorectal carcinoma: pathologic aspects. Journal of gastrointestinal oncology, 3(3), 153.
- 7- Hao, S., Yan, Y., Li, S., Zhao, L., Zhang, C., Liu, L., Wang, C. 2018. The in vitro anti-tumor activity of phycocyanin against non-small cell lung cancer cells. Marine drugs, 16(6), 178.
- 8- Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Hao, Y., Xu, J., Thun, M.J. 2009. Cancer statistics. CA: a cancer journal for clinicians, 59(4), 225-249.
- 9- Jemal, A., Center, M.M., DeSantis, C., Ward, E.M. 2010. Global patterns of cancer incidence and mortality rates and trends. Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers, 19(8), 1893-1907.
- 10- Jiang, L., Wang, Y., Liu, G., Liu, H., Zhu, F., Ji, H., Li, B. 2018. C-Phycocyanin exerts anti-cancer effects via the MAPK signaling pathway in MDA-MB-231 cells. Cancer Cell Int. 18: 12.
- 11- Kuipers, E.J., Grady, W.M., Lieberman, D., Seufferlein, T., Sung, J.J., Boelens, P.G., van de Velde, C.J., Watanabe, T. 2015. Colorectal cancer, Nature reviews. Disease primers, 1, 15065.
- 12- Liao, G., Gao, B., Gao, Y., Yang, X., Cheng, X., Ou, Y. 2016. Phycocyanin inhibits tumorigenic potential of pancreatic cancer cells: role of apoptosis and autophagy. Scientific reports, 6, 34564.
- 13- Li, B., Gao, M.H., Zhang, X.C., Chu, X.M. 2006. Molecular immune mechanism of C-phycocyanin from Spirulina platensis induces apoptosis in HeLa cells in vitro. Biotechnology and applied biochemistry, 43(3), 155-164.
- 14- Marzouk, B., Mussi, F., Jamali, C., Galati, S., Bekkouche, K., Aouni, M., Arru, L., Marzouk, Z., Buschini, A. 2016. Inhibitory activity of leaves extracts of *citrullus colocynthis* schrad on HT29 human colon cancer cells. European Journal of Medicinal Plants, 12(3), 1-10.
- 15- Mukherjee, A., Patil, SD. 2012. Effects of alkaloid rich extract of *Citrullus colocynthis* fruit on Artemia salina and human cancerous (MCF-7 and HEPG-2) cells. J. Pharma Sci Tech, 1, 15-19.
- 16- Najafi, Sh., Mir, N., shafaghat, M. 2016. Antioxidant and Antibacterial Activities of Six Medicinally Important Species of the Genus Salvia from North East of Iran. J Genet Resour. 2(1), 41-47.
- 17- Ou, Y., Lin, L., Yang, X., Pan, Q., Cheng, X. 2013. Antidiabetic potential of phycocyanin: Effects on KKAY mice. Pharmaceutical biology, 51(5), 539-544.
- 18- Rahimi, R., Amin, G., Ardekani, M.R.S. 2012. A review on *Citrullus colocynthis* Schrad.: from traditional Iranian medicine to modern phytotherapy. The journal of alternative and complementary medicine, 18(6), 551-554.
- 19- Ranji, Najmeh. 2014. Investigation of Survivin and hTERT gene expression in gastric adenocarcinoma cell line (AGS) treated by nano Curcumin. J cell Mol Med. 27(2), 233-241.
- 20- Ravi, M., Tentu, S., Baskar, G., Prasad, S.R., Raghavan, S., Jayaprakash, P., Jeyakanthan, J., Rayala, S.K., Venkatraman, G. 2015. Molecular mechanism of anti-cancer activity of phycocyanin in triple-negative breast cancer cells. BMC cancer, 15(1), 768.
- 21- Rezai, M. Davoodi, A., Asori, M., Azadbakht. M. 2018. Cytotoxic Activity of Citrullus colocynthis (L.) Schrad Fruit Extract on Gastric Adenocarcinoma and Breast Cancer Cell Lines. International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research, 45(1), 175-178.
- 22- Subhashini, J., Mahipal, S., Reddy, M., Reddy, M., Rachamalla, A., Reddanna, P. 2004. Molecular mechanisms in C-Phycocyanin induced apoptosis in human chronic myeloid leukemia cell line-K562. Biochemical pharmacology, 68(3), 453-462.
- 23- Tafrihi, M., Nakhaei Sistani, R. 2017. E-cadherin/ β -catenin Complex; A Target for Anti-cancer and Anti-metastasis Plants/Plant-derived Compounds. Nutrition and Cancer: An International Journal, 69(5), 702-722.
- 24- Thangam, R., Suresh, V., Princy, W.A., Rajkumar, M., Senthilkumar, N., Gunasekaran, P., Rengasamy, R., Anbazhagan, C., Kaveri, K.,

- Kannan, S. 2013. C-Phycocyanin from *Oscillatoria tenuis* exhibited an antioxidant and in vitro antiproliferative activity through induction of apoptosis and G0/G1 cell cycle arrest. *Food chemistry*, 140(1-2), 262-272.
- 25- Wang, H., Liu, Y., Gao, X., Carter, CL., Liu, ZR. 2007. The recombinant β subunit of C-phycocyanin inhibits cell proliferation and induces apoptosis. *Cancer letters*, 247(1), 150-158.
- 26- Wen, P., Hu, TG., Wen, Y., Linhardt, RJ., Zong, MH., Zou, YX., Wu, H. 2019. Targeted delivery of phycocyanin for the prevention of colon cancer using electrospun fibers. *Food Funct.* 10(4), 1816-1825.
- 27- Ying, J., Wang, J., Ji, H., Lin, C., Pan, R., Zhou, L., Song, Y., Zhang, E., Ren, P., Chen, J. 2016. Transcriptome analysis of phycocyanin inhibitory effects on SKOV-3 cell proliferation. *Gene*, 585(1), 58-64.

The Synergic effect of Abujahl watermelon extract (*Citrullus colocynthis*) and Phycocyanin on apoptosis induction in human colon cancer cell line (HT-29)

Arbabi M.,¹ Hassanpour H.,² Arabzadeh S.³ and Maghami P.¹

¹ Dept. of Biology, Faculty of Basic science, Science and Research Branch, Islamic Azad university, Tehran, I.R. of Iran

² Aerospace Research Institute, Ministry of science Research and technology, Tehran, I.R. of Iran

³ Dept. of Biology, Faculty of Basic science, Ale Taha institute of higher education, Tehran, I.R. of Iran

Abstract

Colorectal Cancer is one of the most common malignancies and is one of the major causes of mortality. Today, researchers pay attention to use of herbal extracts, including phycocyanin and *Citrus colocynthis* extract for treatment of colon cancer. In this study the synergic effect of these compounds on colon cancer cells growth and expression of *caspase-8* and *Bcl2* genes was assessed. After treatment of human colon cancer cells (HT-29) in different times (24, 48 & 72h) and with different concentrations of aqueous and phycocyanin watermelon extract and also combination of aqueous extract and phycocyanin, percentage of live cells was calculated using MTT method. Then expression of *caspase-8* and *Bcl2* genes were measured by real-time PCR. The highest inhibition of growth of cancer cells was observed after treatment with high concentration of both compounds. In addition, significant differences were observed between the different treatment times with low concentration (1 and 2 μ g/ml). The aqueous extract and phycocyanin reduced the expression of *Bcl2* gene by about 10.27 and 5.22, respectively. However, the combination of extract and phycocyanin was associated with a decrease of 7.31% in expression of this gene. The extract increased the expression of *Caspase-8* gene by 2.3 fold. *Citrus colocynthis* extract induces apoptosis by strongly increasing the expression of *caspase-8* gene. Additionally, the phycocyanin and the combination of extract and phycocyanin strongly decreased the expression of *Bcl2* gene. Phycocyanin and extract and Phycocyanin combination had stronger anti-cancer effects than extract alone.

Key words: Abujahl Watermelon Extract, Phycocyanin, Colon Cancer, Apoptosis