Applied Molecular Biology
Vol.1, issu.1, Winter. 2023

القای آپوپتوز سلول‌های سرطان کولون توسط عصاره گیاه هندوانه ابوجهل

*فاطمه دارابی
**سمیه عرب‌زاده
***حلیمه حسن‌پور
****آزاده حکمت

چکیده

در این مطالعه اثر عصاره هندوانه ابوجهل (*Citrullus Colocynthis*) بر تکثیر سلول‌های سرطان کولون بررسی شد. سپس میزان بیان فاکتورهای آپوپتوزی شامل کاسپاز ۳ و Bax ارزیابی گردید. سلول‌های سرطان کولون انسانی (HT۲۹) با غلظت‌های مختلف ۲ تا ۳۰ (میکروگرم/ میکرولیتر) عصاره سیترولوس به مدت ۲٤، ٤۸ و ۷۲ ساعت تیمار شدند. سپس درصد بقای سلول‌ها با استفاده از روش MTT اندازه‌گیری شد. درنهایت بیان ژن‌های کاسپاز ۳ و Bax با روش real-time PCR بررسی گردید. درنهایت نتایج با استفاده از نرم‌افزار SPSS آنالیز شد. تیمار سلول‌ها با عصاره سیترولوس نشان داد در غلظت‌های پایین (۱ و ۲ میکروگرم/ میکرولیتر) تفاوت معناداری در میزان مرگ سلول‌ها در بین مدت زمان تیمار (۲٤، ٤۸ و ۷۲ ساعت) وجود دارد (P<۰,۰۵). این در حالی است که در غلظت‌های بالاتر تفاوت معناداری در میزان مرگ سلول‌ها در بین مدت زمان تیمار مشاهده نشد. ترکیب عصاره سیترولوس سبب افزایش معنادار ۱,٦۷ برابری بیان ژن Bax شد (p<۰,۰۱). به علاوه عصاره سیترولوس به طور معناداری بیان ژن کاسپاز ۳ را افزایش داد (۷۵,۱ برابر) (p<۰,۰۱). اثرات ضد سرطانی عصاره سیترولوس با افزایش بیان ژن‌های Bax و کاسپاز ۳ و درنتیجه القای مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلولی در سلول‌های سرطان کولون اعمال می‌شود.

واژگان کلیدی: عصاره هندوانه ابوجهل (سیترولوس)، Bax، کاسپاز ۳، سرطان کولون.

---

* گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران.
** گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، مؤسسه آموزش عالی غیر انتفاعی آل طه (نویسنده مسئول). s.arabzadeh@aletaha.ac.ir
*** پژوهشگاه هوا فضا، وزارت علوم و تحقیقات، تهران ۸۳٤-۱٤٦٦۵، ایران.
**** گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران.

مقدمه

بیشتر سرطان‌های کولورکتال از تومورهای کوچک غیر خوش‌خیم و از سلول‌هایی به نام پولیپ‌های آدنوماتوز آغاز می‌شوند. با گذشت زمان برخی از این پولیپ‌ها می‌توانند به سرطان کولون تبدیل شوند. پولیپ‌ها ممکن است کوچک باشند و علائم کمتری داشته باشند. پولیپ به یک برجستگی قابل رؤیت از سطح مخاطی اطلاق می‌شود که از نظر آسیب‌شناختی می‌تواند به صورت هامارتوم غیر نئوپلاستیک، تکثیر مخاطی هیپرپلاستیک یا پولیپ آدنوماتوز رده‌بندی شود. تنها آدنوم‌ها ضایعات پیش بدخیم بوده و قسمتی از این ضایعات به سرطان تبدیل می‌شوند [۱]. بررسی اطلاعات همه‌گیرشناسی نشان داده است شیوع سرطان کولون در مردان بیشتر از زنان می‌باشد. وقوع سرطان کولورکتال در مناطق مختلف جهان نیز بسیار متفاوت می‌باشد [۲،۳]. بر اساس مطالعه‌ای از ایران در سال ۲۰۰۲، سالیانه بیش از ۵۰۰۰۰ مورد سرطان جدید در ایران بروز می‌کند که ۳۸٪ آن مربوط به دستگاه گوارش است [۲]. بر همین اساس و مطالعات انجام‌شده، بروز سرطان کلورکتال در ایران رتبه سوم در مردان و رتبه چهارم در زنان را به خود اختصاص داده است [۳]. درمان سرطان کولورکتال معمولاً بستگی به محل تومور در کولون یا رکتوم و همچنین مرحله بیماری دارد. درمان‌های رایج سرطان کولورکتال شامل جراحی، شیمی‌درمانی، درمان بیولوژیک یا پرتودرمانی می‌باشد. هر چند برخی از بیماران ترکیبی از این درمان‌ها را دارند [٤]. جراحی رایج‌ترین درمان مورد استفاده برای سرطان کولورکتال محسوب می‌گردد [٥]. القای آپوپتوز می‌تواند یکی از مکانیسم‌های مهم در مهار تکثیر سلول‌های سرطانی باشد. عامل‌های متعددی در کنترل و تنظیم آپوپتوز دخیل‌اند که در این میان سیتوکروم C، کاسپاز ۳ و پروتئین Bax از اهمیت ویژه‌ای برخوردارند[٦].

کاسپازها جزء خانواده‌ای از آنزیم‌های پروتئازی سیستئین-آسپارتات هستند که با توجه به نقش آنها در تجزیه پروتئین‌ها نقش بسیار محوری در مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلولی دارند. کاسپازها بر اساس عملکردشان به دو نوع آغازگر شامل کاسپازهای ۸، ۹

و ۱۰ و نوع اجرایی شامل کاسپازهای ۳، ٦ و ۷ و مسیر داخلی شامل کاسپاز ۹ می‌باشند که هر دو مسیر همگرا بوده و از کاسپازهای اجرایی استفاده می‌نمایند که به طور آبشاری فعال شده و منجر به انهدام سلول‌ها می‌شود [٦]. در میان انواعی از کاسپازها نظیر کاسپاز ۱، ۳، ٤ و ۹، کاسپاز نوع ۳ نقشی بسیار کلیدی و محوری در مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلولی دارد. این کاسپاز توسط فعالیت کاسپاز ۹ فعال شده و سپس با تجزیه و تخریب اندامک‌های داخل سلولی منجر به مرگ سلولی می‌شود. در کنار کاسپازها، پروتئین‌های خانواده «B-cell lymphoma-2» (Bcl_2) که ابتدا به عنوان پروتوانکوژن در لنفومای فولیکولار سلول‌های B شناسایی شدند، نقش محوری در تنظیم آپوپتوز دارند. «Bcl_2-associated X protein» (Bax) از اعضای پروآپوپتوز خانواده Bcl_2 می‌باشد. افزایش بیان این پروتئین منجر به افزایش روند آزادسازی سیتوکروم C و درنهایت فعال‌شدن کاسپاز ۹ توسط سیتوکروم C می‌گردد. بنابراین افزایش بیان کاسپازها و همچنین پروتئین Bax در القای مرگ سلول‌های سرطانی نقش کلیدی خواهند داشت [٦]. هدف از این پژوهش بررسی اثر ضد سرطانی عصاره گیاه سیترولوس کولوسینتوس (Citrullus Colocynthis) بر بیان ژن‌های Bax و Caspase3 در دودمان سلولی سرطان کولون (Ht29) می‌باشد.

۱. مواد و روش‌ها

۱-۱. تهیه غلظت‌های مختلف از محلول عصاره سیترولوس

ترکیب عصاره گیاهی سیترولوس از شرکت باریج اسانس (کاشان) خریداری شدند. غلظت‌های مختلفی از عصاره گیاهی (۱، ۲، ۵، ۱۰، ۲۰، ۵۰ و 100 میکروگرم/ میلی‌لیتر) در آب دیونیزه ساخته و در یخچال نگهداری گردید.

تیمار سلول‌های HT29 با غلظت‌های مختلف عصاره سیترولوس و فیکوسیانین

دودمان سلولی سرطان کولون انسان (HT29) (خریداری‌شده از انیستیتو پاستور ایران) در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفت. سلول‌ها در محیط کشت استاندارد

(DMEM)، همراه با ۱۰٪ سرم غیر فعال جنین گاو (FBS)، پنی‌سیلین (100 unit/ml) و استرپتومایسین (10µg/ml) و در شرایط استاندارد کشت داده شدند.

تیمار سلول‌ها با غلظت‌های ۱، ۲، ۵، ۱۰، ۲۰، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم/ میکرولیتر از عصاره انجام شد. میزان مرگ سلولی پس از گذشت زمان‌های ۱۲، ۲٤ و ٤۸ ساعت، به روش MTT بررسی شد تا بهترین غلظت تأثیرگذار و با سمیت کمتر برای مطالعات بعدی به دست آید.

۲-۱. بررسی اثر سمیت عصاره‌ها بر سلول‌های سرطانی

اثرات سمیت عصاره‌های گیاهی بر سلول‌های توموری با استفاده از روش MTT [3- (4 ,5-dimethylthiazol-2-yl) -2, 5- diphynyltetrazolium bromide] بررسی گردید.

سوسپانسیون سلولی (به تعداد تقریبی $۱۰^{٤}$ × ۱ سلول) به داخل یک پلیت ۹٦ چاهکی انتقال داده شدند. پس از آن سلول‌ها با غلظت‌های مختلف عصاره سیترولوس (۱، ۲، ۵، ۱۰، ۲۰، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر) تیمار شدند. بعد از ۲٤ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی‌گراد، زنده‌ماندن سلول‌ها با استفاده از روش MTT بررسی شد. سنجش در سه تکرار برای هر یک از غلظت‌ها انجام شد. ابتدا محیط رویی از چاهک خارج و ۲۰۰ میکرولیتر محلول MTT اضافه شد. میکروپلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ ساعت انکوبه شدند. ۱۲۵ میلی‌لیتر DMSO برای حل‌شدن بلورهای MTT به چاهک اضافه شد. پلیت‌ها برای ۱۵ دقیقه روی صفحه لرزان قرار گرفته و جذب در طول موج 570 نانومتر با دستگاه اسپکترومتر خوانده شد. درنهایت میانگین زنده‌مانی سلول‌های تیمارشده با عصاره نسبت به گروه کنترل (سلول‌های تیمارنشده) مقایسه شد.

۲. استخراج RNA کل از سلول‌های سرطانی

استخراج RNA از سوسپانسیون سلولی با استفاده از کیت RNX-Plus (SinaClon; RN7713C) و بر اساس پروتکل شرکت سازنده کیت مورد نظر انجام شد. تأیید کیفیت و کمیت RNA استخراج‌شده با استفاده از روش‌های نانودراپ و الکتروفورز روی ژل

آگارز انجام گردید؛ سپس cDNA از روی RNA طبق پروتکل استاندارد ساخته شد.

۳. روشReal time PCR

پرایمرهای مورد استفاده برای تکنیک Real time PCR شامل Bax و Caspase3 به همراه ژن کنترل داخلی GAPDH (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) از شرکت سیناکولون خریداری شد (جدول ۱). پس از ٤٠ چرخه میزان mRNAs بیان‌شده برای هر ژن در مقایسه با میزان بیان mRNAs ژن کنترل GAPDH با استفاده از فرمول [ΔCT = CT (target) – CT(control)] محاسبه شد؛ همچنین بیان ژن با روش $2^{-\Delta Ct}$ مورد ارزیابی قرار گرفت.

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

Gene	Forward	Reverse
Bax	TCCCCCCGAGAGGTCTTTT	CGGCCCCAGTTGAAGTTG
GAPDH	GAAGGTGAAGGTCGGAGTC	GAAGATGGTGATGGGATTTC
Caspase 3	GCCTGCCGTGGTACAGAACTGG	GCATACAAGAAGTCGGCCTCCAC

٤. آنالیز آماری

از آزمون شاپیروویلک برای تعیین نرمال‌بودن توزیع داده‌ها و از آزمون لوین جهت بررسی تجانس واریانس‌ها استفاده شد؛ همچنین توصیف کمی داده‌ها بر اساس شاخص‌های پراکندگی مرکزی شامل میانگین و انحراف استاندارد برای اطلاعات به‌دست‌آمده از Real time PCR انجام شد. از آنالیز واریانس یک‌طرفه به منظور بررسی تغییرات معناداری هر یک از متغیرهای مورد مطالعه، بین گروه‌های مختلف، استفاده شد. به هنگام وجود تفاوت معنادار آماری، آزمون تعقیبی توکی در برنامه ANOVA جهت تعیین محل اختلاف بین گروهی به کار برده شد. از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۰ برای تمامی آنالیزهای آماری در این مطالعه استفاده شد؛ همچنین سطح معناداری برای تمام محاسبات $p<۰.۰۵$ در نظر گرفته شد.

۵. نتایج

۵-۱. اثر عصاره سیترولوس بر مهار رشد سلول‌های سرطان کولون انسانی

بر اساس نتایج آزمایش MTT با غلظت‌های متفاوت از عصاره، میزان IC50 عصاره سیترولوس پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تیمار به ترتیب 22.14±1.18، 19.23±1.12، 20.08±0.5 (میکروگرم/ میکرولیتر) اندازه‌گیری شد. بین غلظت تیمارها و میزان مهار رشد سلول‌های سرطانی ارتباطی مستقیم مشاهده شد؛ به طوری که کمترین اثرپذیری در غلظت ۱ (میکروگرم/ میکرولیتر) و بیشترین اثرپذیری در غلظت ۵۰ (میکروگرم/ میکرولیتر) در هر سه زمان تیمار مشاهده گردید (جدول ۱).

تیمار سلول‌ها با عصاره سیترولوس نشان داد در غلظت‌های پایین (۱ و ۲ میکروگرم/ میکرولیتر) تفاوت معناداری در میزان مرگ سلول‌ها در بین مدت زمان تیمار (۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت) وجود دارد ($P<0.05$). این در حالی است که در غلظت‌های بالاتر تفاوت معناداری در میزان مرگ سلول‌ها در بین مدت زمان تیمار مشاهده نشد. با بالارفتن غلظت عصاره، اثر زمان کاهش می‌یابد و ما اثرات مرگ سلولی را در ۲۴ ساعت پس از تیمار مانند ۴۸ و ۷۲ ساعت خواهیم دید؛ در حالی که در غلظت‌های پایین‌تر نقش مدت زمان تیمار بر القای مرگ سلولی پررنگ‌تر از غلظت عصاره می‌باشد (شکل ۱).

۵-۲. اثر عصاره سیترولوس بر بیان ژن Bax و Caspase3

آزمایش‌های بررسی بیان ژن توسط تکنیک Real time-PCR نشان داد عصاره سیترولوس منجر به افزایش معنی‌دار ۲/۳۵ برابری در بیان ژن Bax در سلول‌های سرطانی نسبت به گروه کنترل شد ($p<0.01$) (شکل ۲)؛ همچنین میزان بیان ژن کاسپاز ۳ تحت تیمار با عصاره سیترولوس ۱.۷۵ برابر نسبت به گروه کنترل افزایش یافت ($p<0.05$) (شکل ۳).

بحث و نتیجه‌گیری

بر اساس نتایج این مطالعه، عصاره سیترولوس در هر سه بازه زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از تیمار، اثراتی مبنی بر کاهش رشد سلول‌ها را بر دودمان سلولی سرطان

کولون نشان داد. با افزایش غلظت تیمار میزان تأثیرپذیری آنها بر مهار رشد سلول‌های سرطانی در هر سه بازه زمانی افزایش یافت؛ به طوری که در غلظت ۱ میکروگرم/ میکرولیتر کمترین اثرپذیری و در غلظت ۵۰ میکروگرم/ میکرولیتری بیشترین اثرپذیری مشاهده گردید. بنابراین با توجه به نتایج حاصله، تیمار در غلظت‌های بالاتر اثر بیشتری در مرگ سلولی داشت.

نتایج پژوهش ما بر بیان ژن‌های Bax و کاسپاز ۳ نشان داد عصاره سیترولوس به طور معناداری سبب افزایش بیان این ژن‌ها گردید. از آنجایی که پروتئین Bax و کاسپاز ۳ نقش کلیدی در القای فرایند آپوپتوز دارند، نتایج حاصل از پژوهش ما نشان داد عصاره سیترولوس با افزایش بیان ژن‌های Bax و کاسپاز ۳ سبب القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی کلون می‌شوند. به نظر می‌رسد افزایش بیان Bax و کاسپاز ۳ یکی از مکانیسم‌های عملکرد عصاره سیترولوس می‌باشد؛ هرچند این موضوع نیازمند مطالعات بیشتر در سطح پروتئین می‌باشد.

در همین راستا با مطالعات متعددی تأثیر عصاره هندوانه ابوجهل در القای آپوپتوز و مهار رشد و تکثیر انواعی از دودمان‌های سلول‌های سرطانی بررسی گردیدند.

در پژوهش Tavakol و همکارانش، تأثیر عصاره هندوانه ابوجهل در مهار رشد سلولی سرطان حنجره و همچنین فیبروبلاست نرمال موشی L-929 نشان داده شد. این اثرات سیتوتوکسیک وابسته به غلظت بوده است و قادر است فرایند مرگ سلولی یا آپوپتوز را القا کند [۷]. در مطالعه Liu، عصاره هندوانه ابوجهل با القای آپوپتوز و ممانعت از چرخه سلولی اثر ضد سرطانی بر سلول‌های هپای ۲ داشت [۸]. در مطالعه دیگری Lan و همکاران در سال ۲۰۱۳ نشان دادند کوکوربیتاسین E، رشد سلول‌های سرطانی پستان انسانی را با درنظرگرفتن غلظت و زمان باز می‌دارد. آنالیزهای بعدی آنها نشان داد کوکوربیتاسین E سبب توقف فاز G2/M و القای آپوپتوز سلولی می‌گردد. همچنین آنها نشان دادند کوکوربیتاسین E سبب القای بیان کاسپاز ۳ و تنظیم مثبت P21

و P27 می‌گردد [۹]. نتایج این پژوهش تا حدود زیادی همسو با یافته‌های پژوهش ما بوده است. در مطالعه ما عصاره هندوانه ابوجهل با افزایش بیان پروتئین Bax و کاسپاز ۳ سبب افزایش مرگ سلول‌های سرطان کولون شد؛ همچنین در مطالعه دیگری تأثیر عصاره هیدروالکلی هنداونه ابوجهل بر بیان ژن کاسپازها، به‌ویژه کاسپاز ۳ و ۸، در دودمان سلولی سرطان پستان MCF-7 نشان داده شده است. تیمار سلول‌های سرطانی با افزایش بیان ژن‌های مربوط به کاسپازها و نهایتاً القای آپوپتوز همراه بود. همچنین با افزایش غلظت و زمان کشت در حضور این عصاره، درصد سلول‌های سرطانی زنده به طور چشمگیری کاهش یافت [۱۰].

فعالیت ضد سرطانی عصاره میوه هندوانه ابوجهل بر دودمان‌های سلولی سرطان پستان و آدنوکارسینومای معده نیز بررسی شده است؛ به طوری که که این عصاره دارای اثر مهارکنندگی بالایی علیه سلول‌های سرطانی پستان و آدنوکارسینومای معده می‌باشد. این اثر مهاری از راه مسیر وابسته به القای کاسپازها، سیتوکروم C و Bcl2/Bax منجر به القای آپوپتوز در آنها شده است [۱۱].

در ادامه مطالعات صورت‌گرفته، نتایج این مطالعه اثرات عصاره سیترولوس را بر افزایش بیان ژن‌های Bax و کاسپاز ۳ و القای آپوپتوز در سلول‌های سرطان کولون انسانی گزارش کرد. هرچند به نظر می‌رسد افزایش بیان Bax و کاسپاز ۳ یکی از مکانیسم‌های القای مرگ سلولی عصاره سیترولوس در سلول‌های سرطان کولون انسانی می‌باشد؛ ولی این موضوع نیازمند مطالعات بیشتر در سطح پروتئین است.

References

1. Aggarwal B., Prasad S., Sung B., Krishnan S. et al.; "Prevention and treatment of colorectal cancer by natural agents from mother nature", **Curr Colorectal Cancer Rep**; 9(1), 2013. pp.37-56.
2. Pourfarzi F., Whelan A., Kaldor J., Malekzadeh R.; "The role of diet and other environmental factors in the causation of gastric cancer in Iran--a population based study", **Int J Cancer**; 125, 2009, pp.1953-1960.
3. Fletcher R.; "The diagnosis of colorectal cancer in patients with symptoms: finding a needle in a haystack", **BMC Med**; 7, 2009, pp.18-29.
4. Subhashini J., Mahipal SV., Reddy MC., Reddy MM. et al.; "Molecular mechanisms in C-Phycocyanin induced apoptosis in human chronic myeloid leukemia cell line-K562", **Biochem pharmacol**; 68(3), 2004, pp.453-462.
5. Fernandez E., La Vecchia C., Talamini R., Negri E.; "Joint effects of family history and adult life dietary risk factors on colorectal cancer risk", **Epidemiology**; 13, 2002 pp.360-363.
6. Mahboubi E., Kmet J., Cook PJ., Ghadirian P. et al.; "Oesophegeal cancer studies in the Caspian Littoral of Iran: The Caspian Cancer registry", **Br J Cancer**; 28, 1973, pp.197-214.
7. Tavakkol Afshari J., Rakhshandeh H., Zamani AR., Mahdavi Sh. et al.; "Cytotoxicity effects of Citrullus colocynthis on Hep2 and L929 cell lines", **Hakim Research Journal**; 8(2), 2005, pp.47-54.
8. Liu T., Zhang M., Zhang H., Sun C. et al.; "Inhibitory effects of cucurbitacin B on laryngeal squamous cell carcinoma", **Eur Arch Otorhinolaryngol**; 265, 2008, pp.1225-1232.
9. Lan T., Wang L., Xu Q., Liu W. et al.; "Growth inhibitory effect of cucurbitacin E on breast cancer cells", **Int J Clin Exp Pathol**; 6, 2013, pp.1799-1805.
10. Davoodi RS., Najafi M., Mazaheri M.; "Effect of Hydro Alcoholic Extract of Citrullus colocynthis fruit on Caspase 3 gene expression in MCF-7 breast cancer cell line", **J Shahid Sadoughi Univ Med Sci**; 23(5), 2015, pp.508-518.
11. .Rezai M., Davoodi A., Asori M., Azadbakht M.; "Cytotoxic

activity of Citrullus colocynthis Schrad fruit extract on gastric adenocarcinoma and breast cancer cell lines", **Int J Pharm Sci Rev Res**; 2017, 45(1).