زیست‌شناسی جانوری، سال چهاردهم، شماره چهارم، تابستان ۱۴۰۱، صفحات ۶۳- ۵۱

مقاله پژوهشی

القای آپوپتوز ناشی از اثر هارمین در رده سلولی سرطان کولون انسانی HT29 و تغییرات بیان ژن‌های آپوپتوتیک P53، Bax و Bcl-2

ریحانه چیت‌بندی[۱]، جواد بهارآرا[۲*]، مریم طهرانی‌پور[۱]

۱- گروه زیست شناسی، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران

۲- گروه زیست‌شناسی و مرکز تحقیقات بیولوژی کاربردی تکوین جانوری، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران

*مسئول مکاتبات: baharara@mshdiau.ac.ir

DOI: 10.22034/ascij.2022.1937677.1286

تاریخ دریافت:۱۴۰۰/۰۵/۲۰ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۹/۲۵

چکیده

آلکالوئیدها دارای اثرات ضدتکثیری و محرک آپوپتوز در سلول‌های سرطانی هستند. هارمین نیز یکی از آلکالوئیدهای مهم در بذر اسپند است که اثرات ضدسرطانی آن گزارش شده است. هدف این مطالعه، بررسی اثر آلکالوئید هارمین بر القای آپوپتوز در رده سلولی سرطان کولون انسانی HT29 و تغییرات بیان ژن‌های آپوپتوتیک P53، Bax و Bcl-2 است. به این منظور سلول‌های سرطانی کولون HT29 با غلظت‌های مختلف هارمین (۳۵، ۴۵، ۵۵، ۶۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) به مدت ۲۴ ساعت تیمار شدند. زیست‌پذیری سلول‌ها با استفاده از آزمون MTT بررسی شد. تغییرات مرفولوژی هسته با رنگ‌آمیزی DAPI بررسی گردید. همچنین، القای آپوپتوز با تست انکسین و تغییرات بیان ژن‌های P53، Bax و Bcl-2 با استفاده از Real-time PCR تعیین شد. نتایج این بررسی نشان داد که هارمین به صورت وابسته به غلظت باعث کاهش زیست‌پذیری در سلول‌های سرطانی کولون HT29 شد. همچنین، تیمار سلول‌های سرطانی کولون HT29 با هارمین باعث تغییرات مرفولوژیک هسته سلول از جمله تراکم کروماتین هسته، تشکیل اجسام آپوپتوزی، و چروکیدگی غشای سلول شد. از طرفی، تیمار سلول‌های سرطانی HT29 با هارمین، باعث کاهش بیان Bcl-2 و همزمان افزایش بیان P53 و Bax و در مجموع، کاهش نسبت Bcl-2 به Bax شد. همچنین نتایج تست انکسین نیز تاییدکننده افزایش آپوپتوز در سلول‌ها است. در نتیجه می‌توان بیان کرد که هارمین به دلیل داشتن سیتوتوکسیسته موثر در مهار تکثیر و القای آپوپتوز، می‌تواند در درمان سلول‌های سرطانی کولون مورد استفاده قرار گیرد.

کلمات کلیدی: هارمین، سرطان کولون، سمیت سلولی، آپوپتوز.

مقدمه

سرطان کولون بعد از سرطان معده و مری، یکی از شایع‌ترین سرطان‌های گوارشی در ایران محسوب می‌شود و پس از سرطان ریه دومین علت مرگ‌ومیر ناشی از سرطان در جهان است (۱۹). اخیرا به دلیل اثرات عوامل محیطی و تغییر سبک زندگی مردم، میزان شیوع سرطان کولون بیشتر شده است. سرطان-های کولورکتال در سنین بالا بیشتر شایع هستند؛ به طوری که در زیر ۴۰ سالگی انتظار بروز این سرطان نمی‌رود. اما در ۸۰ سالگی شیوع این سرطان به ۳/۷ در هزار نفر می‌رسد؛ به طوری که ریسک ابتلا به

سرطان در افراد بالای ۵۰ سال ۵ درصد افزایش می-یابد (۲۰). اگرچه بیشتر سرطان‌ها به جراحی و شیمی درمانی پاسخ داده‌اند، بخشی از آنها به سرعت به شیمی درمانی مقاومت نشان می‌دهند که مستلزم به کارگیری استراتژی جدید برای بهبود کارایی شیمی درمانی است (۲). اخیراً شواهد بیانگر اثرات ضدتومور داروهای گیاهی بوده‌اند (۱۲، ۱٤). ترکیبات گیاهی مختلفی از جمله هارمین (Harmine)، رسوراترول (Berbamine)، و بربامین (Berbamine)، اثرات مهارکنندگی قابل توجهی را برعلیه یکسری از سرطان‌ها نشان داده‌اند (٤، ۵، ۲٤). در بین همه این ترکیبات گیاهی، هارمین که از بذرهای Peganum harmala جداسازی شده است، ترکیبی سه حلقه‌ای متعلق به آلکالوئیدهای بتاکاربولین می‌باشد (۱۸). در مطالعات مختلف فعالیت‌های زیستی مختلف هارمین گزارش شده است (۵، ۲۳). در برخی مطالعات اثبات شد که هارمین باعث مهار رشد سرطان‌های مختلف در شرایط in vivo و in vitro می‌شود از جمله مهار تکثیر، مهاجرت، تهاجم، پیشبرد آپوپتوز و جلوگیری از تومورزایی (۱۸، ۲٤). هارمین هر دو مسیر درونی و بیرونی آپوپتوز را فعال کرده و فاکتورهای رونویسی گوناگون و سایتوکاین‌های پیش التهابی را در سلول-های سرطانی تنظیم می‌کند (٦، ۲۵). علاوه بر این، دارای فعالیت ضدرگزایی نیز می‌باشد که تشکیل مویرگ‌های تومور را کاهش داده و رگزایی را مهار می‌کند (۷). هارمین با تنظیم پایین بیان سیکلواکسیژناز ۲ در سلول‌های سرطانی معده باعث القای آپوپتوز شده و تکثیر سلولی تومور را مهار می‌کند. همچنین هارمین می‌تواند p21 و p27 را در سطح بالایی تنظیم کند، تشکیل کمپلکس با CDKها و سیکلین‌های فاز G1-S را افزایش دهد و باعث توقف در فاز G1 شود تا جلوی پیشروی سلول‌های سرطانی را بگیرد (۱٦). از نظر تاثیر عوامل خارجی بر سلول‌های سرطانی، تعادل بین Bcl-2 (مهارکننده آپوپتوز) و Bax (معادل پروآپوپتیک Bcl-2) به عنوان مهمترین پارامتر تعیین کننده سرنوشت سلول در پاسخ به محرک خارج سلول معرفی شده است (۱۰). پروتئین Bcl-2 سبب تنظیم آپوپتوز می‌گردد و این پروتئین در غشاء خارجی میتوکندری قرار دارد و از طریق مهار پروتئین‌های پروآپوپتوزی، نقش مهمی در پیش‌برد بقای سلولی دارد. پروتئین Bax یک پروتئین کلیدی در آپوپتوز القا شده توسط عوامل مختلف در مسیر داخلی آپوپتوز می‌باشد. این پروتئین از طریق برهمکنش با پروتئین‌های غشاء میتوکندری، موجب افزایش نفوذپذیری این غشاء و آزاد شدن سیتوکروم c از میتوکندری، فعال شدن کاسپازها و درنهایت آپوپتوز می‌شود (۱۵). با توجه به شیوع قابل ملاحظه سرطان کولون در ایران و جهان، و عوارض گسترده این سرطان در افراد مبتلا و تحمیل هزینه‌های اجتماعی و مالی قابل توجه بر خانواده و اجتماع و عوارض جانبی حاصل از رادیوتراپی و شیمی درمانی، در این مطالعه به بررسی اثر هارمین بر القای آپوپتوز در رده سلولی سرطان کولون انسانی HT29 و تغییرات بیان ژن‌های آپوپتوتیک P53، Bax و Bcl-2 پرداخته شد.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق ٦ گروه (گروه کنترل، گروه شاهد آزمایشگاهی و ٤ گروه تجربی) مورد بررسی قرار گرفتند ازجمله: گروه کنترل که در آن، دودمان سلولی HT29 هیچ گونه تیماری دریافت نکردند. گروه شاهد آزمایشگاهی که سلول‌ها با حلال هارمین (DMSO) وگروه‌های تجربی ۱ تا ٤ که به ترتیب با غلظت‌های ۳۵، ٤۵، ۵۵ و ٦۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر هارمین، تیمار شدند. سلول‌های سرطانی HT29 از انسیتو پاستور ایران تهیه و در محیط کشت RPMI 1640 (سیگما) حاوی ده درصد FBS یک درصد آنتی

بیوتیک کشت داده شدند. سلول‌ها در انکوباتور حاوی ۵ درصد CO_2، رطوبت ۹۵ درصد با دمای ۳۷ درجه قرار داده شدند. شمارش سلولی و تعداد سلول‌های زنده با استفاده از تریپان بلو انجام شد.

آزمون سمیت سلولی (MTT): بررسی اثر سیتوتوکسیک هارمین با استفاده از روش رنگ‌سنجی MTT تعیین گردید. به منظور بررسی تأثیر هارمین بر میزان تکثیر و بقای سلولی، تعداد 1×10^5 سلول در میلی‌لیتر در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه‌ای کشت داده شدند. سلول‌ها با غلظت‌های مختلف هارمین به مدت ۲۴ ساعت تیمار شدند. سلول‌های تیمار شده با غلظت‌های مختلف از هارمین و فاقد تیمار (گروه کنترل)، به مدت ۲۴ ساعت، انکوبه شدند. رنگ MTT به هر کدام از چاهک‌ها اضافه گردید و سپس به مدت چهار ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و دور از نور انکوبه شدند. پس از پایان چهار ساعت زمان انکوباسیون، جهت سنجش نوری به هر یک از چاهک‌ها دی‌متیل‌سولفوکسید اضافه گردید و کریستال‌های فورمازان درون هر چاهک با پیپتاژ به طور کامل به صورت محلول درآمدند. چگالی نوری محلول درون هر چاهک با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری در طول موج ۵۷۰ نانومتر سنجیده شد (۲۲). میزان بقای سلولی با فرمول زیر محاسبه شد: $\text{درصد توان زیستی} = \frac{\text{میانگین جذب نوری خانه های هر غلظت}}{\text{میانگین جذب نوری خانه های کنترل}} \times 100$

بررسی تغییرات مورفولوژی هسته در سلول‌های تیماری با رنگ‌آمیزی هسته‌ای DAPI: برای بررسی اثرات هارمین بر روی هسته سلول‌های سرطان کولون HT29 از رنگ آمیزی DAPI استفاده شد. از این تست جهت تایید تاثیر سیتوتوکسیک و آنتی‌پرولیفراتیو هارمین مورد استفاده قرار گرفت. به این منظور سلول‌های HT29 با غلظت های ۳۵، ۴۵، ۵۵ و ۶۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره تیمار و پس از ۲۴ ساعت سلول‌ها با محلول متانول و رنگ DAPI فیکس و رنگ‌آمیزی شدند. در انتها نمونه توسط میکروسکوپ فلورسنت مشاهده شد.

آزمون آنکسین V-FITC: به منظور تعیین درصد سلول‌های آپوپتوتیک در یک جمعیت سلولی تیمارشده و قیاس آن با جمعیت سلولی در کنترل، روش فلوسیتومتری استفاده شد. در این روش از دو ترکیب انکسین AnnexinV- FITC) V) و پروپیدیوم یدید (PI) استفاده می‌شود که تشخیص سلول‌های آپوپتوتیک از سلول‌های نکروتیک را امکان پذیر می‌سازد. به این منظور تعداد 1×10^5 سلول در هر یک از چاهک‌های پلیت ۶ خانه‌ای کشت داده شدند. یک گروه به عنوان کنترل و ۴ گروه به عنوان گروه تیمار در نظر گرفته شدند. پس از گذشت ۲۴ ساعت سلول‌ها با غلظت‌های ۳۵، ۴۵، ۵۵ و ۶۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر هارمین تیمار شدند. بعد از گذشت ۲۴ ساعت، سلول‌ها سانتریفیوژ، و به هر نمونه ۵۰۰ میکرولیتر بافر 1X Binding Buffer اضافه و سپس ۵ میکرولیتر Annexin V-FITC و ۵ میکرولیتر پدید پروپیدیوم، افزوده شد و در دمای اتاق به مدت ۵ دقیقه و در تاریکی انکوبه شدند و توسط دستگاه فلوسایتومتری سنجیده شد (۳).

بررسی بیان ژن‌های آپوپتوزی P53، Bax و Bcl-2 با روش آنالیز Real Time PCR: در این مطالعه میزان بیان ژن‌های آپوپتوزی P53، Bax و Bcl-2 با استفاده از روش Real Time PCR سنجیده شد. برای بررسی تغییرات بیان ژن‌ها، در ابتدا RNA سلول‌های تیمار شده توسط هارمین و کنترل با استفاده از کیت استخراج RNA (کیت پارس توس) و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده استخراج شد. پس از بررسی کمی RNA جهت ساخت cDNA مورد استفاده قرار گرفت. به منظور ساخت cDNA از کیت پارس توس بر طبق دستورالعمل شرکت سازنده استفاده شد. در این پژوهش از ژن‌های Bax، Bcl-2 و

P53 به عنوان ژن هدف و ژن GAPDH به عنوان ژن مرجع، استفاده شد. توالی پرایمرهای به کار گرفته شده در این واکنش در جدول ۱ آورده شده است. بیان ژن‌ها با استفاده از دستگاه Bio-Rad Real Time PCR- و رنگ SYBR Green تحت نرم‌افزار Bio-Rad CFX ارزیابی شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها: به منظور تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها از نرم‌افزار Prism، آزمون ANOVA و تست Tukey به منظور مقایسه‌ی داده‌ها صورت گرفته است. به منظور مقایسه نسبی زیست‌پذیری میان گروه‌ها، داده‌ها به صورت درصد، محاسبه و نشان داده شدند. $p<۰/۰۵$ از لحاظ آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

جدول ۱- توالی‌های آغازگر ژن‌های مورد مطالعه

نام ژن	توالی پرایمر ´۵ به ´۳
P53	F:GTCCCCAGGCCTCTGATTC R:CAGAGACCCTCCTCCCCAA
Bcl-2	F:CTGGTGGACAACATCGCTCTG R:GGTCTGCTGACCTCACTTGTG
Bax	F:TGCAGAGGATGATTGCTGAC R:GATCAGCTCGGGCACTTTAG
GAPDH	F: GAACATCATCCCTGCATCCA R: CCAGTGAGCTTCCCGTTCA

نتایج

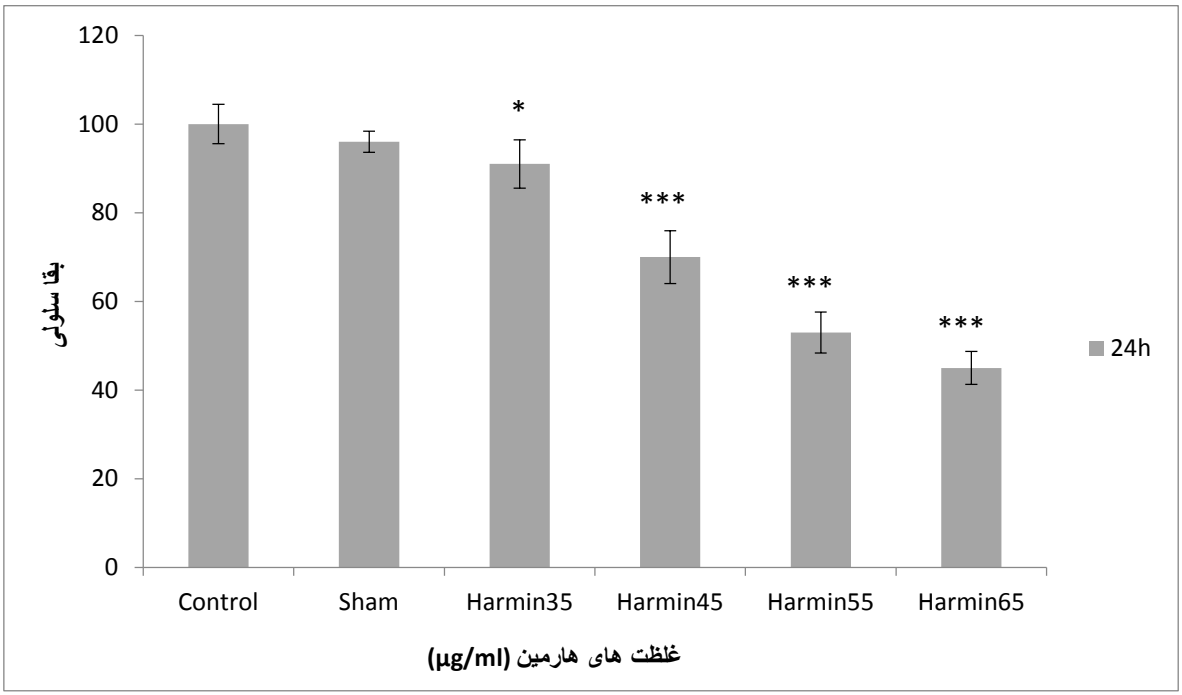
اثرات غلظت‌های مختلف هارمین بر زیست‌پذیری سلول‌های HT29: به منظور تعیین زیست‌پذیری سلول‌های سرطانی HT29 از آزمون سمیت سلولی با استفاده از MTT استفاده شد. با توجه به شکل ۱، هارمین باعث کاهش معنی‌دار زیست‌پذیری سلول‌های سرطانی کولون HT29 تحت تیمار با غلظت‌های ۳۵، ٤۵، ۵۵ و ٦۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر نسبت به کنترل و گروه شاهد آزمایشگاهی (DMSO) شد. بین گروه کنترل و شاهد آزمایشگاهی، تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. کمترین درصد زیست پذیری سلول‌ها مربوط به غلظت ٦۵ میکروگرم بر میلی‌یتر بود.

تغییرات مورفولوژی هسته در سلول‌های تیمار شده با هارمین: برای بررسی اثرات هارمین بر روی هسته سلول‌های سرطان کولون HT29 از رنگ‌آمیزی DAPI استفاده شد. تغییرات مورفولوژیک حاصل از آپوپتوز همچون فشردگی و چروکیدگی هسته و تشکیل اجسام آپوپتوتیک با این رنگ‌آمیزی قابل تشخیص می‌باشند. در شکل ۲ همانطور که مشاهده می‌شود تیمار هارمین به ویژه در غلظت‌های ۵۵ و ٦۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر باعث قطعه‌قطعه شدن هسته و تشکیل اجسام آپوپتوتیک نسبت به کنترل شد.

میزان سلول‌های آپوپتوزی تحت تاثیر هارمین با تست آنکسین: شکل ۳، نتایج تست آنکسین در سلول‌های تیمار شده با غلظت‌های ۳۵، ٤۵، ۵۵ و ٦۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر هارمین را پس از آنالیز سلول-های رنگ‌آمیزی شده با PI و Annexin V با روش فلوسیتومتری نشان می‌دهد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزار دستگاه و تقسیم نقاط ثبت شده در منحنی دوبعدی به چهار ناحیه (نکروز، سلول‌های آپوپتوز شده ثانویه، سلول‌های سالم و سلول‌های آپوپتوز شده اولیه)، صورت گرفت. با توجه به شکل ۳، بیشترین میزان آپوپتوز سلولی در تیمار ٦۵ میلی-

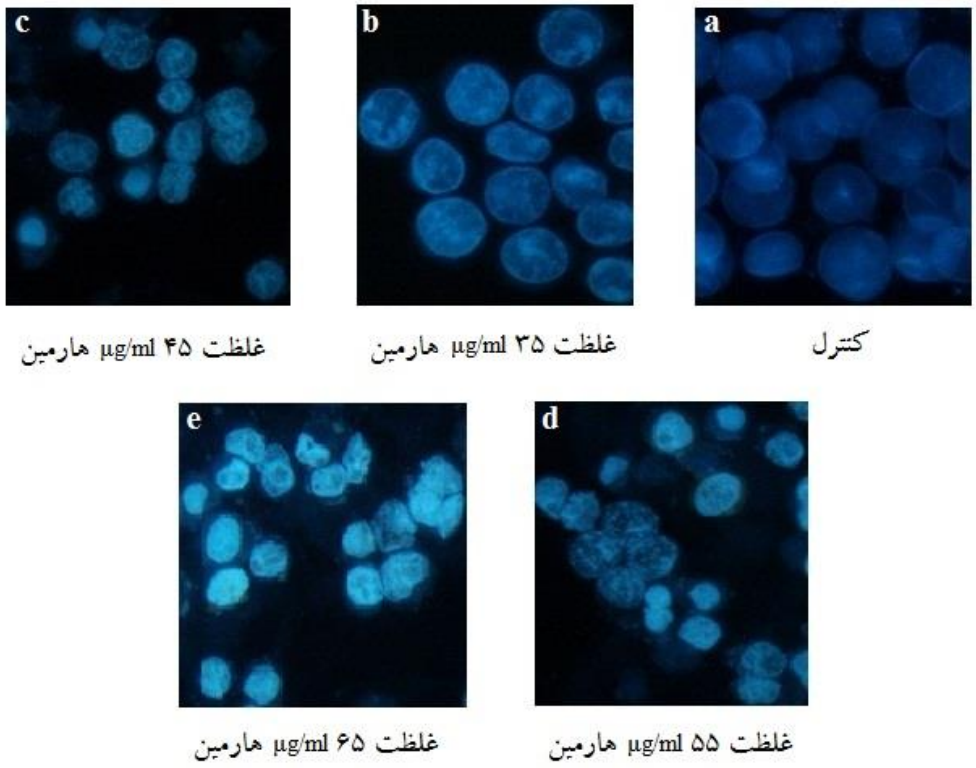
گرم بر میلی‌لیتر هارمین و به میزان ۵۷/۹ درصد رخ داد. نتایج نمودارها به شرح زیر می‌باشد: در نمونه کنترل، ۹۳/۲ درصد سلول‌ها زنده بودند؛ ۰/۲ درصد دچار نکروز، و در مجموع ٦/٦ درصد دچار آپوپتوز شدند. در تیمار ۳۵ میکروگرم بر میلی لیتر، ۳/ درصد از سلول‌ها سالم، ۰/۳ نکروز و در مجموع ۱۰/٤ درصد دچار آپوپتوز شدند. در تیمار ٤۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر، ۷۵/۳ درصد از سلول‌ها سالم، ۱/۱درصد نکروز و در مجموع ۲۳/٦ درصد دچار آپوپتوز شدند. در تیمار ۵۵ میکروگرم بر میلی لیتر، ٤۷/۵ درصد از سلول‌ها سالم، ۳/۱درصد نکروز، و در مجموع ٤۹/٤ درصد دچار آپوپتوز شدند. در نهایت در تیمار ٦۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر، ۳۸/۷ درصد سلول‌ها سالم، ۳/٤ درصد نکروز و ۵۷/۹ درصد دچار آپوپتوز شدند.

بیان ژن‌های آپوپتوزی P53، Bax و Bcl-2 تحت هارمین با روش آنالیز Real-time PCR: در این مطالعه میزان بیان ژن‌های آپوپتوزی P53، Bax و Bcl-2 با استفاده از روش Real-time PCR سنجیده شد. با توجه به شکل‌های ٤ تا ۷، هارمین سطح بیان ژن پروآپوپتوزی BAX افزایش و سطح بیان ژن آنتی آپوپتوزی Bcl-2 کاهش یافت. این تغییرات به ویژه در غلظت ۵۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر بسیار مشهود بود. همچنین، هارمین در غلظت‌های ۳۵، ٤۵ و ٦۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر باعث افزایش بیان ژن P53 نسبت به شاهد شد. نتایج نسبت بیان ژن‌های فوق نسبت به ژن مرجع در رده سلولی سرطان کولون تیمار شده نشان می‌دهد که هارمین با تغییر در بیان ژن‌های P53، Bax و Bcl-2 باعث القای آپوپتوز در سلول‌های سرطان کولون (رده سلولی HT29) شد که بدنبال این امر، تکثیر این سلول‌ها متوقف می‌شود.

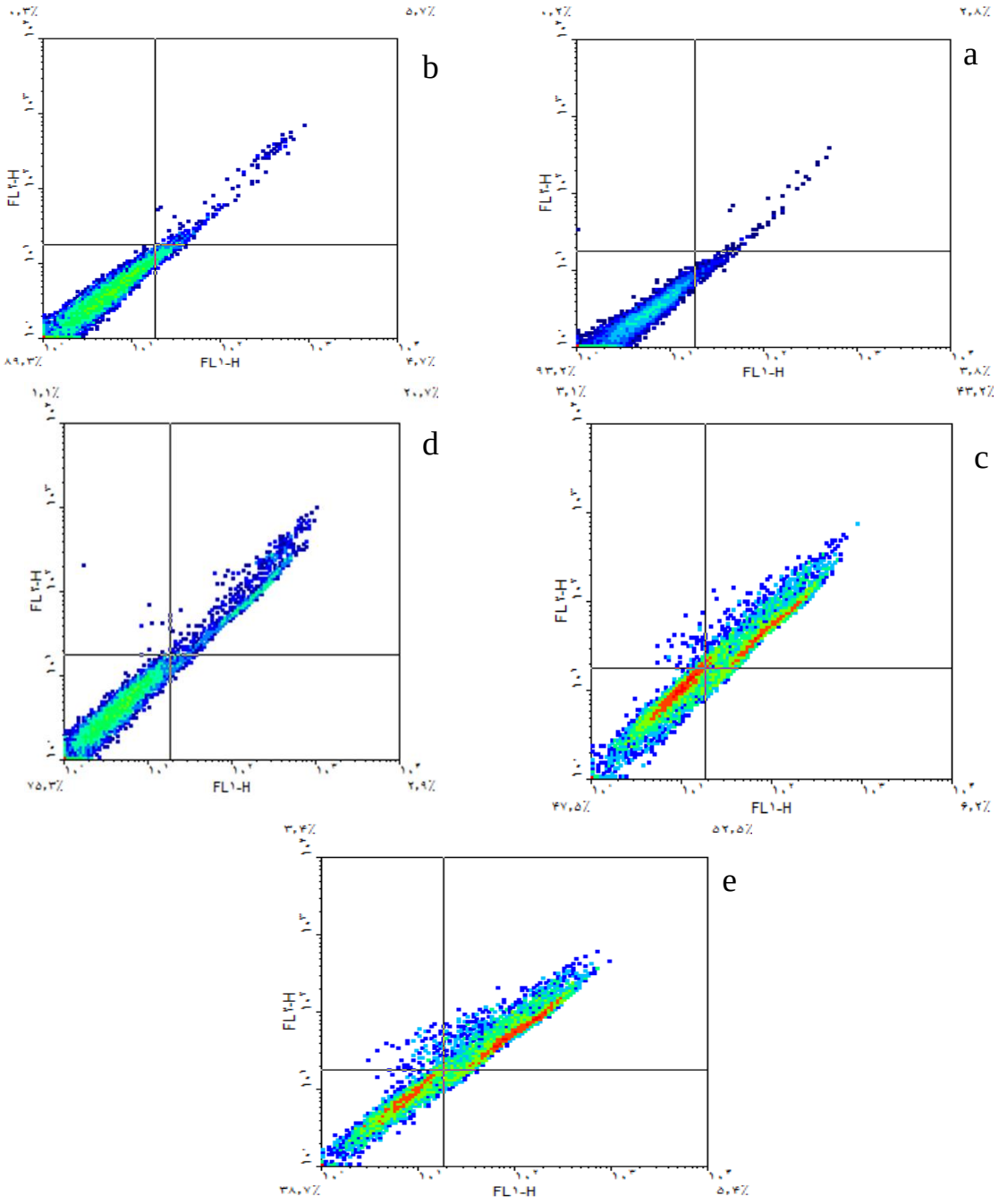


شکل ۱- تاثیر غلظت‌های مختلف هارمین بر زنده مانی سلول‌های HT29

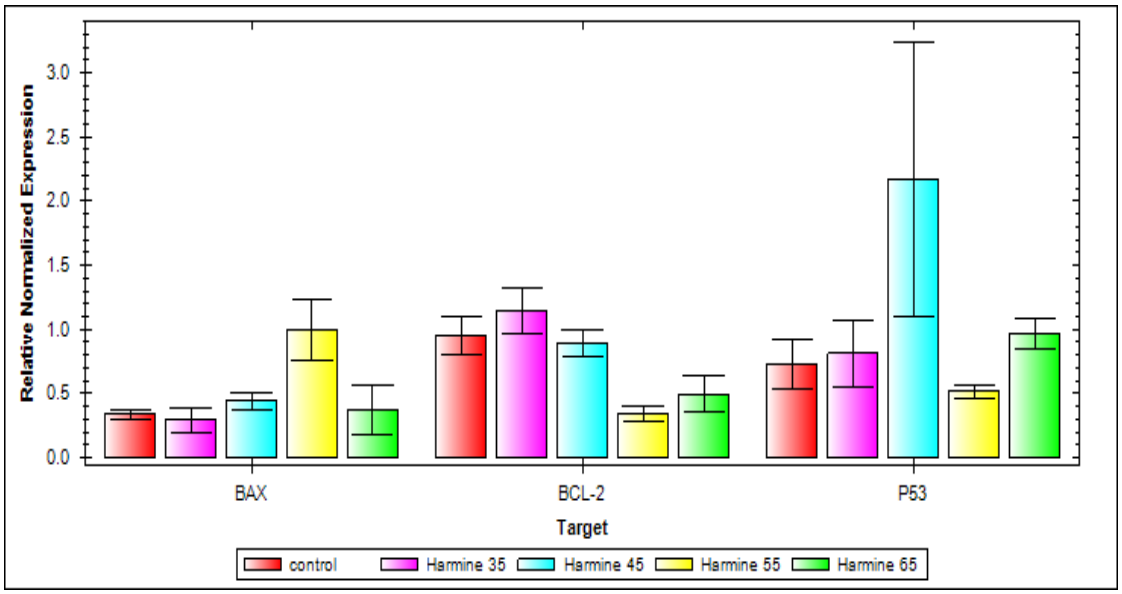
(*: نشان‌دهنده P<0.05، ***: نشان‌دهنده P<0.001 در مقایسه گروه کنترل)



شکل ۲- رنگ‌آمیزی DAPI نشان دهنده تغییرات در هسته سلول‌های سرطان کولون انسان در گروه‌های کنترل و تیمار شده با هارمین (بزرگنمایی ٤٠٠X).



شکل ۳- نتایج تست فلوسایتومتری سلول‌های تیمار شده با غلظت‌های مختلف هارمین (a: کنترل؛ b: غلظت ۳۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر هارمین؛ c: غلظت ۴۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر هارمین؛ d: غلظت ۵۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر هارمین، e: غلظت ۶۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر هارمین)



شکل ٤- مقایسه میزان بیان ژن‌های BAX، Bcl-2 و P53 تحت تیمار غلظت‌های مختلف هارمین

بحث

سرطان یکی از مشکلات عمده سلامت و علت اصلی مرگ نه تنها در کشورهای توسعه نیافته، بلکه در کشورهای توسعه یافته است. طی سال‌های اخیر، دانشمندان با تلاش‌های فراوان در زمینه سرطان توانسته‌اند برخی از بیماری‌های بدخیم را به مرحله درمان برسانند. از سال‌های گذشته، روش‌های درمانی مختلفی در زمینه سرطان استفاده شده است که با محدودیت‌هایی همراه می‌باشند. با این حال، روش-های رایج در درمان سرطان سبب دستیابی به پیشرفت‌هایی در این زمینه شده است و استراتژی درمان‌های اخیر نیاز به تحقیقات بیشتر در محصولات طبیعی داشته که سبب تولید داروهای موثری در درمان سرطان گردیده است (١٦). این تحقیق با هدف بررسی تاثیر آلکالوئید هارمین بر القای آپوپتوز و اثرات ضدسرطانی آن در رده سلولی سرطان کولون انسانی HT29 انجام شد. نتایج نشان داد که هارمین در غلظت‌های بالاتر، دارای سمیت بیشتری است و باعث کاهش درصد زیست‌پذیری سلول‌های سرطانی کولون HT29 شد. همچنین، با افزایش غلظت هارمین تعداد سلول‌ها کاهش و مرگ سلولی افزایش یافت. نتایج تست انکسین نیز نشان داد که هارمین، در غلظت‌های پایین باعث آپوپتوز اولیه و با افزایش غلظت، آپوپتوز ثانویه القا شد و تعداد کمی از سلول‌ها دچار نکروز شدند. تیمار سلول‌های سرطانی HT29 با هارمین به شیوه‌ای وابسته به غلظت باعث کاهش بیان Bcl-2 و همزمان افزایش بیان P53 و Bax و در مجموع، کاهش نسبت Bcl-2 به Bax شد. در همین راستا مطالعات نشان داده ترکیبات طبیعی گیاهی، قابلیت استفاده در درمان سرطان را داشته و سبب کاهش عوارض جانبی و افزایش اثربخشی درمان می‌شود (٢). مطالعات نشان داده است که عصاره اسپند دارای اثرات سایتوتوکسیک بر روی سلول‌های جدا شده از سرطان به صورت آزمایشگاهی می‌باشد. در واقع عصاره اسپند با تأثیر بر فرآیندهای متابولیکی مختلف در سلول مانند متابولیسم انرژی و سنتز پروتئین ممکن است به وسیله تداخل با مکانیسم‌های ژنتیکی بر

فعالیت سلول تأثیر بگذارد (۲۳ ، ۵). ترکیبات فعال اسپند عمدتاً شامل آلکالوئیدهایی است که به ویژه در دانه و ریشه گیاه تجمع می‌یابند. بتاکاربولین‌ها نظیر هارمالین و هارمین به تنهایی بالغ بر ٦٠ درصد آلکالوئیدهای موجود در دانه را تشکیل می‌دهند. این آلکالوئیدها اثرات ضد سرطانی داشته و این اثر در چندین رده سلولی سرطانی گزارش شده است (۹).در مطالعه حاضر نیز که به بررسی میزان سمیت هارمین علیه رده سلولی سرطانی کولون HT29 پرداخته شد؛ نتایج حاکی از آن بود که هارمین به شیوه‌ای وابسته به غلظت بر کاهش زنده مانی سلول‌های سرطانی کولون HT29 موثر می‌باشد. به طوری که در غلظت‌های بالاتر (۵۵ و ٥٦ میکروگرم بر میلی‌لیتر) بیشترین تاثیر را بر کاهش زیست‌پذیری این سلول‌ها داشت. کاهش توانایی زیستی سلول‌ها در تیمار با دوزهای مختلف عصاره هیدرو الکلی اسپند و در دوره‌های زمانی متفاوت در مطالعات دیگری که در این زمینه انجام شده نیز نشان داده شده است. از جمله نتایج مطالعات Hussam و همکاران (۲۰۱٤) بر روی رده سلولی Hep-2 (سرطان حنجره) نشان داد که کاهش معنی-داری در تعداد سلولهای Hep-2 تیمار شده با عصاره اسپند مشاهده شد و با افزایش دوز و زمان عصاره تعداد سلول‌ها به تدریج کاهش بیشتری را نشان داد. بر طبق این نتایج Hussam و همکاران پیشنهاد کردند که عصاره اسپند می‌تواند اثر سیتوتوکسیک بر سلول-های Hep-2 داشته و می‌تواند به صورت وابسته به دوز و زمان بر روند تکثیر سلول‌ها تأثیر بگذارد (۸). Hamsa و Kuttan (۲۰۱۱) توانایی زیستی سلول‌های ملانوم پوست B16F-10 را با دوزهای مختلف عصاره اسپند بررسی و به این نتیجه رسیدند که عصاره اسپند منجر به کاهش توانایی زیستی این سلول‌ها می‌گردد (۷). براساس نتایج لیو و همکاران (۲۰۱٦) آزمون MTT نشانه اولیه در سمیت با عصاره اسپند بر پایه اختلال در زنجیره تنفسی میتوکندری می‌باشد که باعث آزاد شدن فاکتورهای القا کننده آپوپتوزیس می-گردد، این فاکتورها ممکن است باعث قطعه قطعه شدن DNA در هسته سلول شود. افزایش تولید آنزیم-های پروتئازی نظیر کاسپاز ۳، ۸، و ۹ منجر به تغییرات مختلفی در سلول به خصوص در متابولیسم سلول می‌گردد. در واقع مشخص شده که آنزیم‌های پروتئازی وظایف مهمی را در مراحل اولیه آپوپتوز بازی می‌کنند (۱۳). طبق نتایج Hamsa و Kuttan عصاره اسپند فعالیت آنزیم‌های پروتئازی را در سلول-های B16F-10 تحریک می‌کند، از طرفی آسیب DNA و فعال شدن کاسپازها به موازات هم هستند که به وسیله سمیت با عصاره اسپند ایجاد می‌شوند و در نهایت می‌توانند باعث کاهش توانایی زیستی سلول‌ها گردد (۷). احتمالاً در تحقیق حاضر نیز سمیت با هارمین باعث تحریک فعالیت آنزیم‌های پروتئازی و افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) شده و از طریق فعال کردن کاسپازها باعث آسیب شدید به سلول می‌شوند. نتایج حاصل از تحقیقات دانشمندان دیگر نیز کاهش توانایی زیستی سلول‌های تحت تیمار با عصاره اسپند را تأیید کردند؛ از جمله در مطالعات Jimenez و همکاران (۲۰۰۸) معلوم شد که عصاره اسپند موجب کاهش معنی‌داری در توانایی زیستی سلول‌های Hela (کارسینومای اپیتلیال گردن رحم)، C33A (کارسینومای گردن رحم) و SW480 (کارسینومای روده) شد که با نتایج این مطالعه همخوانی داشت (۱۱) .در تحقیق Kuttan و Hamsa (۲۰۱۰) تیمار سلول‌های سرطانی کولون HT29 با هارمین باعث تغییرات مرفولوژیک هسته سلول از جمله تراکم کروماتین هسته، تشکیل اجسام آپوپتوزی، و چروکیدگی غشای سلول شد. تمام این ویژگی‌های مرفولوژیکی نشان دهنده آپوپتوز هستند که نشان می-دهد آپوپتوز نقش مهمی در مرگ سلولی ناشی از

هارمین روی سلول های HT29 دارد (۷). در تحقیق روستایی (۲۰۱۸) القای پدیده آپوپتوز، کاسپازها با اختلال در زنجیره تنفسی سلول، باعث آزادشدن فاکتورهای القاکننده آپوپتوز می‌شوند. این فاکتورها سبب غیرفعال شدن آنزیم‌های توپومراز ۱و ۲ شده و با قطعه قطعه کردن DNA در همانندسازی آن اختلال ایجاد می‌کنند. همچنین با شکستن پروتئین هسته‌ای ساختاری، لامین های غشای هسته توسط کاسپاز ٦ تخریب می‌شوند که باعث تراکم کروماتین و قطعه قطعه شدن آن در سلول‌های آپوپتوزی می‌شود. مجموعه رویدادهای اخیر سبب توقف رشد و همانندسازی سلول‌ها و در نهایت منجر به مرگ سلولی می‌گردد (١٦).

همچنین طبق نتایج تحقیق روستایی (۲۰۱۸) نشان دادند که هارمین باعث افزایش میزان بیان ژن P53 نسبت به شاهد شد و آپوپتوز به وسیله محرک‌های مختلفی آغاز شده و به وسیله افزایش بیان Bcl-2 مهار می‌شود و همچنین افزایش بیان و فعالیت P53 رونویسی Bax را افزایش داده و رونویسی Bcl-2 را مهار می‌کند. P53، Bax را در سطح رونویسی تنظیم می‌کند (١٦). در مطالعه روشن‌خواه و همکاران (۲۰۲۰) افزایش بیان Bax و کاهش بیان Bcl-2 نشان داده شد که بیان و فعالیت P53 می‌تواند رونویسی را افزایش دهد. مولکول P53 نیز یکی از مهمترین مهارکننده‌های چرخه تکثیر سلولی است که با ایجاد وقفه در مرحله G2 باعث مهار چرخه سلولی می‌شود و با القا، از ایجاد تومور جلوگیری می‌کند. آلکالوئید هارمین موجود در گیاه اسپند، با فعال کردن سلول‌های P53 در داخل سلول‌های سرطانی، سبب القای پدیده آپوپتوز در سلول می‌شود و با توقف تقسیم سلولی و تخریب سلول‌های توموری، از رشد و پیشرفت سلول‌های سرطانی جلوگیری می‌کند (۱۷). Wang و همکاران (۲۰۱۵) از آلکالوئیدهای اسپند علیه رشد سلول‌های سرطانی استفاده کردند و نتایج بررسی‌ها نشان داد که از بین ۱۲ نوع آلکالوئید مختلفی که روی سلول‌های سرطانی به کار بردند، آلکالوئید هارمین بیشترین اثر القایی و توقف و مرگ را در سلول‌های سرطانی داشته است و در آپوپتوز القا شده از ترکیبات گیاه اسپند، پتانسیل غشا و سطح ATP میتوکندری، به طور چشمگیری در سلول‌های سرطان خون کاهش یافته است (۲۱). طبق نتایج این تحقیق، تیمار سلول-های سرطانی HT29 با هارمین به شیوه‌ای وابسته به دوز باعث کاهش بیان Bcl-2 و همزمان افزایش بیان Bax و در مجموع، کاهش نسبت Bcl-2 به Bax شد. بالا بودن نسبت Bax به Bcl-2 یکی از شاخصه‌های پیشرفت مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی از طریق آپوپتوز است؛ پس می‌توان گفت که هارمین سبب القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی HT29 می‌شود. Abdalan و همکاران (۲۰۱۸) نیز دریافتند که عصاره آبی برگ گیاه دارمازو دارای قابلیت القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی کولون HT29 می‌باشد. به طوری که بیان ژن های Bcl-2 و Bax و در سلول‌های تیمار شده با عصاره آبی به ترتیب به میزان ۲/۸ و ۲/۲ برابر نسبت به ژن مرجع تغییر یافت. آنها بیان کردند که احتمالا عصاره آبی دارای مواد احیاکننده بیشتری بوده که توانسته مرگ آپوپتوزی بیشتری را نسبت به عصاره هیدروالکلی القا کند (۱). همسو با نتایج این تحقیق محققین دریافتند که هارمین بیان ژن های Bax و Bcl-2 را در لاین‌های سلول سرطان سینه MDA-MB-231 و MCF-7 تحت تاثیر قرار داد که نتایج این تحقیق را تایید می‌کند (٤). مولکول‌های پروآپوپتوتیک از قبیل Bax باعث افزایش نفوذپذیری غشای میتوکندری می-شوند. یک فرضیه این است که این پروتئین‌ها سبب ایجاد کانال در غشای میتوکندری شده و باعث می-شوند که محتویات ماتریکس میتوکندری به بیرون نشت کند. فرضیه دیگر این است که پروتئین‌های

پروآپوپتوتیک سبب تغییر کنفورماسیون کانال‌های آنیونی وابسته به ولتاژ می‌شوند که سبب می‌شود پروتئین‌های درشت از انها عبور کنند (۱۰). جفت شدن مولکول‌های پروآپوپتوتیک با پروتئین‌های آنتی-آپوپتوتیک (Bcl-2) اثر آنتی‌آپوپتوتیک آنها را خنثی می‌کند. بنابراین میزان نسبی واسطه‌های پروآپوپتوتیک و آنتی‌آپوپتوتیک، میزان سیتوکروم c در دسترس برای تشکیل آپوپتوزوم را تعیین می‌کند (۱۵).

نتیجه‌گیری

استفاده از ترکیبات طبیعی همچون گیاهان دارویی در زمینه پزشکی و داروسازی توانسته یک استراتژی موثر جهت مقابله با بیماری‌های مختلف ارائه دهدکه دارای اثرات جانبی و هزینه کمتری می‌باشند. نتایج این مطالعه سمیت هارمین به صورت وابسته به غلظت بر آپوپتوز و مهار رشد سلول‌های سرطانی کولون HT29 را نشان داد. همچنین برای تحقیقهای آتی، بررسی دقیق مسیر سیگنالینگ القاءکننده آپوپتوز در مدل‌های انسانی و حیوانی با هدف درمان بیماران مبتلا به سرطان روده بزرگ، ساخت داروهای ضدسرطان پیشنهاد میشود.

تشکر و قدردانی

از همکاران مرکز تحقیقات و بیولوژی کاربردی و تکوین جانوری دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد، صمیمانه سپاسگزاری می‌شود.

منابع

1. Abdalan S., Baghbani-Arani F., Sadat Shandiz S.A. 2018. Evaluation of Anticancer Effect of Aqueous and Hydroalcoholic Extracts of Quercusin Fectoria Leaf against Colon Cancer HT29 Cell Line. *Journal of Arak University of Medical Sciences*, 21(4) :48-57.

2. Ahamed A., Panneerselvam A., Alaklabi A., Arif I.A., Ambikapathy V., Thajuddin N. 2020. Molecular perspective and anticancer activity of medicinal plants. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 27(2): 666-675.

3. Chen Q., Chao R., Chen H., Hou X., Yan H., Zhou S., Peng W., Xu A. 2013. Antitumor and neurotoxic effects of novel harmine derivatives and structure-activity relationship analysis. *International Journal of Cancer*, 114(5):675-82.

4. Ding Y., He J., Huang J., Yu T., Shi X., Zhang T., Yan G., Chen S., Peng C. 2019. Harmine induces anticancer activity in breast cancer cells via targeting TAZ. *International journal of oncology*, 54(6): 1995-2004.

5. Gianchecchi E., Fierabracci A. 2020 Feb. Insights on the Effects of Resveratrol and Some of Its Derivatives in Cancer and Autoimmunity: A Molecule with a Dual Activity. *Antioxidants*, 9(2): 91.

6. Hamsa T.P., Kuttan G. 2011. Harmine activates intrinsic and extrinsic pathways of apoptosis in B16F-10 melanoma. *Chinese Medicine*, 6(1):11.

7. Hamsa T.P., Kuttan G. 2010. Harmine inhibits tumour specific neo-vessel formation by regulating VEGF, MMP, *TIMP and Pro-Inflammatory Mediators Both in Vivo and in Vitro*, 649(1-3):64-73.

8. Hassan M., Watari H., AbuAlmaaty A., Ohba Y., Sakuragi N. 2014. Apoptosis and molecular targeting therapy in cancer. *BioMed research international*, 2014:150845.

9. Ibraheam I.A., Hussein H.M., Hameed I.H. 2018. Potential uses and Analysis of Bioactive Natural Compounds of Peganum harmala. *International Journal of Pharmaceutical Quality Assurance*, 9(02):153-157.

10. Ismail M.M., Farrag A.M., Harras M.F., Ibrahim MH, Mehany AB. 2020 Jan. Apoptosis: A target for anticancer therapy with novel cyanopyridines. *Bioorganic Chemistry*, 94:103481.

11. Jimenez J., Riveron-Negrete L., Abdullaev F., Espinosa-Aguirre J., Rodríguez-Arnaiz R. 2008. Cytotoxicity of the β-carboline alkaloids harmine and harmaline in human cell assays in vitro. *Experimental and Toxicologic pathology*, 60(4-5): 381-389.

12. Kola P., Metowogo K., Kantati Y.T., Lawson-Evi P., Kpemissi M., El-Hallouty SM, Mouzou AP, Eklu-Gadegbeku K., Aklikokou K.A. 2020. Ethnopharmacological Survey on Medicinal Plants Used by Traditional Healers in Central and Kara Regions of Togo for Antitumor and Chronic Wound Healing Effects. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 6940132:1-12.

13. Liu J., Li Q., Liu Z., Lin L., Cao M., Jiang J. 2016. (Harmine induces cell cycle arrest and mitochondrial pathway-mediated cellular apoptosis in SW620 cells via inhibition of the Akt and ERK signaling pathways. *Oncology Reports*, 35(6): 3363-3370.

14. Omara T., Kiprop A.K., Ramkat R.C., Cherutoi J., Kagoya S., Moraa Nyangena D., Azeze Tebo T., Nteziyaremye P., Nyambura Karanja L., Jepchirchir A., Maiyo A. 2020. Medicinal plants used in traditional management of cancer in Uganda: a review of ethnobotanical surveys, phytochemistry, and anticancer studies. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2020:3529081.

15. Pfeffer C.M., Singh A.T. 2018. Apoptosis: a target for anticancer therapy. *International journal of molecular sciences*, 19(2):448.

16. Roostaee Z. 2018. Effect of alkaloids belong to β-carbolines family in *Peganum harmala* on cancer cells. *Sarem Journal of Reproductive Medicine*, 2(2):73-78.

17. Roshankhah S., Arji Rodsari B., Jalili C., Salahshoor M.R. 2020. The Role of Harmine in Up-regulating p53 Gene Expression and Inducing Apoptosis in MCF-7 Cell Line. *Middle East Journal of Cancer*, 11(1):34-41.

18. Ruan S., Jia F., Li J. 2017. Potential antitumor effect of harmine in the treatment of thyroid cancer. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2017:9402615.

19. Siegel R., DeSantis C., Jemal A. 2014. Colorectal cancer statistics. *CA: a cancer journal for clinicians*, 64(2):104-17.

20. Siegel R.L., Miller K.D., Goding Sauer A., Fedewa S.A., Butterly L.F., Anderson J.C., Jemal A. 2020. Colorectal cancer statistics. *CA: a Cancer Journal for Clinicians*, 70(3):145-164.

21. Wang C., Zhang Z., Wang Y., He X. 2015. Cytotoxic indole alkaloids against human leukemia cell lines from the toxic plant Peganum harmala. *Toxins*, 7(11): 4507-4718.

22. Wijesinghe W.P., Mantilaka M.M., Weerasinghe A.M., de Silva K.N., Gamagedara T.P., Rajapakse R.M. 2016. Colloidal hydroxyapatite/poly (acrylic acid) hybrids using calcium sucrate and ammoniumdihydrogen orthophosphate. *Journal of Applied Solution Chemistry and Modelling*, 5:21-29.

23. Wu L.W., Zhang J.K., Rao M., Zhang Z.Y., Zhu H.J., Zhang C. 2019. Harmine suppresses the proliferation of pancreatic cancer cells and sensitizes pancreatic cancer to gemcitabine treatment. *OncoTargets and therapy*, 12:4585.

24. Zhang H., Jiao Y., Shi C., Song X., Chang Y., Ren Y., Shi X. 2018. Berbamine suppresses cell proliferation and promotes apoptosis in ovarian cancer partially via the inhibition of Wnt/β-catenin signaling. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 50(6): 532-539.

25. Zou N., Wei Y., Li F., Yang Y., Cheng X., Wang C. 2017. The inhibitory effects of compound Muniziqi granule against B16 cells and harmine induced autophagy and apoptosis by inhibiting Akt/mTOR pathway. *BMC Complement Alternative Medicine*, 17:517.

Apoptosis induction of Harmine on Human Colon Cancer Cell Line HT29 and Alteration in Apoptotic Genes Expression P53, Bax and Bcl-2

Reyhaneh Chitbandi [1], Javad Baharara[2*], Maryam Tehranipour [1]

1) Department of Biology, Islamic Azad University, Mashhad Branch, Mashhad, Iran
2) Department of Biology & Research Center for Animal Development Applied Biology, Islamic Azad University, Mashhad Branch, Mashhad, Iran

Abstract

Alkaloids have anti-proliferative and apoptotic stimulatory effects on cancer cells. Moreover, Harmine is one of the key alkaloids reported to have anticancer effects. The aim of this study was to investigate the effect of Harmine on apoptosis induction in human HT29 colon cancer cell line and expression alteration of apoptotic genes P53, Bax and Bcl-2. To this end, HT29 colon cancer cells were treated with different concentrations of Harmine (0, 35, 45, 55, and 65 µg/ml) for 24 hours. Then, the cell viability was assessed using the MTT assay. Nuclear changes and chromatin condensation were investigated by DAPI staining. Besides, apoptosis induction was determined by Annexin V-FITC testing and changes in P53, Bax and Bcl-2 genes expression was assessed by using Real Time PCR. The results showed that the concentration of Harmine reduced the viability of HT29 colon cancer cells. Frthermore, the treatment of HT29 colon cancer cells with Harmine caused morphological changes in the cell nucleus, including chromatin condensation of the nucleus, the formation of apoptotic bodies, and the wrinkling of the cell membrane. All of these morphological features indicate apoptosis. in addition, the results of the Annexin test confirmed this finding; with about 57% of the cells undergoing apoptosis. On the other hand, the treatment of HT29 cancer cells with Harmine reduced the expression of Bcl-2 and at the same time increased the expression of P53 and Bax and, in general, reduced the ratio of Bcl-2 to Bax. Consequently, Harmine can be used to treat colon cancer cells due to its cytotoxicity, being effective in inhibiting cell proliferation and inducing apoptosis.

Key words: Harmine, Colon Cancer, Cytotoxicity, Apoptosis