زیست‌شناسی جانوری، سال شانزدهم، شماره اول، پاییز ۱۴۰۲، صفحات ۲۷۷-۲۶۷

مقاله پژوهشی

بررسی اثر ریشه گیاه دیوخار ترکمنی (*Lycium depressum*) بر بیان ژن‌های *Bcl2*، *Bax* و ارزیابی فعالیت کاسپازهای ۳ و ٦ در سلول‌های سرطانی دهانه رحم (هلا)

یاسمین خانی[۱]، طاهره ناجی[۱*]، سهیلا زمانلوی بنیسی[۲]، سعید محمدی معتمد[۳]

۱- گروه داروسازی و علوم دارویی، واحد علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲- گروه سلول‌های بنیادی و سلول درمانی، پژوهشکده مهندسی بافت و پزشکی بازساختی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۳- گروه فارماکوگنوزی، دانشکده داروسازی و علوم دارویی، وحد علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

*مسئول کاتبات: tnaji2002@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۱/۱۱ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۲/۰۱

DOI: 10.22034/ascij.2023.1979055.1463

چکیده

سرطان رحم سومین علت مرگ ناشی از سرطان، در زنان می‌باشد. پس از سرطان سینه، سرطان گردن رحم شایع‌ترین سرطان در زنان است. امروزه به دلیل عوارض جانبی متعدد شیمی‌درمانی و پرتو درمانی که در اثر استفاده از آنها برای بیمار ایجاد می‌شود و همچنین مقاومت سلول‌های سرطانی به درمان های رایج باعث شده است که محققین رو به داروهای جدید با اثر بیشتر و سمیت کمتر بیاورند. هدف از بررسی حاضر ارزیابی اثر ریشه گیاه دیوخار ترکمنی بر بیان ژن‌های *Bcl2*، *Bax* و ارزیابی فعالیت کاسپازهای ۳ و ٦ در سلول‌های سرطانی دهانه رحم(هلا) بود. در این مطالعه ابتدا عصاره گیاه دیوخار ترکمنی به روش خیساندن بدست آمد، در ادامه سلول‌های سرطانی گردن رحم تهیه و کشت داده شدند، به منظور محاسبه دوز بهینه اثر بخشی عصاره از تکنیک MTT استفاده شد. غلظت‌های ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر به عنوان دوزهای بهینه انتخاب شدند. سپس ارزیابی بیان ژن‌های *Bcl2* ، *Bax* توسط تکنیک Real-time PCR انجام شد. در ادامه به منظور ارزیابی فعالیت کاسپازهای ۳ و ٦ در دوزهای موثر عصاره بر روی سلول‌های سرطانی دهانه رحم (هلا) اثر داده شدند و با استفاده از تکنیک ایمونوسیتوشیمی (ICC) بیان پروتئین اندازه گیری شد. نتایج این پژوهش نشان داد که ریشه گیاه دیوخار ترکمنی می‌تواند تغییراتی در بیان ژن‌های مهم *Bcl2* و *Bax* در مسیر القاء آپوپتوز ایجاد نماید. علاوه بر این بیان پروتئین کاسپاز ۳ و ٦ را در سلول‌های سرطانی افزایش می‌دهد. پس می‌توان امید داشت در تحقیقات تکمیلی بر روی عصاره ریشه گیاه دیوخار ترکمنی به عنوان یک کاندید در درمان طب مکمل مد نظر قرار گیرد.

کلمات کلیدی: سرطان رحم، گیاه دیوخار ترکمنی، آپوپتوز، بیان ژن.

مقدمه

سال‌هاست که بیماری سرطان افراد بسیار زیادی را مورد آسیب قرار داده است و دومین علت جهانی مرگ ومیر پس از بیماری‌های قلبی و عروقی می‌باشد (۷). البته نمی‌توان تمام دلایل ایجاد سرطان را به ژنتیک نسبت داد، در حال حاضر به نظر می‌رسد که علت حدود ۷۵ درصد سرطان‌ها عوامل محیطی باشند. از جمله عوامل محیطی می‌توان به مواد شیمیایی مثل مواد موجود در دود سیگار یا مواد شیمیایی موجود در رنگ‌ها یا داروها اشاره کرد.

علاوه بر آن اشعه ماورای بنفش موجود در نور خورشید یا اشعه ایکس از عوامل شناخته شده سرطان هستند که اگر فرد بصورت کنترل نشده در معرض آنها باشد دچار سرطان خواهد شد. درصد بالایی از سرطان‌ها محصول محیط زیست است، ۳۰ درصد از دود سیگار، ۳۵ درصد از رژیم غذایی، ۲۵ درصد از بیماری‌های عفونی و ۱۰ درصد از اشعه‌های یونی و غیریونی (۱۸، ۲۰). پس از سرطان سینه، سرطان گردن رحم شایع‌ترین سرطان در زنان است. این سرطان بر اثر ابتلا به ویروس پاپیلومای انسانی ایجاد و از طریق تماس جنسی با فرد مبتلا منتقل می‌شود (۳، ٦). مصرف سیگار، داشتن شرکای جنسی متعدد، آلودگی به ویروس پاپیلومای انسانی و قرص‌های پیشگیری از بارداری از عوامل خطر احتمالی ابتلا به این سرطان به شمار می‌روند (۱۳، ۱۵). سرطان مهاجم دهانه رحم به دلیل دارا بودن یک دوره طولانی قبل از تهاجم، در دسترس بودن برنامه غربالگری مناسب و درمان موثر ضایعات اولیه، به عنوان یک سرطان قابل پیشگیری شناخته شده است (۱۱، ۱۲). سلول‌های هلا (HeLa) رده‌ای از سلول سرطانی انسانی است که در سال ۱۹۵۱ از سرطان گردن رحم جدا شد و اکنون در بسیاری از مطالعات بر روی سلول‌های سرطانی مورد استفاده قرار می‌گیرد (۸، ۱۰).

از آنجا که بسیاری از داروهای شیمیایی باعث اختلالات گوارشی، آسیب های کلیوی و... می شوند، دانشمندان به دنبال یافتن داروهایی هستند که عوارض جانبی کمتری نسبت به داروهای شیمیایی داشته باشند، در این راستا گیاهان دارویی مورد توجه بسیار قرار گرفته‌اند. گیاهان دارویی به علت همراه داشتن ترکیبات دیگری همراه با ترکیب با اثر دارویی خاص از عوارض جانبی کمتری نسبت به داروهای شیمیایی برخوردارند (١٤). بسیاری از گیاهان و ادویه ها حاوی عواملی برای جلوگیری از سرطان هستند که می توانند اثرات خود را در مراحل مختلف شروع و رشد سلول‌های سرطانی اعمال کنند (۱). بسیاری از کاربردهای مفید گیاهان دارویی به طور گسترده در سیستم طب سنتی بسیاری از فرهنگ‌ها ثبت شده است. داروهای سنتی گیاهی پتانسیل زیادی برای کشف داروهای جدید ضد سرطان دارند. در همین حال، مواد گیاهی که می‌توانند به طور انتخابی مسیرهای سلولی را برای مهار آپوپتوز در سلول‌های توموری مختل کنند، در سال‌های اخیر مورد توجه محققان در درمان های جدید، القاء آپوپتوز قرار گرفته است (۲۱). از طرفی داروهای گیاهی می‌توانند با ایجاد اختلال در هموستاز سلولی موجب القاء مرگ سلولی شود (٤، ۱۹). تحقیقات نشان داده است ریشه گیاه *Lycium depressum* خاصیت آنتی اکسیدانی و ضد توموری دارد و این خاصیت به خاطر وجود مقادیر زیاد propionyl- dicaffeoylspermidine و dicaffeoylspermine isomers می باشد (۲۲). ریشه گیاه *Lycium depressum* عمدتا برای درمان اختلال عملکرد سیستم ایمنی، دیابت، کبد چرب و سرطان مورد استفاده قرار می‌گیرد (٢٤).

کشت سلول به فرایند کشت سلول‌های پروکاریوتی یا یوکاریوتی در یک محیط کشت، گفته می‌شود. این اصطلاح بیشتر در مورد کشت سلول‌های جانداران پرسلولی کاربرد دارد. در این فرایند، سلول‌ها در محیط آزمایشگاهی یا برون‌تنی و تحت شرایط کنترل‌شده، رشد داده می‌شوند و برای بررسی بیان ژن‌های *Bax* و *Bcl2* و ارزیابی کاسپاز ۳ و ٦ مورد استفاده قرار می‌گیرد.

ژن*Bax* مخفف *Bcl-2-associated X protein* می باشد، ژن *Bax* نخستین عضو ایجاد کننده مسیر آپوپتوز در خانواده پروتئین *Bcl-2* می‌باشد که در ارزیابی‌های ژنتیکی مورد شناسایی قرار گرفته است. امروزه ثابت شده است که ژن‌های *Bax* و *Bcl-2* از جمله ژن‌های مهم دخیل در مسیر میتوکندریایی آپوپتوز به شمار می‌روند. همکاری نزدیک این دو ژن به حدی است که در بررسی‌ها مشخص شده است این ژن‌ها نقش بسیار کلیدی در فرآیند مرگ سلولی دارند. از آنجا که در سلول‌های سرطانی تعادل بین تکثیر و آپوپتوز به هم خورده و سلول‌ها برای رشد و تکثیر بیرویه خود نیاز به آپوپتوز

دارند، ارتباط مستقیمی میان بیان این ژن‌ها و فرآیند سرطانی شدن وجود دارد. لذا بررسی تغییرهای بیانی این ژن‌های مهم می‌تواند از جمله هدف‌های درمانی یا تشخیصی در مطالعات سرطان به شمار رود. پروتئین *Bax* با خنثی‌کردن عمل *Bcl2*، مسیر فرآیند آپوپتوز را فعال می‌نماید و تغییرات بافت شناختی مشخصی ازجمله: قطعه‌قطعه شدن DNA ژنومی، کاهش یا عدم چسبندگی سلول آپوپتوزی به سلول‌های دیگر، آزادسازی ریبوزیم‌ها و تجزیه سلول به اجسام آپوپتوزی و سلول در حال مرگ را ایجاد می‌نماید. افزایش مقادیر *Bax* موجب افزایش میزان آپوپتوز و کاهش آن باعث بقای سلول و ترمیم آن می‌گردد. علاوه بر این افـزایـش مقـادیر *Bcl2* در جهت بقاء و ترمیم سلول است و آپوپتوز را مهار می‌نماید؛ بنابراین تعادل بین *Bax/Bcl2* یک عامل مهم در تعیین میزان فرآیند آپوپتوز به شمار می‌رود (۱۷).

کاسپازها انواعی از پروتئازهای سیستیین-آسپارتات مربوط به مسیر آپوپتوز می‌باشند کـه نقش مهمی در تنظیم و اجرای آپوپتوزیس ایفا می‌کنند. کاسپاز ۳ که از دو واحد ۱۷ و ۱۲ کیلودالتونی تشکیل شده‌است، توسط کاسپاز ۸ ، کاسپاز ۹ و کاسپاز ۱۰ فعال شده و خود به نوبه خود، کاسپاز ٦ و کاسپاز ۷ را فعال می‌کند. کاسپاز ٦ در آپوپتوز، پاسخ اولیه ایمنی و دژنرسانس عصبی در بیماری هانتینگتون و بیماری آلزایمر نقش دارد. این آنزیم توسط کاسپاز ۷، کاسپاز ۸ و کاسپاز ۹ فعال می‌شود و در این میان، با کاسپاز ۸، تعامل پروتئین-پروتئین دارد (۵، ۹). با توجه به اینکه سرطان دهانه رحم یکی از سرطان های شایع در بین زنان است لذا در این تحقیق اثر ریشه گیاه دیوخار ترکمنی (*lycium depressum*) بر بیان ژن‌های Bcl2، Bax و فعالیت کاسپازهای ۳ و ٦ در سلول‌های سرطانی دهانه رحم (هلا) مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها

عصاره گیری از گیاه دیوخار ترکمنی: گیاه از محوطه دانشگاه علوم پزشکی مشهد جمع آوری و در مطالعه از ریشه گیاه استفاده شد.این گیاه توسط مرکز هرباریوم دانشگاه آزاد واحد علوم دارویی با voucher NO:1649-AUPF مورد تایید قرار گرفت. عصاره گیری به روش خیساندن انجام شده است.

تهیه و آماده سازی سلول: رده سلولی سرطان دهانه رحم (هلا) از مرکز ذخایر ژنتیک (ایران-تهران) تهیه گردید. به منظور کشت رده سلولی دهانه رحم(هلا)، محیط کشت DMEM و FBS به نسبت ۹۰ به ۱۰ درصد به سلول‌ها اضافه شد. به این محیط کشت ۱ درصد آنتی بیوتیک پنی استرپتومایسین اضافه گردید. سلول‌ها در فلاسک کشت در انکوباتور کشت با میزان ۵ درصد CO_2 و دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲٤ ساعت قرار داده شد. پس ازگذشت این مدت سلول‌ها مورد ارزیابی تراکمی قرار گرفت. با گذشت چند روز از کشت سلول‌های سرطانی و رشد زیاد آن ها و چسبیدن سلول‌های سرطانی به کف فلاسک، پاساژ سلولی انجام گردید.

تست زنده مانی سلولی: جهت بدست آوردن IC_{50} از نتایج تست MTT در زمان‌های ۲٤، ٤۸ و ۷۲ ساعت استفاده گردید. پس از شمارش سلول‌ها، با توجه به نوع رده سلولی یا بافت سرطانی، تعداد 10^4سلول درهرچاهک پلیت ۹٦ خانه قرارگرفت. بدین منظور در سه پلیت ۹٦ خانه به صورت ۳ بار تکرار تعداد 10^4 سلول سرطانی گردن رحم (هلا) در هر چاهک کشت شد. سپس روی سلول‌ها ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت اضافه گردید و به مدت ۲٤ ساعت درون انکوباتور ۳۷درجه سانتیگراد تحت تأثیر ۵ درصد CO_2 قرار گرفت. در ادامه سپس محیط کشت رویی دور ریخته شد. سپس از غلظت‌های ۳/۱۲، ٦/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵، ۵، ۱۰۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر از عصاره به سلول‌ها اضافه گردید بدین ترتیب در هر چاهک مجموع میزان محیط کشت و عصاره گیاه ۲۰۰ لاندا شد. به تیمار در سه دوره زمانی ۲٤، ٤۸ و ۷۲ ساعت صورت پذیرفت و درصد زنده مانی سلول‌ها با استفاده از تکنیک MTT محاسبه گردید. بدین ترتیب که به مایع رویی سلول‌ها ۵۰ میکرولیتر محلولMTT اضافه شد و پلیت ها در حدود ۳

ساعت در انکوباتور۳۷ درجه قرار داده شد، محیط رویی سلول‌ها کاملاً با احتیاط برداشته شد و به هرچاهک ۲۰۰ میکرولیتر DMSOاضافه گردید. بلورهای فورمازان تشکیل شده درDMSO حل شدند و محلول بنفش رنگی ایجاد گردید. در ادامه شدت رنگ تولید شده توسط دستگاه الایزا ، در طول موج ۵۴۰ تا ۶۳۰ نانومتر اندازه گیری می‌شود و به طور مستقیم با تعداد سلول‌های زنده متناسب است.

استخراج RNA: سوسپانسیون سلولی موجود سانتریفیوژ گردید. محیط رویی سلول‌ها دور ریخته شد و رسوب سلولی در مقدار مشخصی ترایزول (۱ میلی‌لیتر ترایزول به ازای ۵ الی ۱۰ میلیون سلول) لیز گردید. لیزات سلولی حاصل در میکروتیوب ۱/۵ میلی‌لیتر جمع‌آوری گردید. به ازای ۱ میلی‌لیتر ترایزول اضافه شده در مرحله اول، مقدار ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم به نمونه‌ها اضافه کرده و ۱۵ ثانیه تکان داده تا مخلوط شوند (بدون ورتکس) میکروتیوب‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای محیط انکوبه شدند و سپس به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه و دمای ٤ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شد. فاز شفاف رویی حاوی RNA جدا شده و به میکروتیوب دیگری منتقل گردید. به میکروتیوب های حاوی فاز شفاف رویی ایزوپروپانول اضافه شد (۵۰۰ میکرولیتر به ازای ۱ میلی‌لیتر ترایزول اضافه شده) و دو مرتبه میکروتیوب‌ها سر و ته شدند (inverting) تا محتویات میکروتیوب‌ها مخلوط شوند. سپس به مدت ۱۰ دقیقه در دمای فریزر ۲۰- انکوبه شدند. به منظور رسوب RNA، نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۲۰۰۰ دور و دمای ٤ درجه سانتریفیوژ شدند. محلول رویی تخلیه شده و رسوب ها با اتانول ۷۵ درصد شستشو داده شدند به این صورت که مقدار ۲۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۵ درصد به هر میکروتیوب اضافه شده و چند ثانیه ورتکس انجام شد تا رسوب کاملا در اتانول شسته شده و ناخالص ها جدا شوند. سانتریفیوژ در ۷۵۰۰ دور به مدت ۵ دقیقه در دمای ٤ درجه انجام شد. محیط رویی تخلیه و میکروتیوب ها به مدت ۱۵ دقیقه بر روی دستمال کاغذی استریل وارونه قرار داده شدند تا رسوب نیمه خشک شده و الکل تبخیر شود. پس از نیمه خشک شدن رسوب، مقدار ۲۰ الی ۳۰ میکرولیتر آب DEPC یا عاری از RNase به هر میکروتیوب اضافه شد تا رسوب RNA در آن حل شود. برای حل شدن رسوب می‌توان میکروتیوب‌ها را به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۵۵ تا ۶۰ درجه سانتیگراد قرار داد. نمونه‌های استخراج شده در دمای ۲۰- برای نگهداری کوتاه مدت یا ۸۰- درجه برای نگهداری بلند مدت قرار داده شوند.

سنتز c-DNA: جهت تهیه میکس RT، مواد لازم برای ساخت CDNA شامل بافر RT ، آنزیم RT، پرایمر Oligo Dt و آب DEPC با یکدیگر مخلوط شده و سپس در حجم های ۹ میکرولیتر در میکروتیوب‌های ۰/۲ میلی‌لیتری توزیع شدند. میکروتیوب‌های آماده شده حاوی RT mix و نمونه RNA در دستگاه ترموسایکلر یا Dry block heater گذاشته شد و برنامه دمایی اجرا گردید. نمونه‌های cDNA آماده شده تا زمان استفاده در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند. ابتدا تمامی مواد لازم جهت PCR از فریزر در آورده شد و کمی ورتکس و سپس اسپین شوند و بر روی یخ نگهداری شدند. سپس برای هر ژن مخلوطی از اجزای مختلف PCR تهیه و پس از میکس کردن و اسپین در مقادیر ۹ میکرولیتری داخل میکروتیوب های مخصوص دستگاه توزیع شد و در هر ویال یک میکرولیتر از نمونه cDNA مورد نظر اضافه گردید(حجم نهایی هر واکنش PCR ،۱۰ میکرولیتر می باشد). میکروتیوب های آماده حاوی واکنش PCR ، پس از میکس و ورتکس در دستگاه قرار داده شده و برنامه دمایی اجرا گردید. پس از پایان آزمایش، دیتاهای حاصل شامل اعداد CT یا سیکل آستانه (Threshold cycle)، منحنی های تکثیر و ذوب مربوط به هر ژن آماده جهت آنالیز می باشد. اعداد CT مربوط به ژن رفرنس و ژن اصلی هر نمونه در فرمول $2^{-\Delta\Delta CT}$ تغییرات بیان نسبی هر ژن محاسبه گردید.

بررسی ایمونوسیتوشیمی کاسپاز ۳ و ٦: ابتدا سلول‌های داخل پلیت را با پارافرمالدئید٤ درصد به مدت ۲۰ دقیقه فیکس کرده سپس نمونه‌ها با PBS استریل در ۳ مرحله و به فاصله ۵ دقیقه شستشو داده می‌شوند. در ادامه به سلول‌ها تریتون ۰/۳ درصد به مدت ۳۰ دقیقه به منظور نفوذ پذیر کردن غشاء سلول‌ها به نمونه‌ها اضافه گردید ومجددا نمونه‌ها با PBS شستشو داده شدند. در ادامه سرم بز ۱۰ درصد برای مدت ٤٥ دقیقه به منظور بلوک کردن واکنش آنتی بادی ثانویه به نمونه‌ها اضافه گردید. پس از برداشتن سرم بز، آنتی بادی اولیه رقیق شده ۱ به ۱۰۰ با PBSرا بر روی نمونه‌ها ریخته و نمونه به مدت ٢٤ ساعت در یخچال با دمای ۲ تا ۸ درجه قرار داده می‌شود. پس از گذشت ٢٤ ساعت پلیت از یخچال خارج و ٤ مرتبه و هر بار به مدت ۵ دقیقه با PBS شستشو داده شده، سپس آنتی بادی ثانویه با رقت ۱ به ۱۵۰ به نمونه اضافه می‌شوند و در انکوباتور ۳۷ درجه (مدلAriaTeb) به مدت ۱ ساعت و ۳۰ دقیقه در تاریکی انکوبه گردید. در ادامه نمونه از انکوباتور به اتاق تاریک منتقل و بعد از ۳ بار شستشو با PBS، به نمونه‌ها رنگ DAPI (Sigma) اضافه گردید. پس از گذشت ۲۰ دقیقه نمونه با PBS شستشو داده شد. سپس عکس برداری با میکروسکوپ فلورسنت (Olympus) انجام شد.

نتایج

مطابق شکل ۱ در مقایسه با گروه کنترل، به مدت های٢٤، ٤٨ ،٧٢ ساعت در حضور غلظت‌های غلظت‌های ۳/۱۲، ٦/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵، ۵، ۱۰۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر عصاره ریشه گیاه دیوخار ترکمنی، زنده مانی سلول‌ها مورد بررسی قرار گرفت، همانطور که در نتایج نمودار مشاهده می‌شود در غلظت ۳/۱۲ میلی‌گرم/میلی‌لیتر کشندگی در هر سه دوره زمانی نسبت به گروه کنترل کمتر از سایر غلظت ها می باشد، این در حالیست که در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر در تمامی دوره های زمانی کشندگی عصاره بسیار بالاتر از سایر غلظت هاست. همانطور که نتایج نشان می دهد با کاهش غلظت و کاهش زمان در معرض قرار گرفتن سلول‌های سرطانی هلا با عصاره میزان بقاء سلول‌ها ارتباط مستقیمی وجود دارد. با توجه به نتایج به دست آمده، و محاسبه IC50 غلظت ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر به عنوان دوز بهینه انتخاب شد.

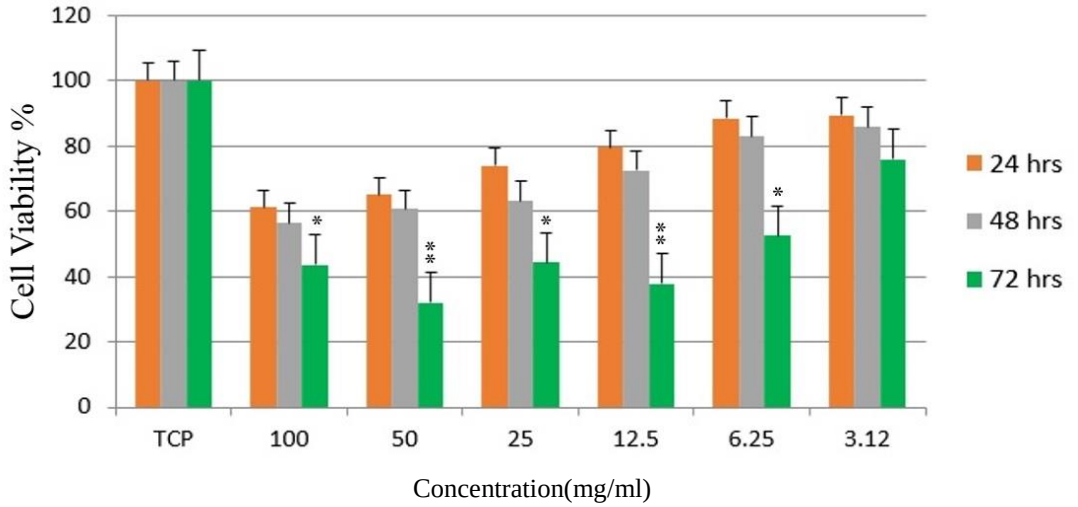
نتایج آنالیز فعالیت کاسپاز ۳: نتایج ارزیابی فعالیت کاسپاز ۳ همانطور که در شکل ۲ مشخص است نشان می دهد که این پروتئین در غلظت ۲۵ میلیگرم/میلی‌لیتر نسبت غلظت ۵۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر بیان کمتری دارد. در مقابسه با گروه کنترل مشاهده می‌شود کاسپاز ۳ وابسته به افزایش غلظت، افزایش بیان پروتئین دارد. آنالیز نتایج با استفاده از نرم افزار imagej جهت کمی‌سازی تصاویر تایید کننده این موضوع است، همانطور که در نمودار۲ نشان داده شده است هم در غلظت ۲۵ و هم در غلظت ۵۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر عصاره به طور معناداری ($p \leq$ ۰/۰۵) بیان پروتئین کاسپاز ۳ افزایش پیدا کرده است.

نتایج ارزیابی بیان ژن‌های *Bax* و *Bcl2*: بیان ژن *Bax* همانطور که در شکل ٤ مشخص است نشان می دهد که در غلظت ۲۵ میلی‌گرم/میلی‌لیتر نسبت به غلظت ۵۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر بیان کمتری دارد. در مقایسه با گروه کنترل (TCPS) مشاهده می‌شود بیان ژن با افزایش غلظت، افزایش می‌یابد. افـزایش مقادیر *Bax* موجب افزایش میزان آپوپتوز و کاهش آن باعث بقـای سلول و ترمیم آن می‌گردد، بنابراین این افزایش بیان ژن معنی‌دار می‌باشد.

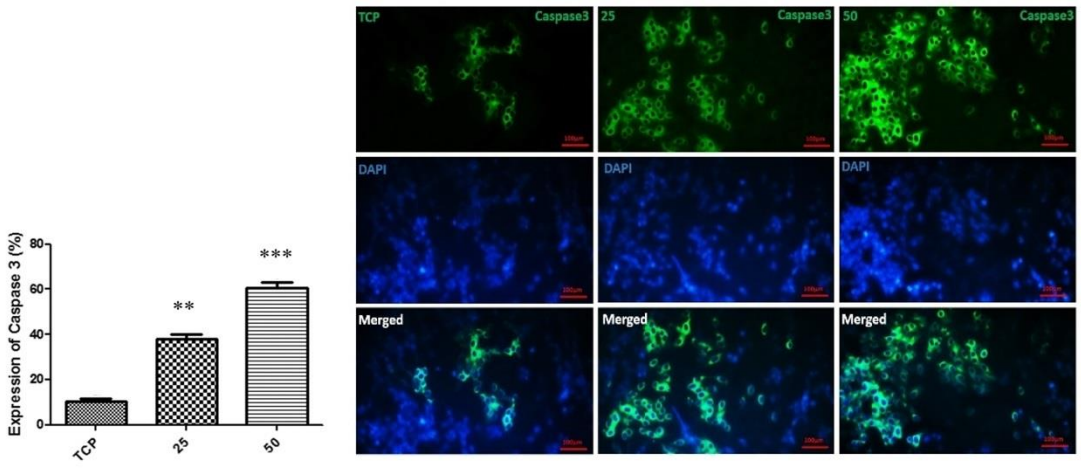
نتایج ارزیابی بیان ژن‌های *Bax* و *Bcl2*: بیان ژن *Bax* همانطور که در شکل ٤ مشخص است نشان می دهد که در غلظت ۲۵ میلی‌گرم/میلی‌لیتر نسبت به غلظت ۵۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر بیان کمتری دارد. در مقایسه با گروه کنترل (TCPS) مشاهده می‌شود بیان ژن با افزایش غلظت، افزایش می یابد. افـزایش مقادیـر *Bax* موجب افزایـش میزان آپـوپتوز و کـاهش آن بـاعث بقـای سـلول و تـرمیـم آن مـی گردد، بنابراین این افزایش بیان ژن معنی دار می باشد.

نتایج آنالیز فعالیت کاسپاز ٦ : نتایج ارزیابی فعالیت کاسپاز ٦ همانطور که در شکل ۳ مشخص است نشان می دهد که این پروتئین در غلظت ۲۵ میلی‌گرم/میلی‌لیتر نسبت غلظت ۵۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر بیان کمتری دارد. در مقابسه با گروه کنترل مشاهده می‌شود کاسپاز ٦ وابسته به افزایش غلظت، افزایش بیان پروتئین دارد. آنالیز نتایج با استفاده از نرم افزار imagej جهت کمی سازی تصاویر تایید کننده این موضوع است، همانطور که در نمودار۳ نشان داده شده است هم در غلظت ۲۵ و هم در غلظت ۵۰ میلیگرم/میلی‌لیتر عصاره به طور معناداری ($p \leq ۰/۰۵$) بیان پروتئین کاسپاز ٦ افزایش پیدا کرده است.

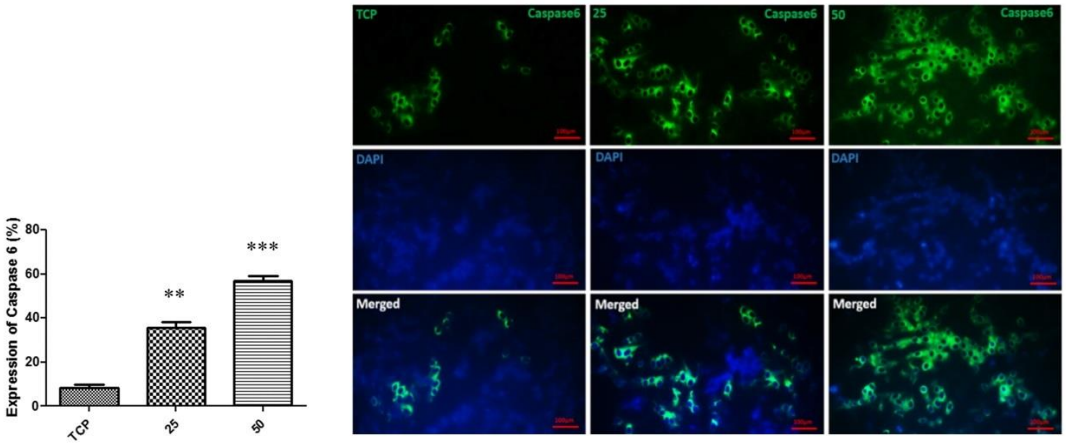
بیان ژن *Bcl2* همانطور که در شکل ۵ مشخص است نشان می‌دهد که در غلظت ۲۵ میلی‌گرم/میلی‌لیتر نسبت به غلظت ۵۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر بیان بیشتری دارد. در مقایسه با گروه کنترل (TCPS) مشاهده می‌شود بیان ژن با افزایش غلظت، کاهش می یابد. افزایش مقـادیر *Bcl2* در جهـت بقاء و ترمیم سلول است و آپوپتوز را مهار می‌نماید بنابراین این کاهش بیان ژن معنی‌دار می‌باشد.



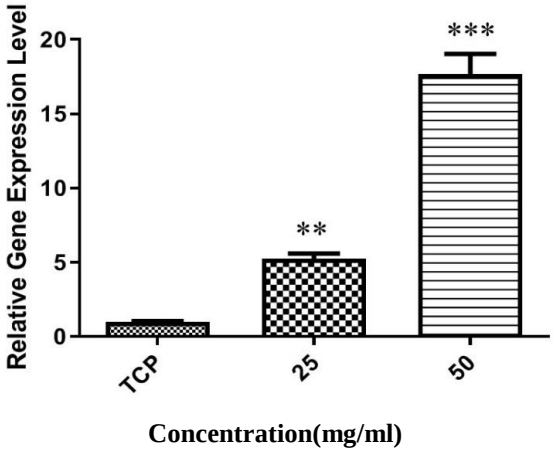
شکل۱- تست سنجش سمیت به روش MTT. غلظت‌ها بر اساس میلی‌گرم/میکرولیتر می باشد. کاهش میزان رشد در روز سوم (۷۲ ساعت) در تمامی غلظت‌ها بجزء ۳/۱۲ میلی‌گرم/میکرولیتر به طور معناداری موجب القا مرگ در سلول‌ها گردید (*P<0.05, **P<0.01).



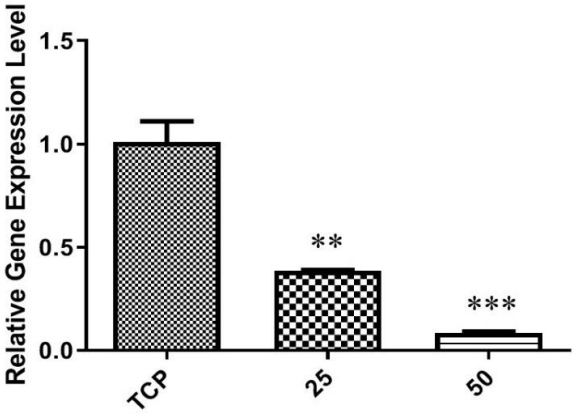
شکل۲- تصویربرداری میکروسکوپ فلورسنت از بیان پروتئین کاسپاز ۳. (بزرگنمایی با نوار مقیاس ۱۰۰ میکرومتر). نمودار کمی سازی تصاویر میکروسکوپ فلورسنت از بیان پروتئین کاسپاز ۳ توسط نرم افزار imagej (TCPS: گروه کنترل می باشد).
(*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001).



شکل۳- تصویربرداری میکروسکوپ فلورسنت از بیان پروتئین کاسپاز ٦. (بزرگنمایی با نوار مقیاس ۱۰۰ میکرومتر). نمودار کمی سازی تصاویرمیکروسکوپ فلورسنت از بیان پروتئین کاسپاز ٦ توسط نرم افزار imagej (TCPS: گروه کنترل می باشد). (*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001).



شکل ٤- نمودار کمی بیان ژن *Bax* در حضور غلظت‌های ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر از عصاره ریشه گیاه دیوخار ترکمنی. (*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001).



شکل ۵- نمودار کمی بیان ژن *Bcl2* در حضور غلظت‌های ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر از عصاره ریشه گیاه دیوخار ترکمنی. (*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001)

بحث

نتایج بدست آمده با نتایج گزارش شده توسط Lei و همکاران همسو می‌باشد، در ارزیابی Lei و همکاران مشخص شد عصاره گیاه *Lycium barbarum* مسیر سیگنال‌دهی *P53* از جمله *Cyclin*، *CDK4*، *P21*، *P53*، *Bax* و *Caspase3* را فعال می‌کند (۲۳). در بررسی حاضر هم بیان ژن *Bax* و افزایش بیان پروتئین کاسپاز ۳ و ٦ توسط عصاره گیاه *Lycium depressum* مشاهده گردید (شکل ۲ و ۳).

Zhu و همکاران در سال ۲۰۱۳ به مطالعه اثرات میوه *Lycium barbarum polysaccharide (LBP)* بر تکثیر سلولی، چرخه سلولی و آپوپتوز در سلول‌های سرطان دهانه رحم انسان (سلول‌های HeLa) پرداختند. نتایج این بررسی نشان داد *LBP* می‌تواند با تغییر توزیع چرخه سلولی و القاء آپوپتوز از تکثیر سلول‌های هِلا جلوگیری کند (۲۵). نتایج تحقیق حاضر نشان داد عصاره گیاه دیوخار ترکمنی می‌تواند با افزایش بیان ژن *Bax*، کاهش بیان ژن *Bcl2* و افزایش بیان کاسپاز ۳ و ٦ موجب افزایش القاء آپوپتوز گردد (شکل‌های ۲، ۳، ٤، ٥).

نتایج این تحقیق با نتایج Xiaox و همکاران در سال ۲۰۱۹ همسو شد. در سال ۲۰۱۹ به بررسی مقایسه ای ترکیبات شیمیایی عصاره میوه، برگ و ریشه گیاه *Lycium barbarum* پرداختند. سنجش‌ها نشان داد که عصاره ریشه دارای قوی‌ترین ظرفیت حذف رادیکال‌های آزاد است، عصاره برگ دومین و عصاره میوه کم ترین ظرفیت را دارد. به طور کلی توانایی آنتی اکسیدانی بسیار بالا عصاره برگ و ریشه با درک رایج ما که میوه توانایی آنتی اکسیدانی قوی دارد متفاوت است(۲۲). نتایج تحقیق حاضر نشان داد که عصاره ریشه گیاه دیوخار ترکمنی میتواند وابسته به دوز تاثیر مستقیمی بر سلول‌های سرطانی هلا بگذارد (شکل ۱). Moshtaghi و همکاران در سال۲۰۱٦ در یک بررسی نشان دادند که عصاره هیدروالکلی سیاهدانه در رده سلولی MCF-7 سرطان سینه موجب افزایش بیان ژن کاسپاز ۳ می‌گردد (۱٦). نتایج بررسی های تحقیق حاضرنیز تایید نمود که عصاره ریشه گیاه دیوخار ترکمنی موجب افزایش بیان ژن کاسپاز ۳ و ٦ می‌شود و با بررسی‌های Moshtaghi و همکاران همسو است (شکل‌های ۲ و ۳). در سال ۲۰۱۱ Yao و همکاران مطالعه ای جهت بررسی فیتوشیمیایی و بیولوژیکی گیاهان دارویی لیسیوم صورت گرفت. نتایج مطالعات فیتوشیمیایی روی گیاه لیسیوم منجر به شناسایی ۲۱٤ ترکیب شد. بسیاری از فعالیت های بیولوژیکی *LBPs* به عنوان اجزای اصلی ریشه گیاه برای درمان اختلال عملکرد سیستم ایمنی، دیابت، کبد چرب، سرطان و غیره مورد استفاده قرار می‌گیرد (۲٤). نتایج این تحقیق نیز نشان داد که ریشه گیاه دیوخار ترکمنی موجب القا آپوپتوز در سلول‌های دهانه رحم می‌شود بنابراین می‌تواند در درمان سرطان مورد استفاده قرار گیرد (شکل ۲، ۳، ٤، ٥).

احمدی و همکاران در سال ۲۰۱۷ در یک بررسی تاثیر عصاره هیدروالکلی برگ گیاه سدر (*Ziziphus spina-christi*) بر زنده مانی رده سلولی سرطان پستان (MCF7) و بیان ژن‌های *BAX* و*Bcl2* پرداختند. در این ارزیابی نشان داده شد که زنده مانی سلول‌های MCF7 در گروه مواجه شده با غلظت‌های ۰/۰۱، ۰/۱، ۱ و ۱۰ میلی-گرم/میلی‌لیتر عصاره برگ سدر نسبت به گروه کنترل تفاوت معنی داری داشت، همچنین میزان بیان نسبی ژن‌های*Bcl2* و *BAX* در مواجهه با غلظت ۰/۱ میلی-گرم/میلی‌لیتر عصاره به ترتیب دچار کاهش و افزایش معنی‌دار گردید (۲). نتایج این ارزیابی با پژوهش حاضر کاملا همسو است، در بررسی حاضر نشان داده شد بیان نسبی ژن‌های *Bax* و *Bcl2* در مواجه با غلظت IC50 عصاره ریشه گیاه دیوخار ترکمنی (۲۵ و ۵۰ میلی-گرم/میلی‌لیتر) به ترتیب دچار افزایش و کاهش گردید،

بنابراین نتایج نشان داد که ریشه گیاه دیو خار ترکمنی خاصیت ضد سرطان دارد (شکل ٤ و ٥).
با توجه به مطالعات مختلف و نتایج بدست آمده از این تحقیق می‌توان بیان کرد که احتمالا عصاره گیاه دیوخار ترکمنی می‌تواند با اثر بر بیان ژن‌های القاکننده مکانیسم مرگ برنامه‌ریزی شده موجب آغاز آبشار کاسپازی ۳ و ٦ و نهایتا القاء موفق مرگ سلولی می‌شود، البته مکانیسم دقیق مولکولی این فرآیند نیازمند بررسی های دقیق تر می باشد.

نتیجه‌گیری

در انتها با در نظر گرفتن تمامی نتایج به دست آمده در پژوهش حاضر و مقایسه این نتایج با بررسی‌های گذشته می‌توان عنوان نمود، در فرآیند سرطانی شدن یک سری ژن‌ها از جمله ژن‌های *Bax*، *Bcl2* و پروتئین‌های کلیدی کاسپاز ۳ و ٦ وجود دارد که در تنظیم سیکل سلولی و هم چنین فرآیند مرگ برنامه‌ریزی‌شده نقش اساسی برعهده دارند. نتایج این پژوهش نشان داد که اثر عصاره ریشه گیاه دیوخار ترکمنی بر بیان ژن‌های *Bax*، *Bcl2* و گروه دریافت کننده و گروه کنترل تفاوت معناداری دارد. همچنین نتایج ارزیابی فعالیت کاسپاز ۳ و ٦ نشان داد که این پروتئین‌ها در غلظت ۲۵ میلی‌گرم/میلی‌لیتر نسبت به غلظت ۵۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر بیان کم تری نشان داد. در مقایسه با گروه کنترل مشاهده می‌شود کاسپاز ۳ و٦ وابسته به افزایش غلظت، افزایش بیان پروتین دارد. نتایج این پژوهش با بررسی‌های گذشته همسو بوده و این موضوع می‌تواند نویدبخش روشی نوین برای درمان سرطان دهانه رحم باشد.

تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته از پایان نامه دکترای داروسازی می باشد که با کد اخلاق IR.IAU.PS.REC.1401.032 در معاونت پژوهشی واحد علوم دارویی دانشگاه آزاد به ثبت رسیده است بدین وسیله نویسندگان مقاله از تمامی افرادی که در به ثمر نشستن این تحقیق سهمی داشته اند تشکر و قدردانی می‌نمایند.

منابع

1. Abdullaev F., 2001. Plant-derived agent's cancer. *Journal of Pharmacology*, 15(3):345-354.

2. Ahmadi R., Rahimi S., Ehteshamzad N., 2017. The effect of hydroalcoholic *Ziziphus spina-christi* leaf extract on viability of breast cancer cell line (MCF7) and evaluation of Bax and Bcl2 genes expression level. *Kashan university of medicinal Journal*, 21(5):407-413.

3. Baharlou R., Atashzar MR., Vasmehjani AA., Rahimi E., Khoshmirsafa M., Seif F., et al., 2016. Reduced levels of T-helper 17-associated cytokines in the serum of patients with breast cancer: indicators for following the course of disease. *Central European Journal Immunology*, 41(1):78.

4. Bedoui S., Herold MJ., Strasser A., 2020. Emerging connectivity of programmed cell death pathways and its physiological implications. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 21(11):675-695.

5. Cowling V., Downward J., 2002. Caspase-6 is the direct activator of caspase-8 in the cytochrome c-induced apoptosis pathway: absolute requirement for removal of caspase-6 prodomain. *Cell Death and Differentiation*, 9(10):1046-1056.

6. Cox JT., Castle PE., Kitchener HC., 2006. Achievements and limitations of cervical cytology screening. *Vaccine*, 24: S63-S70.

7. Fitzmaurice C., Allen C., Barber RM., Barregard L., Bhutta ZA., Brenner H. 2017. Global burden of disease cancer collaboration. global, regional, and national cancer Incidence, mortality, years of life lost, years lived with disability, and disability-adjusted Life-years for 32 cancer groups, 1990 to 2015: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study. *Jama Oncology*, 3(4):524-548.

8. Ghorbani A., Ghorbanihesari T., Mortazavian M., 2012. Effect of aqueous extract – alcohol b and its fractions brtksyr cervical cancer cells. *The Iranian Journal of Obstetrics, Gynecology and Infertility*, 15(22):9-16.

9. Guo Y., Srinivasula SM., Druilhe A., Fernandes-Alnemri T., Alnemri ES., 2002. Caspase-2 induces apoptosis by releasing proapoptotic proteins from mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, 277(16):13430-13437.

10. Harlev E., Nevo E., Lansky EP., Lansky S., Bishayee A., 2012. Anticancer attributes of desert plants: a review. *Anticancer Drugs*, 23:255-271.

11. Horn LC., Raptis G., Fischer U., 2002. Familial cancer history in patients with carcinoma of the cervix uteri. *European Journal Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology*, 101(1):54-57.

12. Horner-Johnson W., Dobbertin K., Andresen EM., Iezzoni LI., 2014. Breast and cervical cancer screening disparities associated with disability severity. *Women's Health*, 24(1):e147-e153.

13. Jafari M., Moradi Y., Khodadost M., Sekhavati E., Anabad HA., Mansori K., et al., 2015. Trend of the esophageal cancer incidence in Iran. *International Journal of Travel Medicine Global Health*, 3(2):127-131.

14. Lazhiry A., Vlak J., 1993. Herb plants. Translated to Persian by: Zaman S. Tehran: Ghoghnoos Pub.

15. Leece P., Kendall C., Touchie C., Pottie K., Angel JB., Jaffey J.,2010. Cervical cancer screening among HIV-positive women. Retrospective cohort study from a tertiary care HIV clinic. *Canadian Family Physician*, 56(12):e425-431.

16. Moshtaghi F., Esmaeilzadeh Bahabadi S., Mazaheri MA., Najafi SH., Dahmardeh Ghalenoo F. 2016. Increasing of caspase3 gene expression in Mcf7 breast cancer cell line by *Nigella sativa* hydro-alcoholic extract. *Shahid Sadoughi University Journals*, 24(1):1-1.

17. Saxena A., Viswanathan S., Moshynska O., Tandon P., Sankaran K., Sheridan DP., 2004. Mcl- 1 and Bcl- 2/Bax ratio are associated with treatment response but not with Rai stage in B- cell chronic lymphocytic leukemia. *American Journal of Hematology*, 75(1):22-33.

18. Sonnenschein C., Soto AM., 2008. Theories of carcinogenesis: an emerging perspective. Seminars in *Cancer Biology*, 18(5):372-377.

19. Thompson CB., 1995. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*, 267(5203):1456-1462.

20. Vogelstein B., Kinzler KW., 2004. Cancer genes and the pathways they control. *Nature Medicine*,10(8):789-799.

21. Wang S-J., Zheng C-J., Peng C., Zhang H., Jiang Y-P., Han T., et al., 2013. Plants and cervical cancer: an overview. *Expert opinion on Investigational Drugs*, 22(9):1133-1156.

22. Xiao X., Ren W., Zhang N., Bing T., Liu X., Zhao Z., Shangguan D. 2019. Comparative study of the chemical constituents and bioactivities of the extracts from fruits, leaves and root barks of *Lycium barbarum*. *Molecules*, 24(8):1585.

23. Xiong L., Deng N., Zheng B., Li T., Liu RH., 2021. Goji berry (*Lycium spp*.) extracts exhibit antiproliferative activity via modulating cell cycle arrest, cell apoptosis, and the p53 signaling pathway. *Food and Function*, 12(14):6513-6525.

24. Yao X., Peng Y., Xu LJ., Li L., Wu QL., Xiao PG., 2011. Phytochemical and biological studies of Lycium medicinal plants. *Chemistry and Biodiversity*, 8(6):976-1010.

25. Zhu C.P., Zhang S.H. 2013. *Lycium barbarum* polysaccharide inhibits the proliferation of HeLa cells by inducing apoptosis. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93:149-560.

Effect of *Lycium depressum* Root on *Bax* , *Bcl-2* Gene Expressions and Evaluation of Caspase 3 and 6 Activity on Uterine Cervical Cancer cells line (Hela)

Yasamin Khani[1], Tahereh Naji[*2], Soheila Zamanlui Benisi[3], Saeid Mohamadi Motamed[4]

1.Pharmacy student, Department of Basic Sciences, Faculty of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Tehran Medical Sciences Unit, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
2.Associate Professor, Department of Basic Sciences, Faculty of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Tehran Medical Sciences Unit, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
3.Assistant Professor, Stem Cells and Cell Therapy Research Center, Tissue Engineering and Regenerative Medicine Institute, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
4.Assistant Professor, Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Tehran Medical Sciences Unit, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

Abstract

Cervical cancer is the third cause of death caused by cancer in women. After breast cancer, cervical cancer is the most common cancer in women. Today, due to the numerous side effects of chemotherapy and radiation therapy that are caused to the patient as a result of their use, as well as the resistance of cancer cells to common treatments, researchers have turned to new drugs with greater effectiveness and less toxicity. The aim of the present study was to evaluate the effect of *Lycium depressum* root on the expression of *Bcl2* and *Bax* genes and to evaluate the activity of caspases 3 and 6 in cervical cancer cells (Hela). In this study, firstly, the extract of *Lycium depressum* root was obtained by soaking method, then cervical cancer cells were prepared and cultured, in order to calculate the optimal effective dose of the extract, the MTT technique was used. The concentrations of 25 and 50 mg/ml were chosen as optimal doses. Then the expression of *Bcl2* and *Bax* genes was evaluated by Real-time PCR technique. Next, in order to evaluate the activity of caspases 3 and 6 in effective doses of the extract, cervical cancer cells (Hela) were affected and protein expression was measured using the immunocytochemistry (ICC) technique. The results of this research showed that the roots of the Turkmen oleander plant can cause changes in the expression of important *Bcl2* and *Bax* genes in the path of apoptosis induction. In addition, it increases the protein expression of caspase 3 and 6 in cancer cells. Therefore, it can be hoped that in additional research on the extract of *Lycium depressum* root, it will be considered a candidate for the treatment of complementary medicine.

Keywords: Cervical cancer, *Lycium depressum*, Apoptosis, Gene expression