فصلنامه (علمی)

زیست شناسی تکوینی

سال شانزدهم، شماره ۲، بهار ۱۴۰۳ ص. ۱۷-۲۵

مقاله پژوهشی

بررسی اثر عصاره هیدروالکلی میوه سپستان بر بیان ژن‌های *BCL-2* و *BAX* در مسیر آپوپتوزی و تکثیرسلولی در رده سلول‌های سرطان ریه انسان

ناهید عسکری[۱*]، کیان آقاعباسی[۲]، الهام رضوان نژاد[۱]

[۱] گروه پژوهشی بیوتکنولوژی، پژوهشکده علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، کرمان، ایران

[۲] گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه گیلان، پردیس دانشگاهی، رشت، ایران

[*] (نویسنده مسئول مکاتبات): nahidaskari@gmail.com

تاریخ دریافت: خرداد ۱۴۰۲ تاریخ پذیرش: شهریور ۱۴۰۲

چکیده

با توجه به اهمیت و شیوع بیش از حد بیماری سرطان در جوامع مختلف، این بیماری به یکی از معضلات مهم تبدیل شده است. از سوی دیگر، در سال‌های اخیر، توجه به گیاهان دارویی افزایش یافته است به همین منظور در این تحقیق به بررسی اثر عصاره میوه سپستان بر تکثیرسلولی در رده سلول‌های سرطان ریه انسان و بررسی بیان ژن‌های *BCL-2* و *BAX* در مسیر آپوپتوزی پرداخته می‌شود. در ابتدا میوه‌های این گیاه جمع‌آوری و به روش خیساندن عصاره هیدروالکلی تهیه شد. غلظت‌های مختلف از عصاره تهیه شد و اثر عصاره هیدروالکلی با غلظت‌های ۰/۲۵، ۰/۵، ۱، ۲، ۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بر روی رده سلول‌های سرطانی ریه و فیبروبلاست انسانی بررسی شد. استخراج mRNA از رده سلول‌های تحت تیمار عصاره و بدون تیمار به منظور بررسی بیان ژن *BCL-2* و *BAX* انجام گرفت، نتایج نشان داد غلظت بالاتر از ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره بر روی رده سلول‌های سرطانی تاثیر کشندگی معنی‌داری دارد. بیان ژن *BAX* تحت تیمار عصاره هیدروالکلی سپستان نسبت به کنترل افزایش و بیان ژن *BCL-2* کاهش یافت. عصاره سپستان در غلظت‌های کم اثر کشندگی بالایی بر سلول‌های سرطانی نداشت، با این حال با توجه به اینکه این عصاره به سلول نرمال آسیبی نرساند، ترکیب این عصاره میوه هیدروالکلی این گیاه با داروهای شیمی درمانی می‌تواند با اثرات جانبی کمتر این داروها مفید باشد.

کلیدواژه‌ها: سپستان، ریه، ژن*BAX*، ژن *BCL-2*.

مقدمه

سرطان، دومین علت مرگ و میر در جهان پس از بیماری‌های قلبی عروقی است. نیمی از مردان و یک سوم زنان در ایالات متحده در طول عمر خود سرطان را تجربه خواهند کرد و با این وجود امروزه میلیون‌ها انسان به علت شناسایی و درمان زودرس سرطان، به زندگی ادامه می‌دهند [۱-۲]، شیوع بیش از حد سرطان در سال‌های اخیر و تأثیر آن بر ابعاد مختلف روحی، جسمی و اجتماعی زندگی آن را به یکی از معضلات مهم و چالش برانگیز قرن تبدیل کرده است [۳]. در واقع به گروهی از بیماری‌ها که مشخصه اصلی آنها رشد سلولی تنظیم نشده، تهاجم و انتشار سلول‌ها از جایگاه اصلی یا مکان اولیه به نقاط دیگر بدن باشند، سرطان گفته می‌شود [۴]. عوامل محیطی

متفاوتی همچون مصرف دخانیات، رژیم غذایی و بی‌تحرکی نقش عمده‌ای در بروز و توسعهٔ انواع سرطان دارند. شغل و سبک زندگی از جمله فاکتورهای محیطی محسوب می‌شوند که عامل بین ۳۰ تا ۳۵ درصد سرطان‌های انسانی هستند [۵-۷]، برخلاف تصورعام فقط ۵ تا ۱۰درصد از سرطان‌ها به علت مشکلات ژنتیکی به وجود می‌آیند [۸]. طبق آمار جهانی سال ۲۰۱۸، سرطان عامل مرگ و میر ۱۳ درصد مردم جهان می‌باشد که میزان بروز و شیوع آن در حال افزایش است [۱۰-۹]، پیش‌بینی می‌شود تا سال ۲۰۳۰ باتوجه به رشد جمعیت از یک سو و پیری جمعیت از سوی دیگر، سرطان سیر صعودی در جهان داشته باشد [۱۱]. سرطان ریه در حال حاضر در جهان بسیار شایع است و یکی از مرگ‌بارترین سرطان‌ها در سرتاسر دنیا به شمار می‌رود [۱۲-۱۳]، به طوری که حدود ۲۹ درصد از کل مرگ و میرهای ناشی از سرطان مربوط به سرطان ریه است [۱۳]، یکی از علل ابتلا و شیوع این بیماری استعمال دخانیات به خصوص سیگار است. هر چند این سرطان در افراد غیر سیگاری نیز دیده می‌شود [۱۴]، امروزه درمان سرطان ریه با روش‌های مختلفی هم‌چون جراحی، پرتو درمانی و شیمی درمانی امکان‌پذیر است. اما به تازگی بسیاری از پژوهشگران اثر داروهای طبیعی با منشا گیاهی بر بیماری‌های مختلف را بررسی کرده‌اند [۱۵]، با این وجود استفاده از گیاهان دارویی در درمان بیماری‌ها از گذشته دور در بسیاری از کشورها سابقه دارد [۱۶-۱۷] و بسیاری از مردم در کشورهای مختلف هنوز از گیاهان به عنوان دارو در درمان بیماری‌هایی هم‌چون سرطان استفاده می‌کنند. بالطبع پزشکان نیز از گیاهان زیادی برای تولید داروهای ضد سرطان استفاده می‌کنند [۱۸]، گیاهان دارای ترکیبات ضد سرطانی و آنتی‌اکسیدانی طبیعی مثل ترکیبات فنولی، فلاونوئیدها و آنتوسیانین هستند. این ترکیبات اهمیت و نقش بسزایی در پیش‌گیری و درمان انواع سرطان [۱۹] و همچنین القای مرگ برنامه‌ریزی شده سلول (آپوپتوز) در سلول‌های سرطانی [۲۰] دارند. مطالعات سال‌های اخیر در جهت یافتن گیاهانی می‌باشند که بتوانند آپوپتوز (یکی از راه حل‌های کلیدی در درمان سرطان) در سلول‌های سرطانی را القا کنند. مسیر درونی یکی از دو مسیر اصلی در القا آپوپتوز سلول‌های سرطانی توسط گیاهان به شمار می‌رود. این مسیر که با نفوذپذیری غشای میتوکندریایی آغاز می‌شود *BAX* به عنوان یک عامل پیشبرنده آپوپتوز است و از سوی دیگر *BCL2* از غشا میتوکندری در برابر اثرات مخرب *BAX* محافظت می‌کند. در نتیجه رابطه و نسبت میان *BAX/BCL2* از عوامل مهم در بقاء سلول در آپوپتوز به شمار می‌رود [۲۱].

گیاه سپستان با نام علمی *Cordia myxa* شناخته شده است. سپستان گیاهی گلدار از خانواده *Boraginaceae* یا گاوزبان است. این گیاه در مناطق گرمسیری و نیمه‌گرمسیری شامل بخش‌هایی از آسیا، استرالیا و آفریقا رشد می‌کند [۲۲-۲۳] و در ایران گیاه سپستان در مناطق جنوبی کشور از جمله استان فارس، سیستان و بلوچستان و هرمزگان رشد می‌کند. اغلب جنس‌های تیرهٔ گاوزبانیان علفی‌اند، ولی تعداد اندکی از جنس‌های این تیره مانند جنس *Cordia* درختی و درختچه‌ای هستند [۲۴]. بیش از ۲۵۰ گونه از این گیاه شناسایی شده است که ۴ گونه آن شامل *Cordia myxa L. Cordia crenata Del , Cordia dichtoma Forst.f* و *Cordia rothii Roem&Schult* در ایران مشاهده شده‌اند [۲۵-۲۶]. از نظر گیاه‌شناسی سپستان درختی برگ ریز، دارای ارتفاع حداکثر دوازده متر، با تنه صاف و بدون انشعاب است که در تابستان میوه می‌دهد. تمامی بخش‌های گیاه سپستان خوراکی است. میوه نارس آن برای تهیه ترشی و همچنین به عنوان سبزی به کار می‌رود. از برگ گیاه سپستان در بعضی نواحی، برای مصارفی شبیه برگ گاوزبان استفاده می‌گردد [۲۷-۲۸]. در طب سنتی از میوه این گیاه به عنوان ملین سینه، مفید در تب، سرفه خشک، تنگی نفس و گرفتگی صدا، درمان عفونت‌های ادراری، ضدکرم و آرام‌بخش، ادرار آور و ضد اسهال استفاده می‌کردند و در طب رایج اثرات گشادگنندگی برونش به دنبال تحریک سنتز اکسید نیتریک در مدل حیوانی دیده شده است [۲۹-۳۱] و این گیاه حاوی موادی مانند پتاسیم، کلسیم، روی و آهن می‌باشد [۳۲]، از جنس *Cordia* ترکیبات متفاوتی هم‌چون فیتوکمیکال‌های مشتق شده است که دارای خواص ضدویروسی، ضدالتهابی، مهارکننده‌های رشد سلول‌های تومور و مهار کننده رادیکال آزاد می‌باشند [۳۳-۳۵]وجود سسکوئی‌ترپن، اسیدهای آمینه، آزافرین، اولئیک اسید، فتالیک اسید، استروئیدها، مورفینان و گالاکتوپیرانوسید [۳۶] و وجود برخی آلکالوئیدهای پیرولیزیدین در میوه این گیاه مشخص شده است [۳۷].

در بسیاری از کشورهای دنیا تحقیق و پژوهش در زمینه منابع گیاهی به منظور مبارزه با انواع بیماری‌ها از جمله سرطان به طور جد در دستور کار محققان بوده است. در حال حاضر طیف وسیعی از داروهای مشتق شده از منابع گیاهی در پزشکی مورد استفاده است که خواص مهار رشد سلول‌های سرطانی، التیام بخشی و آنتی بیوتیکی موثری از خود نشان داده‌اند [۳۸]. بنابراین با توجه به خواص دارویی اشاره شده در مورد گیاه سپستان هدف از این پژوهش تاثیر عصاره هیدروالکلی این گیاه بر میزان بیان ژن‌های*BAX* و *BCL-2*در مسیر القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی بوده است.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری گیاه

میوه گیاه سپستان در محل رویشگاه آن در شهرستان جیرفت استان کرمان در خردادماه ۱۴۰۰ جمع‌آوری گردید و پس از شناسایی توسط گیاه شناس با نمونه هرباریومی مرکز تحقیقات کشاورزی با کد ۱۷۰۸۲ تطبیق داده شد.

استخراج عصاره هیدروالکلی میوه سپستان

در ابتدا میوه‌های برداشت شده با استفاده از آب دیونیزه به خوبی شسته شد. سپس قسمت‌های قابل خوردن از محصول جمع‌آوری شد و پس از خشک شدن به صورت طبیعی در سایه با دستگاه خردکن به طور کامل آسیاب گردید. در ادامه ۱۰۰گرم از پودر حاصل با ۲۵۰ میلی‌لیتر اتانول در یک فلاسک مخروطی با استفاده از همزن مغناطیسی به مدت ۳ ساعت در دمای اتاق در تاریکی مخلوط و تحت مکش با کاغذ (شماره ۱ واتمن) فیلتر شد. مجدداً محتویات کاغذ صافی به یک فلاسک مخروطی انتقال داده شد و عملیات تکرار گردید. در نهایت با استفاده از روتاری با دمای حدود ۶۵ درجه سانتیگراد عصاره تلغیظ و خشک شد. برای محاسبه بازده، عصاره خام حاصل وزن شد و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. از محلول آبی ۷۰ درصد اتانول به عنوان حلال در جهت تهیه عصاره میوه با غلظت‌های مطلوب استفاده گردید. تمام آزمایشات در ۷۲ ساعت پس از استخراج انجام شد [۳۹].

کشت سلول و انجام تست MTT

در این مطالعه، رده سلول‌های سرطانی ریه A549 و رده سلولی فیبروبلاست انسانی (SKM) از انستیتو پاستور ایران تهیه شد. برای کشت هر دو رده سلولی از محیط کشت DMEM حاوی ۱۰ درصدFBS (Fetal bovine serum) به همراه یک درصد آنتی بیوتیک پنی‌سیلین و استرپتومایسین استفاده شد و تحت شرایط استاندارد انکوباتور (دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و $5\ Co_2$ درصد و رطوبت ۹۵ درصد) در فلاسک ۲۵ سانتی‌متری کشت داده شد. بعد از ۵ بار پاساژ منظم، از سلول‌ها برای انجام مراحل بعد استفاده شد. سلول‌ها با غلظت (۱×۱۰^{۴}) در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه کشت داده شدند، شمارش سلولی و تعداد سلول‌های زنده با لام هموسیتومتر با استفاده از تریپان بلو (شرکت سیگما) و با کمک میکروسکوپ اینورت انجام شد.

به منظور اندازه‌گیری اثر سمیت سلولی عصاره هیدروالکلی میوه سپستان از آزمون MTT استفاده شد. در این روش، پس از پوشیده شدن۹۰-۸۰ درصد بستر فلاسک از سلول، با استفاده از تریپسین Trypsin/EDTA لایه سلول چسبنده به کف فلاسک جدا شد و پس از انتقال به لوله‌های استریل به مدت ۴ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس سلول‌ها در محیط تازه کشت معلق و از آنها سوسپانسیون سلولی تهیه شد. برای شمارش سلول‌ها، از لام نئوبار استفاده شد. در پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای (۷۰۰۰ سلول در هر چاهک) ریخته شد و پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور قرار گرفتند. پس از طی مدت زمان لازم به آرامی و با دقت محیط رویی برداشته شد و به همه چاهک‌ها محیط جدید و عصاره هیدروالکلی با غلظت‌های ۰/۲۵، ۰/۵، ۱، ۲،۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اضافه گردید [۴۰] و به چاهک‌های گروه کنترل محیط فاقد عصاره اضافه شد (هر یک از تیمارها ۳ بار تکرار شدند) پس از انکوباسیون به مدت ۲۴ ساعت، پلیت‌ها از انکوباتور خارج شد و به هر چاهک ۱۰ میکرولیتر محلول نمکی زردرنگ MTT (شرکت MELFORD / ساخت انگلستان) اضافه گردید. محلول زرد رنگ MTT در سلول‌های فعال توسط آنزیم دهیدروژناز میتوکندری به ترکیب نامحلول و ارغوانی فورمازان تبدیل می‌شود. مجدداً پلیت‌ها به مدت ۴ ساعت در انکوباتور قرار داده شد. پس از طی مدت زمان لازم ابتدا محیط رویی به طور کامل برداشته شد و به هر چاهک

۱۵۰ میکرولیتر DMSO اضافه گردید تا بلورهای فورمازان حل شوند. بعد از ۳۰ دقیقه، تغییر رنگ حاصل توسط دستگاه Eliza reader در طول موج ۵۷۰ نانومتر قرائت شد[۴۱].

بررسی بیان ژن *BCL-2* و *BAX*

برای بررسی بیان ژن، فرایند استخراج Total RNAاز رده سلول‌های سرطانی ریه و فیبروبلاست بدون تیمار و تیمار با عصاره هیدروالکلی میوه سپستان صورت گرفت. در ابتدا سلول‌ها با کمک تریپسین از سطح فلاسک جدا شدند و فرایند استخراج RNAبا RNA-X PLUS انجام و بعد از آن کمیت و کیفیت RNAاستخراج شده با دستگاه اسپکتوفتومتری و ژل الکتروفورز مورد بررسی قرار گرفت. در ادامه کار، cDNA با کمک کیت سنتز cDNA (Takara / ساخت ژاپن) ساخته شد و پرایمرهای رفت و برگشت دو ژن *BCL-2* و *BAX* و ژن کنترل داخلی بتا اکتین با استفاده از نرم افزارprimer3 طراحی شد (جدول ۱) جهت اطمینان از نداشتن دایمر و میزان درصد GC ، پرایمرها با برنامه (Runner Gene version ۳/۵۰) بررسی شدند.

بعد از تکمیل فرآیند طراحی، پرایمرها توسط شرکت FAZA Biotech ساخته شد. در نهایت با استفاده از دستگاه Corbett/ Rotor-Gene 3000 (Researchاسترالیا) و محلول CYBR Green ارزیابی‌های مولکولی انجام گردید. واکنش Real-time RT-PCR در ٤٥ سیکل و حجم ۱۵ μl با حضور ۱ μl از cDNA، ۱ μl از هر کدام از پرایمرهای نشان داده شده در جدول۱ و ۵/۷ μl محلول کیت یکتا تجهیز آزما و ۵/۴ μl آب دیونیزه استریل مطابق برنامه جدول۲ اجرا شد [۴۲].

آنالیز آماری

داده‌های این مطالعه در نرم‌افزار Excel 2010 وارد و با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۲۳ در سطح معنی‌داری ۵ درصد تحلیل آماری شد. جهت میانگین گروه‌ها از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه ANOVA و جهت مقایسه میانگین‌ها و آزمون بین گروه‌ها از Duncan استفاده شد. داده‌های حاصل از بیان ژن مطابق مقایسه چرخه آستانه انجام و اختلاف چرخه آستانه به دست آمده از سلول‌های تیمار شده با عصاره‌ها و سلول‌های بدون تیمار محاسبه شد و با استفاده از فرمول، $\Delta\Delta Ct$ نسبت ژن هدف به ژن مرجع از طریق فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$ مورد محاسبه قرار گرفت.

جدول ۱- توالی رفت و برگشت پرایمرهای طراحی شده

نام ژن	شماره ثبت شده بانک ژن	دمای ذوب (درجه سانتی‌گراد)	توالی پرایمر	اندازه محصول (جفت باز)
β-ACTIN	NM_001101	٦٤	F: GGACATCCGCAAAGACCTGTA R: ACATCTGCTGGAAGGTGGACA	۱۸۹
BCL2	NM_138578	٦١	F: GTGGATGACTGAGTACCTGA R: AGCCAGGAGAAATCAAACAGA	۱۱۹
BAX	NM_004324	٦١	F: TTTGCTTCAGGGTTTCATCC R: CAGCTCCATGTTACTGTCCA	١٥٤

جدول ۲-برنامه مورد استفاده در واکنش Real-time RT-PCR

	مراحل مختلف واکنش PCR	دما	زمان
۱	واسرشتگی اولیه	۹٤ ℃	۵ دقیقه
۲	واسرشتگی هر چرخه	۹٤ ℃	۳۰ ثانیه
۳	اتصال پرایمر به توالی هدف	٦۰ ℃	۲۵ ثانیه
۴	امتداد و ساخت رشته جدید	۷۲ ℃	۳۰ ثانیه
۵	آمادگی برای مرحله ذوب	۷۲ ℃	۱ دقیقه
۶	افزایش دما از ۷۲ ℃ به ۹۹ ℃		هر ۵ ثانیه ۱ ℃ افزایش

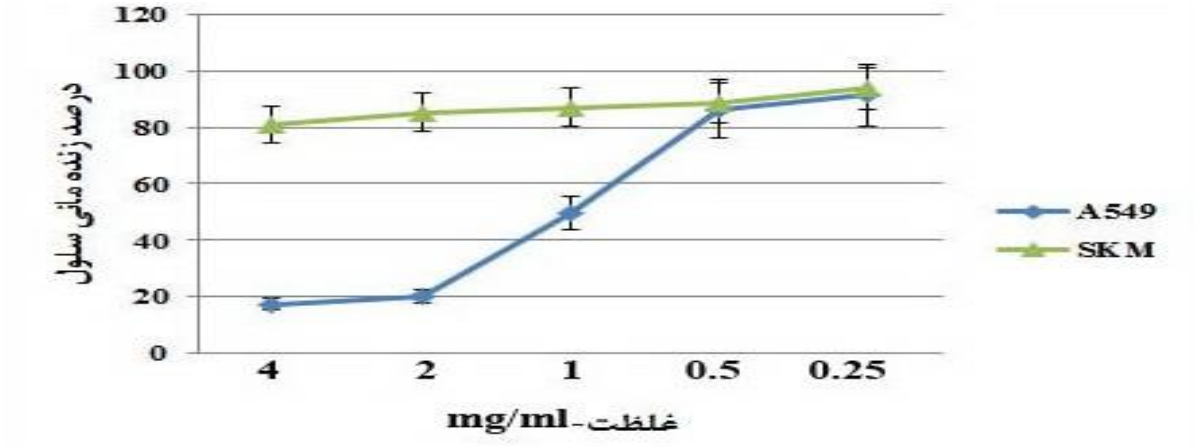
نتایج

نتایج آزمون MTT

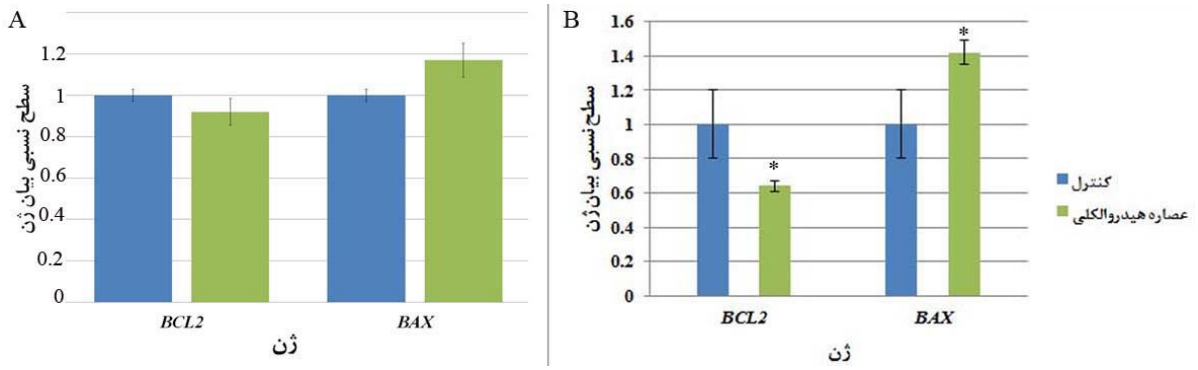
دو رده سلولی A549 و SKM با عصاره هیدروالکلی میوه سپستان با غلظت‌های ۰/۲۵، ۰/۵، ۱، ۲، ٤ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و غلظت ۰ به عنوان کنترل تیمار شد و در بازه زمانی ۲۴ ساعت با استفاده از تست MTT نتایج بررسی گردید. نتایج حاصله به صورت میزان درصد زنده‌مانی در نمودار یک نشان داده شده است. همان‌طور که در شکل مشخص است درصد زنده‌مانی سلول‌های سرطانی ریه در دوزهای مختلف عصاره کمتر از سلول‌های فیبروبلاست می‌باشد و با افزایش میزان غلظت عصاره درصد زنده‌مانی رده سلول‌های سرطانی ریه کاهش پیدا می‌کند، بیشترین میزان کشندگی سلولی توسط غلظت‌های ۲ و ٤ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بر روی رده سلول‌های سرطانی ریه می‌باشد و کمترین میزان کشندگی سلول‌های سرطانی ریه در غلظت ۰/۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر عصاره میوه سپستان مشاهده گردید. نکته قابل توجه اینکه عصاره هیدروالکلی میوه سپستان در همین غلظت‌ها بر روی رده سلول‌های فیبروبلاست اثر کشندگی کمتری داشت به‌طوری که در غلظت‌های پایین با افزایش غلظت عصاره هیدروالکلی تفاوت معنی‌داری در سطح ۵ درصد در میزان درصد زنده‌مانی سلول سالم فیبروبلاست مشاهده نگردید.

نتایج بررسی بیان ژن

غلظت و خلوص RNA استخراج شده به وسیله دستگاه اسپکتروفوتومتر اندازه‌گیری شد. جذب نوری نمونه‌ها نسبت (OD260/OD280) بیانگر میزان خلوص RNA استخراج شده می‌باشد که نزدیک بودن این عدد به ۲ نشان دهنده عدم آلودگی با پروتئین است و همچنین RNA ها روی ژل آگارز و دستگاه الکتروفورز بارگذاری شدند تا میزان اسمیر و همچنین کیفیت باند ها مشخص شود، نتایج حاصل از time RT-Real qPCR دو رده سلولی تحت تیمار و کنترل بعد از ۲۴ ساعت نشان داد که از تکثیر اختصاصی قطعات ژنی مورد نظر، عدم تکثیر قطعات غیر اختصاصی و عدم جفت شدن آغازگرها برای هر دو ژن آپوپتوزی و کنترل داخلی طی روش Real-Time اطمینان حاصل شد. نسبت بیان ژن های *BAX* و *BCL-2* در مقایسه با حالت کنترل تغییر معناداری نشان داد که می تواند به علت تغییر در میزان آپوپتوز باشد، همانطور که در نمودار۲ مشخص است در سلول‌های فیبروبلاست میزان تغییر بیان ژن‌های *BAX* و *BCL-2* نسبت به حالت کنترل تغییر معنی‌داری نداشت، در نتیجه نسبت *BAX/BCL2* نیز در سلول‌های فیبروبلاست نسبت به کنترل بعد از تیمار با عصاره میوه سپستان تغییر معنی‌داری نداشت. بیان ژن *BCL-2* تحت تیمار عصاره نسبت به بدون تیمار کاهش پیدا کرده است و بیان ژن *BAX* تحت تیمار نسبت به حالت کنترل در سطح ۵ درصد ($P>0/05$) افزایش پیدا کرده است، بنابراین عصاره میوه سپستان موجب افزایش *BAX/BCL2* وابسته به غلظت شده و این می تواند سلول‌های سرطانی را به سمت آپوپتوز سوق می‌دهد.



نمودار ۱- غلظت‌های عصاره هیدروالکی و درصد زنده‌مانی رده سلول‌های سرطانی ریه و فیبروبلاست



نمودار ۲- نسبت بیان ژن *BAX* و *BCL2* در سلول‌های فیبروبلاست (A) و رده سلول‌های سرطانی ریه (B) تحت تیمار عصاره هیدروالکلی میوه سپستان

بحث

در این پژوهش اثر عصاره هیدرو الکلی سپستان بر روی رده سلول‌های سرطانی ریه مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج نشان داد عصاره دارای اثرات کشندگی بیشتری بر روی رده سلول‌های سرطانی در مقایسه با رده سلول‌های سالم است و همچنین عصاره حاصل با افزایش غلظت دارای اثرات مهاری رشد بیشتری بر روی رده‌های سلول‌های سرطانی ریه است. در پژوهشی که توسط محققان عراقی سال ۲۰۲۲ صورت پذیرفت تاثیر عصاره هیدروالکلی میوه گیاه سپستان بر روی رده سلول‌های سالم فیبروبلاست مورد مطالعه قرار گرفت، نتایج این تحقیق نشان داد هیچ گونه سمیت سلولی در سلول‌های سالم فیبروبلاست تحت تیمار عصاره میوه سپستان مشاهده نگردید. نتایج این تحقیق کاملا با نتایج تحقیق پیشرو مشابهت داشته است [۴۰] و در تحقیقی دیگر که توسط Vikas Sharma در سال ۲۰۲۲ انجام گرفت فعالیت‌های ضد توموری و سمیت سلولی عصاره قسمت‌های مختلف گیاه سپستان بر روی ده رده سلول‌های سرطانی از جمله سرطان ریه، کلون و پستان مورد مطالعه قرار گرفت و نتایج نشان داد که عصاره گیاه سپستان حاوی اثرات سمیت سلولی و ضد توموری بر روی سلول‌های سرطانی ریه A-549 است که با نتایج این پژوهش مشابهت دارد [۴۳]، در تحقیق دیگری که توسط Khalaf و همکارنش در سال ۲۰۲۱ صورت گرفت، رده سلول‌های سرطانی سینه MCF-7 تحت تیمارهای مختلف عصاره ۷۰ درصدی اتانولی میوه سپستان قرار گرفت که نتایج نشان داد عصاره هیدروالکلی میوه سپستان بالای ۷۰ درصد باعث کاهش زنده‌مانی رده سلول‌های سرطانی سینه MCF7 شدند [۴۴]. مقایسه نتایج این آزمایش با این تحقیق صورت گرفته نشان از افزایش مرگ رده‌های سلول‌های سرطانی در مقابل عصاره هیدروالکلی میوه سپستان دارد. مطالعه دیگری که اثرات مهاری عصاره هیدروالکلی گیاه تیمبرا اسپیکاتا بر رده سلول‌های سرطانی ریه توسط بختیاری و همکارانش در سال ۱۳۹۳ مورد بررسی قرار گرفت، نتایج نشان داد که عصاره هیدروالکلی گیاه تیمبرا با اثر سایتوتوکسیک مستقیم بر سلول های توموری ریه می تواند باعث مهار رشد این رده از سلول‌های سرطانی شود [۴۵] نتایج تحقیق صورت گرفته نشان داد عصاره هیدروالکلی گیاهان داروی می‌توانند اثرات مشابه بر روی رده سلول‌های سرطانی داشته باشند. عصاره هیدروالکلی گیاهان دارویی به دلیل ترکیبات آنتی اکسیدانی قوی که دارند دارای اثرات کشندگی و مهار سلول‌های سرطانی هستند، تعداد زیادی از عصاره‌های گیاهی دارای اثرات کشندگی کمتری بر روی سلول‌های سالم مثل فیبروبلاست هستند که این امر باعث ترغیب بیشتر دانشمندان و محققان در استفاده از ترکیبات گیاهی می‌شود، در همین راستا تحقیق مشابه دیگری توسط محمدی و حویزی بر روی اثر عصاره هیدروالکلی زنجبیل *Zinger Officinale* بر بقای سلول‌های سرطانی ریه و سلول‌های فیبروبلاست جنینی موش در سال ۱۳۹۷ صورت پذیرفت [۴۶]. نتایج به این شکل بود که عصاره هیدروالکلی بر روی رده سلول‌های سرطانی ریه A549 اثرات کشتندگی معنی‌داری داشته است ولی اثرات کشندگی معناداری در سطح ۵ درصد بر روی رده سلول‌های فیبروبلاست نداشته است که این امر نتایج این تحقیق را اثبات می‌کند. بسیاری از گیاهان دارویی با تاثیر بر روی مسیر آپوپتوزی در مرگ سلول‌های سرطانی تاثیر بسزایی دارند، در فرایند مرگ سلولی *BCL-2* نقشی مهمی در برنامه ژنتیکی رشد و بقای

سلول‌های یوکاریوتی از مسیر مهار مرگ سلولی ایفا می‌کند [۴۷]، بنابراین سرکوب کننده‌های *BCL-2* که باعث کاهش بیان این ژن می‌شوند و قابلیت این را دارد که به عنوان روشی برای درمان سرطان از راه کاهش تأثیر مهار *BCL2* بر مرگ برنامه‌ریزی شده سلول استفاده کنند [۴۸] از طرفی *BCL2* با جلوگیری از انتقال *BAX* از سیتوزول به میتوکندری می‌تواند منجر به کاهش *BAX* در میتوکندری شود [۴۹] در واقع کاهش بیان *BCL-2* باعث افزایش بیان *BAX* می‌شود. در همین راستا در ادامه این تحقیق بررسی بیان ژن های *BAX* و *BCL-2* مسیر آپوپتوز سلول‌های سرطانی مورد مطالعه قرار گرفت و نتایج دال بر اثرات کاهشی عصاره میوه این گیاه بر روی بیان ژن *BCL-2* و اثرات افزایشی بیان *BAX* داشت، در تحقیق KHALAF در سال ۲۰۲۱ انجام شد در بخشی از این تحقیق تاثیر عصاره هیدروالکلی میوه سپستان بر روی ژن‌های *PTEN* رده سلول‌های سرطانی پستان مورد بررسی قرار گرفت نتایج نشان داد سلول‌های سرطانی که توسط عصاره تیمار شده اند ژن‌های سرکوبگر آن‌ها مثل *PTEN* پنج تا شش برابر بیشتر بیان شده اند که این تحقیق نشان دهنده اثرات بازدارندگی عصاره میوه این گیاه بر روی بیان ژن در رده سلول‌های سرطانی است [۴۴]. در تحقیق دیگری توسط عسکری و همکاران که اثر عصاره هیدروالکلی ۱/۲۵ میلی‌گرمی بر میلی‌لیتر بذر خارسنبل بر روی بیان ژن های *BAX* و *BCL-2* در مسیر رده سلول‌های سرطانی معده و روده بررسی کردند نشان دادند که عصاره هیدروالکلی باعث کاهش بیان ژن *BCL-2* و افزایش بیان ژن *BAX* نسبت به حالت کنترل در سطح ۵ درصد گردیده است که با مقایسه نتایج این تحقیق نشان می‌دهد اثرات عصاره هیدروالکلی بر روی بیان دو ژن *BAX* و *BCL-2*اثرات مشابهی داشته است [۴۲].

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه پژوهشی نشان داد، عصاره هیدوالکلی میوه سپستان اثرات بازدارندگی رشد بر روی رده سلول‌های سرطانی ریه A549 دارد و بر روی رده سلول‌های فیبروبلاست اثر کشندگی معناداری ندارد و همچنین این عصاره بر روی ژن‌های مسیر آپوپتوز تاثیر گذاشته است و باعث کاهش بیان ژن *BCL-2* و افزایش بیان ژن *BAX* نسبت به حالت کنترل در سطح ۵ درصد شده است. بنابراین با توجه به اثرات ضد تکثیری عصاره میوه گیاه سپستان در غلظت‌های پایین چندان رضایت بخش و چشم‌گیر نبود می‌توان پیشنهاد کرد با توجه به اینکه عصاره میوه گیاه به سلول فیبروبلاست آسیبی نرساند ترکیب این عصاره با داروهای شیمی درمانی موجود در درمان سرطان می‌تواند با اثرات جانبی کمتری همراه باشد و داروها دارای کارایی مفیدتری با عوارض جانبی کمتری باشند.

References

[1] Gallucci BB. Selected concepts of cancer as a disease: from the Greeks to 1900. Oncol Nurs Forum. 1985;12(4):67-71.

[2] Kardinal C, Yarbro JA. Conceptual history of cancer. Semin Oncol 1979;6:396–408.

[3] Poorkiani M, Hazrati M, Abbaszadeh A, Jafari P, Sadeghi M, Dejbakhsh T, et al. Does arehabilitation program improve quality of life in breast cancer patients. Payesh. 2010; 9(1):61-8.

[4] Weis VG, Goldenring JR. Current understanding of SPEM and its standing in the preneoplastic process. Gastric Cancer. 2009; 12: 189-97

[5] World Health Organization, Primary prevention of cancer through mitigation of environmental and occupational determinants. In International Conference on Environmental and Occupational Determinants of Cancer: Interventions for Primary Prevention. Austurias, Spain., 2011.

[6] Anand P, Kunnumakara AB, Sundaram C, Harikumar KB, Tharakan ST, Lai OS, Aggarwa BB.Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. Pharmaceutical research, 2008;25(9):2097-2116.

[7] Black JM, and Jane H. H, 2009, Medical-surgical nursing. Saunders/Elsevier

[8] Chin TM, Tan SH, Lim SE, Iau P, Yong, WP, Wong SW, Lee, SC. Acceptance, motivators, and barriers in attending Breast Cancer genetic counseling in Asians. Cancer detection and prevention, 2005; 29(5): 412-418.

[9] Manoochehri J, Abdollahi A, Tajik, Epidemiological Study of Breast tumors in Iranian Patients.2018

[10] Iida Y, et al., Clinicopathological characteristics of thyroid transcription factor 1-negative small cell lung cancers. Human pathology2018.

[11] Kim J, Gosnell JE, Roman SA. Geographic influences in the global rise of thyroid cancer. Nature Reviews Endocrinology. 2020; 16(1): 17-29.

[12] Kerdidani D, et al, Cigarette Smoke–Induced Emphysema Exhausts Early Cytotoxic CD8+ T Cell Responses against Nascent Lung CancerCells. The Journal of Immunology, 2018: p. ji1700700

[13] Silvestri GA, Alberg AJ, Ravenel J. The changing epidemiology of lung cancer with a focus on screening. Brit Med J 2009; 339:451-54.

[14] Jemal A , et al., Higher Lung Cancer Incidence in Young Women Than Young Men in the United States. New England Journal of Medicine, 2018; 378(21): 1999-2009.

[15] Greenwell M, Rahman PK. Medicinal Plants: their use in anticancer treatment. Int J Pharm Sci Res 2015:6(10):4103-12.

[16] Ljubuncic P, Dakwar S, Portnaya I, Cogan U, Azaizeh H, Bomzon A. Aqueous extracts of *Teucrium polium* possess remarkable antioxidant activity in vitro. Evid Bas Complement Alternat Med 2006; 329-38.

[17] Said O, Khalil K, Fulder S, Azaizeh H. Ethnopharmacological survey of medicinal herbs in Israel, the Golan Heights and the West Bank region. J Ethnopharmacol 2002;83:251-65.

[18] Subchareon P. Handbook of Anticancer: Thai Traditional Medicine: New Concept for Treated Cancer. Thai Traditional Medicine Institute, Bangkok; 1998.P. 3.

[19] Xu D-P, Li Y, Meng X, Zhou T, Zhou Y, Zheng J, et al. Natural antioxidants in foods and medicinal plants: extraction, assessment and resources. Int J Mol Sci. 2017; 18(1): 96-128.

[20] Sakr, S.A., Lamfon, H.A.Protective Effect of Rosemary (Rosmarinus Officinalis) Leaves Extract on Carbon Tetrachloride - Induced Nephrotoxicity in Albino Rats. Life. Sci. J. 2012;9(1):779-85

[21] D'Arcy MS. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. Cell Biol Int 2019; 43:582-92.

[22] Sivalingam PN, Singh D, Chauhan S. Morphological and molecular diversity of an underutilized fruit crop *Cordia myxa L*. germplasm from the arid region of Rajasthan, India. Genet Resour Crop Evol 2012; 59: 305-316.

[23] Tańska M, Roszkowska B, Czaplicki S, Borowska EJ, Bojarska J, Dąbrowska A. Effect of fruit pomace addition on shortbread cookies to improve their physical and nutritional values. Plant Foods Hum Nutr 2016;71:307-313.

[24] Khatamsaz, M. ,Boraginaceae. In:Flora of Iran (Eds. Assadi, M., Khatamsaz, M. and Maassoumi, A. A.) 2002,vol. 39. Tehran, Iran (in Persian).

[25] Borhidi A, Gondáry ZS, and Orosz-Kovács, The reconsideration of the genus *Cordia L*. Acta Botanica Hungarica, 1988; 34: 375–423

[26] Polhill, RM., Flora of Tropical East Africa. Taylor & Francis, 2012; pp 474 .

[27] Jamkhande PG, Barde SR, Patwekar SL, Tidke PS. Plant profile, phytochemistry and pharmacology of *Cordia dichotoma* (Indian cherry): A review. Asian Pacific journal of tropical biomedicine. 2013; 3(12): 1009-12.

[28] Pirnia M. Survey of antimicrobial effect of aqueous and ethanolic *Cordia myxa L*. extracts against food infective and intoxication microorganisms and kinetic modelling of *Bacillus cereus* growth affected by temperature and concentration. [M.ScThesis]. Mashhad: Ferdowsi University of Mashhad, Faculty of Agriculture, Food Science and Technology Department, in Persian. 2014. [Full Text in Persian].

[29] Ma X, Ma X, Ma Z, Wang J, Sun Z, Yu W, et al. Effect of *Hyssopus officinalis L*. on inhibiting airway inflammation and immune regulation in a chronic asthmatic mouse model. Exp Ther Med. 2014;8(5):1371-4

[30] Inas, ZA, Abdallah Hala, AH, Khattab Gehan, H. Heeba. Gastroprotective Effect of *Cordia Myxa L*. Fruit Extract against Indomethacin-Induced Gastric Ulceration in Rats. Life Science Journal, 2011; 8(3): 433-445.

[31] Yaermaimaiti S, Wu T, Aisa HA. Bioassay-guided isolation of antioxidant, antimicrobial, and antiviral constituents of *Cordia dichotoma* fruits. Ind Crops Prod, 2021; 172: 113977.

[32] Masoud K, Eskandar M. and Sayyed FS. preparation and evaluation of *Cordia mayxa* fruit topical cream .World Journal of Pharmaceutical Research. 2015; 4(7):244-253.

[33] Ranjbar M, Varzi HN, Sabbagh A, Bolooki A, Sazmand A. Study on analgesic and anti-inflammatory properties of Cordia myxa fruit hydro-alcoholic extract. Pak J Biol Sci 2013; 16: 2066-2069.

[34] Rahman MA, Sahabjada, Akhtar J. Evaluation of anticancer activity of *Cordia dichotoma* leaves against a human prostate carcinoma cell line, PC3. J Tradit Complement Med. 2016;7:315-321.

[35] Nariya PB, Bhalodia NR, Shukla VJ, Acharya R, Nariya MB. In vitro evaluation of antioxidant activity *of Cordia dichotoma* (Forst f.) bark. Ayu .2013; 34: 124-128.

[36] Gupta, R. and Gupta, G.D,Determination of plant constituent in fractions of Cordia obliquo willd. Leaf methanol extract using GC-MS analysis. International Journal of Pharma and Chemical Research, 2017; 9(9):1274-1279.

[37] Peter PFU, Ya-Chen Y, Qingsu X, Chou MW, Cui YY, Ge lin. Pyrrolizidine alkaloids tumorigenic components in Chinese herbal medicines and dietary supplements. J Food Drug Anal 2002; 10(4): 198-211.

[38] Lee HG, Yu KA, Oh WK, Baeg TW, Oh HC, Ahn JS. Inhibitory effect of jaceosidin isolated from *Artemisia argyi* on the function of E6 and E7 oncoproteins of HPV 16. Journal of Ethnopharmacology , 2005; 98(3): 339-43.

[39] Rajabi L, Rajabi A , Mohammadi A , Khademi R, Khamisipour Gh. The effect of aqueous and ethanolic extracts of *Moringa olifera* leaves on inhibition of Jurkat and Raji cell linesof acute lymphoblastic leukemia,. Sci J Iran Blood Transfus Organ 2022;19 (2): 148-157. (persian)

[40] Al-Musawi MH., Ibrahim KM, Albukhaty S. In vitro study of antioxidant, antibacterial, and cytotoxicity properties of *Cordia myxa* fruit extract. Iranian Journal of Microbiology, 2022; 14(1), 97.

[41] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods 1983; 65(1- 2): 55-63.

[42] Aghaabbasi K, Askari N, Hassani-Kumleh H, Torkzadeh-Mahani M, Ramzani-Ghara A, The *Blepharis persica* seed hydroalcoholic extract synergistically enhances the apoptotic efect of doxorubicin in human colon cancer and gastric cancer cells, Molecular Biology Reports. 47, 2019; 47:843–853.

[43] Raina S, Sharma V , Sheikh ZN , Kour N , Singh SK, Zari A, Hakeem KR. Anticancer Activity of *Cordia dichotoma* against a Panel of Human Cancer Cell Lines and Their Phytochemical Profiling via HPLC and GCMS. Molecules, 2022; 27(7), 2185.

[44] AL-dallee Z.T, KHALAF K.T, ATWAN Z.W, Ethanol Extract of *Cordia myxa L* Fruit Increase Expression of Antioxidant Enzymes and Tumor Suppressor PTEN Genes in MCF-7 Breast Cancer Cells, , International Journal of Pharmaceutical Research – 2021;13 (2).

[45] Sabzali S , Arman R , Panahi J , Havasian M , Haghani K, Bakhtiyari S. Investigation on the Inhibitory Effects of Hydro-alcoholic Extract of *Thymbra spicata* on the Growth of Lung Cancer Cell Line SK-Mes-1,Scientific Journal of Ilam University of Medical Sciences, 2013;22: 153-158.(persian)

[46] Hoveizi E, Mohammadi T, Comparison Of Ginger (*Zingiber Officinale*) Hydroalcoholic Extract On The Viability Of Cancer Cells And Embryonic Fibroblast Cells.JOURNAL OF DEVELOPMENTAL BIOLOGY ,2018 ;10 (3) :73 -80. (persian)

[47] Friedenreich CM, Cust AE. Physical activity and breast cancer risk: impact of timing, type and dose of activity and population subgroup effects. Br J Sports Med. 2008; 42(8): 636-47.

[48] Eliassen AH, Hankinson SE, Rosner B, Holmes MD, Willett WC. Physical activity and risk of breast cancer among postmenopausal women. Arch Intern Med. 2010; 170(19): 1758-64.

[49] Shahvali-koohshoori Y , Marandi M, Kargarfard M, Vaseghi G, Moshtaghian J , The Effect of Aerobic Training on Tumor Growth and Expression of Bcl-2 Gene and Protein in Female Mice with Breast Cancer. Iranian Quarterly Journal of Breast Disease. 2021;13(4):67-76.

Investigation of hydroalcoholic extract effect of *Cordia Myxa* fruit on the expression of *BCL-2* and *BAX* genes in the apoptotic pathway and cell proliferation in human lung cancer cell line

Askari N.[1*], Aghaabbasi K.[2], Rezvannejad E.[1]

[1] Department of Biotechnology, Institute of Sciences and High Technology and Environmental Sciences, Graduate University of Advanced Technology, End of Haft Bagh-e-Alavi Highway, Kerman, Iran
[2] Department of Agriculture Biotechnology, Guilan University, Guilan, I.R. Iran

* (Corresponding author): nahidaskari@gmail.com

Received: Jnne 2023 Accepted: September 2023

Abstract

Cancer is one of the most important causes of death worldwide. On the other hand, the therapeutic use of medicinal plants has increased during recent years. For this purpose, the aim of the present research was to investigate the effect of a *Cordia myxa* fruit extract on cellular proliferation and apoptosis gene expression (*BCL-2* and *BAX*) in lung cancer cell line (A549). The plant was collected and Hydroalcoholic extract was prepared by macerating method. Various concentrations of *Cordia myxa* extracts (of 0.25, 0.5, 1, 2, 4 mg/mL) obtained to treat lung cancer and fibroblast cell lines. Cells were examined by MTT-assay and Real Time RT-qPCR to determine the plant extract-induced cytotoxicity in cell lines with and without treatment The results showed that, the concentration of ≥2 mg/ml extract had a significant lethal effect on cancer cells. The expression of *BAX* gene in the treated cell line increased and the expression of *BCL*-2 gene decreased compared to the control. The extract of *Cordia myxa* fruit didn't show toxicity effects when used in low concentrations. However, this extract demonstrated the lower cytotoxicity against normal fibroblast cells. The combination therapy can be less toxic if both (plant extract and chemotherapeutic agent) use to treat cancers. It can be useful with fewer side effects of chemotherapeutic agents.

Keywords: Cordia myxa L, Lung Cancer cell line, BAX gene, BCL-2 gen.