فصلنامه علمی پژوهشی فیزیولوژی و تکوین جانوری
شماره پیاپی ۴۱، جلد ۱۱، شماره ۲،بهار۹۷، صفحه۵۹تا ۷۰

اثر فیستین در القا مرگ سلولی بر سلو ل های سرطان کولون رده ی CT-29

الهه ودایع خیری[۱]، کاظم پریور[۱]، **جواد بهارآرا**[۲]، بی بی صدیقه فضلی بزاز[۳و۴]، علیرضا ایرانبخش[۱]
۱- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم تحقیقات تهران، تهران. ایران.
۲-گروه زیست شناسی و مرکز تحقیقات بیولوژی کاربردی تکوین جانوری، دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد، مشهد.ایران.baharara@yahoo.com
۳-مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد. ایران.
٤-دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد. ایران.

تاریخ دریافت:۹۶/۱۰/۱۳ تاریخ پذیرش: ۹۷/۱/۲۰

چکیده

زمینه و هدف: فیستین فلاونوئیدی است که می تواند به طورمستقیم از طریق تغذیه بر سلامت انسان تاثیر گذار باشد تاکنون اثرات این فرآورده طبیعی درجلوگیری از تکثیر و القای آپوپتوز در سلول های سرطانی مختلف گزارش شده اما اثرات آن بر سرطان کولون رده سلولی CT-29 بررسی نشده است. هدف از مطالعه حاضر بررسی اثرات آپوپتوتیکی فیستین برسلول های سرطان کولون CT-29 می باشد.

روش کار: سلول های سرطانی رده ی CT-29 با غلظت های ۲۵، ۵۰، ۷۵، ۱۰۰ و ۱۲۵ میکروگرم بر میلی لیترفیستین به مدت ٤۸ ساعت تیمار شدند. میزان زیست پذیری سلول ها و غلظت مهاری IC_{50} با آزمون MTT محاسبه گردید. جهت بررسی القای آپوپتوز در سلول های CT-29 از روش های رنگ آمیزی DAPI و اکریدین اورنج- پروپودیوم یداید، آنالیز فلوسایتومتری انکسین ۵ – پروپودیوم یداید و بررسی بیان ژن های Bax, Bcl2 استفاده شد.

یافته ها: یافته های حاصل از آزمون MTT نشان داد فیستین به صورت وابسته به دوز باعث مهار تکثیر سلول های CT-29 می‌شود. نتایج رنگ آمیزی DAPI نشان داد که فیستین منجر به تراکم و شکست هایی در کروماتین می گردد، رنگ آمیزی اکریدن اورنج- پروپیدیوم یداید نشان دهنده افزایش درصد سلول های آپوپتوزی در سلول های تحت تیمار بود. هم چنین نتایج حاصل از بررسی های Real Time PCR نشان داد که درحالی که بیان ژن Bax در سلول تحت تیمار افزایش می یابد بیان ژن Bcl-2 در سلول های تیماری کاهش می یابد.

نتیجه‌گیری: بر طبق یافته های این پژوهش فیستین باعث القای آپوپتوز در سلول های سرطانی CT-29 می گردد. استفاده از این فلاونوئید می تواند به عنوان یک استراتژی امیدوارکننده در درمان سرطان کولون مورد توجه قرار گیرد.

واژه های کلیدی: فیستین، مرگ سلولی، سرطان کولون.

مقدمه

گستردگی بیماری ها در سال های اخیر باعث شده است که جستجوی روش های پیشگیری و درمان به طور چشم گیری افزایش یابد، سرطان بیماری است که رشد فزاینده ای داشته وسالانه تعداد زیادی را قربانی می گیرد، با وجود پیشرفت در درمان بیماری ها درمان سرطان هنوز به عنوان یک چالش مهم در جهان مطرح است و تحقیقات بسیاری در این زمینه در حال انجام می باشد (۷). بسیاری از روش های درمان سرطان از جمله داروهای شیمی درمانی علاوه بر هزینه ی زیاد، آسیب-های جدی به سلول های سالم بدن می زنند و عوارض جانبی بسیاری دارند، بنابراین جستجوی روشی موثر، کم هزینه، سازگار و کم خطر در اولویت برای انجام پژوهش است(۲۷). بیماری سرطان با پیشرفت غیر طبیعی سلول ها ایجاد می شود که با تغییراتی در فیزیولوژی سلول همراه می باشد، این تغییرات شامل توانایی تحریک رگ زایی، خودکفایی در سیگنال های رشد، عدم محدودیت در

همانند سازی، متاستاز و مقاومت به آپوپتوز است(۲). آپوپتوز به مرگ برنامه ریزی شده ی سلول اطلاق می-شود که در آن موجود زنده در جهت حذف سلول های ناخواسته که بقای سلول را تهدید می کند، عمل می-نماید(۶). واژه ی آپوپتوز برای اولین بار در سال ۱۹۷۲ میلادی توسط محققی به نام کر Keer جهت توصیف مرگ فیزیولوژیک سلولی بر اساس تغییرات مورفولوژیکی معرفی شد(۹). این نوع مرگ سلولی در شرایط طبیعی سبب حذف سلول های پیر، آسیب دیده، اضافی و مضر می شود و برای تکامل و هوموستازی بافتی ضروری است. هر گونه اختلال در روند آپوپتوز منجر به بیماری می شود. بنابراین بسیاری از روش های درمانی سرطان بر اساس ایجاد آپوپتوز در سلول های سرطانی انجام می شود(۱۸). با وجود پیشرفت در درمان بیماری ها درمان سرطان هنوز به عنوان یک چالش مهم در جهان مطرح است و تحقیقات بسیاری در این زمینه در حال انجام می باشد(۷). سرطان کلورکتال یکی از رایج ترین بیماری های بدخیم گوارشی سومین علت مرگ ناشی از سرطان در جهان غرب است، تقریباً ۵۰٪ مبتلایان دچار متاستاز می شوند(۴). خطر ابتلا به این بیماری به طور وسیعی به شرایط تغذیه افراد وابسته است که با توجه به رویکرد جوامع بشری برای استفاده از مواد غذایی آماده احتمال می رود درصد افراد مبتلا به این ناهنجاری در سال های آینده بیشتر شود(۱۹). این سرطان سالانه باعث مرگ بسیاری از افراد در کل جهان می گردد(۲۸). این نوع سرطان در مردان پس از سرطان ریه رایج ترین سرطان می باشد، بسیاری از پژوهش ها به بررسی نقش تغذیه در سرطان های سیستم گوارشی پرداخته اند و به بررسی گیاهان و یا ماده های موثر آنان به جهت سازگاری و اثرات جانبی کم تمرکز کرده اند(۱۷). خطر ابتلا به این نوع بیماری به طور وسیعی به شرایط تغذیه افراد وابسته است که با توجه به رویکرد جوامع بشری برای استفاده از مواد غذایی آماده احتمال می رود درصد افراد مبتلا به این ناهنجاری در سال های آینده بیشتر شود(۱۹). در حال حاضر طیف وسیعی از داروهای گیاهی در پزشکی مورد استفاده می باشد(۳۰). فلاونوییدها یکی از این نمایندگان می باشند، فیستین که در میوه ها و سبزیجات مختلفی یافت می شود نیز نوعی فلاونوئید است. میوه ها و سبزیجات منبع فراوانی از بسیاری از کوفاکتور، ویتامین ها، مواد معدنی هستند، ترکیبات شناخته شده به عنوان فلاونوئیدها توانایی خاصی در هدف قرار دادن وقایع کلیدی سلولی از جمله سرطان را دارند(۱۲). از جمله موارد که می توانند باعث القای مرگ برنامه ریزی شده در سلول های سرطانی شوند مواد و فرآورده های طبیعی می باشند، در دهه‌های اخیر بررسی و جستجوی نقش گیاهان و مواد غذایی و کاربرد آن ها به عنوان دارو مورد توجه قرار گرفته است، تحقیقات نشان می دهد گیاهان دارای ترکیبات فعالی هستند که می توان در شرایط آزمایشگاه آن ها را جدا کرد و در درمان انواع سرطان ها به کار برد(۱۱). فلاونوییدها از جمله ترکیبات فعال گیاهی هستند که در میوه‌ها، سبزیجات و غلات سبوس‌دار که توسط انسان مصرف می‌شوند، به وفور یافت می شوند(۲۵). فیستین نوعی فلاونویید است که اثرات بیولوژیکی و فارماکولوژیک مختلفی دارد و می تواند به طور مستقیم بر روی سلامت تاثیرگذار باشد(۲۲). تا به امروز اثرات ضد التهابی، آنتی اکسیدانی و ضد سرطانی فلاونویید در مطالعات مختلف گزارش شده است(۲۶). نتایج مطالعات نشان می دهد که مصرف فلاونوییدها در عادات غذایی از ابتلا به سرطان روده ی بزرگ جلوگیری می کند و بهبود این بیماری را در شرایط بالینی به دنبال دارد(۲۰). مطالعه ای دیگر اثر فیستین را برروی سلول های سرطان سینه بررسی کرده است نتایج نشان می دهد فیستین آپوپتوز را در سلول های سرطانی سینه سبب شده

است(۲۹). اثر فیستین بر روی سرطان پروستات نیز بررسی شده است، یافته های این پژوهش نشان داده اند که فیستین باعث توقف این سلول ها در فاز ۲G/میتوز می شود، به علاوه تیمار این سلول ها با فیستین باعث مهار تکثیر سلولی، تهاجم، مهاجرت، زیستایی و تشکیل کلونی سلول های سرطانی پروستات می گردد و P-gp پروتئین مقاوم به انواع داروها را کاهش می دهد(۱۰). با توجه به نقش مهم فرآورده های طبیعی و تغذیه در درمان انواع مختلف سرطان، هدف از مطالعه حاضر بررسی اثرات آپوپتوتیکی فیستین بر سلول های سرطان کولون رده ی -۲۹CT می باشد. در بررسی آپوپتوز از روش‌های گوناگونی استفاده می شود، اندازه گیری توان زیستی سلول ها با آزمونMTT یکی از نمونه هاست MTT نمک تترازولیوم محلول درآب است وقتی این محلول در محیط محلول نمکی فاقد فنل رد آماده سازی می شود، محلول زرد رنگی می دهد این ترکیب در میتوکندری سلول های زنده توسط آنزیم دهیدروژناز تبدیل به ترکیب نامحلولی به نام فرمازان می شود که این محصول توسط حلال هایی مانند ایزوپروپانل اسیدی یا DMSO حل شده و رنگ ارغوانی بنفش را ظاهر می سازد(۲۴). این روش برای اندازه گیری های لنفوکاین های پرولیفرایتو، میتوژن ها لیز شده به واسطه ی کمپلمان ها، تعیین فاکتورهای رشدT-cell و بررسی اثرات سایتوتوکسیسیتی مواد و داروهای مختلف بر روی سلول-ها به کار گرفته می شود(۲۴). روش اکریدین اورنج اتیدیوم بروماید نوعی دیگر از روش های بررسی آپوپتوز می باشد. اکریدین اورنج به سلول های زنده و سالم نفوذ می کند و باعث ایجاد رنگ سبز در این سلول ها می-شود. در حالی که سلول هایی که به دچار آپوپتوز شده اند، هسته ای زرد تا قرمز دارند که به دلیل جذب اتیدیوم بروماید در سلول است(۱۵). با توجه به نقش مهم فرآورده های طبیعی و تغذیه در درمان انواع مختلف سرطان، هدف از مطالعه حاضر بررسی اثرات آپوپتوتیکی فیستین بر سلول های سرطان کولون رده ی -۲۹CT می-باشد.

مواد و روش ها

کشت و تکثیر سلول های کارسینومای کولونی CT-29

رده سلولی CT- 29 از موسسه انستیتو پاستور ایران، تهران تهیه و در محیط کشت (BioIdea, Iran RPMI1640 حاوی ۱۰ درصد FBS(Gibco ,USA) و نیز یک درصد آنتی بیوتیک استرپتومایسین- پنی سیلین (Gibco,USA) در فلاسک های مخصوص کشت سلولی، کشت داده و در انکوباتور باشرایط دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، ۵CO2٪ و رطوبت ۹۵٪ نگهداری گردید. هنگامی که سلول ها به رشد مناسب رسیدند در ظرف های کشت ۹۶ و ۶ چاهکی کشت داده و با فیستین برای انجام آزمون های مختلف تیمار شدند(۱).

بررسی سمیت سلولی

به منظور بررسی اثر کشندگی وسمیت از روش MTTاستفاده و سلول های CT- 29 با تعداد ۵× 10^5 درون چاهک های پلیت ۹۶ قرار گرفت. پس از ۲۴ ساعت سلول ها غلظت های ۲۵ ،۵۰، ۷۵، ۱۰۰ و۱۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر فیستین تیمار شدند. پس از گذشت ۴۸ ساعت محیط کشت چاهک ها خارج و محلول MTT اضافه گردید. در محیط تاریک و دمای ۳۷ و ۵٪ قرار داده شدند، پس از مدت ۴ ساعت کریستال‌های فورمازان تولید شده توسط سلول های زنده در(sigma, USA) dmso حل گردید. درصد زیست پذیری سلول ها با استفاده از معادله زیر محاسبه گردید(۸). ۱۰۰×(میانگین جذب نمونه ی کنترل /میانگین جذب نمونه ی تیمار شده)=درصد سلول های زنده

بررسی القا مرگ سلولی با روش انکسین ۵/ پروپودیوم یداید

پس از رسیدن سلول ها به شرایط مناسب، سلول ها با غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر فیستین که توسط آزمون MTT تعیین شده بود تیمار گردیدند. برای بررسی القای آپوپتوز بر روی سلول ها CT، آزمون انکسین انجام شد. جهت انجام این آزمون از کیت انکسین ۵/ پروپویدیوم یداید(Abcam, Germany) استفاده گردید. پس از گذشت ۴۸ ساعت از تیمار سلول-ها با غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر فیستین، سلول ها از کف پلیت جدا شده و به اپندورف منتقل وسانتریفوژ با دور ۲۰۰۰ انجام گرفت. با حذف محیط رویی به هر نمونه ۵۰۰ میکرولیتر و ۵ میکرولیتر انکسین ۵ و ۵ میکرولیتر پروپودیوم یداید اضافه و پس از انکوبه شدن سلول ها به مدت ۵ دقیقه در تاریکی، آنالیز سلول ها توسط دستگاه فلوسایتومر (Bd, Dublin, United Kingdom) انجام شد(۱).

رنگ آمیزی آکریدین اورنج پروپیدیوم یدید

این آزمون تغییرات هسته ی سلول ها را نمایش می-دهد و روشی برای تعیین نوع مرگ سلولی می باشد. پس از تیمار سلول ها با غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر فیستین درچاهک های ۶ خانه ای و گذشت ۴۸ ساعت سلول ها با تریپسین جدا و رنگ های اکریدین اورنج و پروپیدیوم یداید با نسبت های مساوی به سوسپانسیون سلولی اضافه شدند، پس از ۵ دقیقه نمونه ها با میکروسکوپ فلورسانس Olampus مورد بررسی قرار گرفتند(۸).

رنگ آمیزی هسته ای DAPI

برای بررسی تاثیر فیستین بر سلول های CT، تیمار سلول ها با غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر فیستین انجام شد، پس از گذشت ۴۸ ساعت، سلول ها با پارافرمالدهید ۴ درصد به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق ثابت و در نهایت سلول ها به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق تحت تاثیر رنگ DAPI(4,6-diamidino-2-phenylindole) قرار داده شدند، سپس تغییرات ایجاد شده در مورفولوژی سلول ها با میکروسکوپ Biorad بررسی گردید(۳).

بررسی بیان ژن

میزان بیان ژن های Bax , Bcl 2 با استفاده از Real time PCR سنجیده شد. در ابتدا RNA با استفاده از کیت استخراج RNA (Denazist, Iran)، استخراج گردید. غلظت RNA برای ساخت مولکول های DNA مکمل توسط دستگاه نانودراپ در طول موج ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر تعیین، سپس بر طبق پروتوکل با کیت cDNA سنتز cDNA (thermofisher,Germany) انجام گرفت. برای بررسی آپوپتوز پرایمرهای ژن های هدف Bax و Bcl2 استفاده شد، هم چنین GAPDH به عنوان کنترل داخلی استفاده گردید(۲۱)(شکل ۱).

Genes	Sequence
BCL-۲F	CATGTGTGTGGAGAGCGTCAAC
BCL ۲R	CAGATAGGCACCCAGGGTGAT
BAXF	TTTGCTTCAGGGTTTCATCCA
BAXR	CTCCATGTTACTGTCCAGTTCGT
GAPDHF	TGAAGGTCGGTGTGAACGGATTTGGC
GAPDHR	CATGTAGGCCATGAGGTCCACCAC

شکل ۱- توالی پرایمرهای مورد استفاده

نتایج

بررسی سمیت سلول

آزمون MTT به منظور میزان تاثیر فیستین بر روی رشد و تکثیر سلول های سرطانی رده سلولی CT- ۲۹

انجام گرفت و نتایج مهارقوی تکثیر وابسته به غلظت را در سلول های سرطان کولون رده CT-29 توسط فیستین گزارش می دهد. جذب نوری به دست آمده از سلول-های تیمار شده با غلظت های مختلف فیستین و تعیین غلظت مهاری مشخص کرد که غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر از فیستین منجر به مرگ ۵۰ ٪ از سلول ها شده است. هم چنین نتایج حاصل از آزمون MTT مهار قوی وابسته به غلظت را در سلول های سرطان کولون رده CT-29 توسط فیستین گزارش می دهد(نمودار۱).

نمودار۱- درصد بقای سلول های سرطانی کولون CT-29 در برابر غلظت های مختلف فیستین در مدت زمان ۴۸ ساعت

** P< ۰/۰۱ *** P<۰/۰۰۱

بررسی القا مرگ سلولی با روش انکسین ۵/ پروپودیوم یداید

برای بررسی نوع مرگ سلولی از آزمون انکسین استفاده شد نتایج نشان می دهد که درصد آپوپتوز درگروه تحت تیمار با غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر فیستین نسبت به گروه کنترل بیشتر می باشد. نتایج این بررسی نشان می دهد که ۹۸ درصد سلول های گروه کنترل سالم بوده، در حالی که در گروه تحت تیمار درصد آپوپتوز اولیه ۴۶/۲ ٪ و میزان آپوپتوز ثانویه۱۳/۱ ٪ مشاهده شده است. هم چنین در این سلول نکروز مشاهده نشد(نمودار۲).

رنگ آمیزی آکریدین اورنج- پروپودیوم یداید

سلول های سالم و زنده هسته ی طبیعی دارند و در این نوع رنگ آمیزی به رنگ سبزنمایان می شوند، سلول‌های آپوپتیک هسته ی قطعه قطعه دارند هسته سلول های آپوپتوتیک اولیه به رنگ زرد تا نارنجی کم رنگ، هسته سلول هایی که دچار آپوپتوز ثانویه شده اند به رنگ نارنجی تیره و هسته سلول هایی که دچار نکروز شده اند به رنگ قرمز تبدیل می شود. نتایج این آزمون بیان می کند که سلول های ۲۹ -CT که تحت تیمار با فیستین بوده اند هسته شان تغییر رنگ داده و به سمت رنگ های زرد تا نارنجی متمایل می شود. در حالی که سلول های سالم دارای هسته ای سبزرنگ هستند(شکل۲).

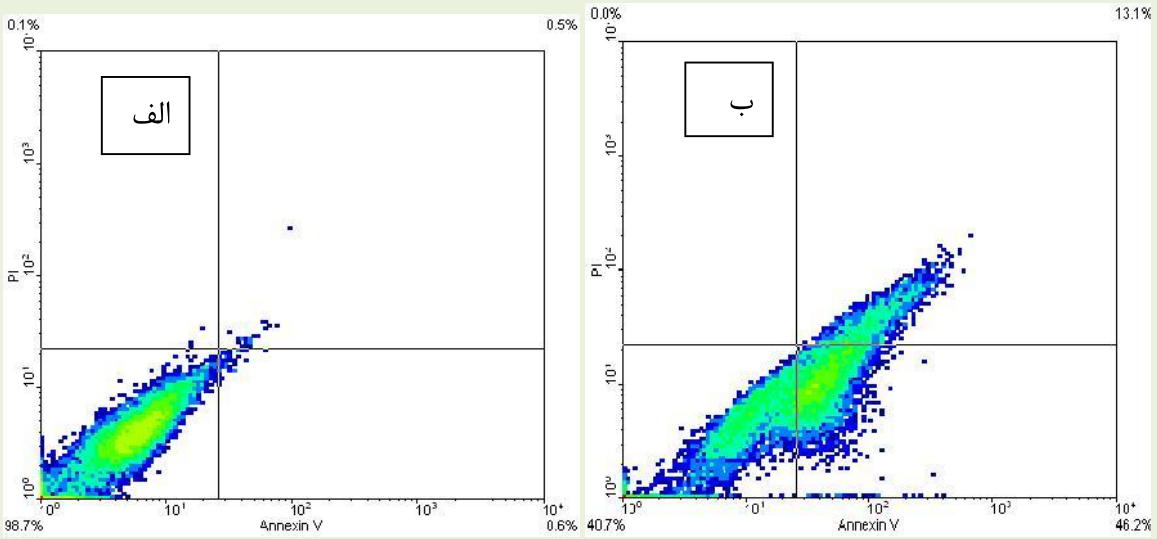
رنگ آمیزی هسته ایDAPI

DAPI یک رنگ فلورسنت است که با قدرت به نواحی غنی از آدنین-تیمین در DNA متصل می شود به

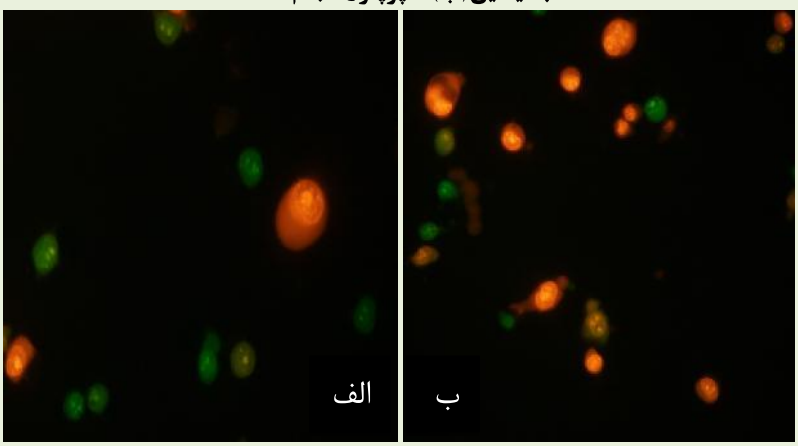
وسیله این رنگ می توان سلول ها را از نظر مورفولوژی بررسی کرد، پس از تیمار سلول ها با غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر فیستین، نتایج رنگ آمیزی DAPI نشان داد که هسته ها قطعه قطعه می شوند و شکل سلول-ها نیز تغییر نموده و بیان گر وقوع آپوپتوز در این سلول‌ها نسبت به گروه کنترل می باشد(شکل ۳).

بررسی بیان ژن

تغییر در بیان ژن های آپوپتوزی Bax و ۲Bcl در سلول های سرطانی کولون تیمار شده با غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر فیستین با استفاده از روش Real time PCR پس از ۴۸ ساعت ارزیابی شد. نتایج نسبت بیان ژن‌های Bax و Bcl 2 نسبت به ژن مرجع در رده سلولی سرطان کولون تیمار شده نشان می دهد که بیان ژن آپوپتوتیکی Bax افزایش داشته است، هم چنین کاهش بیان ژن آنتی آپوپتوتیکی Bcl 2 مشاهده می شود(نمودار۳).

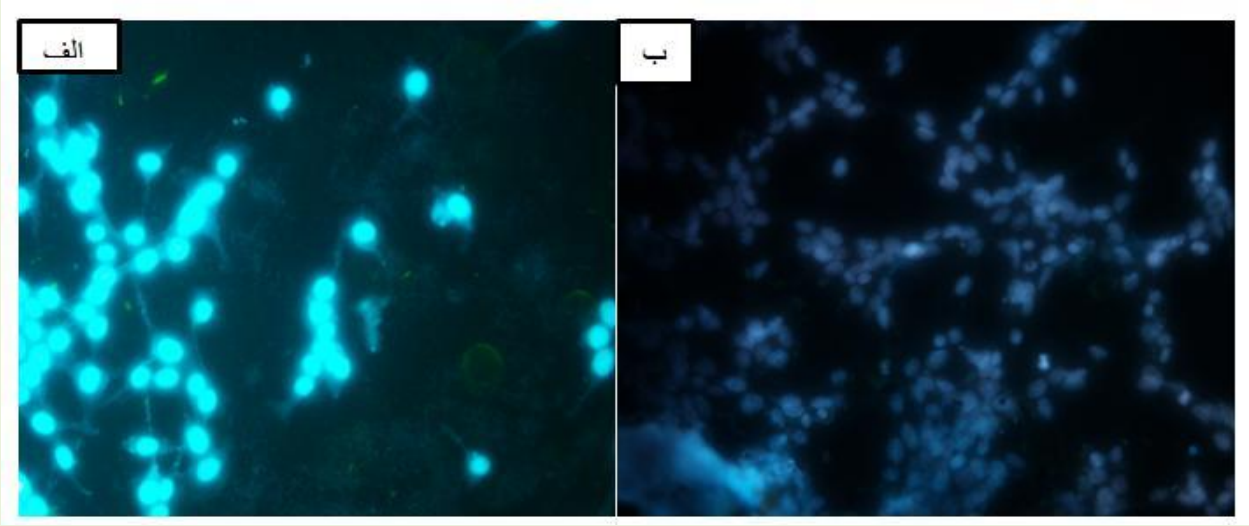


نمودار۲ – نتایج آزمون Annexin V-FPI گروه کنترل(الف) بیش از ۹۸ درصد سلول ها زنده و سالم هستند. گروه سلول های تیمار شده با فیستین(ب)، آپوپتوز انجام داده اند.



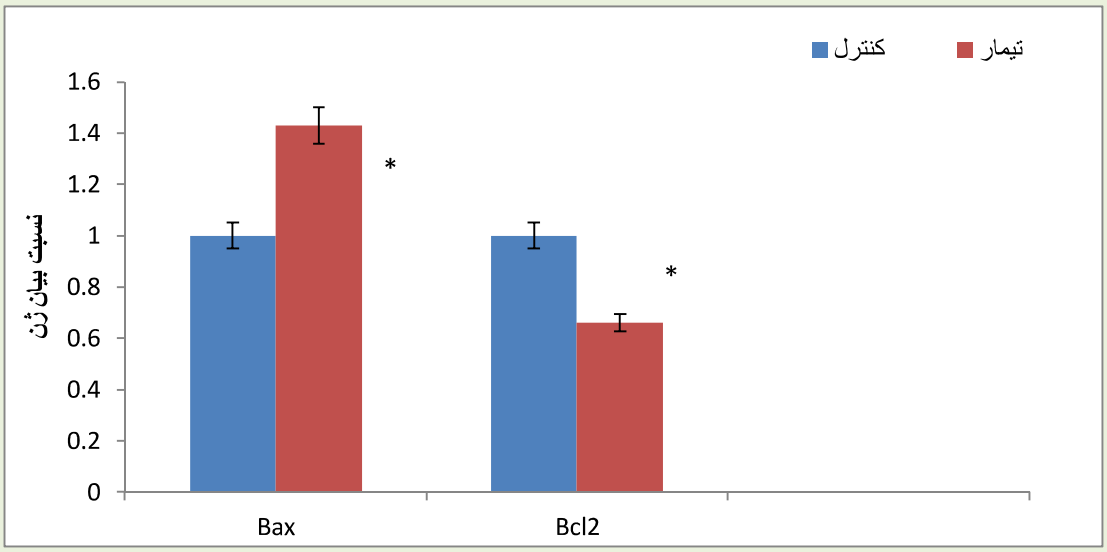
شکل۱- رنگ آمیزی اکریدین اورنج – پروپودیوم یداید(درشت نمایی ۴۰۰ ×). سلول های سبز رنگ سالم هستند و سلول های نارنجی رنگ دچار آپوپتوز شده اند.

الف:گروه کنترل، درصد سلول های سالم با رنگ سبز در این گروه بیشتر می باشد. ب: گروه تیمار، مرگ سلولی در این گروه بیشتر می باشد



شکل۳- رنگ آمیزی DAPI(درشت نمایی ۴۰۰ ×).

الف: گروه کنترل، سلول ها سالم هستند و شکل خود را حفظ کرده اند. ب: گروه تیمار، سلول های تیمار شده با فیستین قطعه قطعه شده اند که نشان دهنده‌ی آپوپتوز در این سلول ها می باشد.



نمودار۳- نسبت بیان ژن Bax و Bcl2 نسبت به ژن GAPDH در سلول های سرطان کولون رده CT-29 تیمار شده توسط فیستین
*** P<۰/۰۵**

بحث و نتیجه گیری

سرطان در سال های اخیر به یکی از دلایل اصلی مرگ بشر تبدیل شده است، این بیماری از تغییر ماهیت سلول های سالم بوجود می آید(۲۹). در بدن تحت یک اصول معین سلول ها با نظم مشخصی تولید و تکثیر و رشد پیدا می کنند و به تدریج از بین می روند و سلول-های جدید جایگزین سلول های از بین رفته می شوند. این روند طبیعی به طور مرتب تکرار شده و اعضای بدن مرتباً از سلول های جدید و سالم برخوردار می شوند، درشرایطی که سلول های طبیعی تغییر ماهیت داده، میزان رشد آن ها از کنترل خارج شده و به صورت خود مختار و بدون وقفه رشد و گسترش پیدا می کنند، بدین ترتیب نظم و ساختار بافت طبیعی و عضو را به هم می زنند(۶). آپوپتوز، اتوفاژی و نکروز انواعی از مرگ سلولی محسوب می شوند. نکروز مرگ پاتولوژیک سلول در زمان آسیب های شدید به سلول ازجمله هیپرترمی، هیپوکسی و سموم خارجی است. همراه با تورم سلول، تخریب غشا و آزاد شدن محتویات سلول اتفاق می افتد که می تواند موجب واکنش های التهابی و آسیب سلول-های مجاور گردد(۱۸). آپوپتوز مرگ فیزیولوژیک

سلول و در واقع مرگ برنامه ریزی شده سلول است که در شرایط طبیعی سبب حذف سلول های آسیب دیده می‌شود. در نتیجه فعال شدن مسیر های آپوپتوزی، تغییرات مورفولوژی و مولکولی سلول و تشکیل اجسام آپوپتوتیک رخ می دهد که در نهایت توسط ماکروفاژها بلعیده می گردند(۷). آپوپتوز می تواند باعث مرگ یک سلول شود، بدون این که تاثیر التهابی بر سلول های مجاور داشته باشد بنابراین در میان این سه مسیر مرگ سلولی، آپوپتوز بهترین مسیر مرگ سلولی می باشد در صورتی که این فرآیند مختل شود، باعث ایجاد سرطان یا دیگر اختلالات می گردد. از این رو، تنظیم آپوپتوز در درمان سرطان با اهمیت است(۲). عوامل متعددی موجب ایجاد سرطان می شوند به طور مثال مواد موتاژن که منجر به موتاسیون درDNA می شود که بر وقایع مربوط به رشد سلول ها اثر گذاشته و زمینه سرطان را فراهم می کنند(۱۷). در پی آزمایشات مختلف بر عوامل سرطان به این نتیجه دست یافته اند که رژیم غذایی مناسب دارای تاثیرات مشخص بر کاهش شیوع تومور در بسیاری از مدل ها بوده است، هم چنین سرطان کولون یکی از سرطان های با شیوع بالا است که به طور مستقیم با تغذیه در ارتباط است(۴). مطالعات اپیدمیولوژی سرطان موید وجود ترکیبات پیشگیری کننده از سرطان در رژیم غذایی می باشد، دریافت مقادیر بالایی از میوه و سبزیجات نشان داد که با کاهش ریسک سرطان ریه و مجاری گوارشی مرتبط است(۱۹). اثرات محافظتی سرطان ممکن است به ترکیبات مختلفی در میوه و سبزی ارتباط داشته باشد(۲۰). مطالعه ای پیرامون تاثیر تغذیه بر سرطان نشان داد که رژیم های سرشار از گوشت قرمز و هم چنین رژیم های فاقد فیبر موجب افزایش خطر سرطان کولون می شوند در حالی که افرادی که غالباً از گوشت ماهی استفاده می کنند کمتر در خطر ابتلا به سرطان کولون هستند(۲۸). شیمی درمانی به عنوان درمان اصلی برای بیشتر سرطان ها در نظر گرفته می شود، اما به علت اثرات جانبی فراوان این نوع درمان، تلاش ها ی اخیر بیشتر بر روی ترکیبات طبیعی برای جلوگیری از گسترش سرطان صورت می گیرد(۲۷). در مطالعه حاضر برای بررسی القای آپوپتوز توسط فیستین در میان سلول هایCT ۲۹ از روش های مختلفی استفاده شد. نتایج MTT نشان می‌دهد که در غلظت ۱۰۰µM فیستین، حدود ۵۱٪ آپوپتوز نسبت به گروه کنترل مشاهده گردید. بنابراین برای روش های بعدی از این غلظت استفاده شد. مشخص گردید که با تیمار سلول ها توسط فیستین، میزان سلول های آپوپتوز شده انکسین مثبت و PI منفی افزایش می‌یابد. در پژوهش کنونی نتایج فلوسایتومتری آزمون انکسین نشان داد که فیستین القای بیشتر آپوپتوز نسبت به نکروز را در سلول های سرطان کولون دارد. این نتایج در تایید MTT نشان می دهد که سلول هایی که در روش MTT تحت تاثیر فیستین بوده اند، دچار آپوپتوز شده‌اند و این آنتی اکسیدان بر روی این رده سلولی در شرایط آزمایشگاهی مؤثر می باشد. در پژوهش کنونی نتایج فلوسایتومتری آزمون انکسین نشان داد که فیستین القای بیشتر آپوپتوز نسبت به نکروز را در سلول های سرطان کولون دارد. روش رنگ آمیزی اکریدین اورنج-اتیدیوم بروماید نیز برای بررسی آپوپتوز مورد مطالعه قرار گرفت، نتایج نشان دادند که رنگ اکریدین اورنج در گروه کنترل به طور وسیعی توسط سلول های سالم جذب شد، اما گروه تیمار شده بیشتر رنگ اتیدیوم بروماید را جذب کردند که نشان دهنده ی آپوپتوز در سلول های تحت تیمار است. آپوپتوز در سلول ها با تغییرات مورفولوژیکی خاصی همراه است که از آن جمله می توان کوچک شدن سلول ها، از دست دادن چسبندگی به ماتریکس، انقباض سلولی، تراکم کروماتین‌ها و قطعه قطعه شدن هسته اشاره کرد(۵). در

پژوهش حاضر برای بررسی تغییرات مورفولوژیک هسته از رنگ آمیزی DAPI استفاده شد نتایج این رنگ آمیزی قطعه قطعه شدن هسته ها در نمونه های تحت تیمار با فیستین نسبت به گروه کنترل را به خوبی نشان می‌دهد. یافته های حاصل از این آزمون نیز القا آپوپتوز توسط فیستین را در سلول های سرطان کولون نمایش دادند. سلول های گروه کنترل بیشتر به رنگ سبز درآمدند درحالی که سلول های گروه تیماربیشتر زرد تا قرمز بودند. بالا بودن میزان نسبت Bax/Bcl ۲ یکی از شاخصه های پیشرفت مرگ برنامه ریزی شده ی سلول از طریق آپوپتوز است(۱۶). هم چنین در این مطالعه جهت بررسی مسیر مولکولی وابسته به مرگ سلولی تغییرات بیان ژن های آپوپتوزی Bax وBcl۲ مورد بررسی قرار گرفت نتایج نشان داد که بیان ژن پرو آپوپتوزی Bax در سلول های تیماری افزایش یافت در حالی که بیان ژن آنتی آپوپتوزی-Bcl2 کاهش یافت. تحقیقات نشان داده است فیستین باعث ایجاد آپوپتوز در سلول های سرطان ریه شده است، Klimaszewska با بررسی تغییرات بیان Baxو Bcl2 در سلول های سرطان ریه که با فیستین تیمار شده اند، نشان دادند که فیستین باعث ایجاد آپوپتوز در این سلول ها می شود(۸). C-Pal و همکارانش در سال۲۰۱۳ تاثیر فیستین را بر روی سلول های سرطان پوست رده ی۴۳۲ A را بررسی کرده اند. نتایج بیان ژن نشان دادند که فیستین باعث القای آپوپتوز بر روی رده ی سلولی۴۳۲ Aمی شود و تکثیر این سلول ها را کاهش می دهد، همچنین بیان ژن های آپوپتوتیک Bax,Bad و Bak را افزایش می دهد(۲۱). هم چنین Li همکارانش با مطالعه بر روی مدل حیوانی مبتلا به سرطان مثانه اثربخشی فیستین را تایید کردند، نتایج نشان داده است در رت‌هایی که فیستین را دریافت کرده بودند بیان ژن های آپوپتوتیک نظیر P ۵۳ افزایش یافته است(۱۴). با بررسی فیستین بر روی سلول های سرطان سینه رده ی MCFV، مشخص شده است که فیستین آپوپتوز را در این سلول ها القا می کند. پژوهشگران در این بررسی دریافتند که فیستین باعث افزایش فعالیت کاسپاز ۳، ۸ و ۹ می شود و از اتوفاژی این سلول ها ممانعت می کند(۲۹). Adan در پژوهشی نقش دو فلاونویید فیستین و هسپارتین را با روش های مختلف بر روی لوکمیا بررسی کردند، از آن جمله آزمونMTT، انکسین و بررسی بیان ژن های آپوپتوزی می باشند، نتایج تمام آزمایشات نشان داده است که فیستین و هسپارتین ژن های مربوط به تکثیر سلولی، تقسیم سلولی و آپوپتوز را تنظیم می کنند و اثر ضد سرطان دارند(۱). پژوهشی دیگر اثر فیستین را بر روی سرطان رحم بررسی کرده است. پژوهش‌گران به جستجوی نقش آنتی متاستازی فیستین بر روی این سرطان بوده اند. نتایج پژوهش آنان نشان داد فیستین مانع مهاجرت سلول های سرطانی می شود(۳). پژوهشی دیگر برروی مدل موش های سرطانی پوست انجام شده است. این موش ها فیستین را به صورت موضعی دریافت کرده-اند، نتایج یافته های این گروه کاهش مارکرهای التهابی، مارکرهای تکثیری و سیتوکینازها را توسط فیستین نشان داده است. هم چنین افزایش بیان پروتئین P۵۳ وP۲۱ نیز مشاهده شده است(۱۳). نتایج این گزارشات با یافته های این پژوهش همسو بود.

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که فیستین منجر به مهار تکثیر و القای آپوپتوز در سلول های سرطانی رده۲۹ Ct می شود.

تشکر و قدردانی

از همکاران مرکز تحقیقات و بیولوژی کاربردی تکوین جانوری دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد، مخصوصاً سرکار خانم دکتر رمضانی صمیمانه سپاس-گزاری می شود.

منابع

1.Adan, A., Baran, Y. (2015). The pleiotropic effects of fisetin and hesperetin on human acute promyelocytic leukemia cells are mediated through apoptosis, cell cycle arrest, and alterations in signaling networks. Tumour Biol., 36(11); 8973–8984.
2.Brown, J.M., Attardi, L.D. (2005). The role of apoptosis in cancer development and treatment response. Nat. Rev. Cancer, 5(3); 231–237.
3.Chou, R.H., Hsieh, S.C., Yu, Y.L., Huang, M.H., Huang, Y.C., Hsieh, Y.H. (2013). Fisetin inhibits migration and invasion of human cervical cancer cells by down-regulating urokinase plasminogen activator expression through suppressing the p38 MAPK-dependent NF-kB signaling pathway. PLoS One, 8(8); 1–12.
4.Cutsem, E.V., Cervantes, A., Nordlinger, B., Arnold, D. (2014). Metastatic colorectal cancer: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. Ann. Oncol., 25;1-9.
5.Firdhouse, M.F., Lalitha, P. (2015). Apoptotic efficacy of biogenic silver nanoparticles on human breast cancer MCF-7 cell lines. Prog. Biomater, 4(2–4); 113–121.
6.Gump, J.M., Thorburn, A. (2011). Autophagy and apoptosis: whats the connection? Apoptosis, 21(7); 387-392.
7.Indran, I.R., Tufo, G., Pervaiz, S., Brenner, C. (2011). Recent advances in apoptosis, mitochondria and drug resistance in cancer cells. Biochim. Biophys. Acta, 1807(6); 735–745.
8.Klimaszewska-Wisniewska, A., Halas-Wisniewska, M., Tadrowski, T., Gagat, M., Grzanka, D., Grzanka, A. (2016). Paclitaxel and the dietary flavonoid fisetin: a synergistic combination that induces mitotic catastrophe and autophagic cell death in A549 non-small cell lung cancer cells. Cancer Cell Int.; 16; 10-18.
9.Kerr, J.F., Wyllie, A.H., Currie, A.R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide- ranging implications in tissue kinetics. Br J Cancer, 26(4); 239-257.
10. Khan, N., Afaq, F., Syed, D.N., Mukhtar, H. (2008). Fisetin, a novel dietary flavonoid, causes apoptosis and cell cycle arrest in human prostate cancer LNCaP cells. Carcinogenesis, 29(5); 1049–1056.
11. Lagari, V.S., Levis, S. (2013). Phytoestrogens in the prevention of postmenopausal bone loss. J. Clin. Densitom, 16(4); 445–449.
12. Lall, R.K., Adhami, V.M., Mokhtar, H. (2016). Dietary flavonoid fisetin for cancer prevention and treatment. Mol. Nutr. Food Res., 60(6); 1396–1405.
13. Li, J., Cheng, Y., Qu, W., Sun, Y., Wang, Z., Wang, H. (2011). Fisetin, a dietary flavonoid, induces cell cycle arrest and apoptosis through activation of p53 and inhibition of NF-kappa B pathways in bladder cancer cells. Basic Clin Pharmacol Toxicol, 108(2); 84-93.
14. Li, J., Qu, W., Cheng, Y., Sun, Y., Jiang, Y., Zou, T. (2014). The inhibitory effect of intravesical fisetin against bladder cancer by induction of p53 and down-regulation of NF-kappa B pathways in a rat bladder carcinogenesis model. Basic Clin. Pharmacol. Toxicol., 115(4); 321–329.
15. Liu, K., Liu, P.C., Liu, R., Wu, X. (2015). .Dual AO/EB staining to detect apoptosis in osteosarcoma cells compared with flow cytometry. Med Sci Monit Basic Res, 21; 15–20.
16. Moldoveanu, T., Follis, A.V., Kriwacki, R.W., Green, D.R. (2014). Many players in BCL-2 family affairs. Trends Biochem. Sci, 39(3); 101–111.
17. Mosieniak, G., Adamowicz, M., Alster, O., Jaskowiak, H., Szczepankiewicz, A.A., Wilczynski, G.M. (2012). Curcumin induces permanent growth arrest of human colon cancer cells: link between senescence and autophagy. Mech. Ageing Dev, 133(6); 444–455.
18. Mukhopadhyay, S., Kumar Panda, P.K., Sinha, N., Nandini, Das. D., Bhuti, S.K. (2014). Autophagy and apoptosis: where do they meet? Apoptosis, 19(4); 555-566.
19. Nimptsch, K., Zhang, X., Cassidy, A., Song, M., O'Reilly, É.J., Lin. J.H. (2016). Habitual intake of flavonoid subclasses and risk of colorectal cancer in 2 large prospective cohorts. Am. J. Clin. Nutr, 103(1); 184–191
20. Noura, E., Gemma, W., Adele, C., Gunter, K., Spencer Jeremy, S. (2014). Polyphenols, glucosinolates, dietary fibre and colon cancer: understanding the potential of specific types of fruit and vegetables to reduce bowel cancer progression. Nutr. Aging, 2(23); 45–67.
21. Pal, H.C., Sharma, S., Elmets, C.A., Athar, M., Afaq, F. (2013). Fisetin inhibits growth, induces G2/M arrest and apoptosis of human epidermoid carcinoma A431 cells: Role of mitochondrial membrane potential disruption and consequent caspases activation. Exp Dermatol, 22(7); 470–475.
22. Pal, H.C., Diamond, A.C., Strickland, L.R., Kappes, J.C., Katiyar, S.K., Elmets, C.A. (2016) Fisetin, a dietary flavonoid, augments the anti-invasive and anti-metastatic potential of

sorafenib in melanoma. Oncotarget, 7(2); 1227-1241.

23. Pi, F., Zhang, H., Li, H., Thiviyanathan, V., Gorenstein, D.G., Sood, A.K. (2017). RNA nanoparticles harboring annexin A2 aptamer can target ovarian cancer for tumor-specific doxorubicin delivery. Nanomedicine Nanotechnology, 13(3); 1183-1193.

24. Seidl, K., Zinkernagel, A.S. (2013). The MTT assay is a rapid and reliable quantitative method to assess *Staphylococcus aureus* induced endothelial cell damage. J. Microbiol. Methods, 92(3); 307–309.

25. Schilling, T., Ebert, R., Raaijmakers, N., Schütze, N., Jakob, F. (2014). Effects of phytoestrogens and other plant-derived compounds on mesenchymal stem cells, bone maintenance and regeneration. J. Steroid Biochem. Mol. Biol, 139; 252–261.

26. Sirotkin, A.V., Harrath, A.H. (2014). Phytoestrogens and their effects. European Journal of Pharmacology,741; 230-236.

27. Weber, J.S., D'Angelo, S.P., Minor, D., Hodi, F.S., Gutzmer, R., Neyns, B. (2015). Nivolumab versus chemotherapy in patients with advanced melanoma who progressed after anti-CTLA-4 treatment(CheckMate 037): a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. Lancet Oncol, 16(4); 375–384.

28. Wei, E.K., Colditz, G.A., Giovannucci, E.L., Wu, K., Glynn, R.J., Fuchs, C.S. (2017). A comprehensive model of colorectal cancer by risk factor status and subsite using data from the nurses' health study. Am J Epidemiol, 185(3); 224–237.

29. Yang, P.M., Tseng, H.H., Peng, C.W., Chen W.S., Chiu, S.J. (2012). Dietary flavonoid fisetin targets caspase-3-deficient human breast cancer MCF-7 cells by induction of caspase-7-associated apoptosis and inhibition of autophagy. Int. J. Oncol., 40(2); 469–478.

30. Zeriouh, W., Nani, A., Belarbi, M., Dumont, A., de Rosny, C., Aboura, I. (2017). Phenolic extract from oleaster (*Olea europaea* var. Sylvestris) leaves reduces colon cancer growth and induces caspase-dependent apoptosis in colon cancer cells via the mitochondrial apoptotic pathway. PLoS One, 12(2); 44-59.

The Effect of Fistin on Inducing Cell Death on Colon Cancer CT-29 Cell Line

E.Vadaye Kheiry[1], K. Parivar[1], **J.Baharara [2]**, S.Fazly Bazzaz BiBi[3'4], A.Iranbakhsh [1]

1. Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran**.**

2. Research Center for Animal Development Applied Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran**. baharara@yahoo.com**

3. Biotechnology Research Center, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran**.**

4. School of Pharmacy, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran.

Received:2018.3. 1 **Accepted: 2018.9.4**

Abstract

Inroduction & Objective: Fistin is a dietary flavonoid that can directly effect on human health. The effects of this natural product have been reported on induction of apoptosis in some cancer cells, but its effects on colon cancer of the cell line of CT-29 dont have been investigated. The aim of this study was to investigate the effects of fistin apoptosis on CT-29 colon cancer cells.

Material and Method: CT-29 cancer cells were treated with 25, 50, 75, 100 and 125 µg / ml of fisetin for 48 hours. The rate of cells vaiability were calculated by MTT assay. For detection apoptosis induction in CT-29 DAPI staning, Acridine Orange-Propodium iodine staning, Anxin 5-Propodium iodide flow cytometry and Bax, Bcl2 expression analysis were used.

Results: The findings of the MTT assay showed that fistin dose-dependently inhibits the proliferation of CT-29 cells. DAPI staining results showed that fistin leads to chromatin defects, Orange-Propidium iodide staning showed increase in the percentage of apoptotic cells in treated groups. Also, the results of Real Time PCR showed Bax gene expression increased but, the expression of Bcl-2 gene decreased. Conclusion: Cording to the findings of this study, fistin induces apoptosis in CT-29 cancer cells. Using this flavonoid can be considered as a promising strategy in the treatment of colon cancer.

Keywords: Fisetin- Cell Death- Colon Cancer.