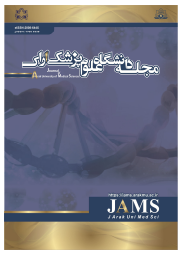
JAMS
مجله دانشگاه علوم پزشکی اراک
دوره بیست و یک، شماره چهار، مرداد و شهریور ۱۳۹۷
journal homepage: http://jams.arakmu.ac.ir



مقاله پژوهشی

بررسی اثر ضد سرطانی عصاره‌های آبی و هیدروالکلی برگ گیاه بومی دارمازو (*Quercus infectoria*) علیه رده سلولی سرطان کولون (HT29)

سحر عبدالان[۱]، فهیمه باغبانی آرانی[۱*]، سیدعطا اله سادات شاندیز[۲]

۱. گروه ژنتیک و بیوتکنولوژی، واحد ورامین- پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین، ایران.

۲. گروه زیست شناسی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

اطلاعات مقاله

تاریخ دریافت: ۹۶/۰۹/۲۰

تاریخ پذیرش: ۹۷/۰۲/۰۲

تاریخ انتشار: ۹۷/۰۵/۰۱

واژگان کلیدی:

گیاه دارمازو

Bax

Bcl-2

آپوپتوز

سرطان کولون

***نویسنده مسئول:**

فهیمه باغبانی آرانی

آدرس پستی: ایران، ورامین، دانشگاه آزاداسلامی واحد ورامین-پیشوا، گروه ژنتیک و بیوتکنولوژی.

تلفن: +98 912 602 2786

نمابر:

E-mail:
fbaghbani@iauvaramin.ac.ir

چکیده

زمینه و هدف: گیاه دارمازو(*Quercus infectoria*) در طب سنتی و مطالعات گذشته به عنوان درمان برای سرطان پیشنهاد شده است. هدف از پژوهش حاضر، بررسی اثر سمیت عصاره‌های آبی و هیدروالکلی برگ گیاه دارمازو علیه رده سلولی سرطانی کولون HT29 و ارزیابی تغییر بیان دو ژن Bax و Bcl-2 در سلول‌های تیمار شده می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه، عصاره آبی و هیدروالکلی برگ گیاه دارمازو تهیه گردید. سپس، رده‌های سلولی سرطانی HT29 و نرمال HEK293 توسط غلظت‌های مختلف عصاره‌ها به مدت ۲۴ ساعت تیمار شد و اثرات سمیت دو عصاره توسط روش رنگ‌سنجیMTT ارزیابی گردید. در نهایت، میزان بیان ژن پروآپوپتوزی Bax و ژن ضدآپوپتوزی Bcl-2 در سلول‌های تیمار شده نسبت به ژن مرجعGAPDH توسط روش Real-Time PCR مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: با توجه به نتایج تست MTT مشخص شد که فقط عصاره آبی دارای اثر توکسیسیتی وابسته به دوز علیه دو رده سلولی می‌باشد. از این‌رو، بیان ژن‌های Bax و Bcl-2 در سلول‌های تیمار شده با عصاره آبی به ترتیب به میزان ۲/۸ ($p<۰/۰۵$) و ۲/۲ ($p>۰/۰۵$) برابر نسبت به ژن مرجع تغییر یافت.

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج می‌توان گفت که عصاره آبی برگ گیاه دارمازو دارای قابلیت القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی کولون HT29 می‌باشد و با مطالعات بیشتر می‌توان آن را در درمان سرطان کولون به کار گرفت.

تمامی حقوق انتشار این اثر، متعلق به دانشگاه علوم پزشکی اراک می‌باشد.

۱. مقدمه

سرطان کولون سومین علت مرگ در اثر سرطان در دنیا می‌باشد. میزان بروز این بیماری در بومیان آلاسکا و سیاه پوستان بیشتر و در آسیایی‌ها به میزان کمتری مشاهده شده است (۱). هم‌چنین بروز این بیماری در آقایان به میزان ۳۰ تا ۴۰ درصد نسبت به خانم‌ها بیشتر می‌باشد. روش‌های درمانی به کار گرفته شده برای درمان سرطان کولون شامل ترکیبی از شیمی‌درمانی، پرتو درمانی و جراحی بوده که در اکثر موارد پیچیده و گران هستند. از این‌رو، به‌کارگیری ترکیبات طبیعی هم‌چون گیاهان دارویی به منظور مهار فرآیند تومورزایی و القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی یک استراتژی جدید برای مقابله با سرطان است که دارای اثرات جانبی و هزینه کمتری می‌باشند (۲). داروهای گیاهی از زمان‌های قدیم برای درمان طیف وسیعی از بیماری‌ها مورد استفاده قرار گرفته و نقشی کلیدی در بهداشت جهانی ایفا کرده‌اند. یکی از این گیاهان گیاه دارمازو است. گیاه دارمازو با نام علمی *Quercus infectoria* شناخته می‌شود که به دلیل داشتن ترکیبات ضدسرطانی، مطالعات بسیاری بر روی عصاره‌های الکلی و آبی ریشه، گال و پوسته گیاه دارمازو صورت گرفته است. دارمازو گیاه کوچکی است از راسته توس‌ها و از تیره بلوط است که با نام علمی *Quercus infectoria* شناخته می‌شود. *Quercus* از خانواده Fagaceae بوده که در ایران با نام بلوط شناخته می‌شود (۳). گزارشات حاکی از آن است که این گیاه دارای فعالیت‌های آنتی اکسیدانی، ضدالتهابی، ضدباکتریایی و آنتی‌دیابتیک می‌باشد (۴). ترکیب گالوتانیک اسید یکی از اجزاء اصلی یافت شده در *Q.infectoria* است که به عنوان یک ماده ضدسرطانی و آنتی اکسیدان شناخته شده است. آنتی اکسیدان‌هایی مانند فلاونول از این گیاه می‌توانند به اثر ضدکارسینوژیک کمک کنند که سبب مهار تکثیر سلولی در شرایط آزمایشگاهی می‌شوند. هم‌چنین در طب سنتی، از این گیاه در درمان زرد زخم، اگزما، خون‌ریزی، اسهال مزمن و خونی استفاده شده است (۵، ۶). به طور کلی، القای مرگ برنامه‌ریزی شده سلول (آپوپتوز) یکی از رویکردهای جذاب در درمان سرطان به شمار می‌رود. بنابراین بیشتر مطالعات سال‌های اخیر در جهت یافتن داروهای ضد سرطانی می‌باشد که بتواند آپوپتوز را در سلول‌های سرطانی القا کند. در طی مسیر آپوپتوز سلول‌ها، تخریب غشای هسته و سیتوپلاسم منجر به قطعه قطعه شدن سلول شده که سریعاً توسط فاگوسیت‌ها بلعیده می‌شوند. عوامل بسیاری از جمله توکسین‌ها، هورمون‌ها، سیتوکین‌ها، اشعه‌ها، حرارت، عفونت ویروسی، کمبود اکسیژن، ازدیاد غلظت کلسیم داخل سلول و نیتریک اکسیدها سبب وقوع آپوپتوز می‌شوند (۷). گزارشات حاکی از آن است که فرآیند ایجاد بسیاری از سرطان‌ها از جمله سرطان کولورکتال به وسیله اختلال در چندین مسیر سیگنالینگ رخ می‌دهد که سبب تکثیر، مهار آپوپتوز و کاهش متاستاز می‌شود (۸). در مهره‌داران، خانواده ژن‌های Bcl-2 مسیر میتوکندریایی آپوپتوز را از طریق تعامل‌های پیچیده‌ای تنظیم می‌کند. خانواده Bcl-2 از لحاظ عملکرد به دو گروه آپوپتوتیک و آنتی‌آپوپتوتیک طبقه‌بندی می‌شوند. در پژوهش حاضر، دو ژن آپوپتوتیک Bax و آنتی آپوپتوتیک Bcl-2 برای ما حائز اهمیت هستند (۹، ۱۰). با توجه به مطالعات مشخص شده است که تاکنون مطالعه‌ای بر روی اثرات سمی دو عصاره آبی و هیدروالکلی برگ گیاه دارمازو بر رده سلولی سرطانی HT29 صورت نگرفته است. هم‌چنین، تاکنون ارزیابی بیان ژن‌های آنتی آپوپتوتیک Bcl2 و آپوپتوتیک Bax در سلول‌های نرمال و سرطانی تیمار شده توسط این دو نوع عصاره انجام نشده است. از این‌رو، در این مطالعه میزان سمیت دو نوع عصاره آبی و هیدروالکلی برگ گیاه دارمازو و تغییرات بیان دو ژن Bax و Bcl-2 را در رده سلولی سرطانی کولون HT29 و نرمال HEK293 تیمار شده توسط دو عصاره مورد ارزیابی قرار دادیم.

۲. ملاحظات اخلاقی

این پژوهش در کمیته اخلاق دانشگاه آزاد واحد ورامین-پیشوا دارای تاییدیه به شماره IR.IAU.Varamin.REC.1396.4 می باشد.

۳. مواد و روش‌ها

گیاه دارمازو پس از جمع آوری از مناطق شمال کشور و تایید توسط کارشناس سیستماتیک گیاهی به روش ماستراسیون عصاره‌های آبی و هیدروالکلی آن تهیه شد. به این صورت که به منظور تهیه عصاره آبی، ۲۰ گرم از پودر خشک شده برگ گیاه در ۲۰۰ سی‌سی آب ریخته شد و به مدت ۲۴ ساعت بر روی شیکر قرار داده شد. سپس محلول حاصل از کاغذ صافی عبور داده شد و در چندین پلیت ریخته شد. پس از تبخیر حلال، ۰/۱ گرم از پودر حاصل در ۱ میلی‌لیتر بافر PBS و ۹ میلی‌لیتر محیط DMEM high glucose (Biosera, USA) حل شد. عصاره هیدروالکلی هم به همین روش تهیه شد، با این تفاوت که ۲۰ گرم از پودر برگ خشک شده گیاه در ۴۰ سی‌سی آب و ۱۶۰ سی‌سی اتانول ۸۰ درصد (مجللی، ایران) ریخته شد (۱۰) و به منظور استریل کردن عصاره‌ها از فیلتر سلولزی (میلی پور، آمریکا) عبور داده شدند.

به منظور کشت سلولی، رده‌های سلولی HT29 و HEK293 از انستیتو پاستور ایران تهیه شدند و در محیط DMEM high glucose غنی شده با ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (FBS) (Gibco, Scotland)، در شرایط ۵ درصد دی‌اکسیدکربن و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. به منظور بررسی اثر میزان سمیت عصاره‌ها بر رده‌های سلولی از روش رنگ سنجی MTT (Sigma Aldrich، آلمان) استفاده شد. بر اساس مطالعات گذشته (۱۵-۱۰)، غلظت‌های ۱، ۰/۱، ۰/۰۱، ۰/۰۰۱ و ۰/۰۰۰۱ و ۰/۰۰۰۰۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از دو عصاره ی آبی و هیدروالکلی تهیه شد و رده‌های سلولی سرطانی و نرمال در بازه زمانی ۲۴ ساعت توسط غلظت‌های تهیه شده از دو عصاره تیمار شدند. پس از گذشت زمان فوق محتوای پلیت ۹۶ خانه‌ای به دقت خارج شد و رنگ MTT به هر چاهک اضافه شد و پلیت به مدت ۴ ساعت در شرایط ۵ درصد دی اکسیدکربن و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. در نهایت، پس از گذشت ۴ ساعت رنگ MTT از پلیت خارج شد و کریستال‌های فورامازان تولید شده توسط سلول‌های زنده، در ایزوپروپانول حل گردید. در نهایت جذب نوری رنگ حاصله توسط دستگاه قرائت‌گر الایزا (ELISA reader, Oraganon Teknika، هلند) در طول موج ۵۷۰ نانومتر خوانده شد و میزان بقای سلول‌ها از تقسیم جذب نوری سلول‌های تیمار شده به جذب نوری تیمار نشده به عنوان کنترل محاسبه گردید. در این تست، برای هر غلظت ۸ بار تکرار در نظر گرفته شد و میزان دوز IC50 (Inhibitor concentration یا دوز ۵۰ درصدکشندگی سلول‌ها) نیز محاسبه شد.

میزان بیان ژن‌های آپوپتوزی Bax و ضدآپوپتوزی Bcl-2 با استفاده از روش Real-Time PCR مورد ارزیابی قرار گرفت. بدین منظور، ابتدا کل RNA سلول‌ها با استفاده از کیت استخراج Trans Gene Biotech استخراج شد و سپس سنتز cDNA بر اساس پروتکل همان کیت صورت گرفت. به منظور انجام واکنش Real-Time PCR، حجم نهایی هر میکروتیوپ ۲۰ میکرولیتر لحاظ شد که حاوی ۱۰ پیکومول از پرایمرهای جلوبر و برگشتی مربوط به هر ژن، ۴۰ نانوگرم cDNA، ۱۰ میکرولیتر mastermix و ۷ میکرولیتر آب RNase free بود. در این واکنش، ژن‌های Bax و Bcl-2 به عنوان ژن هدف و ژن GAPDH به عنوان ژن مرجع در نظر گرفته شدند. توالی پرایمرهای به‌کار گرفته شده در این واکنش در جدول ۱ مشخص شده است.

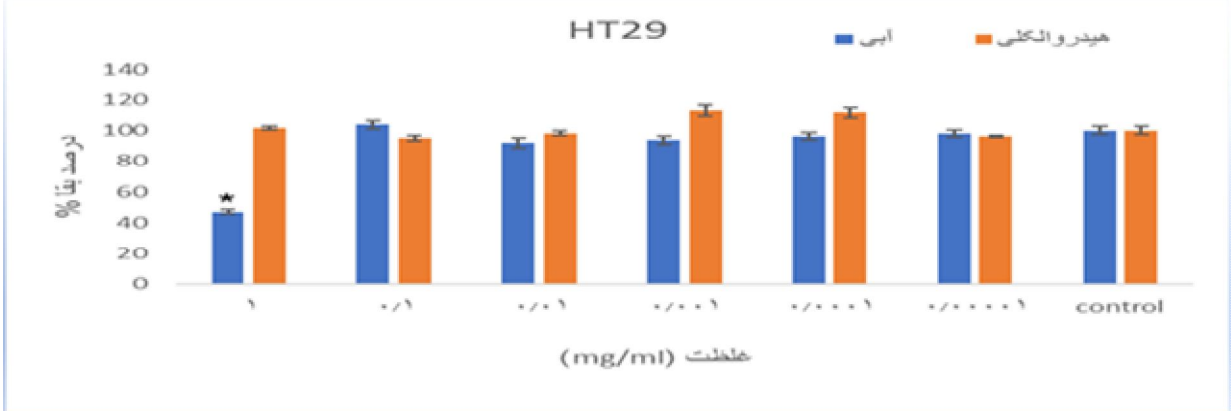
جدول ۱. توالی پرایمرهای به کار گرفته شده در واکنش Real-Time PCR (F : پرایمر جلوبر، R: پرایمر برگشتی)

ژن	توالی پرایمر (5'→3')	طول قطعه تکثیری
Bcl-2 F	TGTGGATGACTGAGTACCTGAACC	122 bp
Bcl-2 R	CAGGCAGGAGAAATCAAACAGAG	
Bax F	TTGCTTCAGGGTTTCATCCAG	101bp
Bax R	AGCTTCTTGGTGGACGCATC	
GAPDH F	CGTCTGCCCTATCAACTTTCG	74bp
GAPDH R	CGTTTCTCAGGCTCCCTCT	

در این تحقیق، برنامه زمانی گرمایی دستگاه PCR (مدل ABI 7300، Foster City,CA,USA ,Applied Biosystems) به صورت ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه، مرحله دوم ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه و ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و مرحله آخر دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه صورت گرفت. در نهایت، تجزیه و تحلیل داده‌ها مطابق مقایسه چرخه آستانه انجام گرفت و اختلاف چرخه آستانه به‌دست آمده از سلول‌های تیمار شده با عصاره‌ها و سلول‌های تیمار نشده با عصاره محاسبه شد و با استفاده از فرمول ΔΔCt، نسبت ژن هدف به ژن مرجع از طریق فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$ مورد محاسبه قرار گرفت. داده‌های به دست آمده با استفاده از تحلیل واریانس یک طرفه و تست تعقیبی توکی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و محاسبه p با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ انجام گرفت. همچنین، مقدار$p < ۰/۰۵$ در هر تست معنی‌دار در نظر گرفته شد.

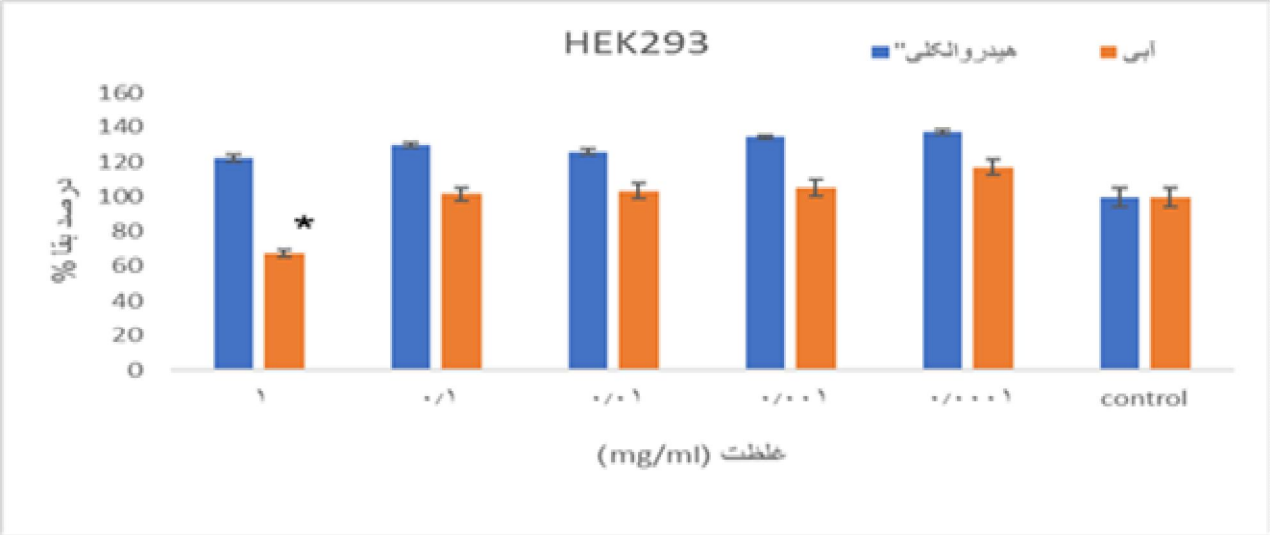
۴. یافته‌ها

تیمار سلول‌های HEK293 و HT29 توسط عصاره‌های آبی و هیدروالکلی با غلظت‌های مختلف (۱، ۰/۱، ۰/۰۱، ۰/۰۰۱ و ۰/۰۰۰۱ و ۰/۰۰۰۰۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) در بازه زمانی ۲۴ ساعت با استفاده از تست MTT صورت گرفت. نتایج حاصله به صورت میزان درصد بقای سلول‌ها در نمودارهای ۱ و ۲ نشان داده شده است، به طوری که عصاره آبی گیاه دارمازو تنها در غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اثر کشندگی معناداری ($p < ۰/۰۵$ *) را روی هر دو رده سلولی نشان می‌دهد و بقیه غلظت‌ها اثر کشندگی نداشته‌اند. این در حالی است که عصاره هیدروالکلی هیچ نوع اثر کشندگی معناداری را روی دو رده سلول سرطانی و نرمال نشان نمی‌دهد.



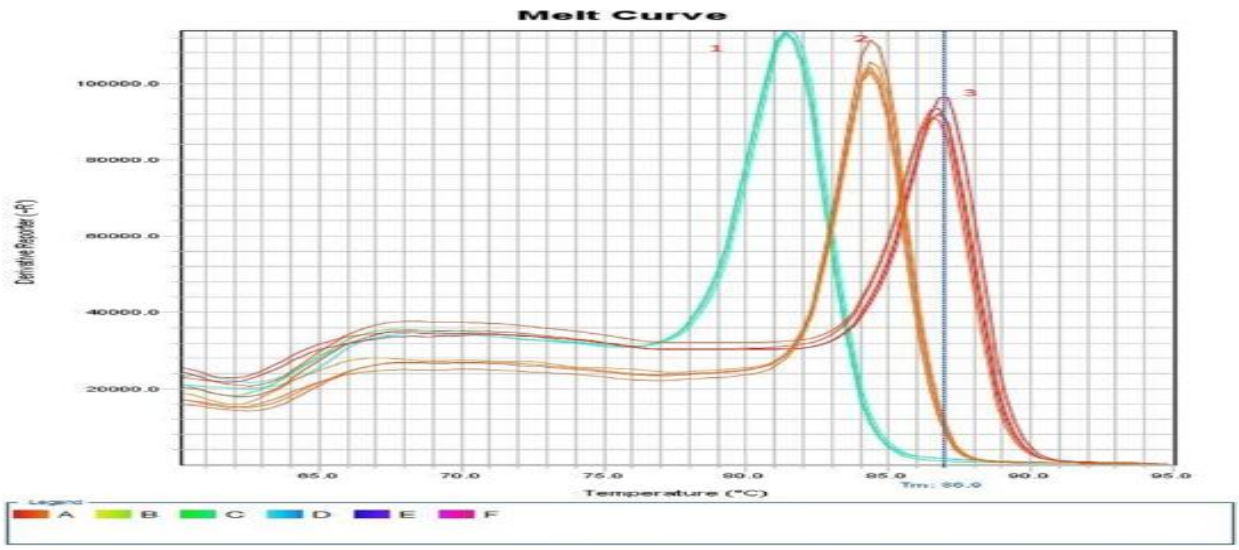
نمودار ۱. محاسبه درصد بقای رده سلولی HT29 تیمار شده توسط دو عصاره آبی و هیدروالکلی برگ گیاه دارمازو در بازه زمانی ۲۴ ساعت: نتایج به صورت درصد بقا گزارش شده است($p < ۰/۰۵$ *).

میزان دوز IC50 برای عصاره آبی در بازه زمانی ۲۴ ساعت در رده سلولی سرطانی HT29 غلظت ۰/۹۶۳ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در نظر گرفته شد. همان‌طور که در نمودار ۲ نیز مشخص است، غلظت ۱/۴۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در سلول‌های نرمال HEK293 نیز سبب کشته شدن حدود ۵۰ درصد از سلول‌ها شده است.

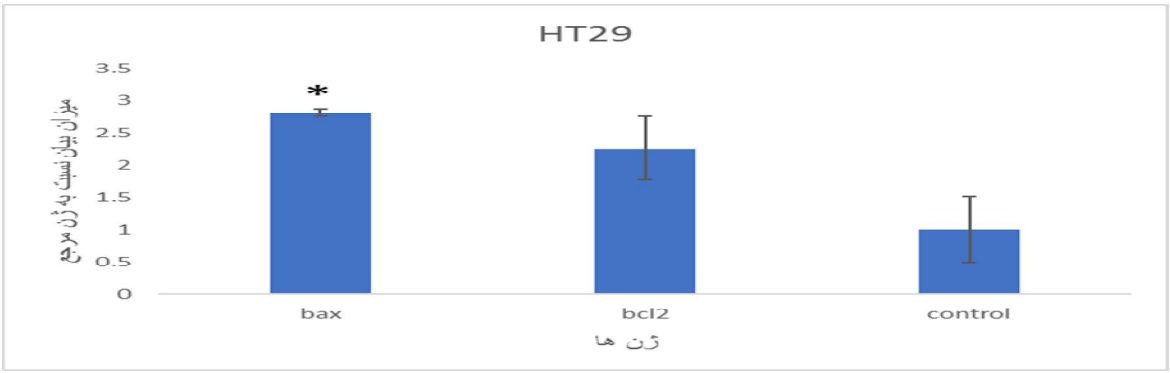


نمودار ۲. محاسبه درصد بقای سلول‌های نرمال HEK293 تیمار شده توسط دو عصاره آبی و هیدروالکلی برگ گیاه دارمازو در بازه زمانی ۲۴ ساعت. نتایج به صورت درصد بقا گزارش شده است ($p < ۰/۰۵$ *).

پس از مشخص شدن دوز IC50، سلول‌های رده سلولی HT29 به منظور ارزیابی بیان ژن‌های Bax و Bcl-2 توسط عصاره آبی گیاه دارمازو با دوز IC50 تیمار شدند و پس از گذشت ۲۴ ساعت، میزان بیان ژن‌ها توسط روش Real-Time PCR مورد ارزیابی قرار گرفت. با توجه به نمودار ۳، 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 ژن‌های Bax و Bcl-2 نسبت به ژن مرجع به ترتیب ۲/۸ ($p<۰/۰۵$) و ۲/۲ ($p>۰/۰۵$) برابر می‌باشد. به عبارتی، میزان بیان ژن Bax افزایش یافت و تغییر معناداری در بیان ژن Bcl-2 نسبت به ژن مرجع مشاهده نشد (نمودار ۴).



نمودار ۳. نمودار نشان دهنده منحنی ذوب ژن‌های GAPDH (۱)، Bcl-2 (۲) و Bax (۳) می‌باشد که محور عمودی نشان دهنده مشتق فلورسنت به مشتق زمان و محور افقی نشان دهنده درجه سانتی‌گراد است. الگوی منحنی ذوب ژنGAPDH ۸۱/۵۴ درجه سانتی‌گراد، ژن Bax ۸۶/۹ درجه سانتی‌گراد و ژن Bcl-2 ۸۴/۵۲ درجه سانتی‌گراد نشان داده شده است. در این واکنش، علامت فلورسنت به صورت خطی است که بیان‌گر عدم جفت شدن آغازگرها و فقدان باند غیر اختصاصی است.



نمودار ۴. تغییر بیان ژن‌های هدف و مرجع در رده سلولی سرطانی تیمار شده توسط عصاره آبی گیاه دارمازو طی ۲۴ ساعت ($p < ۰/۰۵$ *).

۵. بحث

سرطان یکی از مشکلات عمده سلامت و علت اصلی مرگ نه تنها در کشورهای توسعه نیافته، بلکه در کشورهای توسعه یافته است. طی سال‌های اخیر، دانشمندان با تلاش‌های فراوان در زمینه سرطان توانسته‌اند برخی از بیماری‌های بدخیم را به مرحله درمان برسانند. از سال‌های گذشته، روش‌های درمانی مختلفی در زمینه سرطان استفاده شده است که با محدودیت‌هایی همراه می‌باشند. با این حال، روش‌های رایج در درمان سرطان سبب دست‌یابی به پیشرفت‌هایی در این زمینه شده است و استراتژی درمان‌های اخیر نیاز به تحقیقات بیشتر در محصولات طبیعی داشته که سبب تولید داروهای موثری در درمان سرطان گردیده است (۱۱).

خاصیت ضدسرطانی و برخی دیگر از خواص عصاره‌های گیاهی از چندین سال قبل شناخته شده و استفاده مجدد از فرآورده‌های طبیعی همچون گیاهان دارویی می‌تواند رویکرد مثبتی در کنترل و درمان طیف وسیعی از بیماری‌ها از جمله سرطان باشد. از این‌رو، مطالعات مختلفی بر روی اثرات سمیت سلولی عصاره گیاهان بر روی رده‌های سلولی سرطانی صورت گرفته است. مطالعات نشان داده ترکیبات طبیعی همچون عصاره‌ها قابلیت استفاده در درمان سرطان را داشته و سبب کاهش عوارض جانبی و افزایش اثربخشی درمان می‌شود (۱۲).

به عنوان مثال، نتایج تحقیقات شریعتی فر و همکاران در سال ۲۰۱۴ اثرات توکسیک عصاره‌های آبی و اتانولی برگ گیاه دارمازو را علیه پاتوژن‌های مواد غذایی مورد تایید قرار داد. نتایج پژوهش آن‌ها نشان داد که عصاره آبی و اتانولی بیشترین تاثیر را بر روی باکتری Bacillus cereus نسبت به دیگر پاتوژن‌ها از جمله Staphylococcus aureus، Yersinia entercolitica، Salmonella typhi و Vibrio cholera دارد (۱۳). هم‌چنین، در تحقیقاتی که توسط هاسما و همکاران در سال ۲۰۱۰ صورت گرفت، مشخص شد که عصاره‌های آبی، اتانولی و متانولی گال‌های گیاه دارمازو در بازه‌ی زمانی ۷۲ ساعت دارای اثرات توکسیسیتی علیه رده‌های سلولی سرطانی تخمدان و دهانه رحم می‌باشد (۱۰). در تحقیق دیگری که توسط روشنی و همکاران صورت گرفت، مشخص شد که عصاره استونی گیاه دارمازو بر روی سلول‌های سرطانی کولون ایجاد شده توسط ۲۰ میلی‌گرم ۱-۲ دی متیل هیدرازین در مدل موشی (در شرایط درون تنی) دارای فعالیت ضد سرطانی می‌باشد (۱۴). یرانی و همکاران تحقیقی در مورد فعالیت ضدتکثیری و ضد جهش زایی گیاه *Q.infectoria* انجام دادند. تحقیقات آن‌ها نشان داد که عصاره هیدرالکلی پوسته گیاه دارمازو در شرایط آزمایشگاهی سبب مهار جهش‌زایی از طریق سرکوب ترشح MMP-2، MMP-9 و VEGF می‌گردد (۱۵). با این حال مشخص است که تاکنون در مورد اثر عصاره‌های آبی و هیدروالکلی برگ گیاه دارمازو بر روی بیان ژن‌های آپوپتوزی مطالعه‌ای صورت نگرفته است. در مطالعه حاضر، به بررسی میزان سمیت دو عصاره آبی و هیدروالکلی برگ گیاه دارمازو علیه رده‌های سلولی سرطانی کولون HT29 و HEK293 در بازه‌ی زمانی ۲۴ ساعت پرداخته شد. نتایج حاکی از آن بود که عصاره آبی برگ گیاه دارمازو در غلظت ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر دارای اثر کشندگی علیه هر دو رده سلولی بوده، اما عصاره هیدروالکلی دارای هیچ فعالیت توکسیسیتی نمی‌باشد. با توجه به مطالعاتی که قبلا صورت گرفته، عصاره هیدرولکلی دارای فعالیت توکسیک می‌باشد، پس می‌توان تفاوت در نتایج دیگر تحقیقات و پژوهش حاضر را به بخشی از گیاه که از آن عصاره‌گیری صورت گرفته است نسبت داد. از طرفی، مشخص است که عصاره آبی بر هر دو رده سلول نرمال و سرطانی دارای اثر توکسیک می‌باشد. پس می‌توان گفت که دارای هدف‌گیری اختصاصی نیست و نیاز به انجام مطالعات بیشتری دارد. پس از مشخص شدن دوز IC50 ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر رده سلولی سرطانی HT29 توسط دوز IC50 عصاره آبی به منظور ارزیابی بیان ژن‌های آپوپتوتیک Bax و آنتی آپوپتوتیک Bcl-2 توسط روش Real-Time PCR تیمار شد. نتایج حاکی از آن بود که میزان بیان ژن Bax و Bcl-2 به ترتیب به مقدار ۲/۸ ($p < ۰/۰۵$) و ۲/۲ ($p > ۰/۰۵$) برابر افزایش یافتند.

یکی از مسیرهای درگیر در آپوپتوز، مسیر درونی (یا مسیر میتوکندریایی) است. در این مسیر، تغییرات مختلف درون‌سلولی از جمله شرایط تنش‌های اکسیداتیو، آسیب DNA و جهش در ژن‌های مسئول در آپوپتوز می‌توانند به عنوان سیگنال‌های داخلی عمل کنند. این سیگنال‌ها منجر به برهم‌کنش‌های پروتئین‌های ویژه‌ای از خانواده‌ای به نام خانواده ی Bcl-2 (Bcl-2 Family) شده است؛ از این طریق، سیتوکروم C از فضای بین دو غشاء میتوکندری وارد سیتوزول می‌گردد و با تشکیل کمپلکسی به نام آپوپتوزوم، مسیر آبشاری کاسپازها فعال می‌شود (۹). ژن Bax یک نقطه ورود منحصر به فرد برای مسیر سیگنالینگ آپوپتوز درونی است. این مسیر توسط محرک‌های مختلف از جمله محرومیت سیتوکین و استرس سیتوتوکسیک آغاز می‌شود. پروتوآنکوژن Bcl-2 به عنوان یک مهارکننده آپوپتوز شناخته شده که سبب تجمع و انتشار سلول‌های حاوی تغییرات ژنتیکی شده و به نظر می‌رسد فعالیت غیرطبیعی ژن Bcl-2 می‌تواند سبب مهار آپوپتوز و تسهیل فرآیند تومورزایی گردد (۱۰).

بالا بودن نسبت Bax به Bcl-2 یکی از شاخصه‌های پیشرفت مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی از طریق آپوپتوز است. بنابراین با توجه به نتایج، نسبت بیان ژن Bax به Bcl-2 توسط عصاره آبی بزرگ‌تر از ۱ بوده، پس می‌توان گفت که این عصاره سبب القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی می‌شود و در واقع می‌توان

به این نکته اشاره کرد که احتمالا عصاره آبی دارای مواد احیاکننده بیشتری بوده که توانسته مرگ آپوپتوزی بیشتری را القا کند.

با توجه به نتایج حاصل از این تحقیق و مطالعات پیشینی که بر روی گیاه دارمازو صورت گرفته است، مشخص است که این گیاه دارای فعالیت ضدسرطانی است. اما میزان این فعالیت به دوز عصاره‌های گیاه و هم‌چنین رده‌های سلولی به کار گرفته شده بستگی دارد. از طرفی باید این نکته را در نظر گرفت که نوع عصاره و هم‌چنین غلظت آن می‌تواند در رده‌های سلولی مختلف نتایج و شدت اثرات متفاوتی را از خود نشان دهد. هم‌چنین می‌توان تفاوت در میزان سمیت عصاره‌ها را به مناطق رشد گیاه نسبت داد. همان‌طور که در این تحقیق گفته شد، گیاه به‌کار گرفته شده بومی کشور ایران است و همین امر می‌تواند سبب تفاوت در عملکرد عصاره‌های گیاه نسبت به تحقیقات پیشین شود و در آخر باید به این نکته توجه کرد که عصاره‌گیری از قسمت‌های مختلف گیاه نیز سبب تفاوت در عملکرد سمیت عصاره‌های گیاه می‌گردد.

۶. نتیجه‌گیری

در این مطالعه، برای اولین بار به بررسی سمیت عصاره‌های آبی و هیدروالکلی برگ گیاه دارمازو بومی کشور ایران علیه رده سلولی سرطانی کولون HT29 پرداخته شد و مشخص شد که عصاره آبی برگ این گیاه دارای اثر توکسیسیتی علیه رده سلولی HT29 بوده و می‌تواند سبب القای آپوپتوز از طریق افزایش بیان ژن آپوپتوتیک Bax در سلول‌های HT29 شود. بنابراین با توجه به مشکلاتی که در به‌کارگیری جراحی، پرتودرمانی و شیمی‌درمانی در درمان سرطان وجود دارد، می‌توان با مطالعه بیشتر بر روی گیاه دارمازو تأیید اثرات آن در محیط آزمایشگاهی و اثرات ضد سرطانی آن در مدل‌های حیوانی را مورد بررسی قرار داد.

۷. تقدیر و تشکر

مقاله حاضر بخشی از پایان نامه کارشناسی ارشد رشته ژنتیک دانشگاه آزاد واحد ورامین-پیشوا می‌باشد و هیچ‌گونه حامی مالی نداشته است. بدین‌وسیله نویسندگان از مساعدت‌های کارکنان شرکت دانش بنیان جاوید بیوتیک به ویژه جناب آقای دکتر عسگری و خانم بیگدلی سپاس‌گزاری می‌نمایند.

۸. سهم نویسندگان

تمامی نویسندگان معیارهای استاندارد نویسندگی بر اساس پیشنهادات کمیته بین المللی ناشران مجلات پزشکی را دارا بودند.

۹. تضاد منافع

بدین‌وسیله نویسندگان تصریح می‌نمایند که هیچ‌گونه تضاد منافعی در خصوص پژوهش حاضر وجود ندارد.

References

1. Siegel R, DeSantis C, Jemal A. Colorectal cancer statistics, 2014.CA Cancer J Clin 2014; 64(2):104-17.
2. Green DR, Evan GI. A Matter of Life and Death. Cancer Cell. 2002; 1(1):19-30.
3. BasriD, Fan SH. The potential of aqueous and acetone extract of galls of quercus infectoria as antibacterial agents. Indian J Pharmacol 2005; 37: 26-29.
4. Kaur G, Hamid H, Ali A, Alam MS, Athar M. Antiinflammatory evaluation of alcoholic extract of galls of Quercus infectoria. J Ethnopharmacol 2004; 90(2-3):285-92.
5. Umachigi SP, Jayaveera KN, Kumar CA, Kumar GS, Kumar DK. Studies on Wound Healing Properties of Quercus infectoria. Trop J Pharm Res. 2008; 7 (1): 913-919.
6. Lim TK. Edible medicinal and non-medicinal plants: New York, NY, USA: Springer; 2012.
7. Yin C, Knudson CM, Korsmeyer SJ, Van Dyke T. Bax suppresses tumorigenesis and stimulates apoptosis in vivo. Nature. 1997; 385(6617):637-40.
8. Yoo KC, Yoon CH, Kwon D, Hyun KH, Woo SJ, Kim RK, Lim EJ, Suh Y, Kim MJ, Yoon TH, Lee SJ. Titanium dioxide induces apoptotic cell death through reactive oxygen species-mediated Fas upregulation and Bax activation. Int J Nanomedicine. 2012; 7:1203-14.
9. Sinicrope FA, Cleary KR, Stephens LC, Lee JJ, Levin B. bcl-2 and p53 oncoprotein expression during colorectal tumorigenesis. Cancer Res. 1995; 15; 55(2):237-41.
10. Trusheva B, Trunkova D, Bankova V. Different extraction methods of biologically active components from propolis: a preliminary study. Chem Cent J. 2007; 1(1):13.
11. Hasmah A, Nurazila Z, Chow CY, Rina R, Rafiquzzaman M. Cytotoxic effects of Quercus infectoria extracts towards cervical (Hela) and Ovarian (Caov-3) cancer cell lines. Health and the Environment Journal. 2010; 1(2):17-23.
12. Sak K. Chemotherapy and dietary phytochemical agents. Chemother Res Pract. 2012; 20; 2012.
13. Shariatifar N, Fathabad AE, Khaniki GJ, Nasrabadi HG. Evaluation of the antibacterial activity of essential oil and aqueous and ethanolic extracts of Quercus infectoria leaves on food-borne pathogenic bacteria. Int J Pharm Sci Res. 2014; 5(10):709-13.
14. Roshni P. Ramesh. KG. Anticancer Activity of Ac-etone Extract of Quercus Infectoria Olivier Fagaceae in 1, 2 Dimethyl Hy-drazine Induced Colon Cancer. Int J Cancer Stud Res. 2013; 2(1):13-7.
15. Yarani R, Mansouri K, Mohammadi-Motlagh HR, Mahnam A, Emami Aleagha MS. In vitro Inhibition of Angiogenesis by Hydroalcoholic Extract of Oak (Quercus infectoria) a corn Shell via Suppressing VEGF, MMP-2, and MMP-9 Secretion. Pharm Biol. 2013; 51(3):361-8.

JAMS
Journal of Arak University of Medical Sciences
2018; 21(4)
Journal Homepage: http://jams.arakmu.ac.ir

ORIGINAL RESEARCH

Evaluation of Anticancer Effect of Aqueous and Hydroalcoholic Extracts *of Quercusin Fectoria* Leaf against Colon Cancer HT29 Cell Line

Sahar Abdalan[1], Fahimeh Baghbani-Arani[1*], Seyed Ataollah Sadat Shandiz[2]

1. Department of Genetics and Biotechnology, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin, Iran.
2. Department of Biology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

ARTICLE INFORMATION

Article history:
Received: *11 December 2017*
Accepted: *22 April 2018*
Published online: *23 July 2018*

Keywords:
Quercus infectoria
Bax
Bcl-2
Apoptosi
Colon cancer

**** Corresponding Author:***
Fahimeh Baghbani-Arani; Department of Genetics and Biotechnology, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin, Iran.
Tel: *+98 912 602 2786*
Fax:
Email: *fbaghbani@iauvaramin.ac.ir*

ABSTRACT

Background and Aim: In traditional medicine and previous studies, *Quercus infectoria* plants have been suggested as a cancer treatment. The aim of the current study was to investigate the cytotoxic effect of aqueous and hydro alcoholic extracts of *Quercus infectoria* leaf against colon cancer HT29 cell line and to evaluate the Bax and Bcl-2 gene expression in treated cells.

Materials and Methods: In this study, aqueoFus and hydro alcoholic extracts of *Quercus infectoria* leaf were prepared. Then, the HT29 and HEK293 cell lines were treated by various concentrations of extracts for 24 hours and the cytotoxicity effect of extracts was estimated by colorimetric MTT (methyl thiazolyl tetrazolium) assay. Finally, the pro-apoptotic Bax and anti-apoptotic Bcl-2 gene expression in treated cells compared to GAPDH reference gene expression was evaluated using real time PCR technique.

Findings: According to the MTT results, the cytotoxic activity of aqueous extract has dose-dependent manner against both cell lines, therefore, the Bax and Bcl-2 gene expression levels in treated cells by aqueous extract were changed 2.8 ($p<0.05$) and 2.2-fold ($p>0.05$) compared to reference gene, respectively.

Conclusion: According to the results, it seems that the aqueous extract of *Quercus infectoria* leaf has the potential for apoptosis induction in colon cancer HT29 cell line and based on more studies, it can be used as a colon cancer treatment.

© Copyright (2018) Arak University of Medical Sciences

Cite this article as: Abdalan S., Baghbani-Arani F., Sadat Shandiz SA. Evaluation of Anticancer Effect of Aqueous and Hydroalcoholic Extracts of Quercusin Fectoria Leaf against Colon Cancer HT29 Cell Line. J Arak Uni Med Sci. 2018; 21(4): 48-57.

This open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution NonCommercial 4.0 License (CC BY-NC 4.0).