مقاله پژوهشی

ارمغان دانش، مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی یاسوج
دوره ۲۶، شماره ۱، فروردین و اردیبهشت ۱۴۰۰(شماره پی در پی ۱۴۴)

بررسی اثر عصاره میوه گیاه *Citrullus colocynthis* بر بیان ژن‌های casp3 و casp8 در رده سلولی سرطان گلیوبلاستومای انسانی (U87)

نهال عبدی[۱]، طاهره ناجی[۱*]، عبدالحمید انگجی[۲]

[۱]گروه علوم پایه، واحد علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران، [۲]گروه سلولی و مولکولی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران

تاریخ وصول : ۱۳۹۹/۰۴/۱۴ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۷/۳۰

چکیده:

زمینه و هدف: استفاده از ترکیبات استخراج‌شده از گیاهان طبیعی به دلیل کمتر بودن اثرات جانبی می‌تواند جایگزین مناسبی برای داروهای شیمیایی در درمان بیماری‌های کشنده‌ای مثل سرطان باشد. در این تحقیق اثر ضدسرطانی عصاره میوه گیاه هندوانه ابوجهل بر سلول‌های سرطانی گلیوبلاستوما انسانی رده سلولی U87 بررسی شده است. لذا هدف از این مطالعه تعیین و بررسی اثر عصاره میوه گیاه *Citrullus colocynthis* بر بیان ژن‌های کاسپاز ۳ و کاسپاز ۸ در رده‌ی سلولی سرطان گلیوبلاستومای انسانی بود.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی که در سال۱۳۹۸ در دانشکده داروسازی و علوم دارویی دانشگاه آزاد اسلامی انجام شد، عصاره میوه گیاه به روش استخراج با اتانول ۷۰ درصد تهیه شد و برای ارزیابی اثر سمیت 10^4 سلول از سلول‌های U87 با غلظت‌های مختلفی از این عصاره تیمار شد. این سلول‌ها به صورت گروه‌های مستقل تحت تیمار با غلظت‌های مشخص عصاره در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت قرار گرفتند و به وسیله روش MTT ارزیابی شدند. مقدار غلظت IC_{50} مشخص شده در زمان ۲۴ ساعت، به عنوان غلظت مبنا برای تیمار سلول‌ها جهت ارزیابی میزان بیان ژن به وسیله آزمون Real-Time PCR استفاده شد. داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از آزمون‌های آماری کولموگورف ـ اسمیرنوف، آنالیز واریانس یک طرفه و توکی تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: نتایج به دست آمده از آزمون MTT نشان داد که رشد سلول‌های تیمار شده در غلظت‌های بالاتر از غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از عصاره میوه کاملاً مهارشده است و مقدار IC_{50} محاسبه‌شده برای زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تیمار به ترتیب برابر ۱۳۳۷/۴۲ (p>۰/۰۰۰۱)، ۸۹۲/۹۹ (p=۰/۰۰۱۲) و ۳۸۷/۴۹ (p>۰/۰۰۰۱) میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصاره به دست آمد. استفاده از مقدار IC_{50} عصاره میوه گیاه هندوانه ابوجهل به مدت ۲۴ ساعت، باعث افزایش بیان ژن مربوط به کاسپاز ۳ و ۸ به ترتیب برابر ۳/۰۵۲(p=۰/۰۰۱۳) و ۲/۰۹۹(p=۰/۰۲۶۵) برابر می‌شود.

نتیجه‌گیری: این نتایج نشان داد که اثر سمیت سلولی عصاره میوه گیاه هندوانه ابوجهل بر رده سلولیU87 وابسته به غلظت و زمان است و مکانیسم اثر مهارکنندگی این عصاره می‌تواند بر اساس افزایش بیان ژن کاسپاز ۳ و ۸ برای القای مرگ سلولی از مسیر خارجی باشد. از عصاره میوه این گیاه می‌توان برای مهار رشد سلول‌های سرطانی گلیوبلاستوما و احتمالاً از بین بردن تومور مغزی استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: کاسپاز۸ ، کاسپاز۳، هندوانه ابوجهل،U87

***نویسنده مسئول: طاهره ناجی**، تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، علوم پزشکی تهران، دانشکده داروسازی و علوم دارویی، گروه علوم پایه
Email: tnaji2002@gmail.com

مقدمه

گلیوبلاستوما شایع‌ترین تومور مغزی اولیه در بزرگسالان، با میزان شیوع ۵ ـ۴ مورد در هر ۱۰۰۰۰۰ مورد است(۱). سلول‌های گلیوبلاستوما مولتی‌فورم به‌طور چشمگیری به پارانشیم مغز حمله می‌کنند و به طور طبیعی در برابر آپوپتوز و درمان‌های دارویی و پرتودرمانی مقاوم می‌باشند(۲). روش‌های درمانی معمول در درمان سرطان، دارای عوارض جانبی و محدودیت‌هایی هستند. به همین دلیل نیاز استفاده از ترکیبات طبیعی که دارای اثرات جانبی کم و همچنین ارزان باشند، برای درمان سرطان، روز به روز بیشتر احساس می‌شود. بر طبق پژوهش‌های سازمان جهانی بهداشت(WHO) گیاهان دارویی برای به دست آوردن داروهای گوناگون بهترین منبع می‌باشند(۳). در حال حاضر به دلیل داشتن ویژگی‌های مختلف درمانی، گیاهان دارویی مورد توجه بسیاری از محققین سراسر دنیا قرار گرفته است. علی‌رغم استفاده گسترده از گیاهان دارویی در طب سنتی، در طب نوین به تازگی پژوهش‌های متعددی را برای یافتن اثرات بالقوه عصاره‌های مختلف گیاهان دارویی به عنوان عوامل مهارکننده رشد برخی از تومورها انجام داده‌اند(۴) و ترکیبات مختلفی ازجمله؛ کلشی‌سین، وینکریستین، وینبالستین، پودوفیلوتوکسین و تاکسول که علیه انواع مختلفی از تومورها استفاده می‌شوند از گیاهان مختلفی جداسازی شده‌اند(۷ـ۴).

یکی از گیاهان دارویی که مورد مطالعه بسیاری هم قرار گرفته، گیاه هندوانه ابوجهل است. هندوانه ابوجهل میوه‌ای شبیه هندوانه، ولی در اندازه بسیار کوچکتر و با طعم تلخ با نام علمی *Citrullus colocynthis* است. این گیاه در مدیترانه، هند، سبلان و شمال آفریقا پرورش می‌یابد و در ایران نیز در لرستان، فارس، کرمان، بلوچستان، یزد، خراسان، اصفهان، سمنان به صورت وحشی می‌روید. در این گیاه وجود عصاره کوکوربیتاسین[1] خواص درمانی دارد و مصرف آن برای بیماران دیابتی توصیه‌شده است(۹ و۸). میوه این گیاه دارای خاصیت مسهل قوی است و در موارد ضعف روده، فلج ناحیه امعاء و احشاء، آب آوردن نسج و بیماری‌های کبدی به کار می‌رود. از خواص مهم دیگر این گیاه، اثر ضدویروسی، ضد میکروبی و ضد سرطانی آن است. نتایج پژوهش‌ها حاکی از آن است که عصاره تام گیاه هندوانه ابوجهل ممکن است برای مهار رشد و از بین بردن برخی از سلول‌های سرطانی نظیر حنجره مؤثر باشد(۱۰). لذا هدف از این مطالعه تعیین و بررسی اثر عصاره میوه گیاه *Citrullus colocynthis* بر بیان ژن‌های کاسپاز ۳ و کاسپاز ۸ در رده‌ی سلولی سرطان گلیوبلاستومای انسانی بود.

روش بررسی

در این مطالعه تجربی که در دانشگاه آزاد اسلامی انجام شد، گیاه هندوانه ابوجهل در اردیبهشت

1-Cucurbitacin

۱۳۹۸ جمع‌آوری و در آزمایشگاه گیاهان دارویی دانشکده علوم پزشکی شهید بهشتی تهران شناسایی و تأیید شد. پس از شناسایی، میوه گیاه به مدت ۱۴روز در دمای محیط در سایه و به دور از نور خورشید و در دمای محیط آزمایشگاه خشک گردید. برای تهیه عصاره، ابتدا به وسیله ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۱ میلی‌گرم، ۲۵۰ گرم میوه گیاه خشک شده توزین و پس از آسیاب کردن درون یک ارلن ریخته شد. ۵۰۰ میلی‌لیتر اتانول ۷۰ درصد به نمونه اضافه شد، به صورتی که پودر نمونه کاملاً در الکل غوطه‌ور شد. مخلوط به مدت ۴۸ ساعت در دمای محیط نگهداری و سپس ۳ بار به وسیله کاغذ صافی صاف شد تا محلول شفاف حاصل شود. برای به دست آوردن عصاره خالص، محلول الکلی به دست آمده در پتری دیش ریخته شد تا در دمای محیط، الکل تبخیر شود و عصاره کاملاً خشک شود. با استفاده از پودر خشک شده عصاره و محیط کشت سلول، مخلوطی به غلظت بیشینه مورد نظر تهیه شد. سوسپانسیون به دست آمده با استفاده از فیلتر سرسرنگی دارای منافذ ۲۰۰ نانومتری استریل و در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

سلول‌های U87 MG (ATCC® HTB-14) گلیومای مغز انسانی از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه شد. سلول‌ها انجمادزدایی و شمارش شدند. درصد سلول‌های زنده با رنگ‌آمیزی سلول به وسیله تریپان بلو و لام نئوبار تعیین شد. سلول‌ها برای استفاده در محیط کشت DMEM (Gibco-Invitrogen, USA) حاوی ده درصد FBS نگهداری شد.

برای بررسی اثر سمیت عصاره بر سلول‌های گلیومای انسانی در سه زمان ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، تعداد 10^4 سلول در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه کشت داده شد. برای آزمون مربوط به هر زمان پلیت‌های جداگانه‌ای آماده سازی شد. بعد از کشت، سلول‌ها برای رشد به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا حدود ۶۰ درصد سطح چاهک‌ها پوشیده از سلول شود. جهت تیمار سلول‌ها غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۱۵۰۰، ۲۰۰۰، ۲۵۰۰ و ۵۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از عصاره میوه گیاه هندوانه ابوجهل در میکروتیوپ‌های استریل به روش رقیق‌سازی سریالی تهیه شد. بعد از خالی کردن محیط رویی هر چاهک، ۱۰۰ میکرولیتر از محلول حاوی عصاره میوه گیاه با غلظت مشخص به داخل چاهک اضافه و برای هر غلظت در هر آزمون هشت چاهک در نظر گرفته شد. سلول‌های گروه شاهد فاقد عصاره بودند. چاهک های حاوی سلول‌های شاهد تنها با محیط DMEM پر شد و در هر پلیت دارای ۹۶ چاهک، یک گروه ۸ تایی شاهد در نظر گرفته شد. سلول‌های گروه تیمار فقط با عصاره میوه گیاه هندوانه ابوجهل تیمار شدند.

پس از طی زمان‌های مورد نظر(۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت) برای تیمار سلول‌ها با عصاره، پلیت مربوط به آزمون در زمان مورد نظراز انکوباتور خارج و محیط

رویی حاوی عصاره خارج شد، سپس ۱۰۰ میکرولیتر از محلول MTT با غلظت ۰/۰۵ میلی‌گرم در هر چاهک، در تاریکی به پلیت‌ها اضافه و به مدت ۴ ساعت داخل انکوباتور قرار داده شد. پس از ۴ ساعت محیط رویی چاهک‌ها با استفاده از سمپلر برداشته و ۱۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول به چاهک‌ها اضافه شد و به مدت ۲۰ دقیقه بر روی shaker قرار داده شد. در این مرحله سطح ظرف پوشانده شد تا تحت اثر نور قرار نگیرد. در نهایت میزان جذب رنگ حاصل شده به وسیله دستگاه(ELISA Reader (DNM-9602G در طول موج ۵۷۰ نانومتر سنجیده شد.

جهت طراحی پرایمرهای کاسپاز ۳ و کاسپاز ۸ از پایگاه داده بیوانفورماتیکیNCBI و نرم‌افزار پرایمر ٤ و اولیگو ۷ استفاده شد. توالی پرایمرهای ژن کاسپاز ۳ـ و کاسپاز ۸ـ و مشخصات پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه به ترتیب در جدول ۱ و ۲ آورده شده است.

جهت ارزیابی بیان ژن‌های کاسپاز۳ ــ و ۸ ـ ابتدا تعداد ۵×۱۰^{۵} سلول در هر چاهک در پلیت ۶ خانه‌ای کشت داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد در اتمسفر حاوی ۵ درصد دی اکسیدکربن انکوبه شدند. سپس محیط روی سلول‌ها در شرایط استریل خارج شد و داخل چاهک ۹۰۰ میکرلیتر از عصاره میوه گیاه هندوانه ابوجهل و ۱۰۰ میکرولیتر FBS، ریخته شد به صورتی که در هر چاهک غلظت مخلوط برابر غلظت IC_{50} عصاره در ۲۴ ساعت حاصل شود. داخل چاهک دیگری که به عنوان شاهد در نظر گرفته شد، عصاره‌ای ریخته نشد و به آن ۹۰۰ میکرولیتر محیط DEME و ۱۰۰ میکرولیتر FBS اضافه شد و به مدت ۲۴ ساعت انکوبه گردید، بعد از این مدت استخراج RNA انجام شد.

جهت استخراج RNA از کیت Transgen Biotech ER101-01 استفاده شد. ابتدا محیط رویی سلول‌ها خارج و سلول‌ها با استفاده از تریپسین از بستر جدا شدند. مخلوط به دست‌آمده با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد؛ سپس بر روی پلیت به‌دست‌آمده از سلول محلول لیز سلولی اضافه گردید و مراحل بعد از آن طبق پروتکل شرکت سازنده انجام شد. به طور خلاصه ۳۰۰ میکرولیتر BB4 به هر کدام از میکروتیوپ‌های کنترل و تیمار اضافه گردید و پیپتاژ شد تا رسوب از بین برود. سپس به محتوی داخل میکروتیوپ ۳۰۰ میکرولیتر الکل ۷۰ درصد(هم حجم BB4) اضافه و به وسیله ورتکس مخلوط شد. میکروتیوپ‌ها با دستگاه میکروسانتریفیوژ و با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۳۰ ثانیه سانتریفیوژ شدند. محتوی داخل میکروتیوپ‌ها به ستون‌ها منتقل و دوباره سانتریفیوژ شدند. ۵۰۰ میکرولیتر CB4، ۱۰ میکرولیتر DznaI و ۷۰ میکرولیتر بافر واکنش به محتوی ستون‌ها اضافه شد، سپس ستون‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای محیط نگهداری شدند. ستون‌ها داخل با دستگاه

میکروسانتریفیوژ با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۳۰ ثانیه سانتریفیوژ شد. این مرحله باز تکرار و سپس ۵۰۰ میکرولیترWB4 حاوی الکل به ستون‌ها اضافه شد و ستون‌ها به وسیله دستگاه میکروسانتریفیوژ با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۳۰ ثانیه سانتریفیوژ گردید و مایع زیری دور ریخته شد. این مرحله دو بار تکرار شد، سپس ستون خالی به مدت ۲ دقیقه با سرعت ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲ دقیقه سانتریفیوژ شد. برای حذف الکل از محیط ستون‌ها، در آن‌ها در زیر هود باز گذاشته شد. سپس ستون‌ها داخل میکروتیوپ‌های RNAas free قرار داده شدند و به آن‌ها ۱۵ میکرولیتر RNAas free اضافه شد. میکروتیوپ‌ها با استفاده از دستگاه میکروسانتریفیوژ به مدت ۳۰ ثانیه با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند و بدون خارج کردن محتوی، ۱۵میکرولیتر RNAas free به آن‌ها اضافه و با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۳۰ ثانیه سانتریفیوژ گردید. بدین ترتیب RNA از ستون‌ها خارج و به داخل میکروتیوپ منتقل گردید و استخراج RNA انجام شد.

با توجه به این که RNA خیلی سریع از بین می‌رود، سنتز cDNA بلافاصله بعد از استخراج RNA انجام شد. برای سنتز cDNA از کیت Transgen Biotech AE301-02 استفاده شد، ابتدا ۸ میکرولیترRNA و ۱ میکرولیتر الیگوپرایمر داخل میکروتیوپ‌ها ریخته و اسپین شد؛ سپس میکروتیوپ‌ها به مدت ۲ دقیقه روی یخ گذاشته شد. ۱۰میکرولیتر Reaction mix 2X و ۱میکرولیتر Emix به مخلوط افزوده شد و دوباره اسپین گردید. سپس میکروتیوپ‌ها در دستگاه ترموسایکلر TC-96/g/Hcb/C. Hangzhou Bioer Technology قرار داده شد و cDNA با استفاده از برنامه مخصوص الیگو پرایمر به صورت ۳۰ دقیقه در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد و ۵ دقیقه در دمای ۸۵ درجه سانتی‌گراد ساخته شد.

برای آزمون PCR، ۲ میکرولیتر cDNA ، ۶ میکرولیتر آب، ۱۰ میکرولیترMaster mix و ۱ میکرولیتر از هر کدام از پرایمرهای ژن مورد نظر داخل دو میکروتیوپ ریخته شد. یکی از میکروتیوپ‌ها به‌عنوان کنترل و دیگری به‌عنوان تیمار شده در نظر گرفته شد و بعد اسپین گردید. در ادامه میکروتیوپ‌ها را داخل دستگاه ترموسایکلر قرار داده شد تا محصول cDNA تکثیر شود. طبق برنامه واکنش ۵ دقیقه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد جهت دناتوراسیون اولیه، ۳۰ ثانیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد جهت دناتوراسیون موجود در سیکل، ۳۰ ثانیه در ۵۴ سانتی‌گراد جهت Annealing، ۳۰ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد جهت Extension و ۷ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد، انجام شد.

جهت تهیه ژل ۱ درصد، ۰/۱ گرم آگارز داخل ارلن ریخته شد و ۱۰ میلی‌لیتر بافر TAE 1X ، به آن افزوده گردید و با استفاده از دستگاه ماکروویو محلول حرارت داده شد تا آگارز حل شده و به

صورت شفاف درآید. محلول فوق در دمای اتاق قرار داده شد تا دمای آن به ۴۰ تا ۵۰ درجه سانتی‌گراد برسد. شانه در جای مخصوص قرار داده شد و برای جلوگیری از تشکیل حباب محلول آگارز به آرامی اضافه شد. پس از سفت شدن ژل، شانه به آرامی برداشته شد. پلیت حاوی ژل در داخل تانک الکتروفورز حاوی بافر TAE قرار داده شد و بافر به اندازه‌ای که روی سطح ژل را بپوشاند، اضافه شد.

جهت Run محصول PCR، ۵ میکرولیتر از محصول و ۱ میکرولیتر لودینگ بافر با سمپلر داخل چاهک دستگاه الکتروفورز ریخته شد و تحت جریان الکتریسیته با ولتاژ ۸۰ ولت قرار گرفت. پس از ۲۰ دقیقه، ژل داخل ژل داک گذاشته و باند مربوطه به cDNA محصول تیمار شده و محصول کنترل مشاهده شد.

جهت انجام آزمون از دستگاه Real time PCR شرکت ABI ساخت آمریکا استفاده شد. تمام مواد موردنیاز جهت انجام Real time PCR در داخل استریپ ها ریخته شد. تمام مراحل Real time PCR در شرایط بدون RNase و در زیر هود انجام شد. تمام نمونه‌ها به‌صورت سه بار تکرار انجام شد. به‌عنوان گروه کنترل از ژن GAPDH با Tm برابر با Tm ژن‌های مورد نظر استفاده گردید. علاوه بر این گروهی هم به عنوان کنترل منفی آزمون حاوی تمام مواد استفاده شده به غیر از cDNA آماده شد. تمام گروه‌ها در داخل دستگاه Real time PCR (ABI. Step One) قرار داده شدند.

داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزار SPSS و آزمون‌های آماری کولموگورف ـ اسمیرنوف، آنالیز واریانس یک طرفه و توکی تجزیه و تحلیل شدند.

جدول۱: پرایمرهای طراحی شده ژن کاسپاز۳ـ

	GC	Tm	Length	Sequence Primer
Caspase3-F	۵۰/۰	۵۷/۹ °C	۲۲ mer	GCCTGCCGTGGTACAGAACTGG
Caspase3-R	۵۷/۹	۵۹/۳ °C	۲۳ mer	GCATACAAGAAGTCGGCCTCCAC

جدول۲: پرایمرهای طراحی شده ژن کاسپاز۸ـ

	GC	Tm	Length	Sequence Primer
Caspase8-F	۵۷/۱	۶۰/۰ °c	۲۱ mer	GGGCTTTGACCACGACCTTTG
Caspase8-R	۴۷/۶	۵۸/۸ °c	۲۳ mer	CCTCCTGTCCATCAGTGCCATAG

یافته‌ها

جهت بررسی اثرات عصاره میوه گیاه بر رده سلولی U87، غلظت‌های مختلفی از عصاره تهیه شد و سلول‌ها به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تحت تیمار با هر یک از غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۱۵۰۰، ۲۰۰۰، ۲۵۰۰ و ۵۰۰۰ به صورت گروه‌های مستقل قرار گرفتند که نتایج در شکل ۱ نشان داده شده‌اند. بر اساس معادله خط نمودار حاصل‌شده از اتصال حدودی نقاط به‌دست‌آمده از میزان کشندگی عصاره در غلظت‌های مختلف، غلظت ۱۳۳۷/۴۲ میکرولیتر در میلی‌لیتر($p<0/0001$) عصاره میوه گیاه در زمان ۲۴ ساعت، به‌عنوان مقدار تئوری غلظت IC_{50} محاسبه شد (شکل۲ـ a). در نهایت با توجه به انحراف از معیار مربوط به داده‌های به‌دست‌آمده از آزمون مربوط به غلظت ۱۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر ، غلظت ۱۰۰۰میکروگرم در میلی‌لیتر عصاره میوه گیاه هندوانه ابوجهل در زمان ۲۴ ساعت به خاطر درصد خطای کمتر و قابل‌اعتمادتر بودن به‌عنوان غلظت IC_{50} در نظر گرفته و در آزمون بیان ژن استفاده شد.

طبق آنالیزهای آماری در زمان ۴۸ ساعت، عصاره میوه گیاه با غلظت‌های بیشتر از ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر، سبب کاهش شدید درصد زنده ماندن سلول‌ها(بیشتر از ۶۰ درصد) شده است که این اختلاف معنی‌دار است. غلظت‌های زیر ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از عصاره میوه گیاه هیچ اثر سایتوتوکسیک معنی‌داری بر سلول‌ها نداشته است($p<0/05$). غلظت ۸۹۲/۹۹ میکرولیتر در میلی‌لیتر($p=0/0012$) عصاره در زمان ۴۸ ساعت به عنوان مقدار تئوری غلظت IC_{50} محاسبه شد(شکل۲ـb).

در زمان ۷۲ ساعت، غلظت‌های بیشتر از ۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر سبب کاهش درصد زنده ماندن سلول‌ها(حدود ۶۰ درصد) نسبت به گروه کنترل شده است که این اختلاف معنی‌دار است($p<0/0001$). هم‌چنین درصد سلول‌های زنده در سلول‌های تیمار شده با غلظت ۲۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر برابر با ۵۸/۱۶ درصد است که از لحاظ آماری کاهش درصد سلول‌های زنده نسبت به گروه شاهد معنی‌دار است. غلظت ۳۸۷/۴۹ میکرولیتر در میلی‌لیتر($p<0/0001$) عصاره میوه گیاه در زمان ۷۲ ساعت به‌عنوان مقدار تئوری غلظت IC_{50} محاسبه شد (شکل۲ـc).

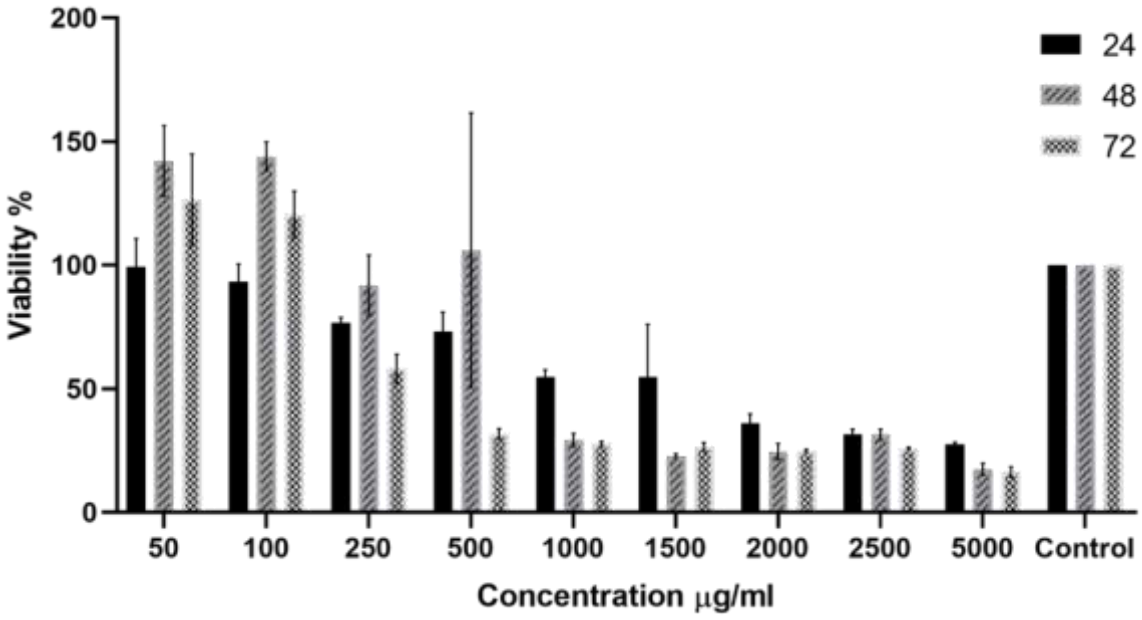
جهت ارزیابی اثر عصاره میوه گیاه هندوانه ابوجهل بر بیان ژن‌های کاسپاز-۳ و ـ۸ در سلول‌های U87، بر اساس نتایج به دست آمده از آزمون MTT، مقدار IC_{50} در ۲۴ ساعت انتخاب شد و سلول‌ها در این غلظت به مدت ۲۴ساعت تحت تیمار قرار گرفتند و سپس میزان بیان ژن‌های کاسپاز به وسیله آزمون Real time PCR تعیین شد.

برای محاسبه میزان افزایش بیان این ژن‌ها، بر اساس سیکل آستانه(Ct)[1] از معادلات لیواک(۱۱) استفاده‌شده است. منحنی تکثیر ژن‌های کاسپاز-۳،

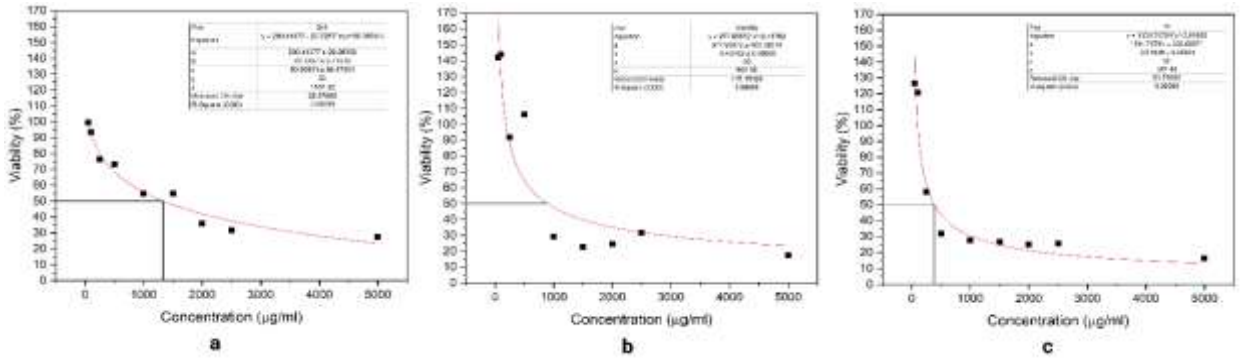
1-Cycle of Threshold

کاسپاز_۸، و ژن کنترل gapdh برای نمونه شاهد و نمونه تیمار شده با مقدار غلظت IC_{50} عصاره میوه گیاه برای به دست آوردن مقادیر سیکل آستانه در واکنش در شکل ۳ آورده شده است. نمودار منحنی ذوب تک قله‌ای مربوط به بیان ژن کاسپاز_ ۳ و کاسپاز ۸ نشان‌دهنده خلوص و عدم وجود ناخالصی است(شکل ۴).

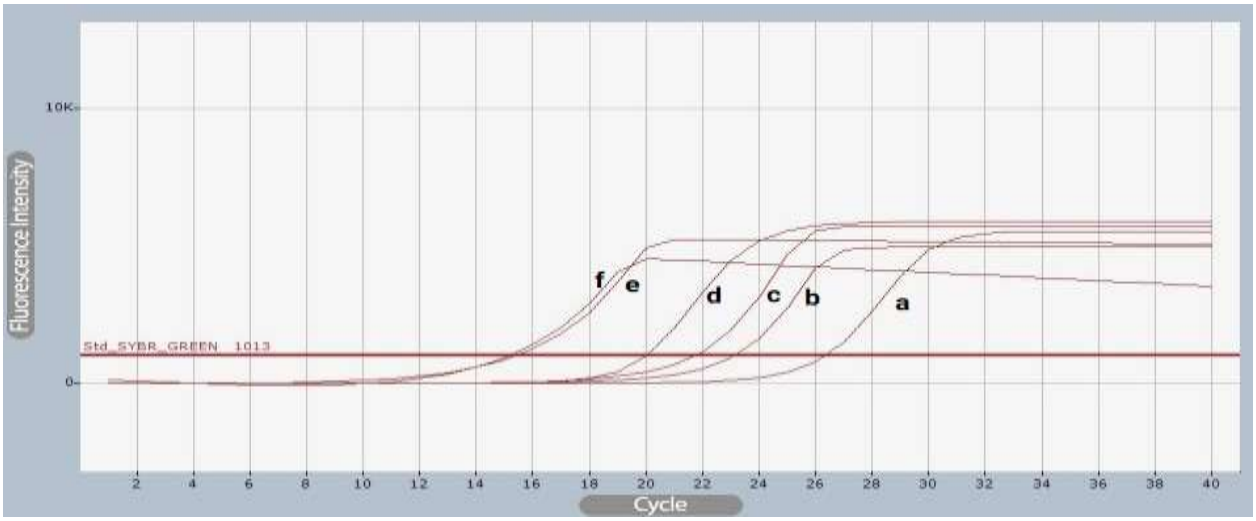
نتایج به‌دست‌آمده از ارزیابی بیان ژن کاسپاز_۳ و کاسپاز_۸ در رده سلولی U87 تیمار شده با عصاره میوه گیاه هندوانه ابوجهل در مقایسه با گروه شاهد به ترتیب در شکل ۵ نشان داده شده است. آنالیزهای آماری نشان می‌دهند که نسبت به گروه کنترل که میزان بیان ژن GAPDH می‌باشد، بیان ژن کاسپاز_۳ به میزان ۳/۰۵۲ برابر(p=۰/۰۰۱۳) و بیان ژن کاسپاز_۸ به میزان ۲/۰۹۹ برابر(p=۰/۰۲۶۵) افزایش یافته است و این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار است.



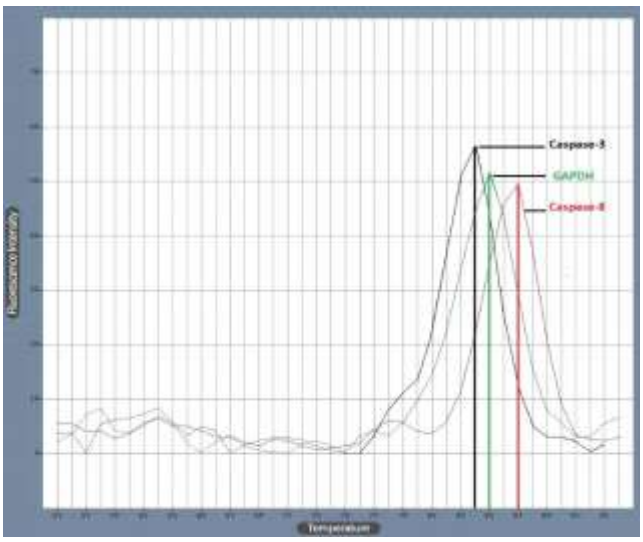
شکل ۱: نتایج اثر غلظت‌های مختلف عصاره میوه گیاه بر رده سلولی U87 به روش MTT در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت. داده‌ها به صورت درصد میانگین زنده ماندن ± درصد انحراف معیار بیان‌شده‌اند



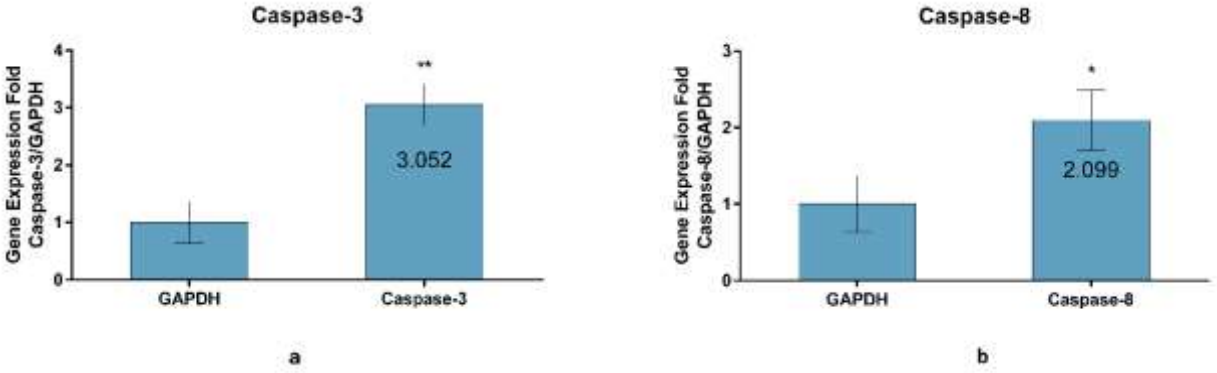
شکل۲: نمودار خطی حاصل از نقاط زنده ماندن سلول‌ها در غلظت‌های مختلف در مدت‌زمان a) ۲۴ ، b)۴۸ و c)۷۲ ساعت



شکل۳: منحنی a)تکثیر ژن‌های IC_{50} کاسپاز-۸(میانگین ۰/۳۹ ± ۲۶/۷۳)، b)IC_{50} گروه کنترل gapdh (میانگین ۰/۳۶±۲۳/۵۹)، c)IC_{50}کاسپاز-۳ (میانگین۰/۳۶±۲۱/۳۹)، d)کنترل کاسپاز-۸ (میانگین ۰/۵۶±۲۰/۶۱)، e)کنترل گروه کنترل gapdh (میانگین۰/۹۴ ± ۱۶/۴۰)، f)کنترل کاسپاز-۳(میانگین۰/۶۲±۱۵/۸۱)



شکل۴: نمودار منحنی ذوب (melt curve) تک قله‌ای نمونه‌های کاسپاز ۸، gapdh، و کاسپاز ۳ برای سنجش خالص بودن نمونه‌ها



شکل۵: مقایسه اثر عصاره میوه گیاه بر بیان ژن a) کاسپاز-۳ (۳/۰۵۲ برابر (p=۰/۰۰۱۳)) و b) کاسپاز-۸ (۲/۰۹۹ برابر(p=۰/۰۲۶۵)) در رده سلولی U87 نسبت به ژن کنترل GAPDH. داده‌ها به صورت درصد میانگین زنده ماندن ± درصد انحراف‌معیار بیان‌شده‌اند. تعداد ستاره‌ها نشان دهنده معنی‌داری اختلاف گروه تحت تیمار با گروه کنترل است

بحث

گلیوبلاستوما مولتی فرم شایع‌ترین مهاجم و در واقع کشنده‌ترین نوع تومور مغزی اولیه در بزرگسالان است. این تومور از سلول‌های آستروسیت که نوعی یاخته گلیال منشاء می‌گیرد. این تومور سلول‌هایی دارد که بسیار متفاوت با سلول‌های نرمال به نظر می‌آیند و معمولاً در افراد بالغ بروز می‌کند، بیشتر در مغز تشکیل می‌شود. مدت زنده ماندن بعد از تشخیص اولیه ۱۵-۱۲ ماه است این سرطان شیوع نسبتاً کمی دارد؛ ولی۲/۵ درصد از مرگ‌های سرطانی را به خود اختصاص داده است و در کشورهای پیشرفته‌تر و نیز در مردها شیوع بیشتری دارد. یکی از مهم‌ترین ریسک فاکتورها بعدازجنسیت مذکر، سن بین ۵۰ تا ۷٤ سال است (۲). لذا هدف از این مطالعه تعیین و بررسی اثر عصاره میوه گیاه *Citrullus colocynthis* بر بیان ژن‌های کاسپاز ۳ و کاسپاز ۸ در رده‌ی سلولی سرطان گلیوبلاستومای انسانی بود.

قرن‌هاست که ترکیبات گیاهی در پزشکی سنتی و در حال حاضر در شیمی درمانی مورد استفاده قرار گرفته و بیش از ۲۵ درصد مواد دارویی تجویزی دارای پیش ساختارهای مشتق از ترکیبات گیاهی هستند. اهمیت ترکیبات مشتق گیاهی به وسیله چندین ماده ضد سرطان گیاهی مشخص شده است. جداسازی آلکالوئیدهای گیاهی از جمله وینبلاستین و وینکریستین عصر جدیدی از کاربرد مواد گیاهی به‌عنوان مواد ضد سرطان را معرفی کرده، که این ترکیبات در حال حاضر با دیگر ترکیبات به‌منظور درمان دسته‌ای از سرطان‌ها ترکیب می‌شوند. کشف ترکیب ضد سرطان تاکسول نمونه دیگری از کشف موفق داروی طبیعی است(۱۲). هندوانه ابوجهل از جمله گیاهان دارویی که دارای ترکیبات ضدتوموری و آنتی‌اکسیدانی است. ترکیبات شناخته شده در هندوانه وحشی شامل گلیکوزیدها(استرول‌ها به ۵ دسته A,B,K,L,E دسته‌بندی می‌شوند)، آلکالوئیدها و

فلانوئیدها است. عمده محتوای شیمیایی مغز میوه *Citrullus colocynthis* (اصل تلخی تا ۱۴ درصد)، رزین و صمغ پکتین است. دانه‌ی حاوی روغن ثابت(۱۷ درصد)، آلبومینوئید (۶ درصد) است(۸).در این تحقیق به ارزیابی اثر سمیت سلولی عصاره میوه هندوانه ابوجهل بر رده سلولی U87 گلیومای انسانی پرداخته شد. نتایج به‌دست‌آمده از آزمون MTT در زمان ۲۴ ساعت نشان داد که اگرچه اثرات سایتوتوکسیک مشاهده شد، اما این اثرات سایتوتوکسیک شدید نبودند و IC_{50} محاسبه‌شده برای عصاره میوه هندوانه ابوجهل در زمان ۲۴ساعت بر سلول‌های U87 بین یک تا یک و نیم میلی‌گرم در میلی‌لیتر و طبق محاسبات برابر ۱۳۳۷/۴۲ ($p<۰/۰۰۰۱$) میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. با توجه به این نتایج، اثرات سایتوتوکسیک عصاره میوه هندوانه ابوجهل بر رده سلولی U87 در زمان ۴۸ و ۷۲ ساعت نیز ارزیابی شد که غلظت ۸۹۲/۹۹ ($p=۰/۰۰۱۲$) و ۳۸۷/۴۹ ($p>۰/۰۰۰۱$) میکروگرم بر میلی‌لیتر به ترتیب برای زمان‌های ۴۸ و ۷۲ ساعت به‌عنوان IC_{50} محاسبه شد(شکل۲-bوc). این نتایج به وضوح نشان داد که سمیت عصاره علاوه بر غلظت، وابسته به زمان نیز می‌باشد. در زمان ۴۸ ساعت در غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر شاهد انحراف از معیار بسیار زیاد و درصد میانگین خارج از روال منطقی نمودار است که به دلیل خطای به وجود آمده در یکی از تکرارهای آزمون در این غلظت بود و عدد به دست آمده فاقد ارزش آماری است. نکته جالب‌توجه در زمان ۷۲ ساعت این است که غلظت‌های ۱۰۰ و ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر سبب افزایش تکثیر معنی‌دار سلول‌ها نسبت به گروه کنترل‌شده‌اند. این می‌تواند به دلیل کم بودن غلظت ماده موثر و زنده ماندن اکثر سلول‌ها بعد از مصرف شدن مواد کشنده محیط باشد. به صورتی که پس از مصرف شدن مواد مؤثر و مرگ سلول‌های مصرف کننده، تعداد زیاد سلول‌های باقی مانده در زمان طولانی فرصت تکثیر داشته و تعداد سلول‌ها پس از ۷۲ ساعت از تعداد سلول‌ها در زمان آغاز آزمون بیشتر شده است. در غلظت‌های بالای ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر این تعداد با افزایش غلظت کاهش می‌یابد.

نتایج این مطالعه هم‌راستا بامطالعه انجام یافته به وسیله افشاری و همکاران بود که به بررسی اثر سمیت عصاره الکلی گیاه هندوانه ابوجهل با استفاده از آزمون MTT پرداخت و اثر مهارکنندگی آن بر رده‌ی سلولی سرطان حنجره و فیبروبلاست نرمال موشی L929 مورد ارزیابی قرارداد. وی تغییرات مورفولوژی رده‌های سلولی در مجاورت عصاره را مورد بررسی قرارداد و مشخص کرد از غلظت ۱۰۰میکروگرم بر میلی‌لیتر رشد سلول‌ها مهارشده و این اثر با کاهش غلظت کمتر شد. وابستگی اثر سمیت به زمان تیمار به وسیله وی بررسی نشد(۱۰). عبداللطیف و همکارانش نیز اثر ضد سرطانی مواد فعال جدا شده از عصاره میوه هندوانه ابوجهل را بر

سلول‌های HepG2 هپاتوما بررسی کردند. آن‌ها برای این کار دو ماده اصلی موجود در عصاره را ابتدا جداسازی و خالص کردند و سپس از آن‌ها برای آزمون‌های زیستی زنده ماندن سلول‌ها استفاده کردند. مواد جدا شده شامل cucurbitacin E glucoside (CuE) و cucurbitacin I glucoside بودند. بر اساس یافته‌های آن‌ها مقدار غلظت IC_{50} ماده خالص شده از گیاه برای سلول‌های HepG2 به ترتیب ۳/۵ و ۲/۸ نانومول در میلی‌لیتر بود(۱۳). آنها همچنین آزمون جانوری این دو ماده را برای تومور EAC سرطان داخلی شکم انجام دادند که منجر به زنده ماندن بیشتر موش‌ها شد. موخرجی و همکار اثر سمیت مواد خالص شده از عصاره هندوانه ابوجهل را بر سلول‌های سرطانی MCF7 بررسی کردند که مقدار IC_{50} برابر ۱۷/۲ میکروگرم در میلی‌لیتر از عصاره در ۲۴ ساعت به دست آمده است. آن‌ها همچنین این آزمون را برای سلول‌های HepG2 تکرار کردند که نتیجه آن مقدار غلظت IC_{50} برابر ۱۲/۵۴ میکروگرم در میلی‌لیتر برای ۲۴ ساعت بود. آن‌ها با تکرار آزمون در ۴۸ و ۷۲ ساعت نتیجه گرفتند که سمیت عصاره علاوه بر غلظت وابسته به زمان نیز بود(۱۴). لازم به توضیح است که در تحقیق حاضر از عصاره کامل میوه گیاه هندوانه ابوجهل استفاده شده و برخلاف پژوهش‌های ذکر شده مواد مؤثر آن جداسازی و تخلیص نشده است. اختلاف غلظت‌های IC_{50} در بررسی‌های پیشین نسبت به تحقیق کنونی به دلیل استفاده از عصاره کامل میوه این گیاه و عدم جداسازی ماده مؤثره آن می‌باشد به طوری که طبق تحقیق کنونی IC_{50}در زمان ۲۴ ساعت برای عصاره کامل میوه گیاه در سلول‌های U87 برابر با ۱۳۳۷/۴۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر و برای ماده مؤثره جدا شده طبق پژوهش‌های پیشین برابر ۱۷/۲ میکروگرم در میلی‌لیتر در سلول HepG2 می‌باشد. آزادبخت و همکاران اثرات سمیت و ضد پرولیفراسیون عصاره استخراج‌شده از این گیاه را بر رده‌های سلولی AGS و MCF-7 در بازه زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بررسی کردند. طبق این بررسی، سمیت این عصاره علاوه بر وابستگی مستقیم به غلظت، به زمان نیز وابسته بود. در این مطالعه مقدار IC_{50} گزارش نشده است(۱۵).

یین و همکاران اثر ماده CuB جدا و خالص شده از هندوانه ابوجهل را بر سلول‌های گلیوبلاستوما مولتیفورم ارزیابی کردند. آن‌ها غلظت IC_{50} را برای این ماده حدود ۱۰-۷ مولار گزارش کردند که طی ۲۴ ساعت باعث توقف G2/M می‌شود(۱۶). سعید و همکاران اثر ضد سرطانی ماده CuE جداشده از عصاره هندوانه ابوجهل بر گروهی از سلول‌های سرطانی مقاوم به دارو را بررسی کردند. آن‌ها با استفاده از روش‌های شبیه‌سازی کامپیوتری برای اتصال مولکولی، روش اتصال CuE به گیرنده‌های انتقال‌دهنده ABC را بررسی کردند. مقدار IC_{50} به دست آمده به وسیله آن‌ها برای سلول‌های U87 برابر ۹/۸± ۷۳/۴ میکرومولار به دست آمد. وی همچنین در این

گزارش اثبات کرد CuE نسبت به دیگر مولکول‌های فعال موجود در عصاره اثر ضد سرطانی بیشتری دارد(۱۷). بر خلاف این پژوهش‌ها، در کار فعلی عصاره کامل میوه هندوانه ابوجهل استفاده شد که قطعاً میزان کشندگی کمتری نسبت به ماده جدا شده خالص از عصاره دارد. متأسفانه در این بررسی‌ها اثر این مواد جدا شده بر روی بیان کاسپازها مورد مطالعه قرار نگرفته است. در این تحقیق جهت بررسی عامل مرگ سلولی ایجاد شده به وسیله عصاره، به ارزیابی بیان ژن‌های کاسپازهای ۳ و ۸ پرداخته شد. نتایج به‌دست‌آمده از این مطالعه نشان داد که استفاده از مقدار IC_{50} عصاره میوه گیاه هندوانه ابوجهل به مدت ۲۴ ساعت باعث افزایش بیان ژن مربوط به کاسپاز ۳ و ۸ به ترتیب برابر ۳/۰۵۲ (p=۰/۰۰۱۳) و ۲/۰۹۹(p=۰/۰۲۶۵) برابر می‌شود، می‌توان گفت که این عصاره سبب افزایش فعالیت کاسپازهای ۳ و ۸ می‌گردد. کاسپاز۳ جزو کاسپازهای مجری است و به عبارت دیگر جزو مسیر مشترک هر دو مسیر خارجی و داخلی آپوپتوز است و افزایش آن نشان دهنده القا آپوپتوز است. جهت مشخص شدن مسیر آپوپتوز نیاز است که کاسپازهای آغازگر مختص به هر مسیر ارزیابی شوند. کاسپاز۸ آغازگر مسیر خارجی آپوپتوز و کاسپاز۹، آغازگر مسیر داخلی آپوپتوز است و افزایش هر یک از آن‌ها نشان دهنده شکل گیری هرکدام از مسیرهای آپوپتوز است. با توجه به این‌که عصاره میوه هندوانه ابوجهل بیان ژن کاسپاز ۸ را افزایش داد، به نظر می‌رسد که عصاره میوه هندوانه ابوجهل از طریق مسیر خارجی و با تحریک گیرنده‌های مرگ سطح سلولی سبب آپوپتوز در سلول‌های U87 شده است. در مطالعه‌ای که به وسیله داوودی و همکاران انجام شده بود، اثر عصاره هیدروالکلی میوه هندوانه ابوجهل بر بیان ژن کاسپاز۳ در رده سلولی سرطان پستان MCF-7 بررسی شد. نتایج تیمار سلولی در آن مطالعه نشان داد که با افزایش غلظت و زمان، زنده‌مانی سلول‌ها کاهش فراوان و معنی‌داری نسبت به گروه کنترل داشت و بیان ژن کاسپاز ۳ در زمان‌های ۴۸ و ۷۲ به‌طور معنی‌دار نسبت به گروه کنترل افزایش یافت، ولی در مقاله منتشرشده اشاره‌ای به مقدار افزایش بیان ژن نشده است(۱۸). در مطالعه دیگری که به وسیله اشپیتز و همکاران انجام شد، اثر بازدارندگی رشد گلیکوزید Cucurbitacin جداشده از هندوانه ابوجهل بر روی سلول‌های سرطان پستان انسان بررسی شد. در این مطالعه نیز مهار رشد سلول‌های سرطانی بر اثر تیمار با عصاره میوه گیاه دیده شد. در همان مطالعه با تجزیه و تحلیل چرخه سلولی مشخص شد که تیمار با عصاره میوه گیاه هندوانه ابوجهل منجر به تجمع سلول‌ها در فاز G2/M چرخه سلولی و تغییرات در مورفولوژی سلول از فرم کشیده به دایره‌ای می‌شود. این تغییر مورفولوژیکی نیز سیگنالینگ درون‌سلولی را تحت تأثیر قرار داده، موجب مهار انتقال سیگنال‌های زنده ماندن و درنتیجه باعث توقف چرخه

سلولی و آپوپتوز می‌شد که ارزش درمانی بالقوه‌ای برای مهار رشد و نابودی سلول‌های سرطان پستان داشت(۱۱). عبدالرضا و همکاران اثر گیاه هندوانه ابوجهل بر سرطان کلورکتال را بررسی کردند، آنها دریافتند اثر ضد سرطانی این عصاره بر اساس مکانیسم‌های القای آپوپتوز(افزایش بیان کاسپاز-۳ و مهار عمل STAT3)، خاصیت آنتی‌اکسیدانت و ضدالتهابی بودن عصاره و مهار مسیر پیام Wnt/B catenin است. تا کنون اثر سمیت سلولی و مکانیسم مهار رشد عصاره میوه این گیاه بر سلول‌های U87 انسانی در بررسی‌های دیگر مطالعه نشده بود و طبق مطالعه کنونی می‌توان گفت که افزایش بیان ژن کاسپاز ۳ و ۸ و القای آپوپتوز از مسیر خارجی یکی از مسیرهایی است که باعث سمیت عصاره میوه این گیاه و مهار رشد سلولی‌های U87 می‌شود.

به‌طور کلی در ادامه این تحقیق باید به بررسی های بیشتری جهت مشخص شدن اثرات و مسیرهای مولکولی داخل سلولی عصاره میوه هندوانه ابوجهل پرداخته شود. پیشنهاد می‌شود اثر سمیت مواد مؤثر جدا شده از عصاره میوه گیاه بررسی و اثر فعال‌سازی ژن کاسپاز آن‌ها نیز بررسی شود. همچنین می‌توان بررسی‌های جانوری برای ارزیابی اثر عصاره بر تومور را نیز انجام داد و پیشنهاد می‌شود القای آپوپتوز به وسیله عصاره میوه هندوانه ابوجهل به روش فلوسایتومتری، بررسی سیکل سلولی به روش فلوسایتومتری، ارزیابی بیان ژن‌های مهمی از جمله P53، BAX و BCL2، بررسی اثرات سایتوتوکسیک عصاره میوه هندوانه ابوجهل بر رده‌های سلولی دیگری به ویژه رده‌های سلولی فیبروبلاستی، بررسی اثرات سایتوتوکسیک هندوانه ابوجهل بر رده‌های سلولی غیر توموری، بررسی ترکیبات شیمیایی مؤثر این عصاره میوه و شناسایی و جداسازی آن‌ها و بررسی اثرات هر یک از اجزا درآینده صورت گیرد.

نتیجه‌گیری

به‌طورکلی نتایج این پروژه نشان داد که عصاره میوه هندوانه ابوجهل دارای اثرات سایتوتوکسیک شدیدی بر رده سلولی U87 است و این اثرات سایتوتوکسیک وابسته به غلظت و زمان است. IC_{50} محاسبه‌شده برای عصاره میوه هندوانه ابوجهل در زمان ۲۴ ساعت روی سلول‌های U87 بین یک تا یک و نیم میلی‌گرم در میلی‌لیتر و طبق محاسبات برابر ۱۳۳۷/۴۲ (p>۰/۰۰۰۱) میکروگرم بر میلی‌لیتر بود و در زمان ۴۸ و ۷۲ ساعت برابر غلظت ۸۹۲/۹۹ (p=۰/۰۰۱۲) و ۳۸۷/۴۹ (p>۰/۰۰۰۱) میکروگرم بر میلی‌لیتر محاسبه گردید. طبق نمودار به‌دست‌آمده اثرات سایتوتوکسیک عصاره میوه هندوانه ابوجهل در زمان ۴۸ ساعت نسبت به زمان ۲۴ ساعت به شدت افزایش یافت. همچنین بررسی‌های تکمیلی این تحقیق نشان داد که یکی از عوامل مؤثر در مرگ سلولی

ایجاد شده به وسیله عصاره میوه هندوانه ابوجهل می‌تواند از طریق افزایش فعالیت ژن کاسپازهای ۳ و ۸ در سلول و القا آپوپتوز از مسیر خارجی باشد؛ زیرا استفاده از مقدار IC_{50} عصاره میوه گیاه هندوانه ابوجهل به مدت ۲۴ ساعت باعث افزایش بیان ژن مربوط به کاسپاز ۳ و ۸ به ترتیب برابر ۳/۰۵۲ (p=۰/۰۰۱۳) و ۲/۰۹۹(p=۰/۰۲۶۵) برابر شد.

تقدیر و تشکر

این مقاله برگرفته از پایان‌نامه دوره دکتری رشته داروسازی با کد اخلاق IR.IAU.PS.REC.1399.074 علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی می‌باشد که با حمایت مالی و معنوی این دانشگاه انجام شد. بدین وسیله نویسندگان مقاله از پرسنل آزمایشگاه سلولی و مولکولی دانشگاه تهران تشکر و قدردانی می‌نماییم.

REFERENCES

1.Palanichamy K, Erkkinen M, Chakravarti A. Predictive and prognostic markers in human Glioblastomas. Current Treatment Options in Oncology 2006; 7(6): 490-504.
2.Lefranc F, Sadeghi N, Camby I, Metens T, Dewitte O, Kiss R. Present and potential future issues in Glioblastoma treatment. Expert Review of Anticancer Therapy 2006; 6(5): 719-32.
3.World Health Organization. WHO global report on traditional and complementary medicine 2019. World Health Organization.
4.Kunwar RM, Uprety Y, Burlakoti C, Chowdhary CL, Bussmann RW. Indigenous use and ethnopharmacology of medicinal plants in far-west Nepal. Ethnobotany Research and Applications 2009; 7: 005-28.
5.Graham JG, Quinn ML, Fabricant DS, Farnsworth NR. Plants used against cancer–an extension of the work of Jonathan Hartwell. Journal of Eethnopharmacology 2000; 73(3): 347-77.
6.Srivastava V, Negi AS, Kumar JK, Gupta MM, Khanuja SP. Plant-based anticancer molecules: a chemical and biological profile of some important leads. Bioorganic & medicinal chemistry 2005; 13(21): 5892-908.
7.Mahboobi S, Sellmer A, Beckers T. Development of tubulin inhibitors as antimitotic agents for cancer therapy. InStudies in Natural Products Chemistry 2006; 33: 719-50.
8.Hussain AI, Rathore HA, Sattar MZ, Chatha SA, Sarker SD, Gilani AH. Citrullus colocynthis (L.) Schrad (bitter apple fruit): A review of its phytochemistry, pharmacology, traditional uses and nutritional potential. Journal of ethnopharmacology 2014; 155(1): 54-66.
9.Shi C, Karim S, Wang C, Zhao M, Murtaza G. A review on antidiabetic activity of Citrullus colocynthis Schrad. Acta Pol Pharm 2014; 71(3): 363-7.
10.Tavakkol Afshari J, Rakhshandeh H, Zamani AR, Mahdavi Shahri N, Ghazezadeh L, Norozi M. Cytotoxicity effects of citrullus colocynthis on Hep2 and L929 cell lines. Hakim 2005; 8(2): 47-54.
11.Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C T method. Nature Protocols 2008; 3(6): 1101.
12.Takara K, Horibe S, Obata Y, Yoshikawa E, Ohnishi N, Yokoyama T. Effects of 19 herbal extracts on the sensitivity to paclitaxel or 5-fluorouracil in HeLa cells. Biological and Pharmaceutical Bulletin 2005; 28(1): 138-42.
13.Ayyad SE, Abdel-Lateff A, Alarif WM, Patacchioli FR, Badria FA, Ezmirly ST. In vitro and in vivo study of cucurbitacins-type triterpene glucoside from Citrullus colocynthis growing in Saudi Arabia against hepatocellular carcinoma. Environmental Toxicology and Pharmacology 2012; 33(2): 245-51.
14.Mukherjee A, Patil SD. Effects of alkaloid rich extract of Citrullus colocynthis fruit on Artemia salina and human cancerous (MCF-7 and HEPG-2) cells. J Pharma Sci Tech 2012; 1: 15-9.
15.Rezai M, Davoodi A, Asori M, Azadbakht M. Cytotoxic activity of citrullus colocynthis(L.) schrad fruit extract on gastric adenocarcinoma and breast cancer cell lines. Int J Pharm Sci Rev Res 2017; 45(1): 175-8.
16.Yin D, Wakimoto N, Xing H, Lu D, Huynh T, Wang X, et al. Cucurbitacin B markedly inhibits growth and rapidly affects the cytoskeleton in glioblastoma multiforme. International Journal of Cancer 2008; 123(6): 1364-75.
17.Saeed ME, Boulos JC, Elhaboub G, Rigano D, Saab A, Loizzo MR, et al. Cytotoxicity of cucurbitacin E from Citrullus colocynthis against multidrug-resistant cancer cells. Phytomedicine 2019; 62: 152945.
18.Davoodi R, Najafi SH, Mazaheri M. Effect of hydro alcoholic extract of citrullus colocynthis fruit on caspase 3 gene expression in MCF-7 breast cancer cell line. SSU_Journals 2015; 23(5): 508-18.

The Effect of *Citrullus colocynthis* on the Induction of Casp3 and Casp8 Gene Expression on Human Glioblastoma U87 Cell Line

Abdi N[1], Najin T[1]*, Anganji AH[2]

[1] Department of Basic sciences, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran,[2]Department of cell and molecular Biology, Kharazmi University

Received: 04 July 2020 Accepted: 21 Oct 2020

Abstract

Background & aim: The use of compounds extracted from natural plants due to less side effects can be a good alternative to chemical drugs in the treatment of deadly diseases such as cancer. In this study, the anticancer effect of Abu Jahl watermelon fruit extract on human glioblastoma cancer cells of U87 cell line was investigated. Therefore, the aim of this study was to determine and evaluate the effect of Citrullus colocynthis fruit extract on the expression of caspase 3 and caspase 8 genes in human glioblastoma cancer cell line.Using in vitro MTT assay and Real-time PCR, the cytotoxicity and cell inhibition mechanism of using *Citrullus colocynthis* on human glioblastoma U87 cell line was investigated.

Methods: In this experimental study conducted in 2019 in the Faculty of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences of Islamic Azad University, the fruit extract of the plant was prepared by extraction with 70% ethanol and to evaluate the toxicity of 104 cells of U87 cells were treated with different concentrations of this extract. These cells were treated as independent groups with specific concentrations of the extract at 24, 48 and 72 hours and were evaluated by MTT method. The determined IC50 concentration at 24 hours was used as the basal concentration for cell treatment to evaluate the amount of gene expression by Real-Time PCR. The collected data were analyzed using Kolmogorf-Smirnov statistical tests, one-way analysis of variance and Tukey.

Results: The results obtained from MTT test showed that the growth of treated cells at concentrations higher than 1000 µg / ml of fruit extract was completely inhibited and the IC50 value calculated for 24, 48 and 72 hours of treatment was 1337.42, respectively. (P> 0.0001), 892.99 (p = 0.0012) and 387.49 (p> 0.0001) µg / ml of extract. Using IC50 value of Abu Jahl watermelon fruit extract for 24 hours increases the expression of caspase 3 and 8 gene by 3.052 (p = 0.0013) and 2.099 (p = 0.065), respectively. .

Conclusion: The data revealed from this work determined that *Citrullus colocynthis* extract has concentration and time dependent toxicity effects on U87 cell line and the inhibition mechanism of this plant may be due to the induced Casp3 and Casp8 gene expression which leads to extrinsic apoptosis pathway. So, *Citrullus colocynthis* extract can be used to inhibit glioblastoma cells growth and may treat brain tumor.

Keywords: *Citrullus colocynthis*, U87, Casp3, Casp8, MTT, Real-Time PCR

***Corresponding author: Naji T,** Department of Basic sciences, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran
Email: tnaji2002@gmail.com

Please cite this article as follows:
Abdi N, Najin T, Anganji AH. The Effect of *Citrullus colocynthis* on the Induction of Casp3 and Casp8 Gene Expression on Human Glioblastoma U87 Cell Line. Armaghane-danesh 2021; 26(1): 1-17.