Journal of Ilam University of Medical Sciences

P-ISSN: 1563-4728
E-ISSN: 2588-3135

# Investigating the cytotoxic effect of aqueous extract of *Peganum harmala* on oxaliplatin-resistant HCT116 cell line and evaluating *BAX* gene expression

**Zahra Salimizadeh[1], Sattar Tahmasebi Enferadi [2], Tayebeh Majidizadeh [1], Razieh Jalal [3], Frouzandeh Mahjoubi [1*]**

[1] Dept of Medical Genetic, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran
[2] Dept of Plant Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran
[3] Dept of Chemistry, Faculty of Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

**Article Info**

***Article type:***
Research article

***Article History:***
Received: Sept. 28, 2024
Received in revised form: Dec. 02, 2024
Accepted: Jan. 18, 2025
Published Online: Apr. 16, 2025

**** Correspondence to:***
Frouzandeh Mahjoubi
Dept of Medical Genetic, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran

Email:
frouz@nigeb.ac.ir

**A B S T R A C T**

**Introduction:** Colorectal cancer is a prevalent digestive tract malignancy, with oxaliplatin being an effective chemotherapeutic drug, but long-term use can lead to drug resistance. It is crucial to develop methods to reduce CRC cells' oxaliplatin resistance. *Peganum harmala L.* (*P. harmala*), is a common anticancer treatment in traditional medicine.

**Materials & Methods:** The study used *P. harmala* seeds extract to treat oxaliplatin-resistant HCT116 cells for 24 and 48 hours. Cell viability was determined using the MTT assay, and RNA extraction was performed from the treated and control cells. cDNA synthesis was performed using extracted RNAs, and the expression level of the *BAX* gene was analyzed using Real-Time PCR. Statistical analysis was conducted using Graph Pad Prism 8 software and t-test, with a significance level of P less than 0.05.

**Results:** Findings indicated a significant correlation between the increase in the concentration of extract and the percentage of dead cells. The cytotoxicity of the aqueous extract of *P. harmala* seeds significantly increased from 24 to 48 hours in oxaliplatin-resistant HCT116 cells. Furthermore, a significant and considerable upregulation in the relative expression of the *BAX* gene was observed compared to the control group (P<0.001).

**Conclusion:** The cytotoxic effect of the aqueous extract of *P. harmala* is dose- and time-dependent. The extract has the potential to induce apoptosis in colorectal cancer cells by regulating apoptosis-related genes, particularly by upregulating pro-apoptotic genes such as *BAX*.

**Keywords**: oxaliplatin, *BAX*, colorectal cancer, *P. harmala*, aqueous extract

**How to cite this paper:** Salimizadeh Z, Tahmasebi Enferadi S, Majidizadeh T, Jalal R, Mahjoubi F. Investigating the cytotoxic effect of aqueous extract of *Peganum harmala* on oxaliplatin-resistant HCT116 cell line and evaluating *BAX* gene expression. *Journal of Ilam University of Medical Sciences*. 2025;33(1):111-126.

## Introduction

Colorectal cancer is among the most prevalent malignant tumors of the digestive tract (1). Treatment strategies for colorectal cancer (CRC) are determined by the stage of the cancer, the location of the tumor, and individual patient factors (2). Current management strategies for colorectal cancer (CRC) involve surgical resection for operable cases, while non-resectable tumors are treated with radiotherapy, chemotherapy, immunotherapy, or a combination of these approaches. For the treatment of colorectal cancer, oxaliplatin is an effective chemotherapeutic drug; however, long-term use of this medication often results in drug resistance (2). It is crucial to develop methods to reduce CRC cells' oxaliplatin resistance (4). As a result, the demand for new anticancer drugs with enhanced efficacy and reduced side effects is increasing (6). Due to their historical success, medicinal plants are considered a valuable source for the discovery

© The Author(s)



[ Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-10-10 ]

of novel chemical compounds with potential anticancer activity. *Peganum harmala L.* (*P. harmala*) is a common anticancer treatment in traditional medicine (5). This plant is a member of the Zygophyllaceae family. *P. harmala* is native to several regions, including Iran and other countries in the Middle East (4). The common name of this plant is *P. harmala*, and in Iran, it is traditionally known as "Esfand," "Espand," and "Harmal." (4). Extraction from medicinal plants is carried out using various methods and different solvents (5, 6). It is evident that the properties of the produced extracts vary depending on the extraction method and the solvent used. The solvents commonly used for extraction include water and organic solvents.

## Methods

Wild *P. harmala* seeds were collected from Shahrekord Mountain, located in Chaharmahal and Bakhtiari Province, Iran. Extraction from *Peganum harmala* seeds was performed using the aqueous method. HCT116/OXA cells were seeded into 96-well microplates at a density of 3200 cells per well for overnight incubation. The cells were subsequently treated with aqueous extract of *P. harmala* seeds, at concentrations ranging from 0.05 to 0.4 mg/mL, for 24 and 48 hours. After the treatment periods, cell viability was measured using the MTT assay. The experimental data were analyzed using GraphPad Prism 8, with the Dunnett test and one-way analysis of variance (ANOVA) applied to compare the MTT results. RNA extraction from both control and treated cells ($IC_{50}$) was carried out using the HiPure Isolation Reagent (Roche Applied Sciences). NanoDrop was used to measure the concentration of extracted RNAs. After RNA extraction, the quality and quantity of the extracted RNA were assessed. Following this, cDNA synthesis was performed using the extracted RNAs with the Norgen Biotek Crop kit. The expression level of the *BAX* gene was analyzed using real-time PCR. Real-time PCR amplification was carried out using the SYBR Fast qPCR kit (Ampliqon A/S, Denmark). Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) was used as the reference gene to normalize the quantitative data. The mRNA expression of *BAX* was assessed 48 hours following treatment with the aqueous extract of *P. harmala* ($IC_{50}$). In this study, the fold change was calculated using REST software. Also, GraphPad Prism 8 software and a t-test were used for statistical analysis between control and treated samples. P less than 0.05 was considered significant.

## Results

The results of the analysis indicated a significant correlation between the increase in the concentration of extract and the percentage of dead cells. The cytotoxicity of the aqueous extract of *P. harmala* seeds significantly increased from 24 to 48 hours in oxaliplatin-resistant HCT116 cells. The $IC_{50}$ values were determined to be 0.2 mg/mL and 0.14 mg/mL after 24 and 48 hours of exposure to the aqueous extract of *P. harmala*, respectively. Subsequently, RNA was extracted from both control and treated cells. In the gel analysis, the presence of two bands corresponding to 18S and 28S ribosomal RNA indicated that the RNA was not degraded and that the extracted RNA was intact. In spectrophotometric analysis, the A260/A280 ratio was found to be between 1.8 and 2, which signifies a high degree of RNA purity and the absence of contamination with proteins or phenolic compounds (such as guanidine thiocyanate). The results of this stage confirmed that the extracted RNA was suitable for use in further experimental procedures. *BAX* mRNA expression was evaluated after treatment with *P. harmala* aqueous extract. A significant and considerable upregulation in the relative expression of the *BAX* gene was observed compared to the control group ($P<0.001$).

## Conclusion

The cytotoxic effect of the aqueous extract of *P. harmala* is dose- and time-dependent. The extract has the potential to induce apoptosis in colorectal cancer cells by regulating apoptosis-related genes, particularly by upregulating pro-apoptotic genes such as *BAX*. These results suggest that the aqueous extract of *P. harmala* may serve as a potential therapeutic agent for drug-resistant colorectal cancer cells.

## Authors' Contribution

Conceptualization: ZS, FM, Methodology: ZS, RJ, Validation: ST, RJ, Formal Analysis, Software, Investigation, Resources, Data Curation: ZS, Writing–Original Draft Preparation: ZS, FM, Writing–Review & Editing: ST, FM, TM, ZS, Visualization: TM, Supervision: ST, FM,

[ Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-10-10 ]

Project Administration: FM.

## Ethical Statement

As this study did not involve the use of human or animal subjects, obtaining an ethics approval code was not applicable.

## Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

## Funding

This study was fully supported by National Institute for Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB).

## Acknowledgment

The authors would like to sincerely thank Dr. Cheraghi for providing the oxaliplatin-resistant HCT116 cell line used in this research.

[ Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-10-10 ]

مجله دانشگاه علوم پزشکی ایلام

JIUMS

P-ISSN: ۱۵۶۳-۴۷۲۸

E-ISSN: ۲۵۸۸-۳۱۳۵

# بررسی اثر سیتوتوکسیک عصارهٔ آبی گیاه اسپند بر ردهٔ سلولی HCT116 مقاوم به اگزالی‌پلاتین و ارزیابی بیان ژن *BAX*

زهرا سلیمی‌زاده [۱]، ستار طهماسبی انفرادی [۲]، طیبه مجیدی‌زاده [۱]، راضیه جلال [۳]، فروزنده محجوبی [۱*]

[۱] گروه ژنتیک پزشکی، پژوهشکدهٔ ملی مهندسی ژنتیک و بیوتکنولوژی، تهران، ایران

[۲] گروه بیوتکنولوژی گیاهی، پژوهشکدهٔ ملی مهندسی ژنتیک و بیوتکنولوژی، تهران، ایران

[۳] گروه شیمی، دانشکدهٔ علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

**اطلاعات مقاله**

**نوع مقاله:** پژوهشی

**تاریخ دریافت:** ۱۴۰۳/۰۷/۰۷

**تاریخ ویرایش:** ۱۴۰۳/۰۹/۱۲

**تاریخ پذیرش:** ۱۴۰۳/۱۰/۲۹

**تاریخ انتشار:** ۱۴۰۴/۰۱/۲۷

**نویسنده مسئول:**

فروزنده محجوبی

گروه ژنتیک پزشکی، پژوهشکدهٔ ملی مهندسی ژنتیک و بیوتکنولوژی، تهران، ایران

**Email:**

frouz@nigeb.ac.ir

**چکیده**

**مقدمه:** سرطان کولورکتال یکی از شایع‌ترین تومورهای بدخیم دستگاه گوارش در جهان است. اگزالی‌پلاتین یک داروی شیمی‌درمانی مؤثر برای درمان سرطان کولورکتال است. بااین‌حال، استفاده طولانی‌مدت از این دارو اغلب به مقاومت دارویی منجر می‌شود. توسعهٔ روش‌هایی برای کاهش مقاومت سلول‌های سرطان کولورکتال به اگزالی‌پلاتین بسیار مهم است. اسپند درمان ضدسرطان رایجی در طب سنتی است.

**مواد و روش‌ها:** در این تحقیق از دوزهای مختلف عصارهٔ آبی دانه‌های اسپند برای تیمار سلول‌های HCT116 مقاوم به اگزالی‌پلاتین به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت استفاده شد. زنده‌ماندنی سلول‌ها با استفاده از روش متیل تیازول تترازولیوم تعیین گردید؛ سپس استخراج RNA از سلول‌های تیمارشده ($IC_{50}$) و سلول‌های کنترل انجام شد. برای اندازه‌گیری غلظت RNAهای استخراج‌شده از نانودراپ استفاده گردید؛ سپس از RNAهای استخراج‌شده cDNA سنتز شد و میزان بیان ژن *BAX* با استفاده از Real-Time PCR بررسی گردید. در این مطالعه، میزان fold change با نرم‌افزار REST محاسبه شد؛ همچنین برای تجزیه‌وتحلیل آماری از نرم افزار Graph Pad Prism 8 و آزمون t- test میان نمونه‌های کنترل و تیمار استفاده گردید. P کمتر از ۰/۰۵ معنی دار در نظر گرفته شد.

**یافته‌های پژوهش:** نتایج تجزیه‌وتحلیل نشان داد که میان افزایش غلظت عصاره و درصد سلول‌های مرده ارتباط معنی‌داری وجود دارد. میزان سمیت سلولی عصارهٔ آبی دانه‌های اسپند از ۲۴ ساعت به ۴۸ ساعت، در ردهٔ سلولی HCT116 مقاوم به اگزالی‌پلاتین افزایش معنی داری داشت. علاوه بر این، افزایش قابل‌توجه و معنادار در سطح بیان نسبی ژن *BAX* در مقایسه با گروه کنترل مشاهده شد ($P<0.001$).

**بحث و نتیجه‌گیری:** در این مطالعه مشاهده گردید که اثر سایتوتوکسیک عصارهٔ آبی اسپند وابسته به دوز و زمان بود. عصارهٔ آبی اسپند این توانایی را دارد که با تنظیم ژن‌های آپوپتوز، ازجمله تقویت ژن‌های پروآپوپتوز مانند *BAX*، باعث مرگ سلولی در سلول‌های سرطان کولورکتال شود. نتایج نشان می‌دهد که عصارهٔ آبی اسپند می‌تواند به‌طور بالقوه در درمان سلول‌های سرطان کولورکتال مقاوم به دارو مفید باشد.

**واژه‌های کلیدی:** اگزالی‌پلاتین، *BAX*، سرطان کولورکتال، عصارهٔ آبی، *P. harmala*

**استناد:** سلیمی‌زاده زهرا، طهماسبی انفرادی ستار، مجیدی‌زاده طیبه، جلال راضیه، محجوبی فروزنده. بررسی اثر سیتوتوکسیک عصارهٔ آبی گیاه اسپند بر ردهٔ سلولی HCT116 مقاوم به اگزالی‌پلاتین و ارزیابی بیان ژن *BAX*. *مجله دانشگاه علوم پزشکی ایلام*، فروردین ۱۴۰۴؛ (۱)۳۳: ۱۲۶-۱۱۱.

[ Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-10-10 ]

CC BY NC



حق‌مؤلف © نویسندگان

**مقدمه**

سرطان کولورکتال (CRC) سومین سرطان بدخیم و دومین علت مرگ ناشی از سرطان در سراسر جهان است (۱, ۲). روش‌های درمانی برای CRC شامل حذف عفونت‌های زمینه‌ای، جراحی، شیمی‌درمانی، پرتودرمانی و درمان هدفمند است. در حال حاضر، شیمی‌درمانی مبتنی بر اگزالی‌پلاتین در CRC پیشرفتهٔ موضعی یا متاستاتیک بسیار مؤثر است (۳–۵). اگزالی‌پلاتین یک داروی شیمی‌درمانی متداول مبتنی بر پلاتین است که نقش مهمی در درمان کولورکتال ایفا می‌کند (۶). سازوکارهای مقاومت دارویی سلول‌های تومور عمدتاً به افزایش اثر پمپ دارو، سم‌زدایی دارو، تغییرات در مسیر مرتبط با آپوپتوز و تغییرات در توانایی ترمیم DNA مربوط می‌شود (۷). مشاهده گردیده است که مهارکننده‌های آپوپتوز در مقاومت به اگزالی‌پلاتین مؤثر هستند. در سلول‌های مقاوم به اگزالی‌پلاتین سرطان کولورکتال میزان بالایی از زنده‌مانی دیده‌شده است (۸). متأسفانه مقاومت دارویی می‌تواند در طول درمان برای سرطان کولورکتال یا سایر بدخیمی‌ها ظاهر گردد که باعث کاهش اثربخشی داروها می‌شود (۹). علاوه بر این، این درمان‌ها معایب خاصی دارند؛ مانند غیراختصاصی و سیتوتوکسیک بودن برای سلول‌های طبیعی که به عوارض ثانویه منجر می‌گردد (۱۰)؛ ازاین‌رو، جای تعجب نیست که محققان به‌دنبال کشف داروهای ضدسرطان جدید از منابع طبیعی با اثر قوی‌تر و عوارض جانبی کمتر باشند. بر اساس موفقیت‌های عمدهٔ گذشته، گیاهان دارویی منبع امیدوارکننده‌ای برای توسعهٔ ترکیبات شیمیایی جدید با فعالیت‌های ضدسرطانی بالقوه در نظر گرفته می‌شوند (۱۱). بسیاری از ترکیبات فیتوشیمیایی‌ها از داروهای گیاهی به‌دست می‌آیند که به‌طور منظم با کنترل مسیرهای سیگنالینگ‌های مولکولی عمل می‌کنند که در توسعهٔ سرطان دخیل هستند. ترکیبات فیتوشیمیایی پتانسیل ضدسرطانی خود را از طریق چندین سازوکار اعمال می‌کنند؛ ازجمله: القای توقف چرخهٔ سلولی و تحریک آپوپتوز، عمل به‌عنوان عوامل ضدمیتوزی و ضدمیکروتوبولی که به کاهش سنتز DNA منجر می‌گردد، افزایش فعالیت ماکروفاژها و مهار سلول‌های سرطانی، مهار سلول‌های سرطانی از طریق مسیرها و آبشارهای سیگنال‌دهی مختلف، نشان دادن آثار ضدآنژیوژنز و معکوس کردن مقاومت دارویی (۱۲–۱۴). چندین داروی ضدسرطان که در حال حاضر استفادهٔ بالینی می‌شوند، محصولات مشتق‌شده از گیاهان هستند و شامل تاکسول، وینبلاستین یا وین کریستین، ایرینوتکان، کامپتوتسین و مشتقات یا آنالوگ‌های آن‌ها می‌گردند (۱۵). در مطالعات پیشین، اثر سیتوتوکسیک گیاهان متعددی بر سرطان کلون به‌صورت *in vitro* و *in vivo* بررسی‌شده است. ازجملهٔ این گیاهان می‌توان به گیاه خرنوب (*Ceratonia silique*) اشاره کرد که با فعال‌سازی کاسپازهای ۳ و ۹ و برش PARP، موجب فعال‌سازی آپوپتوز میتوکندریایی در سلول‌های HCT-116 (سرطان کولورکتال) می‌شود و همچنین اثر پیشگیرانهٔ عصارهٔ آبی آن در موش BALB/c مشاهده گردیده است (۱۵). گیاه اسپند (*P. harmala*) از خانوادهٔ Zygophyllaceae، از دیرباز در طب سنتی ترکیه، ایران و چین برای درمان فشارخون، آسم، دیابت، عفونت‌های مختلف و همچنین به‌عنوان ضدعفونی، ضدالتهاب و ضدسرطان استفاده می‌شده است (۱۶–۱۸). در طب سنتی مراکش، پودر دانهٔ *P. harmala* را برای تومورهای پوستی تجویز می‌کنند. داروی Spinal-Z که جزء اصلی آن عصارهٔ دانهٔ *P. harmala* است، به‌طور سنتی برای مقابله با سرطان‌های مختلف در ایران استفاده می‌شود. این گیاه بومی غرب آسیا از شرق مدیترانه تا شمال هند است. «Syrian Rue» نام عمومی *P. harmala* است و در ایران به‌طور سنتی با نام‌های «اسفند»، «اسپند» و «هارمال» شناخته می‌گردد (۱۸–۲۰). تجزیه‌وتحلیل فیتوشیمیایی *P. harmala* وجود آلکالوئیدها، اسیدهای چرب، استروئیدها، فلاونوئیدها، آنتراکینون‌ها، اسیدهای آمینه و پلی‌ساکاریدها را در دانه‌ها و سایر قسمت‌های گیاه نشان داده است (۲۱, ۲۲). دانه‌های اسپند حاوی ۲/۵ تا ۴ درصد مخلوط آلکالوئیدهای هارمالا است (۲۳). هارمالین و هارمین مهم‌ترین آلکالوئیدهای موجود در *P. harmala* هستند که آثار مفیدی دارند. هارمالین و هارمین آلکالوئیدهای سه حلقه‌ای بتاکربولین هستند که از دانه‌های *P. harmala* جدا شده‌اند و چندین اثر دارویی مانند آثار

[ Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-10-10 ]

ضدمیکروبی، ضدقارچی، آنتی‌اکسیدانی و ضدتوموری و همچنین القای آپوپتوز دارند (۲۴-۲۷). علاوه بر این، *P. harmala* آثار ضدرگ‌زایی و ضدمتاستازی دارد. عصارهٔ هیدروالکلی دانهٔ *P. harmala* رگ‌زایی را در غلظت‌های بالاتر از ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر مهار می‌کند. اثر ضدرگ‌زایی هارمین نیز بر تومور تأییدشده است (۲۸, ۲۹)؛ همچنین مشخص گردیده است که عصارهٔ هیدروالکلی دانهٔ *P. harmala* فعالیت ضد تکثیر بر سلول‌های اندوتلیال بند ناف انسان، به‌صورت وابسته به دوز و زمان دارد (۲۸). تحقیقاتی که روی عصارهٔ گیاه *P. harmala* با روش‌های HPLC و GC انجام‌شده است، ارتباط میان ترکیبات فیتوشیمیایی موجود در عصاره و فعالیت‌های بیولوژیکی مختلف مربوط به آن‌ها را نشان داده است. هارمین و هارمالین آلکالوئیدهای بتاکربولینی هستند که از دانه‌های *P. harmala* جدا شده‌اند و آثار سیتوتوکسیک آن‌ها علیه رده‌های سلولی سرطانی مختلف ازجمله سلول‌های سرطان سینه، پروستات و رودهٔ بزرگ نشان داده‌شده است. آن‌ها باعث توقف چرخهٔ سلولی و آپوپتوز در سلول‌های سرطانی می‌شوند؛ همچنین هارمین و هارمالین با از بین بردن رادیکال‌های آزاد و کاهش استرس اکسیداتیو، فعالیت آنتی‌اکسیدانی از خود نشان می‌دهند (۳۰-۳۲).

آپوپتوز نوعی مرگ سلولی برنامه‌ریزی‌شده است که آن را به یک هدف بسیار امیدوارکننده برای درمان‌های ضدسرطان تبدیل می‌کند. طیف وسیعی از عوامل ازجمله بیان بیش‌ازحد پروتئین‌های ضدآپوپتوز و بیان ناکافی پروتئین‌های پروآپوپتوز، به‌طور معمول مسیر آپوپتوز را در سرطان مهار می‌کنند. درمان‌هایی که آپوپتوز را هدف قرار می‌دهند، مولکول‌هایی را فعال می‌کنند که آپوپتوز را افزایش می‌دهند و فعالیت مولکول‌های ضدآپوپتوز را مهار می‌کنند (۳۳). تهرانی و همکاران نشان دادند که عصارهٔ *P. harmala* به‌طور چشمگیری سرعت رشد و زنده‌مانی سلولی دو ردهٔ سلولی سرطان پستان (MDA-MB-231 و Mcf-7) را کاهش می‌دهد (۳۴)؛ همچنین در مطالعهٔ دیگری، شبانی و همکاران دریافتند که عصارهٔ *P. harmala* با فعال کردن هر دو مسیر آپوپتوز بیرونی و درونی، از تکثیر ردهٔ سلولی سرطان پستان جلوگیری می‌کند (۳۵). خانوادهٔ Bcl-2 حاوی تعداد بسیاری پروتئین ازجمله پروتئین‌های پروآپوپتوز و آنتی‌آپوپتوز است. این مولکول‌ها نقش مهمی در فرایند آپوپتوز دارند. برخی از اعضای این خانواده باعث القای آپوپتوز می‌شوند، درحالی‌که برخی دیگر از آپوپتوز جلوگیری می‌کنند (۳۶). یکی از پروتئین‌های این خانواده که نقش مهمی در تنظیم آپوپتوز دارد، پروتئین *BAX* است که باعث القای آپوپتوز می‌گردد (۳۷). عملکرد *BAX* از طریق مجموعه‌ای از تغییرات ازجمله تغییرات ساختاری (از حالت غیرفعال به فعال)، انتقال (از سیتوزول به میتوکندری) و تغییرات وضعیت تجمع (از مونومر به دایمر و چندتایی) به‌شدت تنظیم می‌شود. مطالعات نشان داده‌اند که پروتئین *BAX* از طریق کاهش غشای خارجی میتوکندری باعث آزادسازی عوامل آپوپتوزی ازجمله سیتوکروم c و Smac/DIABLO از فضای بین غشایی به سیتوزول می‌گردد. سیتوکروم c به همراه فاکتور فعال‌کنندهٔ پروتئاز آپوپتوتیک ۱(Apaf-1)، dATP و پروکاسپاز-۹ یک کمپلکس به نام «آپوپتوزوم» را تشکیل می‌دهد که کاسپاز ۹ را فعال می‌کند و به دنبال آن، سایر کاسپازهای اجرایی را فعال می‌سازد و درنهایت، به مرگ سلول منجر می‌شود (۳۸).

عصاره‌گیری از گیاهان دارویی به روش‌های مختلف و با استفاده از حلال‌های مختلف صورت می‌گیرد. مشخص است که با توجه به روش و حلال استفاده شده، عصاره‌های تولیدشده خواص متفاوتی را از خود نشان می‌دهند. حلال‌هایی که معمولاً برای استخراج عصاره استفاده می‌گردند، شامل آب و حلال‌های آلی هستند (۳۹). روش‌های استخراج مختلفی برای جدا کردن ترکیبات ضدسرطانی موجود در گیاه *P. harmala* وجود دارد. ترکیبات آلکالوئیدی یکی از مهم‌ترین ترکیبات ضدسرطانی در دانه‌های گیاه *P. harmala* هستند. در مطالعه پیشین سلیمی‌زاده و همکاران، مادهٔ مؤثر آلکالوئیدی (هارمین و هارمالین) با روش استخراج اسیدی/ بازی جدا گردید و اثر ضدسرطانی آن بررسی شد (۴۰). هدف از مطالعهٔ حاضر بررسی اثر عصارهٔ آبی بر سلول‌های سرطان کولورکتال مقاوم به اگزالی‌پلاتین است و در ادامه، میزان بیان ژن *BAX* پیش و

[ Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-10-10 ]

پس از تیمار بررسی گردید؛ همچنین در این مطالعه، اثر سیتوتوکسیک عصارهٔ آبی با مادهٔ مؤثر آلکالوئیدی روی سلول‌های سرطانی کولورکتال مقایسه شد.

## مواد و روش‌ها

استخراج عصاره از دانه‌های *P. harmala*: دانه‌های *P. harmala* (از کوه‌های شهرکرد در استان چهارمحال بختیاری) جمع‌آوری گردید. مقدار ۵۰ گرم پودر دانهٔ خشک‌شدهٔ *P. harmala* به مدت ۴۰ دقیقه در ۵۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر جوشانده شد. محلول با کاغذ صافی (واتمن شمارهٔ ۱) فیلتر گردید؛ سپس مایع صاف‌شده در بن‌ماری ۷۰-۶۰ درجهٔ سانتی‌گراد قرار داده شد تا تغلیظ شود؛ سپس عصارهٔ به‌دست‌آمده در پلیت‌های شیشه‌ای بزرگ (برای خشک شدن) ریخته شد و سپس در انکوباتور قرار گرفت. در انتها، عصارهٔ خشک به‌دست‌آمده در فریزر ۲۰- درجهٔ سانتی‌گراد نگه‌داری گردید.

کشت سلولی و آزمون MTT: ردهٔ سلولی استفاده‌شده در این تحقیق HCT116 مقاوم به اگزالی‌پلاتین است. سلول‌های HCT-116 سلول‌های آدنوکارسینومای کولورکتال انسانی هستند که یک جهش در کدون ۱۳ پروتوانکوژن Ras دارند. سلول‌های HCT116 مقاوم به اگزالی‌پلاتین در DMEM (۱۰ درصد FBS، 100 µg/mL استرپتومایسین، 100 U/mL پنی‌سیلین) در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد با ۵ درصد CO2 کشت داده شدند.

در ادامه، آزمون سمیت سلولی MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) انجام گردید. نمک MTT محلول در آب و زردرنگ است و توسط دهیدرژناز میتوکندریایی سلول‌های زنده به فورمازان بنفش‌رنگ غیر محلول در آب تبدیل می‌شود. میزان رنگ بنفش تولیدشده متناسب با تعداد سلول‌های زنده است. این احیای سلولی با دخالت کوفاکتور نوکلئوتید پیریدین NADH و NADPH و دهیدروژنازهای میتوکندریایی صورت می‌گیرد. کریستال‌های فورمازونی که تشکیل می‌گردند، قابل حل شدن هستند و جذب محلول رنگی حاصل می‌تواند با استفاده از دستگاه ELISA reader به‌طور کمی بررسی شود. در این مطالعه، در هر چاهک از پلیت ۹۶ چاهکی به تعداد ۳۲۰۰ سلول (HCT116 مقاوم به اگزالی‌پلاتین) کشت داده شد. سلول‌ها در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه گردیدند؛ سپس سلول‌ها با محیط ۱۰۰ میکرولیتری حاوی غلظت‌های ۰/۴-۰/۰۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصارهٔ آبی *P. harmala* به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت انکوبه شدند. پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت، ۲۰ میکرولیتر محلول MTT (با غلظت ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) به هر چاهک اضافه گردید و به مدت ۴ ساعت در ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد انکوبه شد؛ سپس حدود ۱۰۰ میکرولیتر DMSO (به‌منظور حل شدن بلورهای نامحلول فورمازان) به هر چاهک اضافه گردید. پس از پیپتاژ (آرام)، به مدت ۲۰ دقیقه درون انکوباتور ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد قرار گرفت و سپس جذب رنگ MTT توسط الایزا ریدر خوانده شد و میزان $IC_{50}$ محاسبه گردید.

استخراج RNA:¬ ابتدا استخراج RNA از سلول‌های کنترل و تیمارشده (با غلظت $IC_{50}$ و به مدت ۴۸ ساعت) بر اساس دستورالعمل کیت (Roche Applied Sciences) انجام شد. کیفیت و کمیت RNA استخراج‌شده با استفاده از ژل آگارز و دستگاه نانودراپ بررسی گردید.

سنتز cDNA: سنتز cDNA مطابق با کیت Norgen Biotek Crop حاوی بافر واکنش 2 x (شامل مخلوطی از بافر، نوکلئوتید و پرایمرهای سنتز cDNA از رونوشت‌های total RNA ) و مخلوط آنزیم TruScriptTM (شامل آنزیم رونوشت بردار معکوس M-MuLV) بر اساس دستورالعمل کیت انجام شد. کیفیت cDNAهای سنتزشده توسط پرایمر بتا-۲-میکروگلوبولین انسانی (*B2M*) به‌عنوان یک پرایمر خانه‌دار که در کیت سنتز cDNA وجود داشت، بررسی گردیدند.

Real-Time PCR: بررسی بیان ژن‌ها در نمونه‌های کنترل و تیمار (با غلظت $IC_{50}$ و به مدت ۴۸ ساعت) با تست PCR توسط کیت سایبرگرین انجام شد. در کنار نمونه‌های کنترل و تیمار، چند نمونه به‌عنوان کنترل منفی (NTC) برای بررسی احتمال وجود آلودگی نیز اختصاص یافت. در این مطالعه، از ژن *GAPDH* به‌عنوان کنترل داخلی استفاده گردید.

[ Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-10-10 ]

سطح بیان ژن مدنظر ابتدا با ژن کنترل داخلی (ژن *GAPDH*) نرمال شد و سپس میزان نسبت بیان ژن مدنظر در گروه‌های تیماری نسبت به گروه کنترل با استفاده از فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$ محاسبه گردید. در جدول شمارهٔ ۱ توالی پرایمرهای طراحی‌شده نشان داده‌شده است (۴۰).

**جدول شمارهٔ ۱.** مشخصات پرایمرهای استفاده‌شده برای انجام واکنش PCR

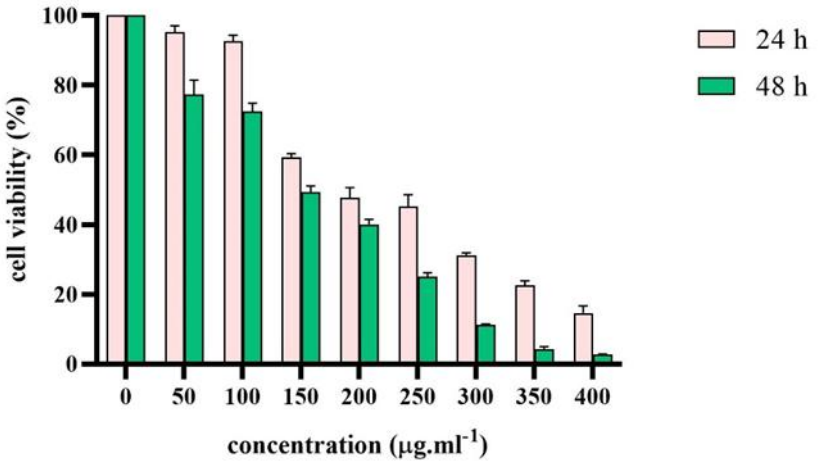
| پرایمر | NCBI Reference Sequence | توالی پرایمر | Tm ($^{\circ}C$) | اندازهٔ طول محصول (جفت باز) |
|---|---|---|---|---|
| *GAPDH* | NM_002046.7 | Forward: CAGGGGGGAGCCAAAAGGGT<br>Reverse: TGGGTGGCAGTGATGGCATGG | ۵۸ | ۲۱۸ |
| *BAX* | NM_001291428.2 | Forward: TGCCTCAGGATGCGTCCACCAA<br>Reverse: CCCAGTTGAAGTTGCCGTCAG | ۵۹ | ۱۷۴ |

تجزیه‌وتحلیل داده‌های MTT با استفاده از نرم‌افزار Graph Pad Prism vol.8 و تجزیه‌وتحلیل آماری داده‌ها با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه انجام گردید. تجزیه‌وتحلیل داده‌های Real-Time PCR با استفاده از نرم‌افزارهای GraphPad Prism vol.8، REST 2009 و روش t- test بین نمونه‌های کنترل و تیمار انجام شد. داده‌های تجربی این مطالعه در سه تکرار انجام گردید و P کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

## یافته‌های پژوهش

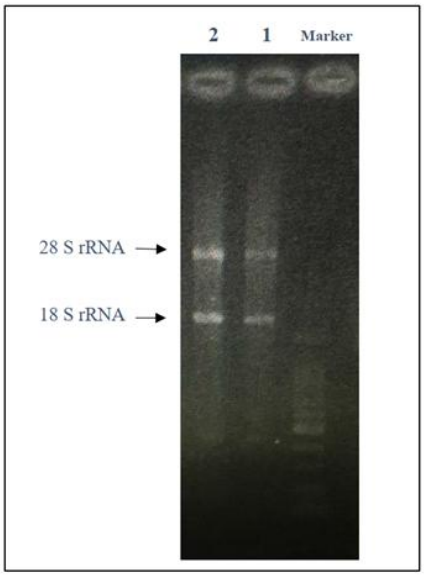
آزمون MTT: در این مطالعه مشاهده گردید، با افزایش غلظت عصارهٔ آبی *P. harmala*، تعداد سلول‌های مرده افزایش می‌یابد. مقدار $IC_{50}$ به‌ترتیب ۰/۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و ۰/۱۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت قرار گرفتن در معرض عصارهٔ آبی *P. harmala* تعیین شد؛ همچنین در ردهٔ سلولی HCT116 مقاوم به اگزالی‌پلاتین، سمیت سلولی عصارهٔ *P. harmala* به‌طور چشمگیری از ۲۴ به ۴۸ ساعت افزایش یافت (شکل شمارهٔ ۱). در ادامه، تجزیه‌وتحلیل‌های آماری با نرم‌افزار Graph Pad Prism برای بررسی وجود ارتباط معنی‌دار در نتایج انجام گردید که مشاهده شد که میان سمیت عصارهٔ آبی بر روی سلول‌های مقاوم و افزایش غلظت عصاره و همچنین افزایش مدت‌زمان تیمار ارتباط معنی‌داری وجود دارد ($P<0.001$)؛ همچنین error bars میانگین ± SD را نشان می‌دهند.

[ Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-10-10 ]




**شکل شماره ۱.** نمودار آزمون MTT ردهٔ سلولی HCT116 مقاوم به اگزالی‌پلاتین در سلول‌های تیمارشده با عصارهٔ آبی در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت

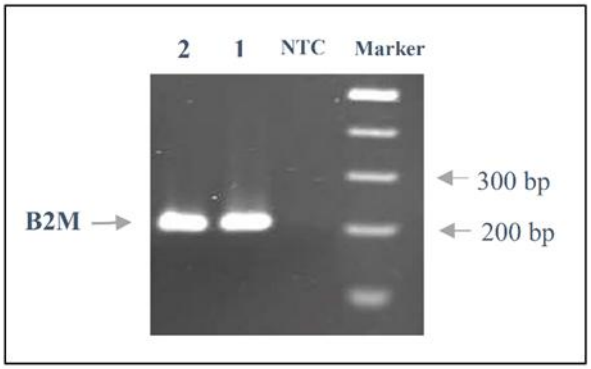
استخراج RNA: پس از استخراج RNA، کیفیت و کمیت RNA استخراج‌شده بررسی گردید. در بررسی ژل، وجود دو باند ۱۸ S و ۲۸ S RNA ریبوزومی نشان‌دهندهٔ تجزیه نشدن RNA و سلامت RNA استخراجی است (شکل شمارهٔ ۲). در بررسی اسپکتروفوتومتری، نسبت A280/A260 بین ۱/۸ و ۲ به‌دست آمد که نشان‌دهندهٔ درجهٔ بالای خلوص RNA و نیز آلودگی نشدن آن با پروتئین و ترکیبات فنلی (گوانیدین تیوسیونات) است. نتایج این مرحله حاکی از آن بود که RNA استخراج‌شده می‌تواند با اطمینان بالا در مراحل بعدی تحقیق استفاده شود.




**شکل شماره ۲.** RNA استخراج‌شده روی ژل آگارز. ۱. نمونه‌های کنترل (HCT116 مقاوم به اگزالی‌پلاتین) و ۲. تیمار (HCT116 مقاوم به اگزالی‌پلاتین تیمارشده با عصارهٔ آبی)

سنتز cDNA: مراحل سنتز cDNA مطابق دستورالعمل کیت انجام و صحت آن توسط پرایمرهای ژن خانه‌دار بتا-۲- میکروگلوبولین (*B2M*) با استفاده از PCR تأیید گردید. شکل شمارهٔ ۳ مربوط به بررسی cDNAهای سنتزشده از RNA استخراجی نمونه‌های مختلف توسط پرایمر *B2M* است و باندها مربوط به محصول PCR ژن *B2M* (230bp) است.

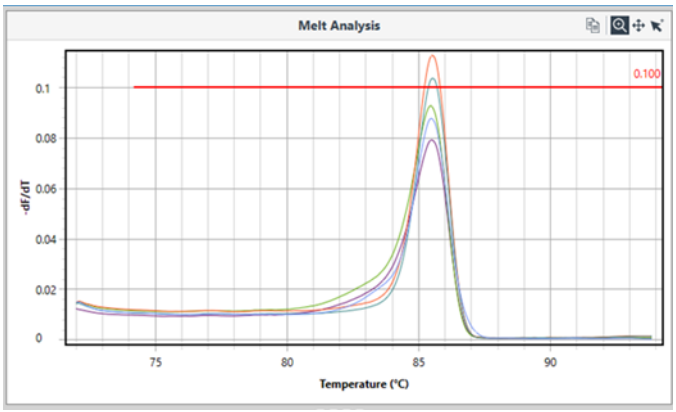
[ Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-10-10 ]



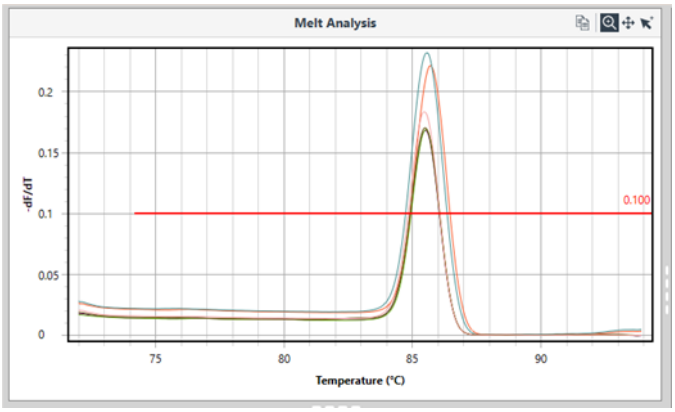

**شکل شماره ۳.** محصول PCR ژن *B2M* روی ژل آگارز با استفاده از cDNAهای سنتز شده. NTC. نمونهٔ کنترل منفی؛ ۱. نمونهٔ کنترل (HCT116 مقاوم به اگزالی‌پلاتین) و ۲. نمونهٔ تیمار (HCT116 مقاوم به اگزالی‌پلاتین تیمارشده با عصارهٔ آبی)

Real-Time PCR: ابتدا شرایط Real-time PCR برای ژن *BAX* و *GAPDH* بهینه‌سازی شد، به صورتی که بررسی منحنی‌های ذوب حکایت از تکثیرنمایی قطعه‌ای با یک منحنی ذوب یکتا بدون پرایمر دایمر داشت که نشان‌دهندهٔ تکثیر اختصاصی این ژن‌ها است (شکل‌های شمارهٔ ۴ و ۵). تغییر در بیان ژن آپوپتوزی *BAX* در سلول‌های سرطانی کلون مقاوم به اگزالی‌پلاتین تیمارشده با عصارهٔ آبی *P. harmala* پس از ۴۸ ساعت بررسی گردید (شکل شمارهٔ ۶).

نتایج نسبت بیان ژن *BAX* در سلول‌های تیمارشده نسبت به کنترل (fold change) حدود ۴/۶ افزایش بیان را نشان می‌دهد. در این مطالعه، میزان fold change با نرم‌افزار REST محاسبه شد. برای تجزیه‌وتحلیل آماری، آزمون t- test میان نمونه‌های کنترل و تیمار انجام گردید و مشاهده شد که افزایش بیان ژن *BAX* معنادار است (P<0.001)؛ همچنین error bars میانگین ± SD را نشان می‌دهد.

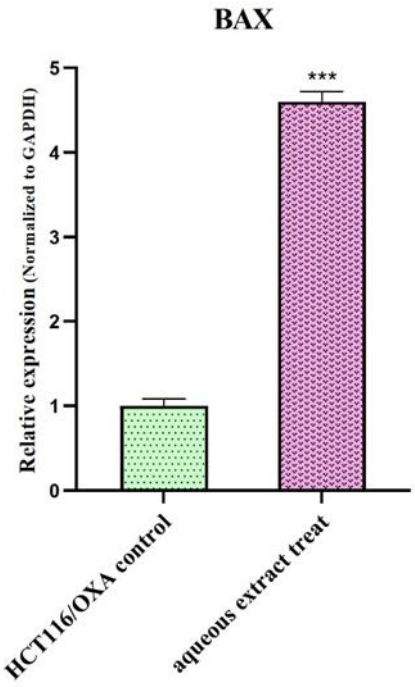



**شکل شماره ٤.** منحنی ذوب ژن خانه‌دار *GAPDH* برای نمونه‌های کنترل و تیمار




**شکل شماره ۵.** منحنی ذوب ژن *BAX* برای نمونه‌های کنترل و تیمار

[ Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-10-10 ]




**شکل شماره ٦.** مقایسهٔ میزان بیان ژن *BAX* در سلول‌های کنترل و تیمار (عصارهٔ آبی) پس از ۴۸ ساعت

## بحث و نتیجه‌گیری

مطالعهٔ حاضر با هدف بررسی اثر عصارهٔ آبی بر سلول‌های سرطان کولورکتال مقاوم به اگزالی‌پلاتین انجام شد. در مطالعهٔ حاضر مشاهده گردید که عصارهٔ آبی اسپند به‌صورت وابسته به دوز و زمان، اثر سیتوتوکسیک بر سلول‌های HCT116 مقاوم به اگزالی‌پلاتین دارد. در مطالعه‌ای که رضایی و همکاران انجام دادند، مشاهده شد که عصارهٔ آبی اسپند به‌صورت وابسته به دوز و زمان، اثر سیتوتوکسیک بر سلول‌های لوسمی دارد (۴۱). در مطالعهٔ پیشین گروه حاضر، اثر مادهٔ مؤثر آلکالوئیدی مستخرج از دانه‌های *P. harmala* بر سلول‌های سرطانی HCT116 در زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت در غلظت‌های مختلف بررسی گردید و مشاهده شد، روی سلول‌های سرطانی HCT116 اثر سایتوتوکسیک معناداری دارد و میزان $IC_{50}$ در زمان ۲۴ ساعت ۰/۰۳ و در ۴۸ ساعت ۰/۰۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و همچنین اثر سایتوتوکسیک آن وابسته به دوز و زمان بود. در مطالعهٔ حاضر، همانند مطالعهٔ پیشین مشاهده شد که عصارهٔ آبی اسپند به‌صورت وابسته به دوز و زمان، اثر سیتوتوکسیک بر سلول‌های HCT116 مقاوم به اگزالی‌پلاتین دارد (۴۰). در مطالعهٔ حاضر، میزان $IC_{50}$ بالاتری در زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت (۰/۲ و ۰/۱۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) نسبت به اثر مادهٔ مؤثر آلکالوئیدی استخراجی مشاهده گردید که این به علت آن است که بیشترین اثر ضدسرطانی دانه‌های گیاه *P. harmala* به سبب حضور آلکالوئیدهای آن به‌ویژه هارمین و هارمالین است. در مطالعهٔ پیشین، آلکالوئیدهای هارمین و هارمالین جداسازی‌شده بودند و به همین علت، در غلظت پایین‌تری روی سلول‌های سرطانی اثر کشندگی داشتند؛ اما در عصارهٔ آبی همهٔ ترکیبات گیاه استخراج شد و به همین علت، $IC_{50}$ بالاتری مشاهده گردید. یکی از فوایدی که استفاده از عصارهٔ آبی نسبت به مادهٔ مؤثر آلکالوئیدی استخراجی دارد، این است که استخراج آن آسان‌تر است و در زمان کمتر و با هزینهٔ کمتری استخراج می‌شود؛ همچنین در روش استخراج آبی، تنها از آب به‌عنوان حلال استفاده می‌گردد که غیرسمی است و برای استفاده روی سلول ایمن‌تر است. در مطالعهٔ حاضر، اثر عصارهٔ آبی اسپند بر سلول‌های کولورکتال مقاوم به اگزالی‌پلاتین بررسی شد و مشاهده گردید که روی سلول‌های مقاوم اثر سیتوتوکسیک دارد. در مطالعهٔ ما و همکاران مشاهده شد که رده‌های سلولی که بیش‌ازحد BCRP را بیان می‌کنند، تقریباً در برابر عوامل سیتوتوکسیک مانند میتوکسانترون و کامپتوتسین (مهارکنندهٔ

[ Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-10-10 ]

DNA توپوایزومراز I ) مقاوم هستند. پروتئین BCRP (عضو خانوادهٔ ناقل‌های ABC) از سلول‌ها، بافت‌ها و ارگان‌های طبیعی در برابر سیتوتوکسیسیتی محافظت می‌کند. BCRP در برخی از تومورها نیز به‌شدت بیان می‌شود. این پروتئین داروهای ضدسرطان را از سلول‌ها پمپاژ می‌کند و درنتیجه،BCRP موجب مقاومت چنددارویی (MDR) در سلول‌های توموری می‌گردد. برای بازگرداندن حساسیت به مقاومت القاشده توسط BCRP، به عوامل معکوس‌کننده نیاز است. در این مطالعه مشاهده شد که درمان هم‌زمان سلول‌های سرطان سینه (با بیان بیش‌ازحد BRCP ) با عوامل سیتوتوکسیک و هارمین به‌طور چشمگیری $IC_{50}$ را برای میتوکسانترون و کامپتوتسین کاهش داد؛ بنابراین، هارمین می‌تواند به‌طور خاص با BCRP تعامل داشته باشد، جریان دارو وابسته به BCRP را مهار کند و مقاومت دارویی را معکوس نماید و موجب افزایش سیتوتوکسیسیتی داروهای ضدسرطان در سلول‌های سرطانی سینه (MDA-MB-231) شود (۴۲). در مطالعهٔ وو و همکاران مشاهده گردید که هارمین مسیر AKT/mTOR را سرکوب می‌کند و هارمین به همراه جمسیتابین نیز به‌طور چشمگیری مسیر سیگنالینگ AKT/mTOR را سرکوب می‌نماید. مسیر AKT/mTOR در سازوکارهای مقاومت به جمسیتابین در سلول‌های سرطانی پانکراس نقش دارد؛ بنابراین، هارمین احتمالاً فعالیت ضدسرطانی جمسیتابین را از طریق سرکوب مسیر AKT/mTOR افزایش می‌دهد (۴۳). مسیر آپوپتوز ذاتی توسط خانوادهٔ Bcl-2 تنظیم می‌گردد که شامل پروتئین‌های پیش‌آپوپتوزی و ضدآپوپتوزی است. نبود پروتئین‌های پیش آپوپتوزی یا افزایش بیان پروتئین‌های ضدآپوپتوزی موجب افزایش مقاومت به اگزالی‌پلاتین می‌شود (۴۴, ۴۵). در مطالعهٔ حاضر، میزان بیان ژن *BAX* پس از تیمار عصارهٔ آبی روی سلول‌های HCT116 مقاوم به اگزالی‌پلاتین بررسی و مشاهده گردید که میزان بیان آن پس از تیمار افزایش یافت. افزایش بیان ژن *BAX* و کاهش بیان Bcl-2 به القای مرگ سلولی در سلول‌های سرطانی منجر می‌شود. داروهای گیاهی مختلف به‌طور بالقوه می‌توانند بیان *BAX* و Bcl-2 را تغییر دهند و درنتیجه، آپوپتوز را در سلول‌های سرطانی آغاز کنند. فن و همکاران دریافتند که بتاکربولین آلکالوئیدهای *P. harmala* بیان Bcl-2 را کاهش می‌دهد، درحالی‌که بر بیان *BAX* در ردهٔ سلولی سرطان معده SGC-7901 می‌افزاید؛ همچنین آنان مشاهده کردند که بتاکربولین آلکالوئیدها می‌توانند بیان FAK، PI3K، AKT و mTOR را در هر دو سطح پروتئین و mRNA در سلول‌های SGC-7901 و بافت‌های تومور تشکیل‌شده توسط سلول‌های SGC-7901 کاهش دهند. آن‌ها ممکن است هدف بتاکربولین در مسیر FAK/PI3K/AKT/mTOR باشند (۴۶). هامسا و همکاران اثر هارمین را بر ردهٔ سلولی ملانوما B16f-10 مطالعه کردند و گزارش دادند که هارمین با افزایش بیان ژن *BAX* و کاهش Bcl-2، بر مسیرهای درونی و بیرونی آپوپتوز تأثیر می‌گذارد (۴۷). در مطالعهٔ دیگری، دینگ و همکاران گزارش دادند که هارمین به کاهش سطح Bcl-2 منجر شد، درحالی‌که به‌طور همزمان بیان *BAX* را افزایش داد. آنان پیشنهاد می‌کنند که هارمین آپوپتوز را افزایش می‌دهد، از تکثیر رده‌های سلولی سرطان سینه جلوگیری می‌کند و رشد تومور را در داخل بدن مهار می‌نماید (۴۸)؛ همچنین *BAX*، به‌عنوان یک عامل پیش آپوپتوتیک، بر پاسخ سلول‌های سرطانی به عوامل شیمی‌درمانی تأثیر می‌گذارد. تحقیقات جدید نشان می‌دهد که افزایش سطح *BAX* حساسیت سلول‌های سرطانی سر و معدهٔ انسان را به داروهای مختلف شیمی‌درمانی افزایش می‌دهد (۴۹, ۵۰). در مطالعهٔ پیشین گروه حاضر، بیان ژن *BAX* پس از تیمار با مادهٔ مؤثر آلکالوئیدی مستخرج از دانه‌های *P. harmala* روی سلول‌های سرطانی HCT116 بررسی و مشاهده شد که این ماده با افزایش بیان *BAX*، رشد سلول‌های سرطانی کولورکتال انسانی را مهار می‌کند. علاوه بر این، سلول‌های HCT116 تحت تیمار با مادهٔ مؤثر آلکالوئیدی *P. harmala*، کاهش بیان پروتئین ضد آپوپتوز Bcl-2 را نشان دادند، درحالی‌که بر بیان پروتئین‌های پروآپوپتوز *BAX* و p53 افزودند. با توجه به این نتایج، مادهٔ مؤثر آلکالوئیدی *P. harmala* فعالیت p53 را فعال می‌کند و p53 مستقیماً باعث فعال شدن *BAX* می‌شود و کمپلکس‌های مهاری با پروتئین

[ Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-10-10 ]

Bcl2 تشکیل می‌دهد. این برهم‌کنش‌ها درنهایت به نفوذپذیری میتوکندری و آزاد شدن سیتوکروم c و سرانجام به آپوپتوز منجر می‌شود؛ همچنین مشاهده گردید که درصد آپوپتوز سلول‌ها در میان سلول‌های HCT116 تیمارشده با مادهٔ مؤثر آلکالوئیدی *P. harmala* در زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت بیشتر از سلول‌های کنترل بود که این نشان می‌دهد، احتمالاً اثر سیتوتوکسیک مادهٔ مؤثر آلکالوئیدی *P. harmala* از طریق فعال کردن سازوکار آپوپتوز است (۴۰). در مطالعات پیشین به مسیرهای متعددی برای مقاومت سلول‌ها به اگزالی‌پلاتین اشاره‌شده است. مسیر آپوپتوز ذاتی توسط خانوادهٔBcl-2 تنظیم می‌گردد که شامل پروتئین‌های پیش‌آپوپتوزی و ضدآپوپتوزی است. نبودِ پروتئین‌های پیش‌آپوپتوزی یا افزایش بیان پروتئین‌های ضدآپوپتوزی موجب افزایش مقاومت به اگزالی‌پلاتین می‌شود (۴۴, ۴۵). همان‌طور که اشاره شد، احتمالاً یکی از مسیرهایی که عصارهٔ آبی باعث افزایش آپوپتوز در سلول‌های HCT116 مقاوم به اگزالی‌پلاتین می‌شود، می‌تواند از طریق افزایش بیان ژن *BAX* باشد. نتایج مطالعهٔ حاضر نشان داد که عصارهٔ آبی *P. harmala* بر سلول‌های سرطان کولورکتال مقاوم به اگزالی‌پلاتین اثر سیتوتوکسیک دارد. در ادامه، برای جلوگیری از عوارض احتمالی آن، مطالعهٔ عصارهٔ آبی *P. harmala* روی سلول‌های طبیعی و نمونه‌های حیوانی با سرطان کولورکتال پیشنهاد می‌گردد؛ همچنین تحقیقات بیشتر برای جداسازی و شناسایی ترکیبات عصارهٔ آبی *P. harmala* پیشنهاد می‌شود که واسطهٔ آثار سیتوتوکسیک هستند؛ همچنین بررسی سازوکار دقیق آثار ضدسرطان این گیاه به‌ویژه در مقایسه با داروهای شیمی‌درمانی موجود و علاوه بر آن، بررسی تأثیر هم‌افزایی عصارهٔ آبی *P. harmala* با داروهای شیمی‌درمانی می‌تواند مفید باشد. پیشنهاد می‌گردد که با انجام مطالعات بیشتر بتوان از عصارهٔ آبی دانه گیاه *P. harmala* در کنار داروهای رایج شیمی‌درمانی برای درمان سرطان کولورکتال مقاوم به دارو استفاده کرد.

## سپاس‌گزاری

از خانم دکتر چراغی برای اهدای ردهٔ سلولی HCT116 مقاوم به اگزالی‌پلاتین کمال تشکر و قدردانی را داریم.

## تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌کنند که هیچ تعارض منافعی وجود ندارد.

## کد اخلاق

با توجه به استفاده نکردن از نمونهٔ انسانی–حیوانی، نیاز به تهیهٔ کد اخلاق نبود.

## حمایت مالی

این مطالعه به‌طور کامل توسط پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری (NIGEB) حمایت شده است.

## مشارکت نویسندگان

تحلیل داده‌ها، نگارش و تفسیر داده‌های پژوهش: زهرا سلیمی‌زاده

طراحی پژوهش، ویرایش: ستار طهماسبی انفرادی، فروزنده محجوبی ، طیبه مجیدی زاده، زهرا سلیمی زاده،

نظارت: ستار طهماسبی انفرادی، فروزنده محجوبی،

بخش آزمایشگاهی: راضیه جلال، زهرا سلیمی زاده،

مدیریت پروژه: فروزنده محجوبی.

[ Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-10-10 ]

## References


1. Avella P, Vaschetti R, Cappuccio M, Gambale F, Rafanelli F, Brunese M, et al. The role of liver surgery in simultaneous synchronous colorectal liver metastases and colorectal cancer resections: a literature review of 1730 patients underwent open and minimally invasive surgery. Minerva Surg. 2022;77:582-90. doi: 10.23736/S2724-5691.22.09716-7.
2. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA Cancer J Clin. 2021;71:209-49. doi: 10.3322/caac.21660.
3. Goldberg RM, Sargent DJ, Morton RF, Fuchs CS, Ramanathan RK, Williamson SK, et al. A randomized controlled trial of fluorouracil plus leucovorin, irinotecan, and oxaliplatin combinations in patients with previously untreated metastatic colorectal cancer. J Clin Oncol. 2004;22:23-30. doi: 10.1200/JCO.2004.09.046.
4. Rödel C, Graeven U, Fietkau R, Hohenberger W, Hothorn T, Arnold D, et al. Oxaliplatin added to fluorouracil-based preoperative chemoradiotherapy and postoperative chemotherapy of locally advanced rectal cancer (the German CAO/ARO/AIO-04 study): final results of the multicentre, open-label, randomised, phase 3 trial. Lancet Oncol. 2015;16:979-89. doi: 10.1016/S1470-2045(15)00159-X.
5. Adebayo AS, Agbaje K, Adesina SK, Olajubutu O. Colorectal cancer: disease process, current treatment options, and future perspectives. Pharmaceutics. 2023;15:2620. doi: 10.3390/pharmaceutics15112620.
6. Yin J, Wang L, Wang Y, Shen H, Wang X, Wu L. Curcumin reverses oxaliplatin resistance in human colorectal cancer via regulation of TGF-β/Smad2/3 signaling pathway. Onco Targets Ther. 2019;12:3893. doi: 10.2147/OTT.S199601.
7. Han W, Yin H, Ma H, Wang Y, Kong D, Fan Z. Curcumin regulates ERCC1 expression and enhances oxaliplatin sensitivity in resistant colorectal cancer cells through its effects on miR-409-3p. Evid Based Complement Alternat Med. 2020;2020. doi: 10.1155/2020/8394574.
8. Wen K, Fu Z, Wu X, Feng J, Chen W, Qian J. Oct-4 is required for an antiapoptotic behavior of chemoresistant colorectal cancer cells enriched for cancer stem cells: effects associated with STAT3/Survivin. Cancer Lett. 2013;333:56-65. doi: 10.1016/j.canlet.2013.01.009.
9. Krishna R, Mayer LD. Multidrug resistance (MDR) in cancer: mechanisms, reversal using modulators of MDR and the role of MDR modulators in influencing the pharmacokinetics of anticancer drugs. Eur J Pharm Sci. 2000;11:265-83. doi: 10.1016/s0928-0987(00)00114-7.
10. Schuell B, Gruenberger T, Kornek G, Dworan N, Depisch D, Lang F, et al. Side effects during chemotherapy predict tumour response in advanced colorectal cancer. Br J Cancer. 2005;93:744-8. doi: 10.1038/sj.bjc.6602783.
11. Fridlender M, Kapulnik Y, Koltai H. Plant derived substances with anti-cancer activity: from folklore to practice. Front Plant Sci. 2015;6:163161. doi: 10.3389/fpls.2015.00799.
12. Choudhari AS, Mandave PC, Deshpande M, Ranjekar P, Prakash O. Phytochemicals in cancer treatment: From preclinical studies to clinical practice. Front Pharmacol. 2020;10:1614. doi: 10.3389/fphar.2019.01614.
13. Browning DD, Kwon IK, Wang R. cGMP-dependent protein kinases as potential targets for colon cancer prevention and treatment. Future Med Chem. 2010;2:65-80. doi: 10.4155/fmc.09.142.
14. Vijayalakshmi M, Meganathan S, Surendhar SK, Umamaheswari A, Lakshmana Prabu S. Exploring the Systematic Anticancer Mechanism in Selected Medicinal Plants: A Review. Oncol Adv. 2024;2:141-7. doi: 10.14218/OnA.2024.00012.
15. Benarba B, Pandiella A. Colorectal cancer and medicinal plants: Principle findings from recent studies. Biomed Pharmacother. 2018;107:408-23. doi : 10.1016/j.biopha.2018.08.006.
16. Mashreghi M, Niknia S. The effect of *Peganum harmala* and Teucrium polium alcoholic extracts on growth of Escherichia coli O157. Jundishapur J Microbiol. 2012;5:511-5. doi:10.5812/jjm.3665.
17. Ababou A, Chouieb M, Bouthiba A, Saidi D, Bouzina MMH, Mederbal K. Spatial pattern analysis of *Peganum harmala* on the salted lower Chelif plain, Algeria. Turk J Bot. 2013;37:111-21. doi:10.3906/bot-1202-16.
18. Lamchouri F, Zemzami M, Jossang A, Abdellatif A, Israili ZH, Lyoussi B. Cytotoxicity of alkaloids isolated from *Peganum harmala* seeds. Pak J Pharm Sci. 2013;26:699-706.
19. Jalali A, Dabaghian F, Zarshenas MM. Alkaloids of *Peganum harmala*: Anticancer biomarkers with promising outcomes. Curr Pharm Des. 2021;27:185-96. doi:10.2174/1381612826666201125103941.
20. Moloudizargari M, Mikaili P, Aghajanshakeri S, Asghari MH, Shayegh J. Pharmacological


[ Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-10-10 ]

and therapeutic effects of *Peganum harmala* and its main alkaloids. Pharmacogn Rev. 2013;7:199. doi: 10.4103/0973-7847.120524.
21. Moussa TA, Almaghrabi OA. Fatty acid constituents of *Peganum harmala* plant using Gas Chromatography–Mass Spectroscopy. Saudi J Biol Sci. 2016;23:397-403. doi: 10.1016/j.sjbs.2015.04.013.
22. Niazi S, Tahmasebi Enferadi S, Ghaderitabar H. Variation of Main Alkaloids and Fatty Acids among Five Natural Populations of *Peganum harmala L.* from Iran. J Med Plants By-Prod. 2021;10:45-52. doi:10.22092/jmpb.2020.128202.1151.
23. Tarkowská D. A fast and reliable UHPLC–MS/MS-based method for screening selected pharmacologically significant natural plant indole alkaloids. Molecules. 2020;25:3274. doi: 10.3390/molecules25143274.
24. Burman MD, Bag S, Ghosal S, Karmakar S, Pramanik G, Chinnadurai RK, et al. Exploring the Structural Importance of the C3═ C4 Double Bond in Plant Alkaloids Harmine and Harmaline on Their Binding Interactions with Hemoglobin. ACS Omega. 2023;8:37054-64. doi: doi: 10.1021/acsomega.3c04432.
25. Uddin MJ, Xu S, Crews BC, Aleem AM, Ghebreselasie K, Banerjee S, et al. Harmaline analogs as substrate-selective cyclooxygenase-2 inhibitors. ACS Med Chem Lett. 2020;11:1881-5. doi: 10.1021/acsmedchemlett.9b00555.
26. Yao P, Yao P, Ku X, Yang J. Harmine suppresses the malignant phenotypes and PI3K activity in breast cancer. Anticancer Drugs. 2023;34:373-83. doi: 10.1097/CAD.0000000000001462.
27. Rashidi M, Mahmoudian E, Mirzaei S, Mazloomi SN, Bazi A, Azadeh H, et al. Harmaline downregulates angiogenesis markers and suppresses the growth of 4T1 breast cancer cells in vivo and in vitro. Chem Biol Interact. 2022;365:110087. doi: 10.1016/j.cbi.2022.110087.
28. Yavari N, Emamian F, Yarani R, Reza Mohammadi-Motlagh H, Mansouri K, Mostafaie A. In vitro inhibition of angiogenesis by heat and low pH stable hydroalcoholic extract of *Peganum harmala* seeds via inhibition of cell proliferation and suppression of VEGF secretion. Pharm Biol. 2015;53:855-61. doi: 10.3109/13880209.2014.946057.
29. Hamsa T, Kuttan G. Harmine inhibits tumour specific neo-vessel formation by regulating VEGF, MMP, TIMP and pro-inflammatory mediators both in vivo and in vitro. Eur J Pharmacol. 2010;649:64-73. doi: 10.1016/j.ejphar.2010.09.010.
30. Zhang Y, Shi X, Xie X, Laster KV, Pang M, Liu K, et al. Harmaline isolated from *Peganum harmala* suppresses growth of esophageal squamous cell carcinoma through targeting mTOR. Phytother Res. 2021;35:6377-88. doi: 10.1002/ptr.7289.
31. Ruan S, Jia F, Li J. Potential antitumor effect of harmine in the treatment of thyroid cancer. Evid Based Complement Alternat Med. 2017;2017. doi: 10.1155/2017/9402615.
32. Javeed M, Rasul A, Hussain G, Jabeen F, Rasool B, Shafiq N, et al. Harmine and its derivatives: Biological activities and therapeutic potential in human diseases. Bangladesh J Pharmacol. 2018;13:203-13. doi: 10.3329/bjp.v13i3.34990.
33. Pfeffer CM, Singh AT. Apoptosis: a target for anticancer therapy. Int J Mol Sci. 2018;19:448. doi: 10.3390/ijms19020448.
34. Seyed Hassan Tehrani S, Hashemi Sheikh Shabani S, Tahmasebi Enferadi S, Rabiei Z. Growth inhibitory impact of *Peganum harmala L.* on two breast cancer cell lines. Iran J Biotechnol. 2014;12:8-14. doi:10.5812/IJB.18562.
35. Shabani SHS, Tehrani SSH, Rabiei Z, Enferadi ST, Vannozzi GP. *Peganum harmala L.*'s anti-growth effect on a breast cancer cell line. Biotechnol Rep. 2015;8:138-43. doi: 10.1016/j.btre.2015.08.007.
36. Qian S, Wei Z, Yang W, Huang J, Yang Y, Wang J. The role of BCL-2 family proteins in regulating apoptosis and cancer therapy. Front Oncol. 2022;12:985363. doi: 10.3389/fonc.2022.985363.
37. Cory S, Adams JM. Killing cancer cells by flipping the Bcl-2/*Bax* switch. Cancer cell. 2005;8:5-6. doi: 10.1016/j.ccr.2005.06.012.
38. Liu Z, Ding Y, Ye N, Wild C, Chen H, Zhou J. Direct activation of *Bax* protein for cancer therapy. Med Res Rev. 2016;36:313-41. doi: 10.1002/med.21379.
39. Huang Hj, Yuan Xz. Recent progress in the direct liquefaction of typical biomass. Prog Energy Combust Sci. 2015;49:59-80. doi:10.1016/j.pecs.2015.01.003.
40. Salimizadeh Z, Enferadi ST, Majidizadeh T, Mahjoubi F. Cytotoxicity of alkaloids isolated from *Peganum harmala* seeds on HCT116 human colon cancer cells. Mol Biol Rep. 2024;51:732. doi: 10.1007/s11033-024-09655-7.
41. Rezaee M, Hajighasemi F. Sensitivity of hematopoietic malignant cells to *Peganum harmala* seed extract in vitro. J basic clin pathophysiol. 2019;7:21-6. doi: 10.22070/JBCP.2019.3982.1107.
42. Ma Y, Wink M. The beta-carboline alkaloid harmine inhibits BCRP and can reverse resistance to the anticancer drugs mitoxantrone and camptothecin in breast cancer cells. Phytother Res. 2010;24:146-9. doi: 10.1002/ptr.2860.

[ Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-10-10 ]

43. Wu LW, Zhang JK, Rao M, Zhang ZY, Zhu HJ, Zhang C. Harmine suppresses the proliferation of pancreatic cancer cells and sensitizes pancreatic cancer to gemcitabine treatment. Onco Targets Ther. 2019:4585-93. doi: 10.2147/OTT.S205097.
44. Hayward RL, Macpherson JS, Cummings J, Monia BP, Smyth JF, Jodrell DI. Enhanced oxaliplatin-induced apoptosis following antisense Bcl-xl down-regulation is p53 and *Bax* dependent: Genetic evidence for specificity of the antisense effect. Mol Cancer Ther. 2004;3:169-78. doi: 10.1158/1535-7163.169.3.2.
45. Almendro V, Ametller E, García-Recio S, Collazo O, Casas I, Augé JM, et al. The role of MMP7 and its cross-talk with the FAS/FASL system during the acquisition of chemoresistance to oxaliplatin. PLoS One. 2009;4:e4728. doi: 10.1371/journal.pone.0004728.
46. Fan Y, Zeng F, Ma L, Zhang H. Effects of β-carboline alkaloids from *Peganum harmala* on the FAK/PI3K/AKT/Mtor pathway in human gastric cancer cell line SGC-7901 and tumor-bearing mice. Pak J Pharm Sci. 2021;34. doi : 10.36721/PJPS.2021.34.3.REG.891-898.1.
47. Hamsa TP, Kuttan G. Harmine activates intrinsic and extrinsic pathways of apoptosis in B16F-10 melanoma. Chin Med. 2011;6:1-8. doi: 10.1186/1749-8546-6-11.
48. Ding Y, He J, Huang J, Yu T, Shi X, Zhang T, et al. Harmine induces anticancer activity in breast cancer cells via targeting TAZ. Int J Oncol. 2019;54:1995-2004. doi: 10.3892/ijo.2019.4777.
49. Guo B, Cao S, Tóth K, Azrak RG, Rustum YM. Overexpression of *Bax* enhances antitumor activity of chemotherapeutic agents in human head and neck squamous cell carcinoma. Clin Cancer Res. 2000;6:718-24.
50. Zhao Y, Xiao B, Chen B, Qiao T, Fan D. Upregulation of drug sensitivity of multidrug-resistant SGC7901/VCR human gastric cancer cells by *bax* gene transduction. Chin Med J (Engl). 2000;113:977-80.

[ Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-10-10 ]