بررسی اثر اوژنول بر بیان ژن های CASP8 و CASP9 در سلول های رده سرطان کولون HT-29

میلاد بنی طالبی دهکردی[۱]، نوشا ضیاء جهرمی*[۱]، حسین سازگار[۱]

۱) گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۰/۱۰ **تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۲/۲۷**

چکیده

مقدمه: در سال های اخیر بسیاری از مطالعات علمی و پزشکی نشان می دهند که اوژنول با فعالیت ضد التهابی، آنتی اکسیدانی، تاثیرگذاری بر چرخه سلولی و القاء آپوپتوز می تواند در پیشگیری و کاهش سرعت پیشرفت سرطان مفید واقع شود. در همین راستا پژوهش حاضر نیز اثر اوژنول بر قابلیت زیست پذیری و میزان بیان ژن های CASP8 و CASP9 در سلول های رده سرطان کولون انسان(HT-29) را مورد بررسی قرار داده است.

مواد و روش ها: در پژوهش حاضر سلول های رده سرطان کولون انسان(HT-29) در محیط کشت RPMI-1640 غنی شده با ۱۰ درصد سرم جنین گاوی کشت داده شدند. با تیمار سلول ها در غلظت های ۲۵۰، ۵۰۰، ۷۵۰، ۹۰۰ و ۱۰۰۰ میکرومولار اوژنول و انکوبه شدن در زمان های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، میزان قابلیت زیست پذیری سلول ها با استفاده از آزمون MTT بررسی شد. بیان ژن های CASP8 و CASP9 نیز به وسیله تجزیه و تحلیل Real-time PCR در سلول های تیمار شده در غلظت ۷۵۰ میکرومولار و در سه زمان مورد بررسی قرار گرفت.

یافته های پژوهش: همگام با افزایش غلظت و مدت زمان تیمار، هر دو رده سلولی با کاهش درصد سلول های زنده مواجه شدند که البته این کاهش در سلول های سرطانی بسیار بیشتر از سلول های فیبروبلاستی مشاهده شد. هم چنین در رده تیمار شده با غلظت ۷۵۰ میکرومولار، بیان ژن های CASP8 و CASP9 به صورت معنی داری نسبت به گروه های کنترل افزایش یافت.

بحث و نتیجه گیری: اوژنول احتمالاً دارای اثر مهاری بر رشد، تکثیر و تهاجم سلول های رده سرطان کولون از طریق افزایش بیان ژن های CASP8 و CASP9 دارد و آپوپتوز را در سلول های دودمان سرطانی HT-29 القاء کرده و موجب کاهش خطر سرطانی شدن سلول های عادی شود.

واژه های کلیدی: اوژنول، آپوپتوز، HT-29، CASP8، CASP9

* نویسنده مسئول: گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

Email: n.zia@iaushk.ac.ir

Copyright © 2019 Journal of Ilam University of Medical Science. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution international 4.0 International License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/) which permits copy and redistribute the material, in any medium or format, provided the original work is properly cited.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-12]

[DOI: 10.29252/sjimu.27.5.85]

مقدمه

سرطان همواره یکی از اساسی ترین مشکلات جوامع بشری بوده است. علی رغم تعداد زیاد پژوهش ها و تحولات در دهه گذشته، سرطان هم چنان یک قاتل جهانی است. طبق آمار اخیر سرطان دومین عامل مرگ و میر در جهان پس از بیماری های قلبی-عروقی به شمار می آید(۱). فرآیند سرطانی شدن از ایجاد پولیپ های روده ای آغاز شده و به طور متوسط پس از گذشت ۸ تا ۱۲ سال به تومورهای بدخیم سرطانی تبدیل خواهد شد. علائم این بیماری ممکن است شبیه به سایر علائم نظیر عفونت ها، تب، هموروئید و بیماری های التهابی روده باشد(۲). در حال حاضر اقدامات درمانی برای بیماران دارای سرطان اساساً شامل جراحی، شیمی درمانی و رادیوتراپی می باشد(۳). جهش هایی که باعث فعال شدن آنکوژن ها و غیر فعال شدن ژن های سرکوب گر تومور می شوند نقش مهمی را در پیشرفت سرطان کولون ایفا می کنند(۴). حداقل ۴ تا ۵ جهش، برای رخ دادن سرطان کولون لازم است(۵) و هر جهشی که رخ دهد باعث ورود بیماری به مرحله ای حادتر خواهد شد(۶). سرطان کولون در بین مردان سومین و در بین زنان دومین سرطان شایع بعد از سرطان پستان بوده و در حال حاضر سومین علت مرگ ناشی از سرطان در جهان است(۱). طبق گزارش ثبت سرطان سالانه ملی ایران، سرطان کولون پنجمین سرطان شایع در بین مردان و سومین در بین زنان است. گزارش های ایرانی، حاکی از گسترش این بیماری در ۲۵ سال اخیر و افزایش فراوانی آن در بین افراد جوان تر در مقایسه با جوامع غربی است(۷). کاسپازها را می توان به دو گروه عمده تقسیم کرد(۸): ۱) کاسپازهایی که با کاسپاز ۱ در ارتباط هستند و در تولید سایتوکاین در طی فرآیندهای التهابی نقش دارند. مانند کاسپازهای ۱، ۴، ۵، ۱۳ و ۱۴. ۲) کاسپازهایی که در فرآیند آپوپتوز نقش اصلی دارند. مانند کاسپاز ۲، ۳، ۶، ۷، ۸، ۹ و ۱۰. این گروه را می توان به گروه های زیر تقسیم کرد: الف: کاسپازهای آغازگر مانند ۲، ۸، ۹ و ۱۰ که در شروع آپوپتوز نقش دارند. ب: کاسپازهای مجری مانند: ۳، ۶ و ۷. کاسپازها در شروع و انجام آپوپتوز نقش بسیار مهمی دارند. بنا بر این به نظر می رسد که سطوح پایین کاسپازها و اختلال در عملکرد آن ها ممکن است منجر به کاهش آپوپتوز و سرطان زایی شود. در مطالعه ای نشان داده شده است که در بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال کاهش کاسپاز-۹ بسیار شایع است. در برخی از موارد ممکن است بیشتر از یک کاسپاز از تنظیم خارج شود و شرایط را برای رشد و توسعه تومور مساعد کند(۹). کاسپاز-۸ یکی از اعضای خانواده پروتئازهای سیستئین-اسید آسپارتیک است و در فرآیند آپوپتوز نقش دارد(۸). آنزیم کاسپاز-۸ با تقویت N-myc به عنوان یک سرکوب گر تومور در نوروبلاستوما عمل می کند(۱۰). بنا بر این جهش هایی که منجر به از دست دادن عملکرد آنزیم کاسپاز-۸ شوند موجب ایجاد سلول های نوروبلاستومای مقاوم به آپوپتوز وابسته به گیرنده مرگ خواهند شد(۱۰،۱۱). کاسپاز-۹ فعال شده دارای نقش کلیدی در پیش برد فرآیند آپوپتوز است. در مطالعاتی که در سال های اخیر انجام شده است، ارتباط مشخصی بین میزان بیان کاسپاز-۹ و ابتلا به لنفوم Non-Hodgkin Lymphoma)NHL) سرطان ریه مشاهده شده است(۱۲). به نظر می رسد وجود پلی مورفیسم در پروموتور ژن CASP9 می تواند یک عامل برای اختلال در عملکرد پروتئین کاسپاز-۹ و کاهش بیان ژن این پروتئین شود که به عنوان یک عامل زمینه ساز همراه با عوامل محیطی، یک عامل خطر ابتلا به سرطان محسوب می شود(۱۲). امروزه با گسترش تحقیقات در زمینه درمان های جدید، کاربرد اثرات درمانی گیاهان دارویی مد نظر قرار گرفته است. اوژنول با فعالیت ضد التهابی، آنتی اکسیدانی، تاثیرگذاری بر چرخه سلولی و القاء آپوپتوز می تواند در پیشگیری و کاهش سرعت پیشرفت سرطان مفید واقع شود. اوژنول(4-allyl-2-methoxyphenol) با فرمول مولکولی C10H12O2 و وزن مولکولی ۱۶۴/۲۱ یکی از اجزاء اصلی روغن میخک بوده و هم چنین به میزان قابل توجه در روغن دارچین و روغن جوز هندی نیز یافت می شود. اوژنول یک ترکیب شیمیایی عضو خانواده فنیل پروپانوئیدها(Phenylpropanoid) است.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-12]

[DOI: 10.29252/sjimu.27.5.85]

مطالعات نشان داده است این ترکیب مهارکننده ژن COX-2، القاء کننده آپوپتوز، و افزایش‌دهنده فعالیت پروتئین کاسپاز-۳ است(۱۳).

هدف از انجام این پژوهش روشن نمودن هر چه بیشتر مکانیزم عمل این ترکیب در مواجهه با عناصر تنظیمی کاسپازها در سلول های رده سرطان کولون HT-29 و معرفی این ترکیب به عنوان عاملی موثر جهت کمک به درمان مبتلایان به سرطان کولون است.

مواد و روش ها

این پژوهش یک مطالعه بنیادی-کاربردی است. رده سلولی مورد استفاده در این پژوهش از انستیتوپاستور ایران تهیه شد. لازم به ذکر است که سلول های تهیه شده از انستیتوپاستور ایران به صورت منجمد به مرکز تحقیقات سلولی-تکوینی منتقل شدند و مراحل ذوب سلولی، طبق دستورالعمل آن موسسه و به صورت کاملاً استریل انجام شد. سپس درصد سلول های زنده با رنگ آمیزی توسط تریپان بلو تعیین گردید. سلول های زنده نسبت به ورود رنگ، نفوذناپذیر بوده در حالی که سلول های مرده رنگ را جذب می نمایند.

گروه های آزمایش: گروه ۱: سلول ها در معرض غلظت ۲۵۰ میکرومولار اوژنول قرار گرفتند. گروه ۲: سلول ها در معرض غلظت ۵۰۰ میکرومولار اوژنول قرار گرفتند. گروه ۳: سلول ها در معرض غلظت ۷۵۰ میکرومولار اوژنول قرار گرفتند. گروه ۴: سلول ها در معرض غلظت ۹۰۰ میکرومولار اوژنول قرار گرفتند. گروه ۵: سلول ها در معرض غلظت ۱۰۰۰ میکرومولار اوژنول قرار گرفتند. گروه کنترل: سلول ها تنها در معرض محیط کشت کامل (RPMI-1640 + 10% FBS) قرار گرفتند. لازم به ذکر است که این غلظت ها بر اساس نتایج حاصل از آزمایشات قبلی به دست آمده است. جهت بررسی اثر اوژنول بر میزان بیان دو ژن CASP8 و CASP9، سلول های دومان HT-29 در معرض تنها یک غلظت از اوژنول(۷۵۰ میکرومولار به عنوان غلظت حد واسط) به همراه گروه کنترل در سه زمان انکوباسیون ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت قرار گرفتند. لازم به ذکر است که ماده موثره مورد استفاده در پژوهش حاضر به صورت مایع با خلوص ۹۹ درصد از شرکت Sigma-Aldrich با نام تجاری Eugenol, Reagent Plus(R) 99% و شماره محصول E51791 تهیه شد.

استخراج RNA و تهیه cDNA جهت استخراج RNA تام سلولی برای سنجش میزان بیان ژن های CASP8 و CASP9 در اثر تیمار با اوژنول، ابتدا ۱۰۶ سلول از رده سلولی به طور جداگانه و در گروه های کنترل و آزمایشی در فلاسک های T-25 کشت داده شدند. پس از گذشت ۲۴ ساعت و چسبیدن سلول های تازه کشت شده به کف فلاسک ها، محیط کشت اولیه خارج شده و سلول ها با بافر PBS شستشو داده شدند. سپس محیط کشت کامل حاوی غلظت ۷۵۰ میکرومولار اوژنول به عنوان تیمار به فلاسک ها افزوده شد و در نهایت فلاسک ها در سه زمان ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت مورد انکوباسیون قرار گرفتند. در این تحقیق از کیت DNase شرکت Takara برای حذف مولکول های DNA از نمونه های RNA و به دست آوردن RNA خالص استفاده شد. نمونه های تیمار شده با DNase برای نگهداری به فریزر ۸۰- درجه سانتی گراد منتقل شدند. سپس به منظور تبدیل mRNA به cDNA و استفاده از آن در واکنش PCR لازم است واکنش رونویسی معکوس صورت گیرد. این واکنش نیاز به حضور پرایمری دارد که بتواند با RNA هیبرید شود و توسط آنزیم DNA پلیمراز وابسته به RNA، دنباله آن ساخته شود. در نتیجه این فرآیند نسخه هایی از cDNA ایجاد می گردد. برای این واکنش از RevertAID First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentase) استفاده شد.

پرایمرها: پرایمرهای مورد استفاده در این تحقیق، ابتدا بر اساس توالی ژن های مربوطه طراحی و سپس توسط شرکت Macrogen سنتز شدند که در جدول شماره ۱ آورده شده است.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-12]

[DOI: 10.29252/sjimu.27.5.85]

جدول شماره ۱. توالی پرایمرها

Size bp	gene	Primers	
289	CASP 8	F	5'- AGAAGAAGGTGACTGGTGGCTGC -3'
		R	5'- AATGTAGTCCAGGCTCAGGAACTTG -3'
231	CASP 9	F	5'- ATTTGGTGATGTCGGTGCTCTTG -3'
		R	5'- ATTTTCTTGGCAGTCAGGTCGC -3'
237	GAPDH	F	5'- GGGAAGGTGAAGGTCGGAGTC -3'
		R	5'- TCGCTCCTGGAAGATGGTGATG -3'

واکنش Real Time RT- PCR: برای انجام این واکنش از کیت مربوطه حاوی بافر ۵x، مخلوط dNTP و آنزیم پلی مراز استفاده گردید. هم چنین از یک رنگ فلورسنت اختصاصی متصل شونده به DNA دو رشته ای به عنوان گزارش گر مورد نیاز برای ساخت Master Mix، تحت عنوان سایبرگرین استفاده شد. سایبرگرین به شیار کوچک DNA دو رشته ای متصل می شود و در اثر تهییج از خود نور ساطع می‌کند؛ بنا بر این با افزایش محصول PCR، میزان فلورسانس نیز افزایش می یابد. لازم به ذکر است که ژن مرجع در پژوهش حاضر GAPDH است. مراحل انجام کار به این صورت بود که مخلوطی به حجم نهایی ۱۵ میکرولیتر شامل ۱/۵ میکرولیتر cDNA، ۰/۳ میکرولیتر پرایمر Forward، ۰/۳ میکرولیتر پرایمر Reverse، ۵/۴ میکرولیتر RNase-free water و ۷/۵ میکرولیتر SYBR تهیه شد. شرایط دمایی واکنش Real-time RT PCR مطابق با شرایط دمایی و زمانی زیر بود: در ابتدا ۹۵ درجه سانتی گراد واسرشت سازی cDNA الگو برای ۵ دقیقه در چرخه اول و سپس دو برنامه دمایی زیر در ۴۰ چرخه تکرار شد: ۹۵ درجه سانتی گراد برای ۱۵ ثانیه، ۶۶ و ۶۵ درجه سانتی گراد برای ۲۰ ثانیه به ترتیب برای ژن های CASP8 و (CASP9 و GAPDH) و دمای نهایی ۷۲ درجه سانتی گراد برای ۲۵ ثانیه. واکنش برای هر نمونه cDNA انجام و Ct برای هر ژن محاسبه گردید. زمانی که واکنش به پایان می رسد دستگاه به ما دو دسته اطلاعات می دهد. که عبارتند از: حالت اول: این اطلاعات به نام Quantification Analysis می باشد. هم چنین دارای منحنی خام پیشرفت واکنش، جدول محاسبات می باشد. مهم ترین این اطلاعات مقدار Ct است. حالت دوم: این اطلاعات مربوط به منحنی ذوب می باشد و به بررسی صحت انجام آزمایش می پردازد. دستگاه Real time PCR استفاده شده برای انجام این پژوهش Rotor Gene 6000 می باشد. نرم افزار به نام Corbett دارد که، می تواند محاسبات کمیت سنجی را به دو روش انجام دهد. محاسبات انجام شده توسط نرم افزار Corbett، شامل موارد زیر می باشد. فرم اول: در این مرحله دستگاه منحنی استاندارد رسم می کند و معادله منحنی رسم شده به دست می آید. نرم افزار تابعی که در شرایط اپتیمم رسم می کند و محاسبات را با آن انجام می دهد، طبق الگوی معادله زیر پیش می رود. فرم دوم: در فرم دوم دستگاه از روش محاسبات به نام $\Delta\Delta c_t$ نسبت بیان دو ژن را محاسبه می کند(۱۴).

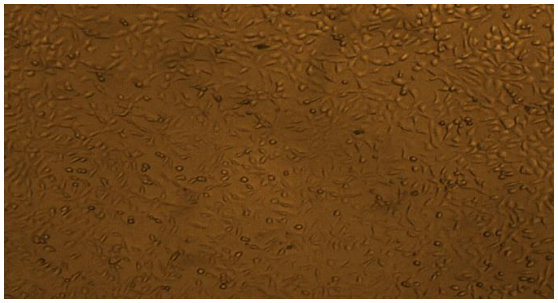
آنالیز آماری: آنالیز آماری داده های این تحقیق با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۱ انجام شد. از آن جا که داده ها از توزیع نرمال برخوردار بودند، با روش آنالیز واریانس یک طرفه و با آزمون پشتیبان post test LSD ارزیابی شدند و نتایج به صورت Mean±SEM ارائه شد. حدود اطمینان برای همه آزمایش ها ۹۵ درصد در نظر گرفته شد و $P<0.05$ معنی دار محسوب گردید.

یافته های پژوهش

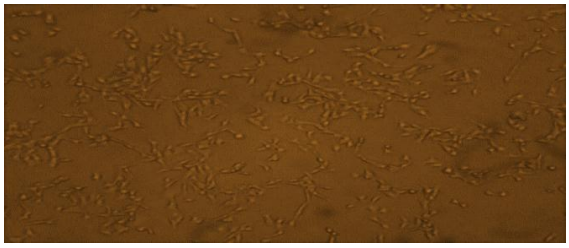
تاثیر اوژنول بر میزان زیست پذیری سلول ها: سلول های رده HT-29 در غلظت های ۲۵۰، ۵۰۰، ۷۵۰، ۹۰۰ و ۱۰۰۰ میکرومولار برای مدت زمان های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت کشت داده شدند. مشاهدات میکروسکوپی حاکی از کاهش قابل توجه تعداد سلول های سرطانی هم زمان با افزایش غلظت دارو و مدت زمان تیمار بود. در ادامه تصاویر میکروسکوپی گروه آزمایشی سلول های سرطانی تیمار شده با غلظت ۷۵۰ میکرومولار اوژنول و گروه کنترل آن در مدت زمان ۷۲ ساعت به عنوان نمونه با هم مقایسه شده اند که در شکل های شماره ۱ و ۲ آورده شده است.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-12]

[DOI: 10.29252/sjimu.27.5.85]



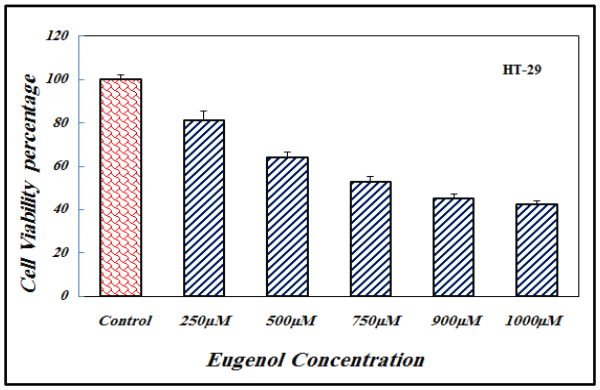
شکل شماره ۱. سلول های رده سرطان کولون HT-29 (گروه کنترل)



شکل شماره ۲. سلول های رده سرطان کولون HT-29 (تیمار با غلظت ۷۵۰ میکرومولار اوژنول)

در این مطالعه برای بررسی دقـــیق تر میزان زیست پذیری سلول های تیمار شده با غلظت های مختلف اوژنول از تست MTT استفاده شد. جهت بررسی تاثیر غلظت های مختلـــف اوژنول بر روی سلول های کشت شده، میزان جذب نوری سلول های کشت شده در سه بازه زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت مورد بررسی قرار گرفت و در ادامه درصد سلول های زنده از نسبت جذب نوری تیمارهای مختلف به نمونه کنترل محاسبه شد.

نتایج بررسی زیست پذیری سلول ها در مجاورت اوژنول پس از ۲۴ ساعت: در بررسی اولیه تاثیر اوژنول بر درصد سلول های زنده در رده سلولی HT-29، میزان جذب نوری و درصد سلول های زنده برای تیمار ۲۴ ساعته سلول های HT-29 با غلظت های ۲۵۰، ۵۰۰، ۷۵۰، ۹۰۰ و ۱۰۰۰ میکرومولار اوژنول مورد بررسی قرار گـــرفت. میزان جذب نوری نسبت به غلظت های مختلف تیمار اوژنول در رده سلـــولی HT-29 در نمودار شماره ۱ نشان داده شده است.



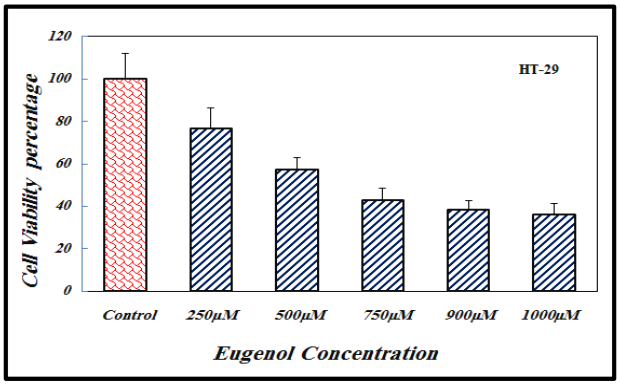
نمودار شماره ۱. میزان بقای سلولی در غلظت های مختلف تیمار ۲۴ ساعته اوژنول در سلول های HT-29

نتایج بررسی زیست پذیری سلول ها در مجاورت اوژنول پس از ۴۸ ساعت: در ادامه به بررسی تیمار اوژنول ۴۸ ساعته بر درصد سلول های زنده در رده سلولی HT-29 پراخته شد. در این راستا میزان جذب نوری و درصد سلول های زنده برای تیمار ۴۸ ساعته سلول های HT-29 با غلظت های ۲۵۰، ۵۰۰، ۷۵۰،

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-12]

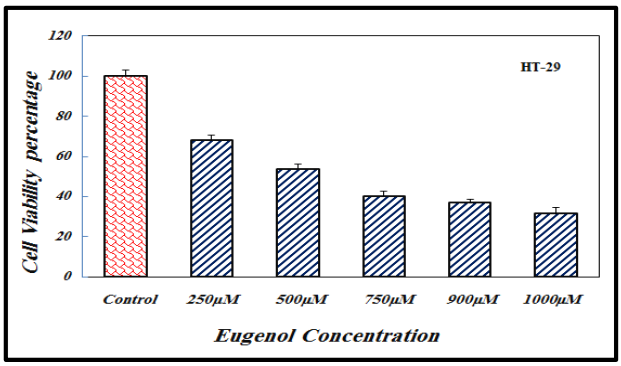
[DOI: 10.29252/sjimu.27.5.85]

۹۰۰ و ۱۰۰۰ میکرومولار اوژنول مورد بررسی قرار گرفت. میزان جذب نوری نسبت به غلظت های مختلف تیمار اوژنول در رده سلولی HT-29 در نمودار شماره ۲ قابل مشاهده است.



نمودار شماره ۲. میزان بقای سلولی در غلظت های مختلف تیمار ۴۸ ساعته اوژنول در سلول های HT-29

نتایج بررسی زیست پذیری سلول ها در مجاورت اوژنول پس از ۷۲ ساعت: در این مرحله به بررسی تیمار اوژنول ۷۲ ساعته بر درصد سلول های زنده در رده سلولی HT-29 پراخته شد. نتایج بررسی جذب نوری برای تیمار ۷۲ ساعته اوژنول در نمودار شماره ۳ نمایش داده شده است.



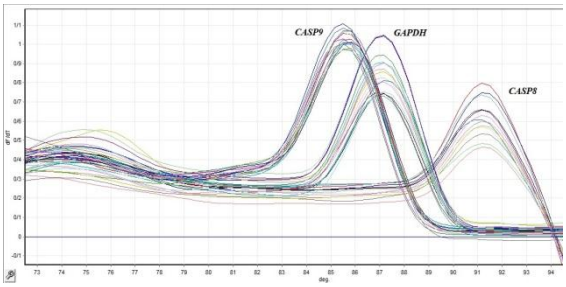
نمودار شماره ۳. میزان بقای سلولی در غلظت های مختلف تیمار ۷۲ ساعته اوژنول در سلول های HT-29

مقایسه نتایج به دست آمده از تاثیر اوژنول بر زیست پذیری سلول ها: نتایج به دست آمده توسط آزمون MTT بر روی سلول های سرطانی HT-29 نشان دهنده اثر معنی دار اوژنول در کاهش رشد و تکثیر این سلول ها است؛ این اثر هم وابسته به زمان و هم به شدت وابسته به غلظت اوژنول در تیمار می باشد.

نتایج Real-time RT PCR: مطابق با شکل، سیکل های Real-time PCR به طور متوالی در دمای Annealing ژن های مربوطه در ۴۰ سیکل تکرار شدند. در نمودار شماره ۴ منحنی ذوب(Melt Curve) مربوط به ژن های CASP8، CASP9 و ژن مرجع GAPDH که به صورت هم زمان برای همه نمونه ها انجام شده است. نمودار با یک قله نشان می دهد که بیان ژن به صورت اختصاصی بوده است.

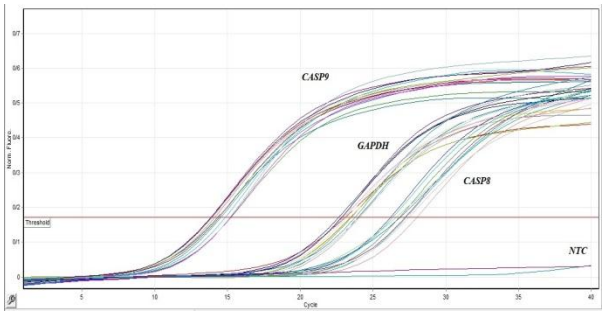
[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-12]

[DOI: 10.29252/sjimu.27.5.85]



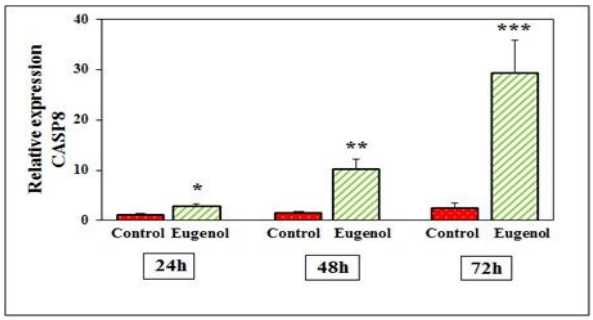
نمودار شماره ۴. منحنی ذوب(Melt Curve) مربوط به ژن های CASP8، CASP9 و ژن مرجع GAPDH که به صورت هم زمان برای همه نمونه ها انجام شده است. نمودار با یک قله نشان می دهد که بیان ژن به صورت اختصاصی بوده است

در نمودار شماره ۵ منحنی تکثیر ژن های CASP8، CASP9 و ژن مرجع GAPDH برای کلیه نمونه های تیمار شده در غلظت ۷۵۰ میکرومولار اوژنول نشان داده شده است.



نمودار شماره ۵. منحنی تکثیر ژن های CASP8، CASP9 و ژن مرجع GAPDH برای کلیه نمونه های تیمار شده در غلظت ۷۵۰ میکرومولار اوژنول

بیان ژن CASP8 در رده سلولی HT-29 درحضور تیمار اوژنول: تغییرات بیان ژن CASP8 در حضور تیمار اوژنول ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعته در سلول های HT-29 نشان داد که بیان این ژن در حضور تیمار اوژنول در بازه های زمانی تیمار ۲۴ ساعته (P=0.046)، ۴۸ ساعته(P=0.003) و ۷۲ ساعته(P<0.001) به صورت معناداری افزایش می یابد که در نمودار شماره ۶ نشان داده شده است.

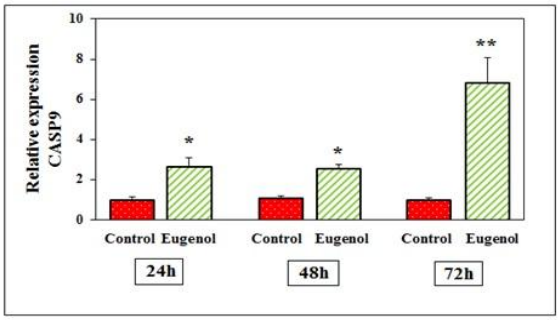


نمودار شماره ۶. میزان تغییرات بیان ژن CASP8 بر اساس CT در سلول های HT-29 همراه با غلظت ۷۵۰ میکرومولار اوژنول در سه زمان ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت. *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-12]

[DOI: 10.29252/sjimu.27.5.85]

بیان ژن CASP9 در رده سلولی HT-29 درحضور تیمار اوژنول: تغییرات بیان ژن CASP9 در حضور تیمار اوژنول ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعته در سلـــول های HT-29 نشان داد که بیان این ژن در حضور تیمار اوژنول در بازه های زمانی تیمار ۲۴ ساعته(P=0.029)، ۴۸ ساعـــــته(P=0.043) و ۷۲ ساعته(P=0.008) به صورت معناداری افزایش می یابد که در نمودار شماره ۷ نشان داده شده است.



نمودار شماره ۷. میزان تغییرات بیان ژن CASP9 بر اساس CT در سلول های HT-29 همراه با غلظت ۷۵۰ میکرومولار اوژنول در سه زمان ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت. *P<0.05; **P<0.01

بحث و نتیجه گیری

طی تحقیقی در رابطه با اثر درمـــانی اوژنول بر سرطان معده در رت با توجه به آپوپتوز، آنژیوژنز و تهاجم سلول های سرطانی به عنوان شاخص های اصلی انجام شد که نتایج نشان داد اوژنول با تنظیـم پروتئین های خانواده Bcl-2، فعال کردن فـاکتور ۱ پروتئاز آپوپتوتیک(Apaf-1)، سـیتوکروم C و پروتئاز سیستئین آسـپارتیک، با القاء آپوپتوز مانع از حمله سرطان و آنژیوژنز می شود. در تحقیق حاضر در ابتدا میزان سمیـــت و اثـــرگذاری اوژنـــــول بر توانایی زیست پذیری سلول های سرطانی در غلظت ها و طول دوره های تیمار مختلف بررسی شد که نتایج حاصل نشان داد که درصد مرگ سلولی با افزایش غلظت و طول زمان تیمار با اوژنول افزایش یافته است. در یک مقایسه به عنوان نمونه در یک گـــروه آزمایشی از سلول های رده سرطانی HT-29 که به مدت ۴۸ ساعت در تیماری از اوژنول با غلظت ۷۵۰ میکرومولار قرار گرفته بودند، درصد سلول های زنده نسبت به گروه کنترل به ۴۳/۱۸ درصد بود. پس از بررسی میزان اثرگذاری اوژنول بر توانایی زیست پذیری سلول ها در غلظت های مختلف، توانایی این ترکیب در القاء آپوپتوز از طریق بیان بیان ژن های کدکننده پروتئین های پیش آپوپتـــوزی دخیل در مسیر مرگ سلولی مورد بررسی قرار گرفت. بدین صورت که سلول ها برای مدت زمان های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تحت تاثیر غلظت ۷۵۰ میکرومولار از اوژنول قرار گرفتند؛ سپس میزان بیان ژن های CASP8 و CASP9 در آن ها اندازه گیری شد. نتایج به دست آمده حاکی از افزایش بیان قابل توجه هر دو ژن نسبت به گروه های کنترل، در طول زمان و بر روی رده سلولی سرطـــانی بود و می تواند نشان دهنده قابلیت درمان کنندگی اوژنول بر سلول های سرطانی باشد. به علاوه تحقیقات ارائه شده در ادامه، شواهد محکمی بر اثبات نتایج حاصل شده از پژوهش حاضر هستند: کیم و همکاران در سال ۲۰۰۳، به مطالعه در رابطه با تاثیر اوژنول بر میزان بیان ژن COX-2 در سلول های رده سرطانی کولون HT-29 پرداختند. ژن COX-2 نقش مهمی در ایجاد التهاب و سرطان زایی در کولون دارد. یافته های آن ها نشان داد اوژنول می تواند بیان ژن COX-2 را مهار کند. از سویی دیگر یافته ها به کمک آزمون MTT، حاکی از آن بود که اوژنول می تواند مانع از تکثیر سلول های رده سرطانی کولون HT-29 شود. در پژوهش حاضر نیز مشاهدات میکروسکوپی و آزمون MTT، هر دو حاکی از کاهش رشد و تکثیر سلول های رده سرطانی HT-29 بودند(۱۵). گاش و همکاران در سال ۲۰۰۵، به مطالعه در رابطه با تاثیر اوژنول بر رشد سلول های

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-12]

[DOI: 10.29252/sjimu.27.5.85]

ملانوما پرداختند. یافته های آن ها حاکی از آن بود که اوژنول با جلوگیری از رونویسی عناصر E2F1 و متوقف کردن چرخه سلولی در فاز S، مانع از رشد سلول های ملانوما می شود(۱۶). مانیکاندان و همکاران در سال ۲۰۱۰، پژوهشی در رابطه با اثر درمانی اوژنول بر سرطان معده در رت با توجه به آپوپتوز، آنژیوژنز و تهاجم سلول های سرطانی به عنوان شاخص های اصلی انجام دادند. آن ها دریافتند که اوژنول با تنظیم پروتئین های خانواده Bcl-2، فعال کردن فاکتور ۱ پروتئاز آپوپتوتیک(Apaf-1)، سیتوکروم C و پروتئاز سیستئین آسپارتیک، با القاء آپوپتوز مانع از حمله سرطان و آنژیوژنز می شود. بررسی بیان ژن های CASP9 و CASP3 در موش های سرطانی تیمار شده با اوژنول نشـان دهنده تاثیر این ترکیب در افزایش بیان هر دو ژن بود. در پژوهش حاضر نیز افزایش بیان ژن CASP9 در اثر تیمار با اوژنول مشاهده شد(۱۷). پال و همکاران در سال ۲۰۱۰، به مطالعه اثر اوژنول در ارتباط با سرطان پوست در موش پرداختند. آن ها با استفاده موضعی از DMBA، تومورهای پوستی را در موش القاء کرده و سپس به درمان ۱۵ روزه موش ها توسط تجویز خوراکی اوژنول پرداختند. آن ها برای بررسی تاثیر درمانی اوژنول بیان برخی از ژن ها را به کمک تکنیک های RT-PCR و وسترن بلات اندازه گیری نمودند. نتایج به دست آمده نشان دهنده کاهش در بروز و اندازه تومورهای پوستی، افزایش کلی بقای موش ها شد. آن ها برای فهم مکانیسم این پدیده ژن های متعددی در ارتباط با آپوپتوز از جمله Bcl2، P53 و CASP3 مورد بررسی قرار دادند که در بین آن ها افزایش سطح بیان ژن CASP3 در اثر تیمار با اوژنول مورد توجه پژوهش حاضر قرار گرفت(۱۸). جاگاناتان و همکاران در سال ۲۰۱۱ دریافتند که میزان اثر آپوپتوزی اوژنول، وابسته به دوز و نوع سلول مورد آزمایـــش است. بررسی های آن ها نشان داد که چرخه سلولی، در سلول های سرطانی مورد تیمار قرار گرفته به وسیله اوژنول، در فاز SubG1، طی یک فرآیند وابســـته به زمان متوقف می شود. آن ها برای روشن شدن هر چه بیشتر نقش کاسپازها در القاء آپوپتوز در سلول های سرطانی تیمار شده توسط اوژنول پیشنهاد کردند که بیان ژن های CASP8 و CASP9 در این سلول ها مورد بررسی قرار گیرد(۱۹). ویدیا و همکارش در سال ۲۰۱۱، به مطالعه اثر اوژنول بر روی سلول های رده سرطان پستان MCF-7 پرداختند، آن ها علاوه بر مشاهده کاهش رشد و تکثیر سلول های سرطانی متوجه اهمیت میزان غلظت مورد استفاده و مدت زمان تیمار سلول ها توسط اوژنول شدند. در پژوهش حاضر نیز به طور مشابه تاثیر افزایش غلظت و طول مدت زمان تیمار سلول ها توسط اوژنول مشاهده شد(۲۰). الشریف و همکاران در سال ۲۰۱۳، پژوهشی در رابطه با اثر اوژنول بر سلول های سرطان پستان انجام دادند مشاهده کردند که اوژنول از طریق کاهش تنظیم E2F1/Survivin و مستقل از p53 و ERα موجب آپوپتوز سلول های سرطانی می شود؛ علاوه بر آن مشاهده کردند که اوژنول مهـــارکنـــنده برخی آنکوژن های وابســـته به سرطان پستان از جمله: NF-κB و cyclin D1 است. آن ها در فرآیند مطالعاتشان دریافتند که اوژنول موجب افزایش سطح پروتئین Caspase-9 می شود. نتایج به دست آمده از پژوهش حاضر نیز هم سو با تحقیقات الشریف و همکاران است(۲۱). مجید و همکاران در سال ۲۰۱۴، پژوهشی در رابطه با تاثیرات آپوپتوزی نانو امولسیون اوژنول در سلول های سرطانی کولون و کبد به انجام رساندند و آپوپتوز سلول ها، توقف رشد و کاهش تکثیر هر دو رده سرطانی را مشاهده نمودند. آن ها دریافتند که اوژنول از طریق تولید اکسیژن واکنشی(ROS)، موجب القاء آپوپتوز می شود. نتایج به دست آمده از پژوهش حاضر نیز تناقضی با یافته های مجید و همکاران ندارد(۲۲). الوافای و همکاران در سال ۲۰۱۷، به مطالعه در رابطه با حساسیت شیمیایی سلول های سرطـانی پســـتان MCF-7 به اوژنول پرداختند. یافته های آن ها عبارت بودند از: کاهش زیست پذیری وابسته به دوز اوژنول و کاهش تکثیر سلول های MCF-7، افزایش اکسیژن واکنشی(ROS)، کاهش سطح ATP و پتانسیل غشای میتوکندریایی و انتشار لاکتات دهیدروژناز و سیتوکروم C به درون محیط کشـت سلولی. سطوح بیان هر دو مـارکر ضـد و پیـش

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-12]

[DOI: 10.29252/sjimu.27.5.85]

آپوپتـوزی Bcl-2 و Bax، نیز بدون دگرگونی در وابستگی نسبی آن ها، با افزایش غلظت اوژنول، کاهش یافت؛ از طرف دیگر سلول های MCF-7 تیمار شده با اوژنول همانند سلول های تیمار نشده بیـش از حد Bcl-2 را بیان می کردند. بنا بر این مشخص شد که سمیت اوژنول وابسته به مسیر آپوپـتوزی Bcl-2 نیست. نتایج به دست آمده از پژوهش حاضر نیز تناقضی با یافته های الوافای و همکاران ندارد(۲۳). فانگجون و همـــکارش در سال ۲۰۱۷ دریافتند که اوژنول می تـــواند توانـــایی زنده ماندن سلول های سرطانی ریه را کاهش دهد و هم چنین از جا به جایی سلول ها و تهاجم آن ها به اطراف از طریق مسیر PI3K/Akt در شرایط آزمایشـگاهی جلوگیری کند. مشاهدات این دو پژوهشگر حاکی از کاهش سطح بیان phosphate-Akt و MMP-2 در سلول های سرطانی ریه بعد از تیمار شدن با اوژنول بود. نتایج به دست آمده از پژوهش حاضر نیز هم سو با تحقیقات فانـگ جون و همکاران است(۲۴).

نتایج به دست آمده از آزمون MTT و RT Real-time PCR انجام شده در پژوهش حاضر، بیان گر این مسئله هستند که اوژنول احتمالاً قادر است با تاثیرگذاری بر بیان ژن های CASP8 و CASP9 و افزایش میزان تولید محـــصـــــول آن ها که در واقع پروتئین های پیش آپوپتوزی هستند، آپوپتوز را در سلول های رده سرطانی HT-29 القاء کند و از این طریق در پیشگیری و درمان سرطان موثر واقع گردد.

سپاسگزاری

این مقاله برگرفته از پایان نامه کارشناسی ارشد مولف اول می بـــاشد که با حمایت دانشگاه آزاد شهرکرد و در مرکز تحـــقیقات این دانشگاه به انجام رسید، که بدین وسیله نویســـنده مقاله مراتب تشکر و قدردانـــی خود را از این دانشـــگاه و تمام کسانی که در این پژوهـــش یـــاری رســـاندند را اعلام می نماید.

References

1.Anand P, Kunnumakara AB, Sundaram C, Harikumar KB, Tharakan ST, Lai OS, et al. Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. Pharm Res 2008;25:2097-116. doi:org/10.1007.

2.Saif MW, Chu E. Biology of colorectal cancer. Cancer J2010;16:196-201. doi: 10.1097/PPO.0b013e3181e076af.

3.Winawer S, Fletcher R, Miller L, Godlee F, Stolar M, Mulrow C, et al. Erratum colorectal cancer screening clinical guidelines and rationale Gastroenterology 1997; 112: 594-642. doi: https://jhu.pure.elsevier.com.

4.Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. Cell1990;61:759-67. doi:10.1016/0092-8674(90)90186-I

5.Peltomaki P. Role of DNA mismatch repair defects in the pathogenesis of human cancer. J Clin Oncol2003;21:1174-9.

6.Lynch HT. What the physician needs to know about Lynch syndrome an update. Oncol Melv2005;19:455-62.

7.Pourhoseingholi MA, Zali MR. Colorectal cancer screening time for action in Iran. World J Gast Oncol 2012;4:82. doi: 10.4251/wjgo.v4.i4.82.

8.Mcilwain DR, Berger T, Mak TW. Caspase functions in cell death and disease. Cold Spring Harbor Perspec Biol2015;2:7. doi: 10.1101/cshperspect.a008656.

9.Shen XG, Wang C, Li Y, Wang L, Zhou B, Xu B, et al. Downregulation of caspase 9 is a frequent event in patients with stage II colorectal cancer and correlates with poor clinical outcome. Colo Dis2010;12:1213-8. doi: 10.1111/j.1463-1318.2009.02009.x.

10.Teitz T, Wei T, Valentine MB, Vanin EF, Grenet J, Valentine VA, et al. Caspase 8 is deleted or silenced preferentially in childhood neuroblastomas with amplification of MYCN. Nature Med 2000;6:529. doi: 10.1101/cshperspect.a014415.

11.Yang X, Merchant MS, Romero ME, Tsokos M, Wexler LH, Kontny U, et al. Induction of caspase 8 by interferon γ renders some neuroblastoma cells sensitive to tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand but reveals that a lack of membrane TR1/TR2 also contributes to

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-12]

[DOI: 10.29252/sjimu.27.5.85]

TRAIL resistance in NB. Cancer Res2003;63:1122-9.
12.Kelly JL, Novak AJ, Fredericksen ZS, Liebow M, Ansell SM, Dogan A, et al. Germline variation in apoptosis pathway genes and risk of non-Hodgkin lymphoma. Cancer Epidemiol Preve Biomark 2010;2: 581-6. doi: 10.1158/1055-9965.
13.Kong X, Liu X, Li J, Yang Y. Advances in pharmacological research of eugenol. Curr Opin Comp Alternat Med. 2014;1:8-11. doi: 10.1016/j.scienta.2014.03.004.
14.Fraga D, Meulia T, Fenster S. Real time PCR current protocols essential laboratory techniques.1th ed. Sunders Publication. 2008; P.10-40.doi: 0.1002/9780470089941. et1003s08.
15.Kim SS, Oh OJ, Min HY, Park EJ, Kim Y, Park HJ, et al. Eugenol suppresses cyclooxygenase-2 expression in lipopolysaccharide stimulated Mouse macrophage RAW264 Cells. Life Sci2003;73:337-48. doi: 10.1016/s0024-3205(03)00288-1.
16.Ghosh R, Nadiminty N, Fitzpatrick JE, Alworth WL, Slaga TJ, Kumar AP. Eugenol causes melanoma growth suppression through inhibition of E2F1 transcriptional activity. J Biolo Chem2005;280:5812-9. doi: 10.1074/jbc.M411429200.
17.Manikandan P, Murugan RS, Priyadarsini RV, Vinothini G, Nagini S. Eugenol induces apoptosis and inhibits invasion and angiogenesis in a Rat model of gastric carcinogenesis induced by MNNG. Life Sci2010;86:936-41. doi: 10.1016/j.lfs.2010.04.010.
18.Pal D, Banerjee S, Mukherjee S, Roy A, Panda CK, Das S. Eugenol restricts DMBA croton oil induced skin carcinogenesis in Mice downregulation of cMyc and H ras and activation of p53 dependent apoptotic pathway. J Dermatol Sci2010;59:31-9. doi: 10.1016/j.jdermsci.2010.04.013.
19.Jaganathan SK, Mazumdar A, Mondhe D, Mandal M. Apoptotic effect of eugenol in human colon cancer cell lines. Cell Biol Int2011;35:607-15. doi: 10.1042/ CBI20100118.
20.Vidhya N, Devaraj SN. Induction of apoptosis by eugenol in human breast cancer. Cells2011; 49:871-8.
21.Alsharif I, Remmal A, Aboussekhra A. Eugenol triggers apoptosis in breast cancer cells through E2F1 survivin down regulation. BMC Cancer2013;13:600. doi: 10.1186/1471-2407-13-600.
22.Majeed H, Antoniou J, Fang Z. Apoptotic effects of eugenol loaded nanoemulsions in human colon and liver cancer cell lines. Asian Pac J Cancer Prev2014;15:9159-64.doi: 10.7314/apjcp. 2014.15.21.915.
23.Al Wafai R, Elrabih W, Katerji M, Safi R, El Sabban M, Elrifai O, et al. Chemosensitivity of MCF 7 cells to eugenol release of cytochrome c and lactate dehydrogenase. Sci Rep2017;7:43730. doi: 10.1038/srep43730
24.Fangjun L, Zhijia Y. Tumor suppressive roles of eugenol in human lung cancer cells. Thorac Cancer2018;9:25-9. doi: 10.1111/1759-7714.12508.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-12]

[DOI: 10.29252/sjimu.27.5.85]

Study the Effect of Eugenol on CASP8 and CASP9 Genes Expression in Colon Cancer Cell Lines HT-29

*Banitalebidehkordi M[1], Ziajahromi1 N[*1], Sazgar H[1]*

(Received: December 31, 2018 Accepted: March 18, 2019)

Abstract

Introduction: Many scientific and medical studies in the recent years have shown that Eugenol could be an effective reagent in preventing and reducing cancer progression by antioxidant and anti-inflammatory activities and induction of apoptosis in cancer cells. In this regard the present study also examined the effect of Eugeonl on the viability and expression of CASP8 and CASP9 genes in human colorectal cancer cell line (HT-29).

Materials & Methods: In the present study, human colorectal cancer cell line (HT-29) was cultured in RPMI-1640 medium enriched with 10% bovine serum. The cells were treated in different concentration (250, 500, 750, 900, 1000 µM) of Eugenol and incubated for 24, 48 and 72 hours. After that cell viability was analyzed by MTT assay. The expression of CASP8 and CASP9 genes was also evaluated by Real-time PCR analysis in treated cells at 750 µM concentration of Eugeonl and during 24, 48 and 72 hours, incubation.

Findings: Along with increasing concentration and duration of Eugenol treatment, both cell lines encountered a decrease in the percentage of live cells. Although this reduction was found to be much higher in the cancer cells than in fibroblastic cells. Also, in the treated group with a concentration of 750 µm, expression of CASP8 and CASP9 genes significantly increased compared to control groups.

Discussion & Conclusions: Eugenol may have an inhibitory effect on the growth, proliferation and invasion of colon cancer cells by increasing the expression of CASP8 and CASP9 genes, and inducing apoptosis in HT-29 cancer cells and reducing the risk of cancerous cell proliferation it turns out.

Keywords: Eugenol, Apoptosis, HT-29, CASP8, CASP9

1. Dept of Basic Science, Faculty of Biology, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran
** Corresponding author Email: Email: n.zia@iaushk.ac.ir*

Scientific Journal of Ilam University of Medical Sciences

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-12]

[DOI: 10.29252/sjimu.27.5.85]