

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

Zahra Salimizadeh¹ , Sattar Tahmasebi Enferadi² , Tayebbeh Majidizadeh¹ ,
Razieh Jalal³ , 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

ABSTRACT

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)

Publisher: Ilam University of Medical Sciences



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,

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.

بررسی اثر سیتوتوکسیک عصاره آبی گیاه اسپند بر رده سلولی HCT116 مقاوم به اگزالی پلاتین و ارزیابی بیان ژن BAX

زهره سلیمی زاده^۱ , ستار طهماسبی انفرادی^۲ , طیبه مجیدی زاده^۱ , راضیه جلال^۲ , فروزنده محجوبی^{۱*} 

^۱ گروه ژنتیک پزشکی، پژوهشکده ملی مهندسی ژنتیک و بیوتکنولوژی، تهران، ایران

^۲ گروه بیوتکنولوژی گیاهی، پژوهشکده ملی مهندسی ژنتیک و بیوتکنولوژی، تهران، ایران

^۳ گروه شیمی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

چکیده

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،

پژوهشکده ملی مهندسی ژنتیک

و بیوتکنولوژی، تهران، ایران

Email:

frouz@nigeb.ac.ir

مقدمه: سرطان کولورکتال یکی از شایع ترین تومورهای بدخیم دستگاه گوارش در جهان است. اگزالی پلاتین یک داروی شیمی درمانی مؤثر برای درمان سرطان کولورکتال است. با این حال، استفاده طولانی مدت از این دارو اغلب به مقاومت دارویی منجر می شود. توسعه روش هایی برای کاهش مقاومت سلول های سرطان کولورکتال به اگزالی پلاتین بسیار مهم است. اسپند درمان ضد سرطان رایجی در طب سنتی است.

مواد و روش ها: در این تحقیق از دوزهای مختلف عصاره آبی دانه های اسپند برای تیمار سلول های HCT116 مقاوم به اگزالی پلاتین به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت استفاده شد. زنده ماندنی سلول ها با استفاده از روش متیل تiazol ترازولیم تعیین گردید؛ سپس استخراج RNA از سلول های تیمار شده (IC_{50}) و سلول های کنترل انجام شد. برای اندازه گیری غلظت RNA های استخراج شده از نانودراپ استفاده گردید؛ سپس از RNA های استخراج شده cDNA سنتز شد و میزان بیان ژن BAX با استفاده از Real-Time PCR بررسی گردید. در این مطالعه، میزان fold change با نرم افزار REST محاسبه شد؛ همچنین برای تجزیه و تحلیل آماری از نرم افزار Graph Pad Prism 8 و آزمون t-test میان نمونه های کنترل و تیمار استفاده گردید. P کمتر از ۰/۰۵ معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته های پژوهش: نتایج تجزیه و تحلیل نشان داد که میان افزایش غلظت عصاره و درصد سلول های مرده ارتباط معنی داری وجود دارد. میزان سمیت سلولی عصاره آبی دانه های اسپند از ۲۴ ساعت به ۴۸ ساعت، در رده سلولی HCT116 مقاوم به اگزالی پلاتین افزایش معنی داری داشت. علاوه بر این، افزایش قابل توجه و معنادار در سطح بیان نسبی ژن BAX در مقایسه با گروه کنترل مشاهده شد ($P < 0.001$).

بحث و نتیجه گیری: در این مطالعه مشاهده گردید که اثر سیتوتوکسیک عصاره آبی اسپند وابسته به دوز و زمان بود. عصاره آبی اسپند این توانایی را دارد که با تنظیم ژن های آپوپتوز، از جمله تقویت ژن های پرو آپوپتوز مانند BAX، باعث مرگ سلولی در سلول های سرطان کولورکتال شود. نتایج نشان می دهد که عصاره آبی اسپند می تواند به طور بالقوه در درمان سلول های سرطان کولورکتال مقاوم به دارو مفید باشد.

واژه های کلیدی: اگزالی پلاتین، BAX، سرطان کولورکتال، عصاره آبی، *P. harmala*

استاد: سلیمی زاده زهره، طهماسبی انفرادی ستار، مجیدی زاده طیبه، جلال راضیه، محجوبی فروزنده. بررسی اثر سیتوتوکسیک عصاره آبی گیاه اسپند بر رده سلولی HCT116

مقاوم به اگزالی پلاتین و ارزیابی بیان ژن BAX. مجله دانشگاه علوم پزشکی ایلام، فروردین ۱۴۰۴؛ ۳۳(۱): ۱۱۱-۱۲۶.

سرطان کولورکتال (CRC) سومین سرطان بدخیم و دومین علت مرگ ناشی از سرطان در سراسر جهان است (۱). روش‌های درمانی برای CRC شامل حذف عفونت‌های زمینه‌ای، جراحی، شیمی‌درمانی، پرتودرمانی و درمان هدفمند است. در حال حاضر، شیمی‌درمانی مبتنی بر اگزالی‌پلاتین در CRC پیشرفته 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 دیده شده 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)؛ از این رو، جای تعجب نیست که محققان به دنبال کشف داروهای ضدسرطان جدید از منابع طبیعی با اثر قوی‌تر و عوارض جانبی کمتر باشند. بر اساس موفقیت‌های عمده گذشته، گیاهان دارویی منبع امیدوارکننده‌ای برای توسعه 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 توسعه سرطان دخیل هستند. ترکیبات فیتوشیمیایی پتانسیل ضدسرطانی خود را از طریق چندین سازوکار اعمال می‌کنند؛ از جمله: القای توقف چرخه سلولی و تحریک آپوپتوز، عمل به‌عنوان عوامل ضد میتوزی و ضد میکروتوبولی 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 ضدآپوپتوز و معکوس کردن مقاومت دارویی (۱۲-۱۴). چندین داروی ضدسرطان که در حال حاضر استفاده بالینی می‌شوند، محصولات مشتق‌شده از گیاهان هستند و شامل تاکسول، وینبلاستین یا وین کریستین، ایرینوتکان، کامپوتسین و مشتقات یا آنالوگ‌های آن‌ها می‌گردند (۱۵). در مطالعات پیشین، اثر سیتوتوکسیک گیاهان متعددی بر سرطان کلون به‌صورت *in vitro* و *in vivo* بررسی شده است. از جمله 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 پیشگیرانه عصاره آبی آن در موش BALB/c مشاهده گردیده است (۱۵). گیاه اسپند (*P. harmala*) از خانواده Zygophyllaceae، از دیرباز در طب سنتی ترکیه، ایران و چین برای درمان فشارخون، آسم، دیابت، عفونت‌های مختلف و همچنین به‌عنوان ضد عفونی، ضد التهاب و ضدسرطان استفاده می‌شده است (۱۶-۱۸). در طب سنتی مراکش، پودر دانه *P. harmala* را برای تومورهای پوستی تجویز می‌کنند. داروی Spinal-Z که جزء اصلی آن عصاره دانه *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). تجزیه و تحلیل 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

ضدمیکروبی، ضدقارچی، آنتی اکسیدانی و ضدتوموری و همچنین القای آپوپتوز دارند (۲۴-۲۷). علاوه بر این، *P. harmala* آثار ضد رگ زایی و ضد متاستازی دارد. عصاره هیدروالکلی دانه *P. harmala* رگ زایی را در غلظت های بالاتر از ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر مهار می کند. اثر ضد رگ زایی هارمین نیز بر تومور تأیید شده است (۲۸، ۲۹)؛ همچنین مشخص گردیده است که عصاره هیدروالکلی دانه *P. harmala* فعالیت ضد تکثیر بر سلول های اندوتلیال بند ناف انسان، به صورت وابسته به دوز و زمان دارد (۲۸). تحقیقاتی که روی عصاره گیاه *P. harmala* با روش های HPLC و GC انجام شده است، ارتباط میان ترکیبات فیتوشیمیایی موجود در عصاره و فعالیت های بیولوژیکی مختلف مربوط به آن ها را نشان داده است. هارمین و هارمالین آلکالوئیدهای بتاکربولینی هستند که از دانه های *P. harmala* جدا شده اند و آثار سیتوتوکسیک آن ها علیه رده های سلولی سرطانی مختلف از جمله سلول های سرطان سینه، پروستات و روده بزرگ نشان داده شده است. آن ها باعث توقف چرخه سلولی و آپوپتوز در سلول های سرطانی می شوند؛ همچنین هارمین و هارمالین با از بین بردن رادیکال های آزاد و کاهش استرس اکسیداتیو، فعالیت آنتی اکسیدانی از خود نشان می دهند (۳۰-۳۲).

آپوپتوز نوعی مرگ سلولی برنامه ریزی شده است که آن را به یک هدف بسیار امیدوارکننده برای درمان های ضد سرطان تبدیل می کند. طیف وسیعی از عوامل از جمله بیان بیش از حد پروتئین های ضد آپوپتوز و بیان ناکافی پروتئین های پرو آپوپتوز، به طور معمول مسیر آپوپتوز را در سرطان مهار می کنند. درمان هایی که آپوپتوز را هدف قرار می دهند، مولکول هایی را فعال می کنند که آپوپتوز را افزایش می دهند و فعالیت مولکول های ضد آپوپتوز را مهار می کنند (۳۳). تهرانی و همکاران نشان دادند که عصاره *P. harmala* به طور چشمگیری سرعت رشد و زنده ماندن سلولی دو رده سلولی سرطان پستان (MDA-MB-231 و MCF-7) را کاهش می دهد (۳۴)؛ همچنین در مطالعه دیگری، شبانی و همکاران دریافتند که عصاره *P. harmala* با فعال کردن هر دو مسیر آپوپتوز بیرونی و درونی، از تکثیر رده سلولی سرطان پستان جلوگیری

می کند (۳۵). خانواده Bcl-2 حاوی تعداد بسیاری پروتئین از جمله پروتئین های پرو آپوپتوز و آنتی آپوپتوز است. این مولکول ها نقش مهمی در فرایند آپوپتوز دارند. برخی از اعضای این خانواده باعث القای آپوپتوز می شوند، در حالی که برخی دیگر از آپوپتوز جلوگیری می کنند (۳۶). یکی از پروتئین های این خانواده که نقش مهمی در تنظیم آپوپتوز دارد، پروتئین BAX است که باعث القای آپوپتوز می گردد (۳۷). عملکرد BAX از طریق مجموعه ای از تغییرات از جمله تغییرات ساختاری (از حالت غیر فعال به فعال)، انتقال (از سیتوزول به میتوکندری) و تغییرات وضعیت تجمع (از مونومر به دایمر و چندتایی) به شدت تنظیم می شود. مطالعات نشان داده اند که پروتئین BAX از طریق کاهش غشای خارجی میتوکندری باعث آزادسازی عوامل آپوپتوزی از جمله سیتوکروم c و Smac/DIABLO از فضای بین غشایی به سیتوزول می گردد. سیتوکروم c به همراه فاکتور فعال کننده پروتئاز آپوپتوتیک ۱ (Apaf-1)، dATP و پروکاسپاز-۹ یک کمپلکس به نام «آپوپتوزوم» را تشکیل می دهد که کاسپاز ۹ را فعال می کند و به دنبال آن، سایر کاسپازهای اجرایی را فعال می سازد و در نهایت، به مرگ سلول منجر می شود (۳۸).

عصاره گیری از گیاهان دارویی به روش های مختلف و با استفاده از حلال های مختلف صورت می گیرد. مشخص است که با توجه به روش و حلال استفاده شده، عصاره های تولید شده خواص متفاوتی را از خود نشان می دهند. حلال هایی که معمولاً برای استخراج عصاره استفاده می گردند، شامل آب و حلال های آلی هستند (۳۹). روش های استخراج مختلفی برای جدا کردن ترکیبات ضدسرطانی موجود در گیاه *P. harmala* وجود دارد. ترکیبات آلکالوئیدی یکی از مهم ترین ترکیبات ضدسرطانی در دانه های گیاه *P. harmala* هستند. در مطالعه پیشین سلیمی زاده و همکاران، ماده مؤثر آلکالوئیدی (هارمین و هارمالین) با روش استخراج اسیدی/بازی جدا گردید و اثر ضدسرطانی آن بررسی شد (۴۰). هدف از مطالعه حاضر بررسی اثر عصاره آبی بر سلول های سرطان کولورکتال مقاوم به اگزالی پلاتین است و در ادامه، میزان بیان ژن BAX پیش و

پس از تیمار بررسی گردید؛ همچنین در این مطالعه، اثر سیتوتوکسیک عصاره آبی با ماده 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 دانه خشک‌شده *P. harmala* به مدت ۴۰ دقیقه در ۵۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر جوشانده شد. محلول با کاغذ صافی (واتمن شماره ۱) فیلتر گردید؛ سپس مایع صاف‌شده در بن‌ماری ۷۰-۶۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا تغلیظ شود؛ سپس عصاره به‌دست‌آمده در پلیت‌های شیشه‌ای بزرگ (برای خشک شدن) ریخته شد و سپس در انکوباتور قرار گرفت. در انتها، عصاره خشک به‌دست‌آمده در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری گردید.

کشت سلولی و آزمون MTT: رده سلولی استفاده‌شده در این تحقیق HCT116 مقاوم به اگزالی‌پلاتین است. سلول‌های HCT-116 سلول‌های آدنوکارسینومای کولورکتال انسانی هستند که یک جهش در کدون ۱۳ پروتئین کوژن Ras دارند. سلول‌های HCT116 مقاوم به اگزالی‌پلاتین در DMEM (۱۰ درصد FBS، ۱۰۰ µg/mL استرپتومایسین، ۱۰۰ U/mL پنی‌سیلین) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با ۵ درصد CO₂ کشت داده شدند.

در ادامه، آزمون سمیت سلولی (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) انجام گردید. نمک MTT محلول در آب و زردرنگ است و توسط دهیدروناز 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 دهیدرونازهای 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 درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه گردیدند؛ سپس سلول‌ها با محیط ۱۰۰ میکرولیتری حاوی غلظت‌های ۰/۴-۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره 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 درجه سانتی‌گراد انکوبه شد؛ سپس حدود ۱۰۰ میکرولیتر DMSO (به‌منظور حل شدن بلورهای نامحلول فورمازان) به هر چاهک اضافه گردید. پس از پیتاژ (آرام)، به مدت ۲۰ دقیقه درون انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و سپس جذب رنگ MTT توسط الیزا ریدر خوانده شد و میزان IC₅₀ محاسبه گردید.

استخراج RNA: ابتدا استخراج RNA از سلول‌های کنترل و تیمار شده (با غلظت IC₅₀ 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 x 2 (شامل مخلوطی از بافر، نوکلئوتید و پرایمرهای سنتز cDNA از رونوشت‌های total RNA) و مخلوط آنزیم TruScript™ (شامل آنزیم رونوشت بردار معکوس M-MuLV) بر اساس دستورالعمل کیت انجام شد. کیفیت cDNAهای سنتز شده 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 IC₅₀ 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.

محاسبه گردید. در جدول شماره ۱ توالی پرایمرهای طراحی شده نشان داده شده است (۴۰).

سطح بیان ژن مدنظر ابتدا با ژن کنترل داخلی (*GAPDH*) نرمال شد و سپس میزان نسبت بیان ژن مدنظر در گروه‌های تیماری نسبت به گروه کنترل با استفاده از فرمول $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$

جدول شماره ۱. مشخصات پرایمرهای استفاده شده برای انجام واکنش PCR

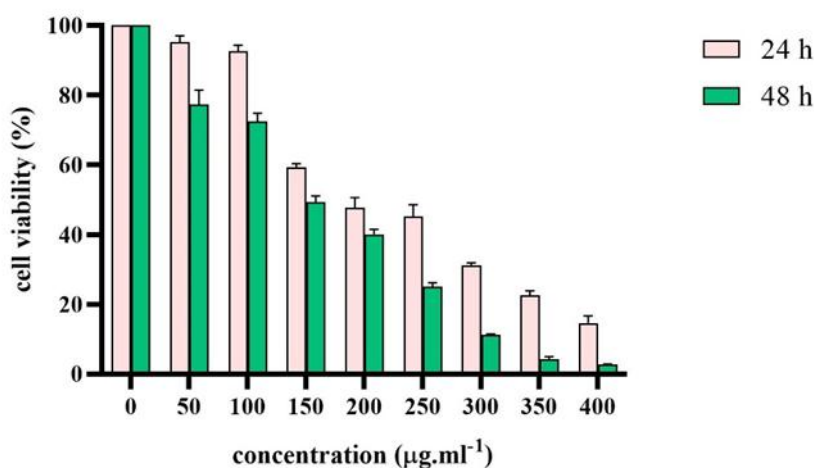
اندازه طول محصول (جفت باز)	Tm (°C)	توالی پرایمر	NCBI Reference Sequence	پرایمر
۲۱۸	۵۸	Forward: CAGGGGGGAGCCAAAAGGGT Reverse: TGGGTGGCAGTGATGGCATGG	NM_002046.7	<i>GAPDH</i>
۱۷۴	۵۹	Forward: TGCCTCAGGATGCGTCCACCAA Reverse: CCCAGTTGAAGTTGCCGTCAG	NM_001291428.2	<i>BAX</i>

مرده افزایش می‌یابد. مقدار IC_{50} به ترتیب ۰/۲ میلی گرم بر میلی لیتر و ۰/۱۴ میلی گرم بر میلی لیتر پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت قرار گرفتن در معرض عصاره آبی *P. harmala* تعیین شد؛ همچنین در رده سلولی HCT116 مقاوم به اگزالی پلاتین، سمیت سلولی عصاره *P. harmala* به طور چشمگیری از ۲۴ به ۴۸ ساعت افزایش یافت (شکل شماره ۱). در ادامه، تجزیه و تحلیل‌های آماری با نرم افزار Graph Pad Prism برای بررسی وجود ارتباط معنی دار در نتایج انجام گردید که مشاهده شد که میان سمیت عصاره آبی بر روی سلول‌های مقاوم و افزایش غلظت عصاره و همچنین افزایش مدت زمان تیمار ارتباط معنی داری وجود دارد ($P < 0.001$)؛ همچنین error bars میانگین $\pm SD$ را نشان می‌دهند.

تجزیه و تحلیل داده‌های MTT با استفاده از نرم افزار Graph Pad Prism vol.8 و تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه انجام گردید. تجزیه و تحلیل داده‌های Real-Time PCR با استفاده از نرم افزارهای 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 معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته‌های پژوهش

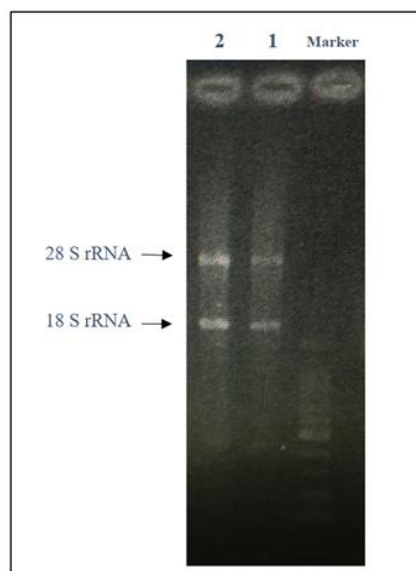
آزمون MTT: در این مطالعه مشاهده گردید، با افزایش غلظت عصاره آبی *P. harmala*، تعداد سلول‌های



شکل شماره ۱. نمودار آزمون MTT رده سلولی HCT116 مقاوم به اگزالی پلاتین در سلول‌های تیمار شده با عصاره آبی در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت

۱/۸ و ۲ به دست آمد که نشان‌دهنده درجه بالای خلوص RNA و نیز آلودگی نشدن آن با پروتئین و ترکیبات فنلی (گوانیدین تیوسونات) است. نتایج این مرحله حاکی از آن بود که RNA استخراج شده می‌تواند با اطمینان بالا در مراحل بعدی تحقیق استفاده شود.

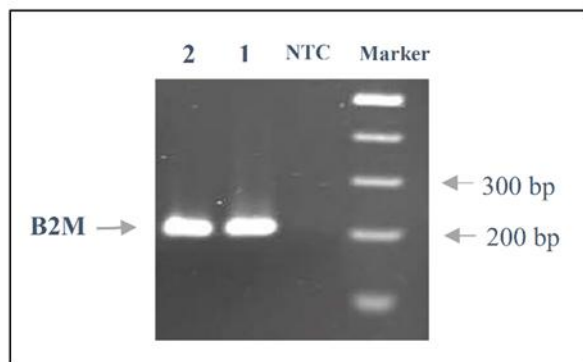
استخراج RNA: پس از استخراج RNA، کیفیت و کمیت RNA استخراج شده بررسی گردید. در بررسی ژل، وجود دو باند ۱۸ S و ۲۸ S RNA ریوزومی نشان‌دهنده تجزیه نشدن RNA و سلامت RNA استخراجی است (شکل شماره ۲). در بررسی اسپکتروفتومتری، نسبت A280/A260 بین



شکل شماره ۲. RNA استخراج شده روی ژل آگارز. ۱. نمونه‌های کنترل (HCT116 مقاوم به اگزالی پلاتین) و ۲. تیمار (HCT116 مقاوم به اگزالی پلاتین تیمار شده با عصاره آبی)

سنتز شده از RNA استخراجی نمونه‌های مختلف توسط پرایمر B2M است و باندها مربوط به محصول PCR ژن B2M (230bp) است.

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 شماره ۳ مربوط به بررسی cDNA های

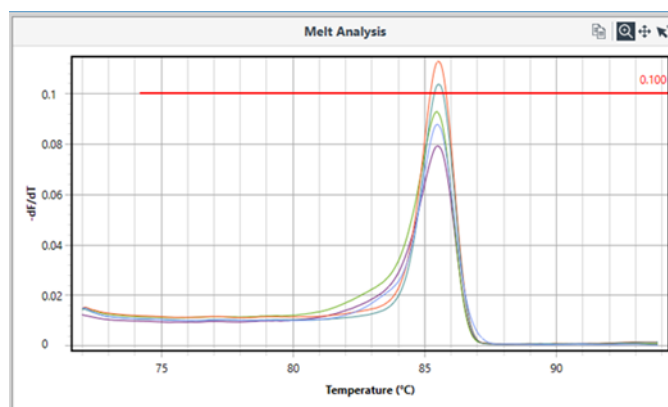


شکل شماره ۳. محصول PCR ژن *B2M* روی ژل آگارز با استفاده از cDNA های سنتز شده. NTC. نمونه کنترل منفی؛ ۱. نمونه کنترل (HCT116 مقاوم به اگزالی پلاتین) و ۲. نمونه بیمار (HCT116 مقاوم به اگزالی پلاتین تیمار شده با عصاره آبی)

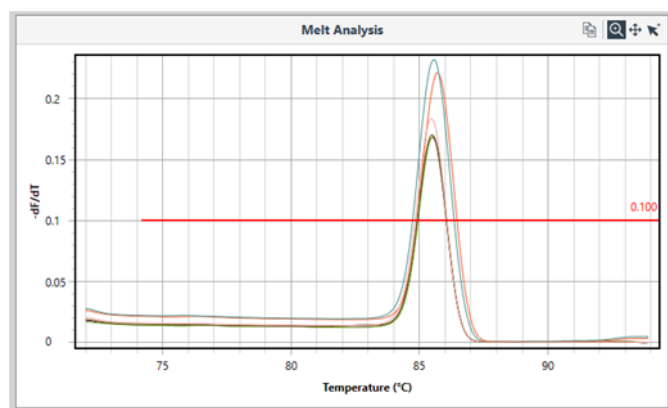
نتایج نسبت بیان ژن *BAX* در سلول های تیمار شده نسبت به کنترل (fold change) حدود ۴/۶ افزایش بیان را نشان می دهد. در این مطالعه، میزان fold change با نرم افزار REST محاسبه شد. برای تجزیه و تحلیل آماری، آزمون t- میان نمونه های کنترل و بیمار انجام گردید و مشاهده شد که افزایش بیان ژن *BAX* معنادار است ($P < 0.001$)؛ همچنین error bars میانگین $\pm SD$ را نشان می دهد.

Real-Time PCR: ابتدا شرایط

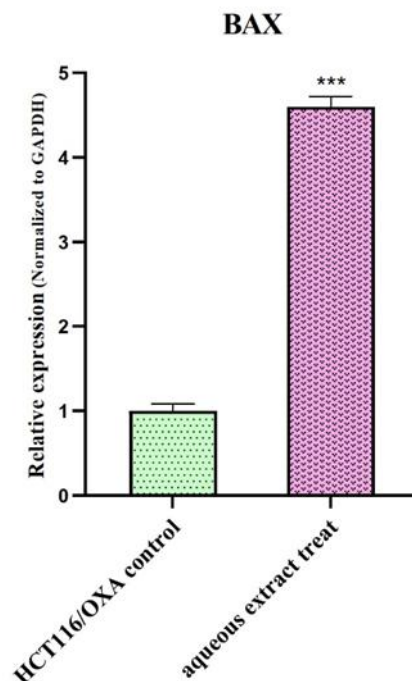
Real-time PCR برای ژن *BAX* و *GAPDH* بهینه سازی شد، به صورتی که بررسی منحنی های ذوب حکایت از تکثیرنمایی قطعه ای با یک منحنی ذوب یکتا بدون پرایمر دایمر داشت که نشان دهنده تکثیر اختصاصی این ژن ها است (شکل های شماره ۴ و ۵). تغییر در بیان ژن آپوپتوزی *BAX* در سلول های سرطانی کلون مقاوم به اگزالی پلاتین تیمار شده با عصاره آبی *P. harmala* پس از ۴۸ ساعت بررسی گردید (شکل شماره ۶).



شکل شماره ۴. منحنی ذوب ژن خانه دار *GAPDH* برای نمونه های کنترل و بیمار



شکل شماره ۵. منحنی ذوب ژن *BAX* برای نمونه های کنترل و بیمار



شکل شماره ۶. مقایسه میزان بیان ژن BAX در سلول‌های کنترل و تیمار (عصاره آبی) پس از ۴۸ ساعت

بحث و نتیجه‌گیری

مطالعه حاضر با هدف بررسی اثر عصاره آبی بر سلول‌های سرطان کولورکتال مقاوم به اگزالی‌پلاتین انجام شد. در مطالعه حاضر مشاهده گردید که عصاره آبی اسپند به صورت 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 عصاره آبی اسپند به صورت وابسته به دوز و زمان، اثر سیتوتوکسیک بر سلول‌های لوسمی دارد (۴۱). در مطالعه پیشین گروه حاضر، اثر ماده 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 سیتوتوکسیک معناداری دارد و میزان IC_{50} در زمان ۲۴ ساعت ۰/۰۳ و در ۴۸ ساعت ۰/۰۲ میلی گرم بر میلی لیتر و همچنین اثر سیتوتوکسیک آن وابسته به دوز و زمان بود. در مطالعه حاضر، همانند مطالعه پیشین مشاهده شد که عصاره آبی اسپند به صورت وابسته به دوز و زمان، اثر سیتوتوکسیک بر سلول‌های HCT116 مقاوم به اگزالی‌پلاتین دارد (۴۰). در مطالعه حاضر، میزان IC_{50}

بالا‌تری در زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت (۰/۲ و ۰/۱۴ میلی گرم بر میلی لیتر) نسبت به اثر ماده مؤثر آلکالوئیدی استخراجی مشاهده گردید که این به علت آن است که بیشترین اثر ضدسرطانی دانه‌های گیاه *P. harmala* به سبب حضور آلکالوئیدهای آن به ویژه هارمین و هارمالین است. در مطالعه پیشین، آلکالوئیدهای هارمین و هارمالین جداسازی شده بودند و به همین علت، در غلظت پایین تری روی سلول‌های سرطانی اثر کشندگی داشتند؛ اما در عصاره آبی همه ترکیبات گیاه استخراج شد و به همین علت، IC_{50} بالا‌تری مشاهده گردید. یکی از فوایدی که استفاده از عصاره آبی نسبت به ماده مؤثر آلکالوئیدی استخراجی دارد، این است که استخراج آن آسان‌تر است و در زمان کمتر و با هزینه کمتری استخراج می‌شود؛ همچنین در روش استخراج آبی، تنها از آب به عنوان حلال استفاده می‌گردد که غیرسمی است و برای استفاده روی سلول ایمن‌تر است. در مطالعه حاضر، اثر عصاره آبی اسپند بر سلول‌های کولورکتال مقاوم به اگزالی‌پلاتین بررسی شد و مشاهده گردید که روی سلول‌های مقاوم اثر سیتوتوکسیک دارد. در مطالعه ما و همکاران مشاهده شد که رده‌های سلولی که بیش از حد BCRP را بیان می‌کنند، تقریباً در برابر عوامل سیتوتوکسیک مانند میتوکسانترون و کامپوتوتسین (مهارکننده

DNA توپوایزومراز I) مقاوم هستند. پروتئین BCRP (عضو خانواده ناقل‌های ABC) از سلول‌ها، بافت‌ها و ارگان‌های طبیعی در برابر سیتوتوکسیسیته محافظت می‌کند. BCRP در برخی از تومورها نیز به‌شدت بیان می‌شود. این پروتئین داروهای ضدسرطان را از سلول‌ها پمپاژ می‌کند و در نتیجه، 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 BCRP) با عوامل سیتوتوکسیک و هارمین به‌طور چشمگیری IC₅₀ را برای میتوکسانترون و کامپوتوسین 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 سیتوتوکسیسیته داروهای ضدسرطان در سلول‌های سرطانی سینه (MDA-MB-231) شود (۴۲). در مطالعه وو و همکاران مشاهده گردید که هارمین مسیر AKT/mTOR را سرکوب می‌کند و هارمین به همراه جمستایین نیز به‌طور چشمگیری مسیر سیگنالینگ AKT/mTOR را سرکوب می‌نماید. مسیر AKT/mTOR سازوکارهای مقاومت به جمستایین در سلول‌های سرطانی پانکراس نقش دارد؛ بنابراین، هارمین احتمالاً فعالیت ضدسرطانی جمستایین را از طریق سرکوب مسیر AKT/mTOR افزایش می‌دهد (۴۳). مسیر آپوپتوز ذاتی توسط خانواده Bcl-2 تنظیم می‌گردد که شامل پروتئین‌های پیش آپوپتوزی و ضدآپوپتوزی است. نبود پروتئین‌های پیش آپوپتوزی یا افزایش بیان پروتئین‌های ضدآپوپتوزی موجب افزایش مقاومت به اگزالی‌پلاتین می‌شود (۴۴، ۴۵). در مطالعه حاضر، میزان بیان ژن BAX پس از تیمار عصاره 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

در نتیجه، 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 رده 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 رده 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 مطالعه 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 معده انسان را به داروهای مختلف شیمی‌درمانی افزایش می‌دهد (۴۹، ۵۰). در مطالعه پیشین گروه حاضر، بیان ژن BAX پس از تیمار با ماده 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 ماده 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، ماده مؤثر آلکالوئیدی *P. harmala* فعالیت p53 را فعال می‌کند و p53 مستقیماً باعث فعال شدن BAX می‌شود و کمپلکس‌های مهاری با پروتئین

HCT116 مقاوم به اگزالی پلاتین کمال تشکر و قدردانی را داریم.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می کنند که هیچ تعارض منافی وجود ندارد.

کد اخلاق

با توجه به استفاده نکردن از نمونه انسانی- حیوانی، نیاز به تهیه کد اخلاق نبود.

حمایت مالی

این مطالعه به طور کامل توسط پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری (NIGEB) حمایت شده است.

مشارکت نویسندگان

تحلیل داده ها، نگارش و تفسیر داده های پژوهش: زهرا سلیمی زاده

طراحی پژوهش، ویرایش: ستار طهماسبی انفرادی، فروزنده محجوبی، طیه مجیدی زاده، زهرا سلیمی زاده، نظارت: ستار طهماسبی انفرادی، فروزنده محجوبی، بخش آزمایشگاهی: راضیه جلال، زهرا سلیمی زاده، مدیریت پروژه: فروزنده محجوبی.

Bcl2 تشکیل می دهد. این برهم کنش ها در نهایت به نفوذپذیری میتوکندری و آزاد شدن سیتوکروم c و سرانجام به آپوپتوز منجر می شود؛ همچنین مشاهده گردید که درصد آپوپتوز سلول ها در میان سلول های HCT116 تیمار شده با ماده مؤثر آلکالوئیدی *P. harmala* در زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت بیشتر از سلول های کنترل بود که این نشان می دهد، احتمالاً اثر سیتوتوکسیک ماده مؤثر آلکالوئیدی *P. harmala* از طریق فعال کردن سازوکار آپوپتوز است (۴۰). در مطالعات پیشین به مسیرهای متعددی برای مقاومت سلول ها به اگزالی پلاتین اشاره شده است. مسیر آپوپتوز ذاتی توسط خانواده Bcl-2 تنظیم می گردد که شامل پروتئین های پیش آپوپتوزی و ضد آپوپتوزی است. نبود پروتئین های پیش آپوپتوزی یا افزایش بیان پروتئین های ضد آپوپتوزی موجب افزایش مقاومت به اگزالی پلاتین می شود (۴۴، ۴۵). همان طور که اشاره شد، احتمالاً یکی از مسیرهایی که عصاره آبی باعث افزایش آپوپتوز در سلول های HCT116 مقاوم به اگزالی پلاتین می شود، می تواند از طریق افزایش بیان ژن *BAX* باشد. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که عصاره آبی *P. harmala* بر سلول های سرطان کولورکتال مقاوم به اگزالی پلاتین اثر سیتوتوکسیک دارد. در ادامه، برای جلوگیری از عوارض احتمالی آن، مطالعه عصاره آبی *P. harmala* روی سلول های طبیعی و نمونه های حیوانی با سرطان کولورکتال پیشنهاد می گردد؛ همچنین تحقیقات بیشتر برای جداسازی و شناسایی ترکیبات عصاره آبی *P. harmala* پیشنهاد می شود که واسطه آثار سیتوتوکسیک هستند؛ همچنین بررسی سازوکار دقیق آثار ضدسرطان این گیاه به ویژه در مقایسه با داروهای شیمی درمانی موجود و علاوه بر آن، بررسی تأثیر هم افزایی عصاره آبی *P. harmala* با داروهای شیمی درمانی می تواند مفید باشد. پیشنهاد می گردد که با انجام مطالعات بیشتر بتوان از عصاره آبی دانه گیاه *P. harmala* در کنار داروهای رایج شیمی درمانی برای درمان سرطان کولورکتال مقاوم به دارو استفاده کرد.

سپاس گذاری

از خانم دکتر چراغی برای اهدای رده سلولی

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

- 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: 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/acsmchemlett.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.

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.