

اثر ضدسرطانی Oxypeucedanin methanolate خالص شده از گیاه *Ferulago trifida Boiss* بر رده سلولی A549 سرطان ریه

آمنه غلامی^۱، سید جلال زرگر^{۲*}، سعید توکلی^۳

۱- کارشناس ارشد، گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده زیست‌شناسی، دانشکدگان علوم، دانشگاه تهران، تهران، ایران

۲- دانشیار، گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده زیست‌شناسی، دانشکدگان علوم، دانشگاه تهران، تهران، ایران

۳- استادیار، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، پژوهشکده گیاهان دارویی، جهاد دانشگاهی، کرج، ایران

* صندوق پستی ۶۴۵۵-۱۴۱۵۵، تهران، ایران

Zargar@ut.ac.ir

پذیرش: ۱۴۰۱/۰۱/۲۴

دریافت: ۱۴۰۰/۰۸/۱۶

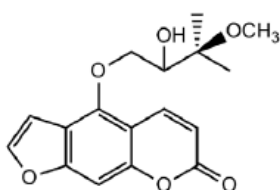
چکیده

آدنوکارسینوما ریه، رایج‌ترین نوع سرطان سلول غیر کوچک ریه می‌باشد. Oxypeucedanin methanolate ترکیب طبیعی از فورانوکومارین‌ها است که از گیاه *Ferulago trifida Boiss*، گونه بومی مناطق شمال غربی ایران استخراج شده است. در این پژوهش اثر Oxypeucedanin methanolate بر مسیر آپوپتوز و اتوفاژی و سازوکارهای مربوط به این مسیرها در سلول‌های غیرکوچک سرطان ریه (NSCLC) بررسی شده است. اثر Oxypeucedanin methanolate بر حیات سلول‌های A549 توسط آزمون MTT و میزان آپوپتوز سلول‌ها با استفاده از روش فلوسایتومتری بررسی شد. سطح بیان ژن‌های BAX، caspase-3، BCL2 و LC3 توسط روش Real time RT-PCR اندازه‌گیری شد و تهاجم سلول‌های A549 توسط آزمون ترمیم زخم ارزیابی شد. بر اساس ارزیابی آزمون MTT، Oxypeucedanin methanolate تکثیر سلول‌های A549 را به دوز و زمان مهار وابسته کرده است. میزان آپوپتوز در سلول‌های A549 تیمار نشده (۵/۴۶ درصد) است؛ در حالی که میزان آپوپتوز سلول‌های تیمار شده در غلظت ۰/۴ میلی‌مولار (۲۹/۶ درصد) بوده است. نتایج Real time RT-PCR نشان داد که سطح بیان ژن‌های BAX، caspase-3 و LC3 افزایش پیدا کرده است. در حالی که میزان بیان ژن BCL2 کاهش یافته است. میزان تهاجم سلول‌های تیمار نشده پس از گذشت ۷۲ ساعت به‌طور چشمگیری افزایش یافت. Oxypeucedanin methanolate باعث مهار تکثیر می‌شود و می‌تواند به القای مسیر آپوپتوز و اتوفاژی در رده سلولی A549 سرطان ریه منجر شود. Oxypeucedanin methanolate ممکن است کاندیدی مناسبی برای کاهش متاستاز سلول‌های A549 باشد.

کلید واژگان: سرطان ریه سلول غیرکوچک، کومارین، Oxypeucedanin methanolate، آپوپتوز، اتوفاژی

۱-مقدمه

کشف داروهای ضدسرطانی جدید با کارایی بالا و سمیت کم، می تواند از اهمیت بالایی برخوردار باشد [۶ و ۷]. کومارین^۹، (۱ و ۲ بنزوپیرون)^{۱۰} و یا (هیدروکسی سینامیک اسید-۸-لاکتون)^{۱۱} گروهی از ترکیبات فنولی اند که در گیاهان، باکتری ها و قارچ ها وجود دارند. این ترکیبات برای نخستین بار در سال ۱۸۲۰ میلادی توسط فردی به نام وگل^{۱۲} از دانه های تونکا^{۱۳} گیاه کومارو^{۱۴} جداسازی شده اند. کومارین ها به پنج گروه یعنی کومارین ساده، فورانوکومارین، پیرانوکومارین، دی کومارین و فنیل کومارین دسته بندی می شوند [۸ و ۹]. مشتقات آن به طور گسترده فعالیت ضد باکتریایی، ضد انعقادی^{۱۵}، ضد ویروسی و همچنین فعالیت ضد توموری را بر روی انواع سلول های توموری، مانند تومورهای سرطان روده بزرگ^{۱۶}، سرطان معده^{۱۷}، سرطان پستان^{۱۸} و سرطان سلول غیرکوچک ریه نشان داده اند [۱۴-۱۱]. Oxypeucedanin methanolate ترکیب کومارینی است که از ریشه گیاه *Ferulago trifida Boiss* گونه بومی مناطق شمال غربی ایران توسط گروه فارماکوگنوزی دانشکده داروسازی دانشگاه تهران به روش کروماتوگرافی ستونی استخراج شده است (شکل ۱) [۱۵].



شکل ۱ ساختار شیمیایی Oxypeucedanin methanolate.

سرطان ریه^۱ یا کارسینوما ریه^۲، تومور بدخیم ریه است که با رشد غیرقابل کنترل در بافت ریه مشخص می شود. سرطان ریه بر اساس خصوصیات بافت شناسی به دو دسته اصلی یعنی؛ سرطان سلول غیرکوچک ریه^۳ و سرطان سلول کوچک ریه^۴ تقسیم بندی می شود [۱]. سرطان سلول غیرکوچک ریه در ایجاد ۸۵ درصد از موارد سرطان ریه نقش دارد و خود شامل سه گروه اصلی آدنوکارسینوما^۵، کارسینوما سلول سنگفرشی^۶ و کارسینوما سلول بزرگ^۷ می باشد [۲]. سرطان ریه بر اساس آمار گزارش شده در سال ۲۰۲۰ توسط GLOBOCAN و آژانس بین المللی تحقیقات سرطان^۸، به عنوان رایج ترین عامل بروز سرطان پس از سرطان پستان و مهم ترین عامل مرگ سرطان به شمار می رود. این سرطان در میان مردان دلیل اصلی ابتلاء سرطان و مرگومیر حاصل از آن است؛ در حالی که در میان زنان، سرطان ریه از نظر بروز رتبه سوم را پس از سرطان پستان و روده بزرگ و از نظر مرگومیر رتبه دوم را پس از سرطان پستان به خود اختصاص داده است [۳]. در حال حاضر جراحی از رایج ترین روش های درمانی در مراحل اولیه سرطان ریه است که منجر به حذف سلول های توموری غیرمتاستازی و افزایش بقاء بیماران می شود [۴ و ۵]. با وجود این، در اغلب موارد سرطان ریه در مراحل انتهایی پیشرفت تومور شناسایی می شود که روش های درمانی رایج در این مرحله از پیشرفت تومور، شامل شیمی درمانی، پرتودرمانی، رادیوتراپی و درمان هدفمند می باشد. از آنجایی که این روش های درمانی دارای معایبی چون سمیت، مقاومت دارویی و عدم حساسیت هستند، بنابراین

¹⁰ 1,2-benzopyrone

¹¹ O-hydroxycinnamic acid-8-lactone

¹² Vogel

¹³ Tonka beans

¹⁴ Cumaru

¹⁵ Anticoagulant

¹⁶ Colon cancer

¹⁷ Gastric cancer

¹⁸ Breast cancer

¹ Lung cancer

² Lung carcinoma

³ NonSmall-Cell Lung Cancer (NSCLC)

⁴ Small-Cell Lung Cancer (SCLC)

⁵ Adenocarcinoma (ADC)

⁶ Squamous-Cell Carcinoma (SCC)

⁷ Large-Cell Carcinoma (LCC)

⁸ International Agency for Research on Cancer

⁹ Coumarin

رده سلولی سرطان ریه سلول غیرکوچک (A549) از شرکت ژنیران خریداری شد. سلول‌ها در محیط کشت DMEM/F12 خریداری شده از شرکت ایده زیست نو ترکیب (BIO-IDEA) حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (FBS) (شرکت BIOCHROM) و محلول پنی‌سیلین-استرپتومایسین ۱۰۰X (شرکت Gibco) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و در ۵ درصد CO₂ در انکوباتور (Memmert آلمان) کشت داده شدند.

سایر مواد استفاده شده در این مطالعه شامل تریپسین (Trypsin-EDTA 100 x) (شرکت ایده زیست نو ترکیب)، محلول MTT (شرکت Sigma)، کیت بررسی آپوپتوز (AnnexinV-FITC/PI Apoptosis Detection Kit) (شرکت IQ Products) کیت استخراج RNA Total (RNA Extraction Kit) و کیت سنتز cDNA (Easy™ cDNA Synthesis Kit) (شرکت پارس‌توس (Parstous))، مستر میکس (RealQ Plus 2x Master Mix Green) (شرکت AMPLIQON) و کیت بررسی آپوپتوز (Annexin V-FITC/PI Apoptosis Detection Kit) از شرکت (IQ Product) می‌باشد.

۲-۲ آزمون MTT

تعداد ۱×۱۰^۴ سلول در چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه کاشته شد. پس از گذشت زمان ۲۴ ساعت، سلول‌ها با غلظت‌های ۰/۱، ۰/۲، ۰/۴، ۰/۶، ۰/۸ و ۱ میلی‌مولار oxypeucedanin methanolate حل شده در DMSO به مدت ۴۸ و ۷۲ ساعت تیمار شدند. پس از گذشت زمان‌های ذکر شده، محتوای چاهک‌ها تخلیه شد و به چاهک‌ها محلول MTT (۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) اضافه شد و به مدت ۳ ساعت در شرایط ۵ درصد CO₂ و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. پس از آن محلول MTT

آپوپتوز^{۱۹} ساز و کار طبیعی مرگ برنامه‌ریزی شده سلول است که با حذف سلول‌های غیرضروری، در حفظ تکامل و هموستاز موجودات زنده نقش دارد. اختلال در تنظیم این مسیر نشانه‌ای در طیف گسترده‌ای از بیماری‌ها است. آپوپتوز تسریع شده در ایجاد ناباروری، نقص ایمنی و بیماری‌های تخریب‌کننده^{۲۰} نقش دارد. در حالی‌که توقف یا مهار آپوپتوز در ارتباط با بیماری‌های خود ایمنی و سرطان می‌باشد. رشد کنترل نشده، رگ‌زایی و فرار از آپوپتوز از نشانه‌های سرطان در تمام سلول‌های سرطانی می‌باشد. عدم تنظیم آپوپتوز باعث می‌شود که سلول‌های سرطانی بیشتر زنده بمانند و زمان بیشتری را برای تجمع جهش‌هایی در اختیار داشته باشند که منجر به افزایش تهاجم^{۲۱}، رگ‌زایی^{۲۲} و تکثیر سلولی در طول پیشرفت تومور می‌شود [۱۶].

اتوفاژی^{۲۳} با حذف ماکرومولکول‌ها و اندامک‌های آسیب‌دیده نقش اساسی در حفظ هموستاز سلولی و یکپارچگی ژنومی دارد؛ به طوری که نقص در این مسیر می‌تواند از طریق ایجاد استرس‌های اکسیداتیو، آسیب به DNA و ناپایداری کروماتین، منجر به تجمع جهش‌های آنکوژنی و افزایش تومورزایی شود [۱۷].

هدف از مطالعه حاضر بررسی اثر ضد سرطانی Oxypeucedanin methanolate خالص شده از گیاه *Ferulago trifida Boiss* بر روی رده سلولی A549 سرطان ریه و آنالیز بیان ژن‌های آپوپتوزی BAX، caspase3، BCL2 و ژن اتوفاژی LC3 بود. علاوه بر آن، در این مطالعه، میزان آپوپتوز توسط روش فلو سایتومتری بررسی شد. در انتها نیز میزان تهاجم سلول‌ها توسط روش ترمیم زخم بررسی شد.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱ کشت سلول

²² Angiogenesis

²³ Autophagy

¹⁹ Apoptosis

²⁰ Degenerative disease

²¹ Metastasis

حجم نهایی آن با آب دو بار تقطیر به ۲۰ میکرولیتر رسانده شد. سپس، سنتز cDNA با برنامه زمانی-دمایی به صورت ۱۰ دقیقه در ۲۵ درجه سانتی‌گراد، ۶۰ دقیقه در ۴۷ درجه سانتی‌گراد، ۵ دقیقه در ۸۵ درجه سانتی‌گراد و ۱۵ دقیقه در ۴ درجه سانتی‌گراد توسط دستگاه سنتز cDNA (Corbett Research، استرالیا) انجام شد. پرایمر برای ژن های هدف BAX، caspase-3، BCL2 و LC3 و ژن GAPDH به‌عنوان کنترل داخلی استفاده شد. واکنش Real-time PCR شامل ۵ میکرولیتر RealQ Plus 2x (Master Mix Green)، ۱ میکرولیتر از پرایمرهای پیشرو و پسر، ۰/۵ میکرولیتر cDNA و مابقی آن توسط آب دوبار تقطیر به حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر رسانده شد. در نهایت واکنش Real-time PCR با استفاده از دستگاه (Applied Biosystem/StepOne Real Time PCR System، آمریکا) با شرایط زمانی-دمایی شامل ۴۰ چرخه مشتمل بر ۱۵ ثانیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد و ۳۰ ثانیه در ۶۰ درجه سانتی‌گراد و یک دقیقه در ۷۳ درجه سانتی‌گراد انجام شد. در نهایت اختلاف چرخه‌های آستانه به‌دست آمده از نمونه‌های تیمار و کنترل محاسبه شد و با استفاده از فرمول $\Delta\Delta C_T$ نسبت ژن هدف به ژن مرجع از طریق $2^{-\Delta\Delta C_T}$ توسط نرم‌افزار Excel محاسبه شد.

۲-۵ آزمون ترمیم زخم^{۲۴}

میزان تهاجم سلول‌ها توسط آزمون ترمیم زخم ارزیابی شد. در ابتدا سلول‌ها در پلیت شش خانه با محیط کشت حاوی FBS ۱۰ درصد کشت داده شدند و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور قرار داده شدند تا به تراکم ۸۰-۹۰ درصد رسیدند. پس از آن توسط سرسمپلر ۲۰۰ میکرولیتر، خراشی در تک‌لایه‌ی سلول‌ها در مرکز پلیت ایجاد شد. پس از ایجاد خراش، محیط سلول‌ها به همراه سلول‌های کنده شده به‌طور کامل دور ریخته شد. میزان تهاجم سلول‌ها در زمان‌های ۰، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت توسط

جداسازی شد و بلورهای فورمازان تولید شده توسط سلول‌های زنده در DMSO (۱۰۰ میکرولیتر در هر چاهک) حل شدند. سپس، جذب نمونه‌ها با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر میکروپلیت (Epoch، BioTek، آمریکا) در طول موج ۵۷۰ نانومتر خوانده و ثبت شد. میزان حیات نسبی سلول‌ها توسط نرم‌افزار Excel محاسبه شد. همچنین، میزان غلظت ۵۰ درصد کشندگی (LC50) نیز بررسی شد.

۲-۳ فلوسایتومتری

برای بررسی میزان آپوپتوز در سلول‌های A549 تیمار شده با oxypeucedanin methanolate، این سلول‌ها با استفاده از کیت (Annexin V-FITC/PI Apoptosis Detection Kit) و دستگاه فلوسایتومتر (BD Calibur BD FACS، San Jose, CA, USA) biosciences، بر اساس دستورالعمل‌های مربوط، مطالعه شدند. تعداد 25×10^4 سلول به مدت ۴۸ ساعت با غلظت LC50 تیمار شدند و سلول‌های تیمار نشده به‌عنوان کنترل استفاده شدند. رنگ FITC و PI توسط لیزر ۴۸۸ نانومتر تحریک شده و در دو کانال ۵۳۰ نانومتر و ۶۱۰-۵۷۵ نانومتر نشر پیدا کردند.

۲-۴ روش Real-time PCR

میزان بیان ژن‌های آپوپتوزی BAX، caspase-3، BCL2 و ژن اتوفازی LC3 با استفاده از روش Real-time PCR سنجیده شد. در ابتدا RNA سلول‌های تیمار شده و تیمار نشده (نمونه کنترل) با استفاده از کیت استخراج RNA (Total RNA Extraction Kit) طبق دستورالعمل آن استخراج شد و غلظت RNA استخراج شده برای نمونه تیمار و کنترل توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر میکروپلیت (Epoch، BioTek، آمریکا) اندازه‌گیری شد. سنتز cDNA توسط کیت (Easy™ cDNA Synthesis Kit) انجام شد. مخلوط واکنش شامل ۵ میکروگرم از RNA، ۲ میکرولیتر مخلوط آنزیم و ۱۰ میکرولیتر مخلوط بافر می‌باشد که

²⁴ Wound healing assay

۵۰ درصد رسیده و توان حیاتی سلول‌ها به ۴۶ درصد کاهش یافته است و این غلظت در ۴۸ ساعت به عنوان غلظت نهایی برای انجام تحقیقات بعدی انتخاب شد (شکل ۲).

۲-۳ بررسی میزان آپوپتوز با روش فلوسایتومتری

برای تعیین میزان آپوپتوز القاء شده در سلول‌های A549، این سلول‌ها توسط رنگ‌های AnnexinV-FITC و PI رنگ‌آمیزی شده و توسط دستگاه فلوسایتومتر مطالعه شدند. نتایج فلوسایتومتری در شکل ۳ نشان داده شده که در آن مربع بالا سمت چپ (Q₁) نشان‌دهنده سلول‌های نکروز یافته، مربع بالا سمت راست (Q₂) نشان‌دهنده آپوپتوز ثانویه، مربع پایین سمت راست (Q₃) نشان‌دهنده آپوپتوز اولیه و مربع پایین سمت چپ (Q₄) نشان‌دهنده سلول‌های زنده می‌باشد که بر طبق این نتایج میزان آپوپتوز سلول‌ها با غلظت Oxypeucedanin methanolate LC50 نسبت به نمونه کنترل (۲۴/۱۴ درصد) می‌باشد.

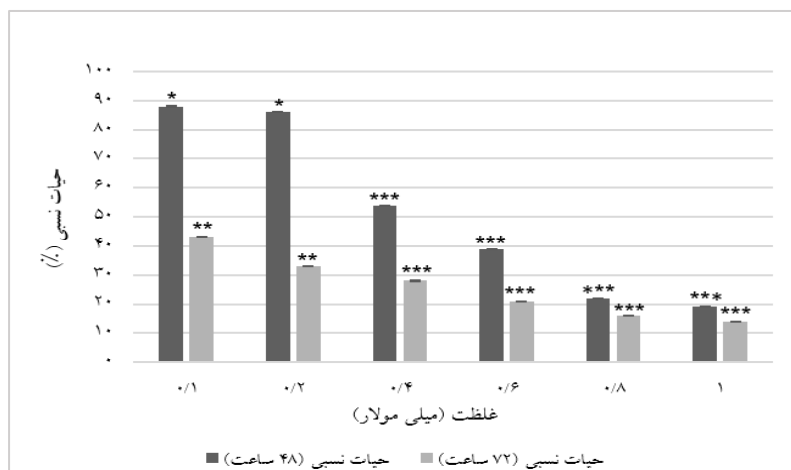
میکروسکوپ معکوس (Inverted Microscope, Nikon) بررسی و عکس برداری انجام شد. در نهایت اندازه شکاف‌ها توسط نرم‌افزار Image J ارزیابی شد و مقایسه اندازه شکاف‌ها در حالت تیمار نشده و تیمار شده نسبت به زمان صفر توسط نرم‌افزار Excel محاسبه شد.

۳- نتایج

۱-۳ تیمار سلول‌های A549 با Oxypeucedanin

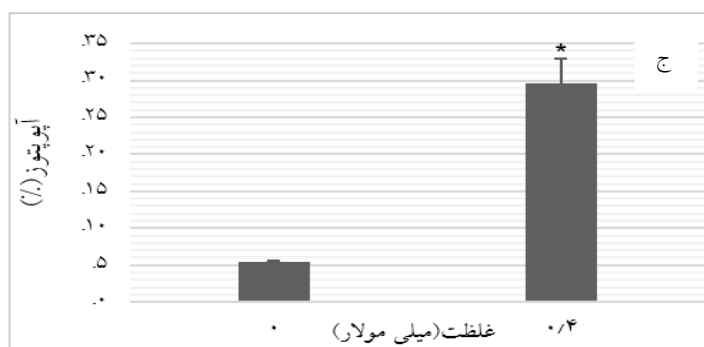
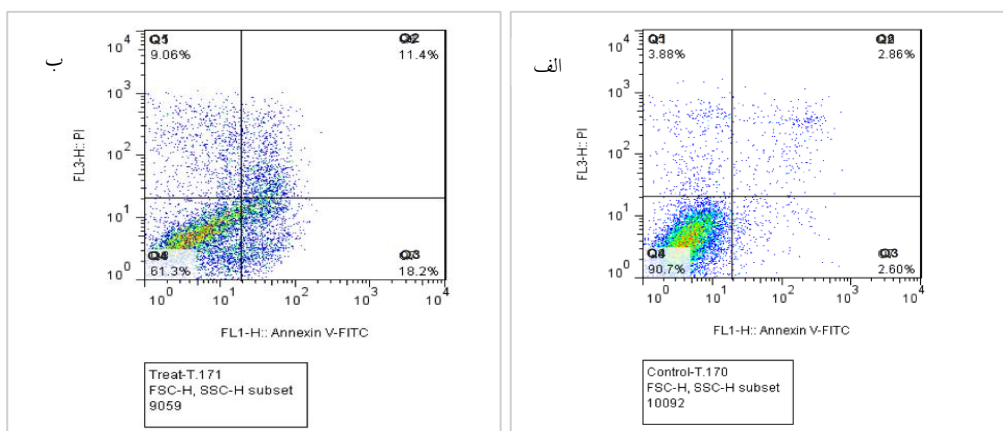
methanolate در مدت زمان ۴۸ و ۷۲ ساعت

تیمار سلول‌های A549 با غلظت‌های مختلف ۰/۱، ۰/۲، ۰/۴، ۰/۶، ۰/۸ و ۱ میلی‌مولار Oxypeucedanin methanolate با استفاده از روش MTT طی مدت زمان ۴۸ و ۷۲ ساعت انجام شد. بر اساس روش آماری (T-TEST) گروه‌های تیمار نسبت به گروه کنترل مقایسه شدند و حیات نسبی آن‌ها توسط نرم‌افزار Excel محاسبه شد. نتایج نشان می‌دهد که با زیاد شدن غلظت عصاره دارویی و زمان انکوباسیون، اثر کشندگی افزایش می‌یابد و میزان کاهش جمعیت سلولی تا حدود ۸۰ درصد در ۴۸ ساعت و ۸۵ درصد در ۷۲ ساعت پیش می‌رود. در غلظت ۰/۴ میلی‌مولار در ۴۸ ساعت، تقریباً کشندگی سلول‌ها به



شکل ۲ درصد حیات نسبی سلول‌های A549 در برابر غلظت‌های مختلف Oxypeucedanin methanolate در مدت زمان ۴۸ و ۷۲ ساعت. نتایج به صورت درصد حیات نسبی نسبت به نمونه کنترل گزارش شده است. (***) $P < 0.001$, (**) $P < 0.01$, (*) $P < 0.05$.

(الف)



شکل ۳ نتایج آزمون فلوسایتومتری تحت تأثیر Oxypeucedanin methanolate بر رده A549. الف) سلول‌های کنترل، ب) سلول‌های تیمار شده، ج) نمودار میزان آپتوز در غلظت‌های ۰ و ۰/۴ میلی‌مولار را نشان می‌دهد (* $P < 0.5$).

داده است که میزان تهاجم سلول‌های تیمار نشده در زمان ۷۲ ساعت در مقایسه با زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت نسبت به کنترل (زمان ۰)، به میزان چشمگیری افزایش یافته است. در حالی که سلول‌های تیمار شده تهاجمی را نشان نداده‌اند و میزان رشد آن‌ها کاهش یافته است (شکل ۵).

۴- بحث

ترکیبات طبیعی منبع عظیمی از ترکیبات زیست‌فعال^{۲۵} با تنوع ساختاری فراوان هستند که به‌طور گسترده برای کشف ترکیبات ضدسرطانی بررسی شده‌اند.

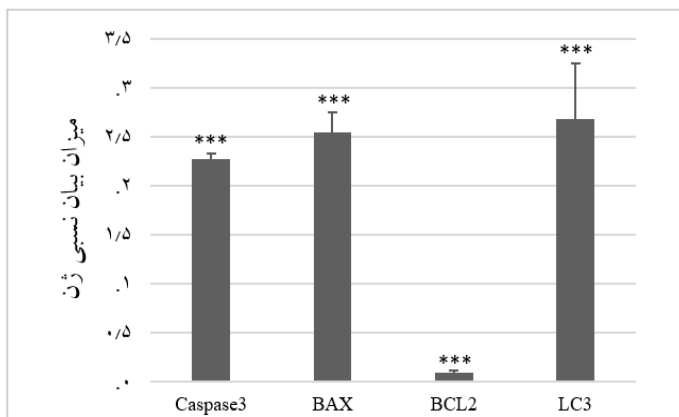
۳-۳ بررسی بیان ژن‌ها با روش Real-time PCR

طبق نتایج به‌دست آمده از Real-time PCR نشان داده شد که میزان بیان ژن‌های BAX، caspase-3 و LC3 تحت تأثیر Oxypeucedanin methanolate به‌صورت معناداری افزایش پیدا کرده است؛ در حالی که میزان بیان ژن BCL2 به‌صورت معناداری کاهش یافته است. میزان بیان ژن‌های مزبور در شکل ۴ مشخص شده است.

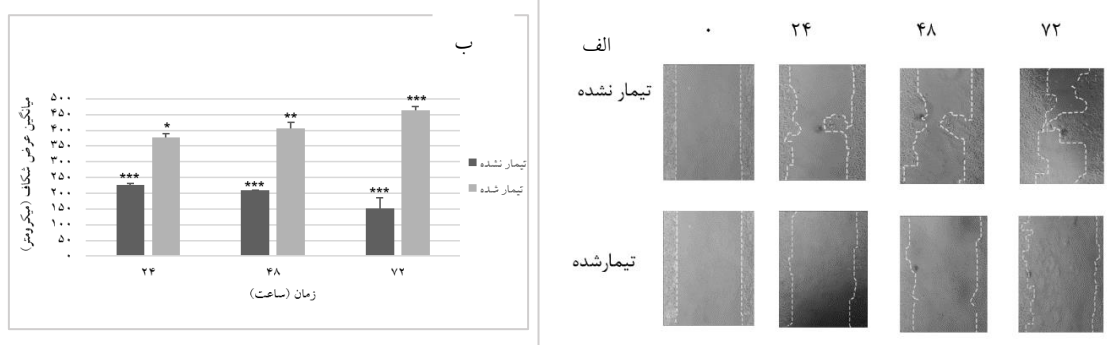
۳-۴ بررسی میزان تهاجم سلولی

اثر Oxypeucedanin methanolate بر تهاجم سلول‌های A549 توسط آزمون ترمیم زخم ارزیابی شد. نتایج نشان

²⁵ Bioactive compounds



شکل ۴ بررسی بیان ژن‌های Caspase-3، BAX، BCL2، و LC3 توسط روش Real-time PCR. میزان بیان ژن‌ها نسبت به کنترل داخلی (GAPDH) ارزیابی شده است. (***) $P < 0.001$.



شکل ۵ آزمون ترمیم زخم سلول‌های A549 در تیمار دارویی با Oxypeucedanin methanolate (الف) تصویر میزان تهاجم سلول‌های تیمار نشده و تیمار شده در زمان ۰، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت. (ب) نمودار میانگین اندازه شکاف در شرایط تیمار نشده و تیمار شده سلول‌ها در زمان‌های ۰، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت که در آن میانگین اندازه شکاف نمونه تیمار نشده و تیمار شده نسبت به زمان ۰ هرکدام از نمونه‌ها ارزیابی شده است. (* $P < 0.05$ ، ** $P < 0.01$ ، *** $P < 0.001$).

می‌شود [۱۹]. سلول‌های سرطانی با تغییر در ژن‌هایی که در تنظیم فرایند آپوپتوز دخیل هستند، منجر به فرار این سلول‌ها از آپوپتوز می‌شوند [۲۰]. اکثر ترکیبات ضدسرطانی از طریق القای مرگ برنامه‌ریزی شده منجر به حذف این سلول‌های سرطانی می‌شوند [۲۱]. از طرفی نیز اتوفازی به‌عنوان یک مکانیسم مقاومتی برای زنده ماندن در محیط رشد نامطلوب عمل می‌کند که اختلال در این فرایند با تومورزایی در ارتباط است [۱۷].

کومارین‌ها گروهی از ترکیبات طبیعی هستند که فعالیت ضدسرطانی آن‌ها بر روی انواع مختلفی از سلول‌های سرطانی گزارش شده است [۱۴-۱۱]. آپوپتوز و اتوفازی مسیرهایی از مرگ برنامه‌ریزی شده سلول هستند که به شدت با یکدیگر مرتبط هستند و در حفظ هوموستاز سلولی نقش دارند [۱۸]. آپوپتوز نوعی مرگ برنامه‌ریزی شده سلول است که بدون آسیب به سلول‌ها و یا بافت‌های اطراف، منجر به حذف سلول‌های ناخواسته و آسیب‌دیده

و با همکاری گروه فارماکوجنزوی دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تهران به اجرا درآمده است. بدین وسیله از همه عزیزانی که در انجام این پژوهش همکاری نموده‌اند کمال تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

۶- منابع

- [1] Thakur C. (2019) An Overview, Current Challenges of Drug Resistance, and Targeting Metastasis Associated with Lung Cancer. *Nanotechnology-Based Targeted Drug Delivery Systems for Lung Cancer*. 1, 21-38.
- [2] Sutherland KD, Berns A. (2010) Cell of origin of lung cancer. *Molecular oncology*. 4(5), 397-403.
- [3] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. (2021) Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*. 71, 209-249.
- [4] Salmenkivi K, Knuutila A. (2014) Diagnostics of non-small cell lung carcinoma. *Duodecim; laaketieteellinen aikakauskirja*. 130,701-704.
- [5] Rosenzweig K. (2017) Stereotactic Body Radiation Therapy as an Alternative to Surgery in Early-Stage Non-Small-Cell Lung Cancer. *Oncology (08909091)*. 31,492-498
- [6] Wan Y, Yuan Y, Pan Y, Zhang Y. (2017) Antitumor activity of high-dose pulsatile gefitinib in non-small-cell lung cancer with acquired resistance to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors. *Experimental and therapeutic medicine*. 13,3067-3074.
- [7] Zhang K, Yuan Q. (2016) Current mechanism of acquired resistance to epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitors and updated therapy strategies in human nonsmall cell lung cancer. *Journal of cancer research and therapeutics*. 12,131-137.
- [8] Wu L, Wang X, Xu W, Farzaneh F, Xu R. (2009) The structure and pharmacological functions of coumarins and their derivatives. *Current medicinal chemistry*. 16, 4236-4260.
- [9] Stefanachi A, Leonetti F, Pisani L, Catto M, Carotti A. (2018) Coumarin: A natural, privileged and versatile scaffold for bioactive compounds. *Molecules*. 23,250.
- [10] Ren QC, Gao C, Xu Z, Feng LS, Liu ML, Wu X, Zhao F. (2018) Bis-coumarin derivatives and their biological activities. *Current topics in medicinal chemistry*. 18,101-113.
- [11] Lin MH, Cheng CH, Chen KC, Lee WT, Wang YF, Xiao CQ, Lin CW. (2014) Induction of ROS-independent JNK-activation-mediated apoptosis by a novel coumarin-derivative, DMAC, in human

در این مطالعه، ابتدا توسط آزمون MTT نشان دادیم که Oxypeucedanin methanolate فعالیت مهارکنندگی رشد را بر روی سلول‌های A549 داشته است. علاوه بر آن نتایج حاصل از فلوسایتومتری و Real-time PCR القاء مسیر آپوپتوز را تحت تأثیر Oxypeucedanin methanolate بر روی سلول‌های A549 مورد تأیید قرار داده است. کاسپازها و پروتئین‌های اعضای خانواده Bcl-2 نقش مهمی در مسیر آپوپتوز دارند [۲۲]. محرک‌های سیتوتوکسیک با مهار کردن پروتئین‌های ضد آپوپتوزی اعضای خانواده Bcl-2 و فعال کردن پروتئین‌های پیش آپوپتوزی Bax منجر به فعال شدن کاسپازهای اجرایی مانند کاسپاز-۳ می‌شوند [۲۳]. نتایج ما نشان داده است که Oxypeucedanin methanolate با کاهش بیان BCL2 و افزایش بیان BAX و caspase-3، می‌تواند منجر به راه انداختن مسیر آپوپتوز وابسته به کاسپاز شود. علی‌رغم این، افزایش بیان LC3 به‌عنوان مهم‌ترین نشانگر اتوفژی می‌تواند گویای به راه افتادن مسیر اتوفژی نیز باشد. از سویی افزایش بیان BCL2 با مهار Beclin-1 به‌عنوان تنظیم‌کننده مهم اتوفژی، منجر به مهار اتوفژی می‌شود [۲۴]. بنابراین، کاهش بیان BCL2 با فعال شدن مسیر اتوفژی نیز در ارتباط می‌باشد. مطالعات اخیر نشان داده است که برخی از ترکیبات کومارینی می‌تواند منجر به القای اتوفژی سلول‌های سرطان‌های پستان و ریه شود [۲۵ و ۲۶].

از سویی نتایج حاصل از آزمون ترمیم زخم می‌تواند تا حدودی نشان‌دهنده جلوگیری از متاستاز توسط تیمار Oxypeucedanin methanolate بر روی سلول‌های A549 باشد.

۵- سپاس و قدردانی

این مطالعه بخشی از پایان‌نامه خانم آمنه غلامی دانشجوی دوره کارشناسی ارشد است که با حمایت گروه علوم سلولی و مولکولی دانشکده زیست‌شناسی دانشگاه تهران

- [20] Fernald K, Kurokawa M. (2013) Evading apoptosis in cancer. *Trends Cell Biol*; 23(12), 620-633.
- [21] Kiess W, Gallaher B. (1998) Hormonal control of programmed cell death/apoptosis. *Eur J Endocrinol*; 138, 482-491.
- [22] Ashkenazi A, Salvesen G. (2014) Regulated cell death: signaling and mechanisms. *Annual review of cell and developmental biology*. 30,337-356.
- [23] Czabotar PE, Lessene G, Strasser A, Adams JM. (2014) Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nature reviews Molecular cell biology*. 15,49-63.
- [24] Nakahira K, Cloonan SM, Mizumura K, Choi AM, Ryter SW. (2014) Autophagy: a crucial moderator of redox balance, inflammation, and apoptosis in lung disease. *Antioxidants & redox signaling*. 20,474-494.
- [25] Ren G, Luo W, Sun W, Niu Y, Ma DL, Leung CH, Wang Y, Lu JJ, Chen X. (2016) Psoralidin induced reactive oxygen species (ROS)-dependent DNA damage and protective autophagy mediated by NOX4 in breast cancer cells. *Phytomedicine*. 23,939-947.
- [26] Suparji NS, Chan G, Sapili H, Arshad NM, In LL, Awang K, Hasima Nagoor N. (2016) Geranylated 4-Phenylcoumarins exhibit anticancer effects against human prostate cancer cells through caspase-independent mechanism. *PloS one*. 11.
- colon cancer cells. *Chemico-biological interactions*. 218, 42-49.
- [12] Wang G, Lu M, Yao Y, Wang J, Li J. (2017) Esculetin exerts antitumor effect on human gastric cancer cells through IGF-1/PI3K/Akt signaling pathway. *European journal of pharmacology*. 814,207-215.
- [13] Musa MA, Cooperwood JS, Khan MO. (2008) A review of coumarin derivatives in pharmacotherapy of breast cancer. *Current medicinal chemistry*. 15,2664-2679.
- [14] Zhang H, Feng QQ, Gong JH, Ma JP. (2018) Anticancer effects of isofraxidin against A549 human lung cancer cells via the EGFR signaling pathway. *Molecular medicine reports*. 18,407-414.
- [15] Tavakoli S, Delnavazi MR, Hadjiaghaee R, Jafari-Nodooshan S, Khalighi-Sigaroodi F, Akhbari M, Hadjiakhoondi A, Yassa N. (2018) Bioactive coumarins from the roots and fruits of *Ferulago trifida* Boiss., an endemic species to Iran. *Natural product research*. 32,2724-2728.
- [16] Pfeffer CM, Singh AT. (2018) Apoptosis: a target for anticancer therapy. *International journal of molecular sciences*. 19,448.
- [17] KS. (2012) Autophagy and cancer. *Experimental & molecular medicine*. 44,109-120.
- [18] Su M, Mei Y, Sinha S. (2013) Role of the crosstalk between autophagy and apoptosis in cancer. *Journal of oncology*. 2013.
- [19] Elmore S. (2007) Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*. 35(4), 495-516.

Anti-cancer effect of Oxypeucedanin methanolate purified from *Ferulago trifida Boiss* plant on A549 lung cancer cell line

Amene Gholami¹, Seyed Jalal Zargar^{*2}, Saeed Tavakoli³

1. Department of Cell & Molecular Biology, School of Biology, College of Science, University of Tehran, Tehran, Iran

2. Medicinal Plants Research Center, Institute of Medicinal Plants, ACECR, Karaj, Iran

3. Assistant Professor, Medicinal Plants Research Center, Institute of Medicinal Plants, ACECR, Karaj, Iran

Zargar@ut.ac.ir

Receipt: 2021/11/07

Accepted: 2022/04/13

Abstract

Lung adenocarcinoma is the most primary histologic subtype of non-small cell lung cancer (NSCLC). Oxypeucedanin methanolate, a member of furanocoumarin, is a naturally occurring compound, which is isolated from *Ferulago trifida Boiss*, an endemic species in North-West of Iran. We attempt to uncover the capacities of oxypeucedanin methanolate to induce apoptosis and autophagy in NSCLC cells, as well as the underlying mechanism involved in this process. The effect of oxypeucedanin methanolate on cell viability was evaluated on A549 cells by MTT assay. Flow cytometry assay was used to detect cellular apoptosis. Expression levels of BAX, caspase-3, BCL2 and LC3 in A549 cells were measured by Real time quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (Real time RT-PCR). A549 cells migration were analyzed using a wound- healing assay. Oxypeucedanin methanolate inhibited A549 cell proliferation in dose- and time- dependent manner, as evaluated by MTT assay. The total apoptosis rate was (5.46%) for A549 cells not treated with oxypeucedanin methanolate. In contrast, the apoptosis rate was (29.6%) for A549 cells treated with oxypeucedanin methanolate at the concentration of 0.4 mM. Real time RT-PCR revealed that the mRNA expression of BAX, caspase-3 and LC3 were upregulated, while mRNA expression of BCL2 was downregulated. Untreated cell migration increased significantly after 72 hours. Oxypeucedanin methanolate inhibits proliferation and it could induce apoptosis and autophagy of human non-small cell lung cancer cell line A549. Oxypeucedanin methanolate may be a good candidate for reducing of A549 cells metastasis.

Keywords: Non-Small Cell Lung Cancer, Coumarin, Oxypeucedanin methanolate, Apoptosis, Autophagy.