Journal of Cell and Tissue 16(2), Summer (2025) 185-199

Journal of Cell and Tissue
https://jct.araku.ac.ir
ISSN: 2345-3567

Apoptosis-promoting effect of Augerin B in HT29 colorectal cancer cell line

Amini E[a*], Shakeri A[b], Sheikholeslami A[c]

[a] Department of Animal Biology, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran

[b] Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

[c] Department of Mesenchymal Stem Cells, Academic Center for Education, Culture and Research (ACECR), Qom, Iran

Original Article

Use your device to scan and read the article online

Citation: Amini E, Shakeri A, Sheikholeslami A. Apoptosis-promoting effect of Augerin B in HT29 colorectal cancer cell line. Journal of Cell and Tissue. 2025; 16(2):185-199.

https://doi.org/10.61882/JCT.185

KEYWORDS

apoptosis colorectal neoplasms caspases tumor suppressor gene

EXTENDED ABSTRACT

Introduction: Colorectal cancer (CRC) is the second most commonly diagnosed malignant tumor in the world, with about 1,926,425 new cases estimated for 2022. The most therapeutic approaches for CRC include surgery, chemotherapy, targeted medicine, and radiation therapy. Each of these treatments exerts side effects such as fatigue, constipation, loss of appetite, and low blood cell counts. Natural products have provided valuable anticancer effects for years. An increasing number of studies have elucidated that plant-based natural compounds can act as an alternative chemotherapy option against CRC. It has been demonstrated that herbal bioactive compounds such as flavonoids, alkaloids, peptides, terpenoids, and steroids have the potential to effectively treat CRC. Sesquiterpenoid lactones, a subclass of terpenoid compounds, have been shown to induce anti-tumor effects. Aguerin B, a sesquiterpene lactone, exhibits cytotoxic effects against some types of tumors.

Aims: The current study aims to investigate the effect of Aguerin B on HT29 colorectal cancer, and assess the molecular mechanism of Aguerin B in colorectal cancer by evaluating the type of cell death it induces and its effect on the expression of the tumor suppressor gene p53 in HT29 colorectal cancer cells.

Materia and Methods: Colorectal cancer cells were purchased from the Iranian Biological Resource Center. HT29 cells were cultured in DMEM medium enriched with 10% fetal bovine serum and 1% antibiotics in 96-well plates. After 24 hours, the cells were treated with Aguerin B (variable concentrations from 1 to 8 µg/ml) for 24 and 48 hours. Cell viability was assessed using the MTT assay. Acridine orange-propidium iodide staining, caspase-3 and caspase-9 activity assays, using DCF-DA

* Corresponding author. Tel :+989159517523; Fax: 00982061-450005
E-mail address: elaheh.amini@khu.ac.ir
DOI: https://doi.org/10.61882/JCT.185
Received: 15 Apr. 2025; Received in revised form: 21 May. 2025; Accepted: 25 May. 2025
Original Article
© Author

kits, were used to determine the type of cell death induced by Aguerin B. Additionally, qRT-PCR was used to evaluate p53 expression at the transcriptional level.

Results: The findings demonstrated that Aguerin B exerts cytotoxic effects on colorectal cancer cells in a dose- and time-dependent manner, with an IC50 (Inhibitory Concentration) value of 4.6 µg/ml. Acridine orange-propidium iodide staining confirmed apoptosis induction at the IC50 concentration of Aguerin B. The cultivated activity of caspase-3 and -9, along with elevated ROS levels, indicated apoptosis induction via the mitochondrial pathway. Furthermore, the upregulation of p53 suggests the tumor-suppressive effect of Aguerin B in colorectal cancer cells.

Discussion: Among the cell death mechanisms, the induction of apoptosis is a more profound mechanism of cell death mediated by anticancer bioactive compounds extracted from natural sources. Recent investigations have been focused on cancer therapeutic techniques that increase the apoptosis rate in tumor cells by disrupting mitochondrial biogenesis, leading to mitochondrial dysfunction. Caspases, as proteolytic enzymes, play a significant role as effector molecules in the apoptosis-induced cell death pathway. HT29 cells are sensitive to the chemotherapeutic drugs 5-fluorouracil and oxaliplatin, which are standard treatment options for colorectal cancer, and therefore were selected as chemotherapy-responsive colorectal cancer cells in this study. The results of this study exhibited that Aguerin B can induce cytotoxicity and anticancer effects in HT29 colorectal cancer cells in a dose- and time-dependent manner. This compound is also able to induce its properties through the recruitment of the intrinsic pathway, the caspase-dependent pathway in HT29 cells. Nevertheless, the role of p53 mutations in the pathogenesis of CRC has been recognized. The obtained data showed that Aguerin B can exert its anti-cancer potential. Previously, it was found that some natural products, including sesquiterpenoids, can also exert their suppressive effects against cancers by targeting the p53-MDM2 pathway.

Conclusion: Given its potent cytotoxicity and apoptosis-inducing effects, Aguerin B, which can suppress HT29 cells, appears to be an effective compound for obstructing human colorectal cancer cells, warranting further investigation in the pre-clinical phase and clinical studies.

سلول و بافت، دوره ۱۶، شماره ۲، تابستان ۱۴۰۴، صفحات ۱۸۵ تا ۱۹۹

سلول و بافت

شاپا الکترونیکی: ۳۵۶۷-۲۳۴۵

اثر پیش‌برنده آپوپتوزیس آگرین‌بی (Augerin B) در رده سلولی سرطان کولورکتال HT29

الهه امینی*[۱]، ابوالفضل شاکری[۲]، آذر شیخ الاسلامی[۳]

[۱] استادیار، گروه علوم جانوری، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران

[۲] دانشیار، گروه فارماکوگنوزی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، ایران

[۳] استادیار، گروه پژوهشی بیولوژی سلولی و پزشکی بازساختی، جهاد دانشگاهی واحد استان قم، قم، ایران

واژگان کلیدی

آپوپتوزیس
نئوپلاسم‌های کولورکتال
کاسپاز ۹
سرکوبگر تومور

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۱/۲۶

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۴/۰۲/۳۱

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۳/۰۴

چکیده

هدف: در سال‌های اخیر فراورده‌های طبیعی اثرات ضد سرطان ارزشمندی ارائه کرده‌اند. جهت درک مکانیسم مولکولی اثر آگرین‌بی (Aguerin B) در سرطان کولورکتال، هدف این پژوهش بررسی نوع مرگ سلولی القا شده توسط آگرین‌بی و بیان فاکتور سرکوب‌گر تومور p53 در سلول‌های سرطان کلورکتال HT29 است. **مواد و روش‌ها:** سلول‌های سرطان کلورکتال در محیط کشت DMEM غنی شده با ۱۰ درصد سرم جنین گاوی و ۱ درصد آنتی بیوتیک پنی سیلین-استرپتومایسین درون پلیت ۹۶ خانه کشت شد. پس از گذشت ۲۴ ساعت، سلول‌ها توسط آگرین‌بی (غلظت‌های ۱ تا ۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر) به‌مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت تیمار شدند. آزمون MTT جهت ارزیابی بقای سلول‌ها، رنگ‌آمیزی اکریدین-اورنج-پروپودیوم-یداید، کیت کاسپاز ۳، ۹ و کیت DCF-DA جهت تعیین نوع مرگ سلولی القا شده توسط آگرین‌بی و از qRT-PCR جهت ارزیابی بیان p53 در سطح رونویسی استفاده شد. **نتایج:** یافته‌ها نشان داد آگرین‌بی به‌صورت وابسته به دوز و زمان موجب القای اثرات سیتوتوکسیک در سلول‌های سرطان کولورکتال می‌شود. غلظت ۴/۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر به‌عنوان غلظت میانه مهاری (IC50) مشخص شد. رنگ آمیزی اکریدین-اورنج-پروپودیوم-یداید نشان‌دهنده القای آپوپتوزیس تحت تیمار با غلظت میانه مهاری آگرین‌بی بود. افزایش فعالیت کاسپاز ۳ و ۹ و افزایش میزان ROS، نشان‌دهنده القای آپوپتوزیس از طریق مسیر میتوکندری تحت تیمار با آگرین‌بی بود. به‌علاوه، افزایش بیان p53 نشان‌دهنده اثر سرکوب‌گر تومور تحت تیمار با آگرین‌بی بود. **نتیجه‌گیری:** با توجه به اعمال سمیت موثر و اثر القاکننده آپوپتوزیس، آگرین‌بی به‌عنوان یک ترکیب موثر در مهار سلول‌های سرطان کولورکتال انسانی HT29 در مطالعات پیش بالینی و بالینی پیشنهاد می‌شود.

۱- مقدمه

سرطان کولورکتال (CRC: colorectal cancer) چهارمین سرطان شایع و دومین علت مرگ ناشی از سرطان در ایالات متحده است. مدیریت درمان CRC که از حالت موضعی خارج و حالت متاستازی پیدا کرده است شامل داروهای مختلف، چه به‌صورت ترکیبی و چه به‌صورت منفرد است. انتخاب درمان بر اساس در نظر گرفتن اهداف درمان، نوع و زمان درمان قبلی،

* نویسنده مسئول؛ تلفن:۰۹۱۵۹۵۱۷۵۲۳ ؛ فکس: ۴۵۰۰۰۵-۰۲۶۱

آدرس پست الکترونیک: elaheh.amini@khu.ac.ir

مشخصات جهشی تومور و پروفایل‌های سمیت متفاوت داروهای تشکیل دهنده است (۱). در اواخر دهه ۱۹۹۰، سرطان کولورکتال چهارمین عامل مرگ و میر ناشی از سرطان در افراد زیر ۵۰ سال بود، اما در حال حاضر اولین عامل مرگ و میر در مردان و دومین عامل مرگ و میر در زنان به‌شمار می‌رود. انجمن سرطان آمریکا برآورد کرده است که در سال ۲۰۲۴، ۱۵۲۸۱۰ نفر در ایالات متحده به سرطان روده بزرگ مبتلا خواهند شد و ۵۳۰۱۰ نفر بر اثر این بیماری جان خود را از دست خواهند داد (۲).

عوامل مختلفی مانند سابقه خانوادگی، بیماری‌هایی مانند دیابت نوع ۲، بیماری‌های التهابی روده، چاقی و رژیم غذایی عاری از فیبر، سن بالا، مصرف نوشیدنی‌های الکلی و سیگار در ابتلا به سرطان کولورکتال نقش اساسی دارند (۳). افرادی که در رژیم غذایی آن‌ها مقدار زیادی از چربی‌های ترانس، کلسترول، کربوهیدرات و الکل دیده می‌شود در مقایسه با افرادی که به‌طور مکرر فیبر، سلنیوم، کلسیم، روی و منیزیم، ویتامین‌هایی نظیر B_{12} و B_6، امگا ۳ ، امگا ۶، مصرف می‌کنند، احتمال ابتلای CRC در آن‌ها بیشتر است (۴). به‌طور کلی روش‌های درمان سرطان کولورکتال شامل شیمی‌درمانی، پرتو درمانی، جراحی، و روش‌های ترکیبی است که هر یک دارای معایبی همچون القای عوارض جانبی بر بافت‌های نرمال، عود و رشد مجدد تومور هستند (۵).

مطالعات نشان داده است ناهنجاری در عملکرد آپوپتوزیس در پاتوژنز سرطان کولورکتال (آغاز و پیشرفت سرطان) و مقاومت نسبت به روش‌های درمان و داروهای شیمیایی نقش دارد. از این‌رو القای آپوپتوزیس مکانیسم اصلی اعمال سمیت سلولی برای انواع روش‌های درمان سرطان کولورکتال از جمله شیمی‌درمانی و پرتودرمانی به شمار می‌رود (۶). در سال ۲۰۲۲، محققین نشان دادند سلول‌های سرطانی که درون تومور تحت آپوپتوزیس قرار گیرند از طریق فعال‌سازی کاسپازها قادر به رهایش فاکتورهای جاذب شیمیایی از جمله اینترلوکین ۸ هستند که نوتروفیل‌ها را به‌سمت توده توموری جذب می‌کند (۷).

p53 یک فاکتور رونویسی القا شده توسط استرس است که ژن‌های پایین دست متنوعی را برای اعمال عملکرد تنظیمی در فرآیندهای سیگنالینگ متعدد تنظیم می‌کند. تقریبا در ۵۰-۴۰ درصد از سرطان کولورکتال اسپورادیک جهش p53 رخ می‌دهد که ارتباط نزدیکی با پیشرفت سرطان دارد. انواع مختلف جهش p53 نقش بنیادی در تعیین رفتار بیولوژیکی سرطان کولورکتال از جمله میزان تهاجم و جایگاه متاستاز دارند. به‌علاوه مطالعات نشان داده است بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال که دارای p53 جهش یافته هستند مقاومت بیشتر و پیش آگهی ضعیف‌تری نسبت به شیمی‌درمانی دارند (۸).

در سال‌های اخیر، برخی از ترکیبات کوچک مولکول به‌منظور بررسی فعال‌سازی و بازیابی p53 از طریق مکانیسم‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفته‌اند (۹). در طب سنتی، فراورده‌های طبیعی گیاهی با دارا بودن اثرات ضد تکثیری، آنتی‌اکسیدانت، ضد التهابی و ضد رگ‌زایی به‌عنوان منبع جدیدی از داروهای ضد سرطان شناخته شده‌اند (۱۰). تعدادی از فراورده‌های طبیعی شناسایی شده‌اند که با ایجاد توقف چرخه سلولی و القای آپوپتوزیس، کاهش تکثیر سلولی و رگ‌زایی، مهار تهاجم و متاستاز به سلول‌های تومور، اثرات شیمیایی پیشگیرانه خود را بر سرطان کولورکتال اعمال می‌کنند (۱۱).

سسکوئی‌ترپن لاکتون‌ها گروهی از ترکیبات طبیعی دارای فعالیت ضد سرطان هستند که در گیاهان خانواده Asteraceae به‌وفور وجود دارند و اثرات خود را با واکنش با گروه‌های عاملی موجود بر روی پروتئین‌ها و آنزیم‌ها، به‌ویژه گروه تیول، اعمال می‌کنند (۱۲). اولین بار چیکا و همکاران (۱۳) پس از آنالیز فیتوشیمیایی از بخش هوایی Centaurea *deflexa* فعالیت ضد تکثیری دو سسکوئی‌ترپن لاکتون تحت عنوان آگرین‌بی (Aguerin B) و ۱۵ 15-guaianolide-*nor* را بر روی سلول‌های

سرطانی پانکراس و روده بزرگ انسانی بررسی کردند. نتایج پژوهش آن‌ها نشان داد از بین دو ترکیب تنها آگرین بی‌دارای نقش پیش برنده آپوپتوزیس است و دلیل آن وجود حلقه α-متیلن-γ-لاکتون موجود در آگرین‌بی است.

با وجود تحقیقات پیشین، هدف از انجام این پژوهش بررسی اثر آگرین‌بی بر رده سلولی آدنوکارسینوم کولورکتال انسانی HT29 و بررسی اثر آن بر روی استرس اکسیداتیو، القای آپوپتوزیس و بیان ژن سرکوب‌گر تومور p53 است.

۲- مواد و روش‌ها

تهیه آگرین بی: این ترکیب سسکوئی ترپن لاکتون در مطالعات قبلی از عصاره دی کلرومتان گیاه Centaurea behen توسط کروماتوگرافی بر روی سیلیکاژل با پیک ۱۷۵۰ تا ۱۷۸۰ که مشخصه جذبی حلقه لاکتونی در طیف FTIR است جداسازی و توسط RP-HPLC با خلوص بالای ۹۵ درصد خالص سازی شد و در درمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان استفاده نگه‌داری شد (۱۴).

کشت سلولی: این پژوهش تجربی آزمایشگاهی تحت نظارت و تایید کمیته اخلاق دانشگاه خوارزمی با کد IR.KHU.REC.1402.088 انجام شد. سلول‌های سرطان کولورکتال HT29 از بانک سلولی مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران خریداری شدند. سلول‌ها در محیط DMEM حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (FBS) و آنتی بیوتیک پنی‌سیلین-استرپتومایسین ۱ درصد در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد درون انکوباتور CO_2 ۵ درصد کشت داده شدند.

ارزیابی زنده مانی سلول‌ها: سلول‌های سرطان کولورکتال به تعداد ۵×۱۰^{۳} در هر چاهک از پلیت ۹۶ کشت شدند و به‌مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت تحت تیمار با غلظت‌های مختلف آگرین‌بی از ۱ تا ۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر قرار گرفتند. گروه کنترل، سلول‌های سرطانی بودند که تحت تیمار قرار نگرفتند. جهت بررسی عدم تاثیر حلال اتانول (جهت آماده سازی استوک آگرین‌بی که پس از رقیق سازی با محیط کشت از آن غلظت‌های مختلف تیمار ساخته شد) میزان حلال به‌کار رفته به‌عنوان شم در نظر گرفته شد. پس از گذشت زمان موردنظر، بررسی تراکم سلول‌های گروه‌های تیماری و کنترل زیرمیکروسکوپ اینورت بررسی شد. سپس ۱۰ میکرولیتر MTT (۵ میلی گرم بر میلی‌لیتر) به‌هر چاهک اضافه شد و به‌مدت ۳ تا۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. در نهایت ۸۰ میکرولیتر DMSO جهت انحلال کریستال‌های فورمازان به‌هر چاهک اضافه و در طول موج ۵۶۰ نانومتر جذب نوری خوانش شد. بر اساس جذب نوری نمونه نسبت به کنترل، درصد بقا محاسبه شد.

ارزیابی آپوپتوزیس و نکروز: سلول‌های سرطان کولورکتال به تعداد ۲×۱۰^{۴} کشت شدند و پس از ۴۸ ساعت تیمار با غلظت‌های مهارکننده تکثیر آگرین‌بی توسط تیمار آنزیمی با تریپسین از کف پلیت جدا و پس از شستشو با PBS، با ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون رنگی حاوی ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر آکریدین‌اورنج (AO) و پروپودیوم یداید (PI) رنگ آمیزی و در زیر میکروسکوپ فلورسانس مشاهده شدند.

بررسی فعالیت کاسپاز ۳ و ۹: سلول‌های سرطان کولورکتال به تعداد ۲×۱۰^{۵} کشت شدند. بعد از گذشت ۴۸ ساعت از تیمار، سلول‌های گروه کنترل و تیماری از کف پلیت جدا و پس از سانتریفیوژ، محیط رویی برداشته شده و به هر نمونه ۵۰ میکرولیتر از بافر لیزکننده سلولی موجود در کیت شرکت Abcam کاسپاز ۹ و ۳ به ترتیب (ab39401, ab65607) افزوده شد. سپس نمونه‌ها ۱۰ دقیقه بر روی یخ قرار گرفتند و در دور ۱۰۰۰۰ به‌مدت ۲ دقیقه سانتریفوژ شدند. محیط رویی برای تعیین غلظت

پروتئین به‌روش بردفورد استفاده شد. برای ارزیابی فعالیت کاسپاز، ۵۰ میکرولیتر از DDT و x buffer 2 و ۵ میکرولیتر از سوبسترای کاسپاز ۹ (LEHD-p-NA) و سوبسترای کاسپاز ۳ (DEVD-p-NA) به نمونه کنترل و تیماری اضافه و به‌مدت ۲ ساعت درون انکوباتور انکوبه شدند. سپس، جذب هر نمونه در طول موج ۴۰۰ یا ۴۵۰ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد.

اندازه گیری میزان ROS: سلول‌های سرطان کولورکتال به تعداد ۲×۱۰^{۵} کشت شدند و ۴۸ ساعت تحت تیمار با غلظت میانه مهاری آگرین‌بی قرار گرفتند. تولید گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) با استفاده از کیت DCFDA (2'-7'-دی کلروفورسئین دی استات) و زیر میکروسکوپ فلورسانس به طور کیفی بررسی شد. به‌طور خلاصه، پس از تیمار، سلول‌ها با ۵ میکرومولار رنگ DCFDA به‌مدت ۱۰ دقیقه انکوبه و سپس توسط PBS شستشو شدند. سپس تعیین مقدار ROS درون سلولی با بررسی شدت فلورسنت DCFDA در زیر میکروسکوپ فلورسانس مورد بررسی قرار گرفت.

آنالیز بیان ژن p53 توسط q-RT-PCR: جهت بررسی اثر آگرین‌بی بر بیان ژن سرکوب‌گر تومور P53 بر سلول‌های سرطانی کولورکتال HT29، سلول‌ها به تعداد ۶×۱۰^{۵} درون فلاسک T12.5 کشت داده شدند. پس از ۴۸ ساعت تیمار سلول‌ها با غلظت میانه مهاری این ترکیب، RNA از نمونه کنترل و تیماری استخراج و cDNA توسط کیت پارس طوس سنتز شد.

برای انجام qRT-PCR، ۱۲/۵ میکرولیتر master mix، ۲/۵ میکرولیتر پرایمر و ۱۰ میکرولیتر cDNA برای نمونه کنترل و تیماری مجزا مخلوط و تحت ۳۵ سیکل دمایی (فعال‌سازی در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۵ دقیقه، دناتوراسیون در ۹۵ درجه به‌مدت ۵ ثانیه، اتصال و گسترش در ۶۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ ثانیه) قرار گرفت. داده‌های کمی با روش آستانه مقایسه ای (Ct) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. β-اکتین به‌عنوان ژن مرجع داخلی استفاده شد (جدول ۱). داده‌ها به‌صورت نسبت ژن مرجع به ژن هدف با استفاده از فرمول زیر بیان شد:

$$\Delta Ct = Ct\ (\text{ژن مدنظر}) - Ct\ (\text{ژن مرجع})$$

برای تعیین سطوح بیان نسبی، از فرمول زیر استفاده شد:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct\ (\text{درمان شده}) - \Delta Ct(\text{کنترل})$$

سپس نسبت بیان ژن مدنظر به مرجع در نمونه تیماری نسبت به کنترل از فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$ محاسبه شد.

جدول ۱: توالی پرایمر ژن‌های p53 و β-actin

ژن	توالی پرایمر فوروارد	توالی پرایمر ریورس	دمای ذوب
p53	CCAGGGCAGCTACGGTTTC	CTCCGTCATGTGCTGTGACTG	R: 61/4 F: 61/9
β-actin	GGCTGTATTCCCCTCCATCG	CCAGTTGGTAACAATGCCATGT	F: 59/7 R: 59/3

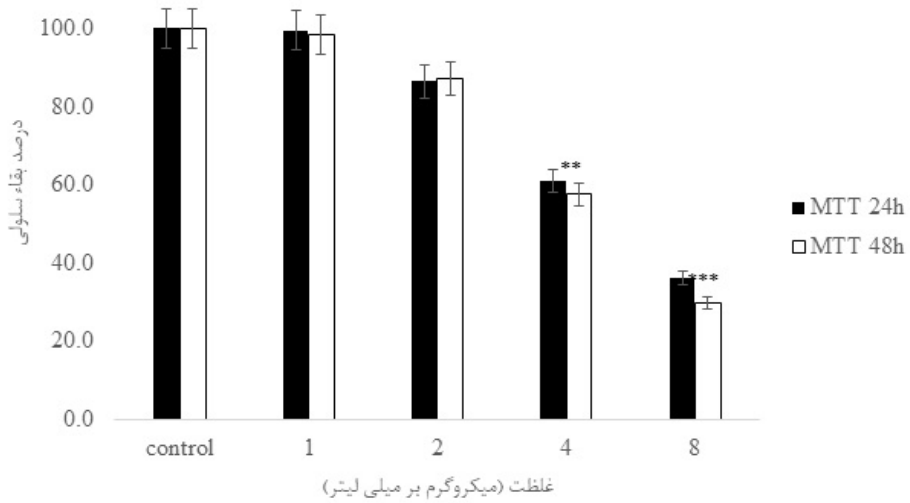
۳- آنالیز آماری

نتایج حاصل پس از سه بار تکرار (n=3) با استفاده از آزمون آماری استنباطی، نرم افزار SPSS 22 و روش one-way ANOVA در مورد آزمون MTT و سایر آزمون‌ها توسط روش student-T test و آزمون تعقیبی توکی تحلیل شد و سطح p<۰/۰۵ به‌عنوان سطح معنی‌دار نظر گرفته شد.

۴- نتایج

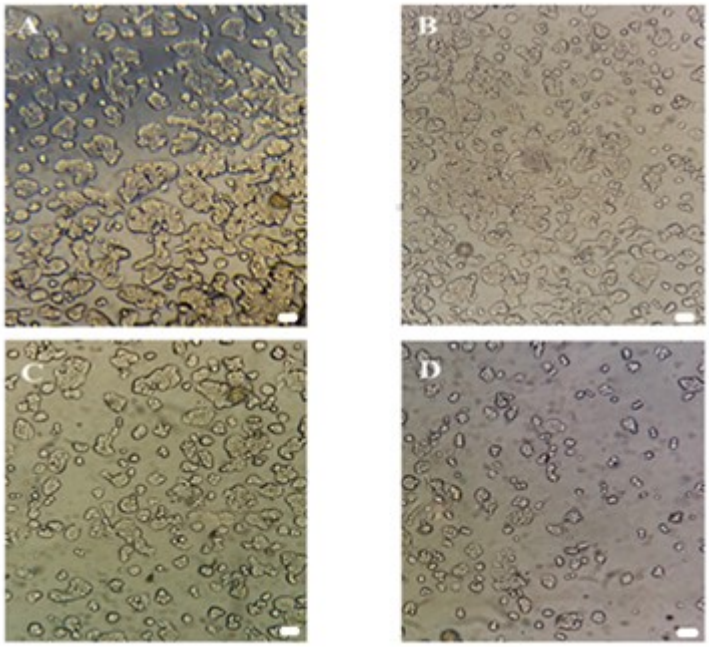
بررسی زنده‌مانی سلول‌های HT29

نتایج حاصل از آزمون MTT نشان داد که سلول‌های HT29 درحضور غلظت‌های مختلف آگرین بی (۱ تا ۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر) موجب کاهش زنده‌مانی سلول‌ها به‌صورت وابسته به دوز و زمان می‌شود. اما در گروه شم، تغییر معنی‌داری در بقای سلول‌ها مشاهده نشد. محاسبات نشان داد غلظت میانه مهاری یا IC50 ترکیب آگرین‌بی پس از گذشت ۴۸ ساعت ۴/۶۵ میکروگرم بر میلی لیتر بود که برای ارزیابی نوع مرگ سلولی القا شده در آزمون‌های بعدی مورد استفاده قرار گرفت (نمودار ۱).



نمودار ۱: اثر غلظت‌های مختلف آگرین‌بی بر بقای سلول‌های HT29 توسط آزمون MTT پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت از تیمار. داده‌ها ۳ بار تکرار و به‌صورت انحراف معیار ± میانگین بیان شدند (n=3; **p<۰/۰۱, p* **<۰/۰۰۱)

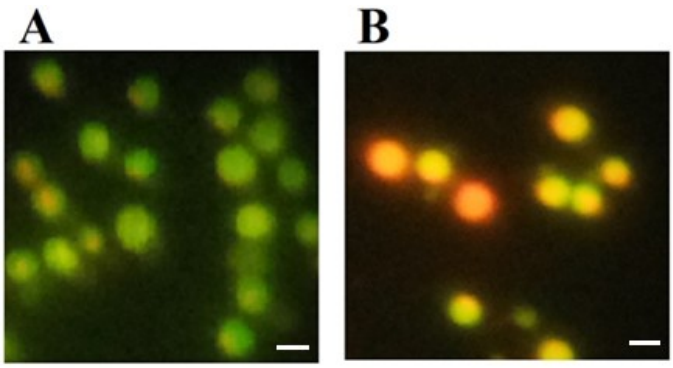
همچنین تصاویر میکروسکوپی نشان دهنده کاهش در تعداد و تراکم و همچنین تغییر شکل سلول‌های HT29 تحت تیمار با آگرین‌بی بود (شکل ۱).



شکل ۱: ارزیابی تعداد و مورفولوژی سلول‌های HT29 پس از تیمار با اگرین بی. A: گروه کنترل، B: تحت تیمار با دوز ۲ میکروگرم بر میلی لیتر، C: تحت تیمار با دوز ۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر و D: تحت تیمار با دوز ۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر. Scale bar: 100µm

ارزیابی آپوپتوزیس و نکروز توسط رنگ آمیزی اکریدین اورنج/ پروپودیوم یداید

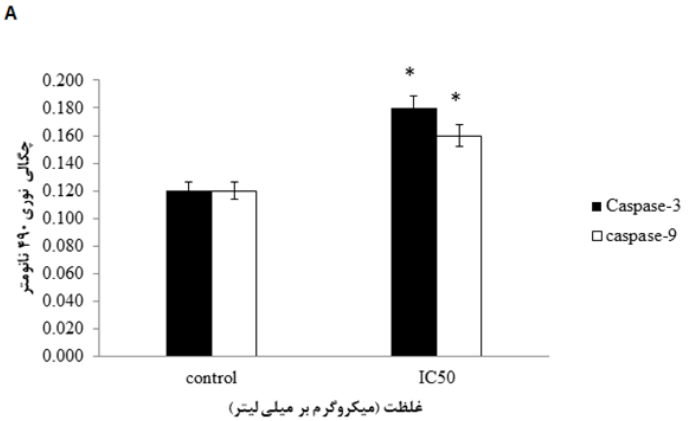
بر اساس داده‌های شکل ۲ سلول‌های HT29 در گروه کنترل (بدون تیمار) به رنگ سبز رنگ‌آمیزی شدند که موید زنده بودن سلول‌ها و سلول‌های تحت تیمار با غلظت میانه مهاری یا IC50 از ترکیب آگرین‌بی به رنگ سبز مایل به زرد و زرد مایل به نارنجی رنگ‌آمیزی شدند که بیانگر مرگ سلولی آپوپتوزیس می‌باشد. بنابراین آگرین‌بی از طریق القای آپوپتوزیس سمیت خود را روی سلول‌های سرطان کولورکتال HT29 اعمال کرده است.



شکل ۲: آزمون اکریدین اورنج/ پروپودیوم یداید جهت ارزیابی نوع مرگ سلولی. تصویر بیانگر القاء آپوپتوزیس در غلظت میانه مهاری ترکیب آگرین‌بی در سلول‌های HT29 است. A: سلول‌های HT29 گروه کنترل؛ B: سلول‌ها تحت تیمار با دوز میانه مهاری آگرین بی. Scale bar: 10µm

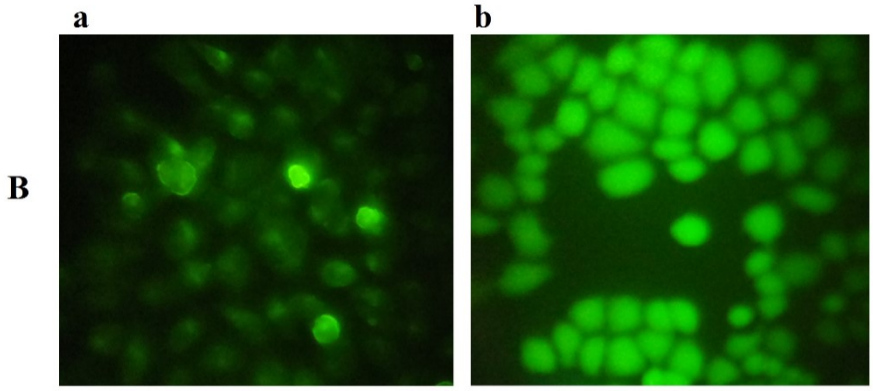
ارزیابی نوع مسیر القای آپوپتوزیس

جهت تعیین نوع مسیر القای آپوپتوزیس توسط غلظت میانه مهاری آگرین‌بی از آزمون بررسی فعالیت کاسپاز ۳ و ۹ استفاده شد. همان‌طور که در نمودار ۲ نشان داده شده است افزایش جذب کاسپاز ۳ در مقایسه با کاسپاز ۹ در سلول‌های سرطان کولورکتال HT29 تحت تیمار با غلظت میانه مهاری آگرین بی‌مشاهده می‌شود که بیانگر القای مسیر آپوپتوزیس درونی یا میتوکندری در پیشبرد اثرات آگرین‌بی در سلول‌های سرطان کولورکتال HT29 است.



نمودار ۲: اثر غلظت میانه مهاری آگرین‌بی بر فعالیت آنزیم‌های کاسپاز ۳ و کاسپاز ۹ در سلول‌های HT29 پس از ۴۸ ساعت تیمار. داده‌ها به‌صورت انحراف معیار ± میانگین بیان شدند (*p<۰.۰۵)

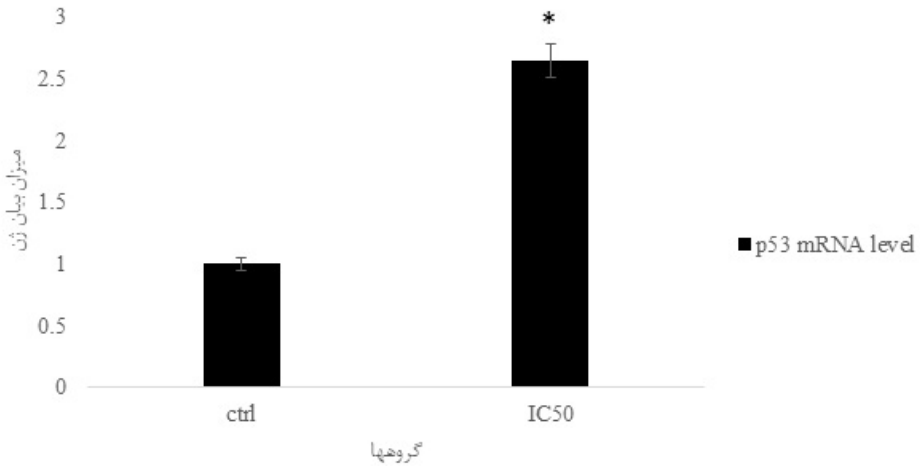
به‌منظور درک این مطلب که آیا فعالیت پیش برنده آپوپتوزیس ترکیب آگرین‌بی به افزایش تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن در سلول‌های سرطانی HT29 نسبت داده می‌شود یا خیر، میزان ROS توسط کیت DCF-DA اندازه‌گیری شد. بررسی میکروسکوپی نشان داد سلول‌های HT29 تحت تیمار با آگرین‌بی موجب افزایش میزان ROS می‌شود که از طریق افزایش میزان رنگ در شکل ۳، در مقایسه با گروه کنترل مورد تایید است. بنابراین این سسکوئی ترپن لاکتون از طریق مسیر میتوکندری قادر به القای آپوپتوزیس در سلول‌های HT29 است.



شکل ۳: اثر آگرین‌بی بر میزان تولید ROS درون سلولی توسط کیت DCF-DA در سلول‌های سرطان کولورکتال HT29. a: سلول‌های HT29 گروه کنترل، b: سلول‌ها تحت تیمار با دوز میانه مهاری آگرین‌بی. بزرگنمایی ×۲۰۰

بررسی بیان ژن p53 *توسط روش* *q RT-PCR*

نتایج ارزیابی بیان ژن نشان داد که میزان بیان ژن p53 در گروه تحت تیمار با غلظت میانه مهاری آگرین‌بی در مقایسه با گروه کنترل (سلول‌های HT29 فاقد تیمار) به‌صورت معنادار افزایش یافته است که این افزایش با $p\leq0.05$* معنی‌دار بود (نمودار ۳).



نمودار ۳: بررسی میزان بیان ژن p53 در سلول‌های HT29 تحت تیمار با غلظت میانه مهاری آگرین‌بی با روش qRT-PCR.
*p<.۰/۰۵

۵- بحث

در میان مکانیسم‌های مرگ سلولی، القای آپوپتوزیس مکانیسم موردنظر برای مرگ سلولی سلول‌های سرطانی است که می‌تواند با کم‌ترین عارضه جانبی توسط ترکیبات ضد سرطان مستخرج از منابع طبیعی انجام شود (۱۵). مطالعات نشان داده است استفاده از فراورده های طبیعی گیاهی دارای اثرات پرو آپوپتوزیسی به‌صورت تنها یا به‌صورت ترکیبی در سنتز سبز ترکیبات نانو همانند نانوفیبرها که در درمان سرطان مورد استفاده قرار دارند، می‌تواند نویدبخش بستر درمانی نوین در آینده باشد (۱۶). بنابراین اثبات اثرات ضد سرطان ترکیبات طبیعی گیاهی همواره مدنظر محققین قرار دارد.

سلول‌های HT29 نسبت به داروهای شیمی درمانی ۵-فلوئوروراسیل و اگزالی‌پلاتین به‌عنوان گزینه‌های درمانی استاندارد برای سرطان کولورکتال حساس هستند و بنابراین در این پژوهش به‌عنوان سلول‌های سرطان کولورکتال پاسخ دهنده نسبت به شیمی‌درمانی انتخاب شدند (۱۷). نتایج پژوهش حاضر نشان داد آگرین‌بی قادر به اعمال سمیت سلولی و اثر ضد سرطان در رده HT29 سرطان کولورکتال به‌صورت وابسته به دوز و زمان است. همچنین این ترکیب قادر است اثرات خود را از طریق القای آپوپتوزیس و مسیر وابسته به کاسپاز از طریق مسیر درونی در این سلول‌ها اعمال کند.

مطالعات نشان داده است کاسپازها نقش موثری در القای آپوپتوزیس دارند. طی مسیر آپوپتوزیس پس از رهایش سیتوکروم c از میتوکندری، کاسپاز ۹ فعال می‌شود. کاسپاز ۹ از طریق فعال‌کردن کاسپاز اجرایی ۳ با القای فعالیت پروتئولیتیک قادر به کلیواژ تنوعی از پروتئین‌های عملکردی و ساختاری است (۲۰-۱۸). در خصوص عملکرد ضد سرطان فراورده‌های طبیعی، بر اساس

یافته‌ها این ترکیبات می‌توانند از طریق مهار زنجیره تنفسی میتوکندری، افزایش ROS، اختلال در پتانسیل غشای میتوکندری، آزادسازی فاکتورهای پرو آپوپتوزیسی، فعال کردن خانواده پروتئین کاسپاز و هدف گیری انتخابی تقسیم میتوکندری، آپوپتوزیس را در سلول‌های سرطان کولورکتال القا کنند. از جمله فراورده‌های طبیعی که اثرات ضد سرطان خود را در سرطان کولورکتال از طریق فعال‌سازی و افزایش بیان کاسپاز۳ یا ۹ اعمال می‌کنند می‌توان به کریپتوتانشینون، آمورفروتین، آپی‌ژنین، بایکالین، دیوسین، امودین، پسورالیدین، پلی فیلین، تیمول و لوناسین اشاره کرد. در این میان برخی ترکیبات همانند کاستیسین، و کورکومین از طریق افزایش بیان هر دو کاسپاز ۳ و ۹ قادر به القای آپوپتوزیس از طریق مسیر میتوکندری و اعمال اثر ضدسرطان بر روی سرطان کولورکتال هستند (۲۱). حسینی و همکاران (۲۲) سطوح بیان ژن‌های کاسپاز را در سلول‌های تومور کولورکتال SW480 بررسی کردند و نشان دادند تحت تاثیر پپتید نیسین بیان mRNA کاسپاز ۹ و ۸ و ۶ و ۳ در سلول‌های توموری کولورکتال گروه تیماری در مقایسه با گروه کنترل بیشتر است. شافعی پور و همکاران (۲۳) نشان دادند ترکیب مونوترپن آلفا-پینین دارای اثرات ضد تکثیری بر روی سلول‌های سرطان کلورکتال انسانی HT-29 است. این ترکیب قادر است از طریق افزایش بیان ژن‌های پرو آپوپتوزیسی Bax و کاسپاز ۳، مهار Bcl-2 و سرکوب مسیر سیگنالینگ PI3K و Akt نقش ضد سرطان خود را اعمال کند.

مطالعات پیشین بر روی اثرات ضدسرطان و پرو آپوپتوزیسی سسکوئی ترپن لاکتون‌ها صورت گرفته است. در سال ۲۰۱۸ تیم پژوهشی حاضر، فعالیت ۶ سسکوئی ترپن لاکتون را از جمله آگرین‌بی(استخراج شده از گیاه Centaurea behen L که گونه‌ای متعلق به خانواده آستراسه است) بر روی سلول‌های سرطان تخمدان A2780 ارزیابی کرد. نتایج نشان داد آگرین‌بی قادر به اعمال اثر توکسیک روی سلول‌های سرطان تخمدان با IC50= 1.62 µg/ml است. همچنین این ترکیب قادر به اعمال اثرات ضد رگ‌زایی از طریق مهار تکثیر سلول‌های اندوتلیال بندناف جنینی است (۱۴). Chen و همکاران (۲۴) گزارش کردند آنتروسین به‌عنوان یک سسکوئی ترپن لاکتون مکانیسم مرگ سلولی آپوپتوزیس را از طریق تعدیل نشانگرهای آپوپتوزیس مختلف آغاز می‌کند و منجر به افزایش سطح کلیواژ کاسپاز ۳، کاسپاز ۹ و PARP همراه با افزایش بیان Bax و کاهش Bcl-2 در سلول‌های سرطان پروستات PC3-KD می‌شود.

Liu و همکاران (۲۵) اثبات کردند آلانتولاکتون از طریق کاهش Bcl-2، و افزایش بیان ژن پرو آپوپتوزیسی Bax و سرکوب‌گر تومور p53 و همچنین فعال کردن کاسپازهای ۳ و ۱۲، القا کننده آپوپتوزیس در سلول‌های MCF-7 است (۲۵). در مطالعات اخیر در یک پژوهش اثر ترکیبی نانوی آرتمیزینین و متفورمین بر روی سلول های سرطان سینه T-47D مورد بررسی قرار گرفت و نشان داده شد این درمان ترکیبی از طریق افزایش Bax، و همچنین فعال کردن کاسپاز ۷ و کاسپاز ۳ القاکننده آپوپتوزیس در سلول‌های سرطانی است.

تکوین و توسعه سرطان کولورکتال یک فرآیند چند عاملی و چند مرحله‌ای است که شامل فعال شدن انکوژن‌ها و غیرفعال کردن ژن‌های سرکوب‌گر تومور است (۲۶). مطالعات نشان داده است پیشرفت سرطان کولورکتال به‌دنبال جهش در ژن‌های APC، K-Ras و p53 رخ می‌دهد. جهش ژن p53 در سرطان کولورکتال در ۳۴ درصد از تومورهای پروگزیمال کولون و ۴۵ درصد از تومورهای دیستال کولورکتال رخ می‌دهد. اکثر این جهش‌ها در اگزون ۵ تا ۸ (دومین اتصال یابنده به DNA) و عمدتا در برخی از کدون ها مانند ۱۷۵، ۲۴۵،۲۴۸، ۲۷۳ و ۲۸۲ رخ می‌دهد که شامل انتقال G به A، C به T است و منجر به جایگزینی یک اسیدآمینه در پروتئین p53 می‌شود (۲۷ و ۲۸). در خصوص مکانیسم عمل p53 در القای آپوپتوزیس سلول‌های سرطانی، یافته‌ها نشان می‌دهد p53 از طریق اثر بر پروتئین‌های پرو آپوپتوزیسی PUMA, NOXA قادر به مهار اعضای آنتی

آپوپتوزیسی خانواده Bcl2 همانند MCL-1, BCL-XL است. در مرحله بعد p53 قادر به فعال‌سازی BAX, BAK و متعاقبا رهایی سیتوکروم C، شکل گیری آپوپتوزوم و فعال‌سازی کاسپارهای اجرایی است. از طرفی p53 قادر است از طرق دیگری همچون بیان تعدادی از microRNA، از جمله تحریک miR-34 ژن Bcl-2 را هدف قرار دهد و موجب کاهش فاکتورهای پیش برنده بقای سلول‌های سرطانی شود (۲۹).

مطالعات نشان داده است به‌کارگیری داروها یا ترکیباتی که بتوانند منجر به افزایش عملکرد p53 و فعالسازی مجدد آن به‌عنوان عامل سرکوب‌گر توموری شوند، می تواند کاربرد زیادی در مهار سرطان داشته باشد. (۳۰). اپی کاتچین گالات (ECG) به‌عنوان یکی از مهم‌ترین ترکیبات پلی فنولی موجود در چای سبز از طریق تحریک بیان p53 ، p21، MAPKs (پروتئین کینازهای فعال شده با میتوژن)، تثبیت p53 توسط مهار تجزیه پروتئین و RNA و توقف چرخه سلولی در G0/G1 قادر به اعمال اثرات ضدتوموری در سرطان کولورکتال است (۹). در پژوهش Al-Fatlawi و همکاران (۳۱) گزارش شد پارتنولید به‌عنوان یک سسکوئی‌ترپن لاکتون موجب مهار تکثیر رده‌های سلولی سرطان دهانه رحم انسان (SiHa) و سرطان پستان (MCF-7) می‌شود و سلول‌های تحت تیمار شده با پارتنولید با تغییر در سطوح بیان ژن‌های p53 ، Bax، کاسپازهای ۳، ۶ و ۹- و mRNA ژن Bcl-2 موجب القای آپوپتوزیس در این سلول‌های سرطانی شدند. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد آگرین‌بی قادر به افزایش سطح بیان فاکتور سرکوب‌گر تومور p53 است و از این طریق قادر به مهار سلول‌های سرطانی HT29 است. ماسیلینیک اسید یک تری‌ترپن و دارای خواص ضدسرطانی قوی در مقابل سلول‌های سرطان کولورکتال است. بررسی آزمون‌های آزمایشگاهی نشان داده است این ترکیب از طریق تداخل با پروتئین‌های اسکلت سلولی در سلول‌های HT29 دارای اثر ضد توموری است (۳۳). همچنین پژوهش‌گران نشان دادند ماسیلینیک اسید از طریق مکانیسم القای بیان JNK، p53 ، و افزایش فاکتورهای مسیر میتوکندری قادر به توقف چرخه سلولی و القای آپوپتوزیس در سلول‌های سرطان کولورکتال HT29 است (۳۳). در پژوهش‌های دیگر فعالیت القاکننده آپوپتوزیس از طریق فعالسازی p53 در مورد سسکوئی ترپن لاکتون‌هایی همچون کاستونولید، ایزوالانتول استون در رده های سلولی سرطانی اثبات شده است (۳۱ و ۳۴).

۶- نتیجه‌گیری

درمجموع، آگرین‌بی به‌عنوان یک سسکوئی‌ترپن لاکتون با القای اثرات پیش برنده آپوپتوزیس و القا از طریق مسیر درونی یا میتوکندری قادر به مرگ موثر سلول‌های سرطان کولورکتال HT29 است. از این‌رو با توجه به اعمال اثرات توکسیک در غلظت‌های پایین (۴/۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر) این ترکیب می‌تواند به‌عنوان کاندیدی برای درمان سرطان کولورکتال در مطالعات پیش بالینی و بالینی پیشنهاد شود. از جمله محدودیت‌های این مطالعه جهت کاربرد در پژوهش‌های بالینی می‌توان به عدم بررسی فاکتورهای دخیل در آپوپتوزیس در سطح پروتئین، عدم استفاده از کنترل مثبت، یا محدودیت مدل سلولی اشاره کرد. از این‌رو، مطالعات تکمیلی در مدل موشی جهت بررسی اثرات پرو آپوپتوزیسی آگرین‌بی بر تومور کلورکتال مورد نیاز است.

۷- تشکر و قدردانی

از حمایت معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه خوارزمی به‌جهت تصویب و تامین مالی و همراهی کارشناسان محترم آزمایشگاه مرکزی دانشگاه خوارزمی جهت آنالیز دستگاهی صمیمانه سپاسگزاریم. بخشی از هزینه انجام طرح تحت عنوان " بررسی اثر ضد سرطان Augerin B بر سرطان کولون در شرایط *in vitro* و *in vivo* " از گرنت (شماره قرارداد ۲۷۴۴۹) دانشگاه خوارزمی تامین شده است.

۸- منابع

1. Benson AB, Venook AP, Adam M, Chang G, et al. Colon cancer, version 3.2024, NCCN clinical practice guidelines in oncology. Natl Compr Canc Netw. 2024; 22 (2D): e240029. doi: 10.6004/jnccn.2024.0029.

2. Siegel RL, Giaquinto AN, Jemal A. Cancer statistics, 2024. CA Cancer J Clin . 2024; 74(1): 12-49 doi: 10.3322/caac.21820.

3. Sawicki T, Ruszkowska M, Danielewicz A, Niedźwiedzka E, et al. A review of colorectal cancer in terms of epidemiology, risk factors, development, symptoms and diagnosis. Cancers (Basel). 2021; 13(9): 2025. doi: 10.3390/cancers13092025.

4. Pericleous M, Mandair D, Caplin ME. Diet and supplements and their impact on colorectal cancer. J Gastrointest Oncol. 2013; 4(4): 409.-23. doi: 10.3978/j.issn.2078-6891. 2013.003.

5. Kumar A, Gautam V, Sandhu A, Rawat K, et al. Current and emerging therapeutic approaches for colorectal cancer: A comprehensive review. World J Gastrointest Surg. 2023; 15(4): 495-19. doi: 10.4240/wjgs.v15.i4.495.

6. Zhang L, Yu J. Role of apoptosis in colon cancer biology, therapy, and prevention. Curr Colorectal Cancer Rep. 2013; 9(4): 10.1007/s11888-013-0188-z.

7. Schimek V, Strasser K, Beer A, et al. Tumour cell apoptosis modulates the colorectal cancer immune microenvironment via interleukin-8-dependent neutrophil recruitment. Cell Death Dis. 2022; 13(113). https://doi.org/10.1038/s41419-022-04585-3

8. Takayama T, Miyanishi K, Hayashi T, Sato Y, et al. Colorectal cancer: genetics of development and metastasis. J Gastroenterol. 2006; 41(3): 185-92. doi: 10.1007/s00535-006-1801-6.

9. Li XL, Zhou J, Chen ZR, Chng WJ. P53 mutations in colorectal cancer-molecular pathogenesis and pharmacological reactivation. World J Gastroenterol. 2015; 21(1): 84-93. doi: 10.3748/wjg.v21.i1.84.

10. Asma ST, Acaroz U, Imre K, Morar A, et al. Natural products/bioactive compounds as a source of anticancer drugs. Cancers. 2022; 14(24): 6203. doi: 10.3390/cancers14246203.

11. Rajamanickam S & Agarwal R. Natural products and colon cancer: current status and future prospects. Drug Deve Res. 2008; 69(7): 460-71. doi: 10.1002/ddr.20276.

12. Babaei G, Aliarab A, Abroon S, Rasmi Y, et al. Application of sesquiterpene lactone: A new promising way for cancer therapy based on anticancer activity. Biomed Pharmacother. 2018; 106: 239-46. doi: 10.1016/j.biopha.2018.06.131.

13. Chicca A, Tebano M, Adinolfi B, Ertugrul K, et al. Anti-proliferative activity of aguerin B and a new rare nor-guaianolide lactone isolated from the aerial parts of Centaurea deflexa. Euro J Med Chem. 2011; 46(7): 3066-070. doi: 10.1016/j.ejmech. 2011.03.011.

14. Shakeri A, Amini E, Asili J, Masullo M, et al. Screening of several biological activities induced by different sesquiterpene lactones isolated from Centaurea behen L. and Rhaponticum repens (L.) Hidalgo. Nat Prod Res. 2018; 32(12): 1436-440. doi: 10.1080/14786419. 2017. 1344661.

15. Chaudhry G-e-S, Md Akim A, Sung YY, Sifzizul TMT. Cancer and apoptosis: The apoptotic activity of plant and marine natural products and their potential as targeted cancer therapeutics. Front Pharmacol. 2022; 13: 842376. doi: 10.3389/fphar. 2022. 842376.

16. Khoshnazar SM, Asadi A, Karimian A, Abdolmaleki A, et al. Applications of nanofibers in the diagnosis and treatment of cancer. Iran J Blood Cancer. 2022; 14(2): 92-107. doi: 10.58209/ijbc.14.2.92

17. Folkvord S, Flatmark K, Seierstad T, Røe K, et al. Inhibitory effects of oxaliplatin in experimental radiation treatment of colorectal carcinoma: does oxaliplatin improve 5-fluorouracil-dependent radiosensitivity? Radiothe Oncol. 2008; 86(3): 428-34. doi: 10.1016/j.radonc.2007.10.012.

18. Kowalczyk T, Sitarek P, Skała E, Toma M, et al. Induction of apoptosis by in vitro and in vivo plant extracts derived from Menyanthes trifoliata L. in human cancer cells. Cytotechnology. 2019; 71(1): 165-80. doi: 10.1007/s10616-018-0274-9.

19. Hensley P, Mishra M, Kyprianou N. Targeting caspases in cancer therapeutics. Biol Chem. 2013; 394(7): 831-43. doi: 10.1515/hsz-2013-0128.

20. Brentnall M, Rodriguez-Menocal L, De Guevara RL, Cepero E, et al. Caspase-9, caspase-3 and caspase-7 have distinct roles during intrinsic apoptosis. BMC Cell Biol. 2013; 14(32): 1-9. doi: 10.1186/1471-2121-14-32.

21. Wei F, Nian Q, Zhao M, Wen Y, et al. Natural products and mitochondrial allies in colorectal cancer therapy. Biomed Pharmacother. 2023; 167: 115473. doi: 10.1016/j.biopha.2023.115473.

22. Hosseini SS, Hajikhani B, Faghihloo E, Goudarzi H. Increased expression of caspase genes in colorectal cancer cell line by Nisin. Arch Clin Infect Dis. 2020; 15(2): e97734. https://doi.org/10.5812/archcid.97734.

23. Shafieipour S, Zamanian Y, Hadipour E. et al. Exploring the effects of alpha-pinene on apoptosis induction in human colon cancer cells via the PI3K/AKT signaling pathway: an in vitro study. Egypt J Med Hum Genet. 2025; 26(27). https://doi.org/10.1186/

24. Chen YA, Tzeng DTW, Huang YP, Lin CJ, et al. Antrocin sensitizes prostate cancer cells to radiotherapy through inhibiting PI3K/AKT and MAPK signaling pathways. Cancers (Basel). 2018; 11(1): 34. doi: 10.3390/cancers11010034.

25. Liu J, Liu M, Wang S, He Y, et al. Alantolactone induces apoptosis and suppresses migration in MCF-7 human breast cancer cells via the p38 MAPK, NF-κB and Nrf2 signaling pathways. Int J Mol Med. 2018; 42(4): 1847-856. doi: 10.3892/ijmm.2018.3751.

26. Qi L, Ding Y. Screening of tumor suppressor genes in metastatic colorectal cancer. Biomed Res Int. 2017; 2017:2769140. doi: 10.1155/2017/2769140.

27. López I, Oliveira LP, Tucci P, Alvarez-Valín F, et al. Different mutation profiles associated to P53 accumulation in colorectal cancer. Gene. 2012; 499(1):81-7. doi: 10.1016/j.gene.2012.02.011.

28. Aubrey BJ, Kelly GL, Janic A, Herold MJ, et al. How does p53 induce apoptosis and how does this relate to p53 -mediated tumour suppression? Cell Death Differ. 2018; 25(1):104-13. doi: 10.1038/cdd.2017.169.

29. Liebl MC, Hofmann TG. The Role of p53 Signaling in Colorectal Cancer. Cancers (Basel). 2021; 13(9):2125. doi: 10.3390/cancers13092125.

30. Tsukamoto S. Natural products that target p53 for cancer therapy. J Nat Med. 2025. https://doi.org/10.1007/s11418-025-01906-6.

31. Al-Fatlawi AA, Al-Fatlawi AA, Irshad M, Rahisuddin, Ahmad A. Effect of parthenolide on growth and apoptosis regulatory genes of human cancer cell lines. Pharm Biol. 2015; 53(1): 104-09.

32. Rufino-Palomares EE, Reyes-Zurita FJ, García-Salguero L, Mokhtari K, et al. Maslinic acid, a triterpenic anti-tumoural agent, interferes with cytoskeleton protein expression in HT29 human colon-cancer cells. J Proteomics. 2013; 83: 15-25. doi: 10.1016/j.jprot. 2013.02. 031.

33. Reyes-Zurita FJ, Pachón-Peña G, Lizárraga D, Rufino-Palomares EE, et al. The natural triterpene maslinic acid induces apoptosis in HT29 colon cancer cells by a JNK-p53 -dependent mechanism. BMC Cancer. 2011; 11:154. doi: 10.1186/1471-2407-11-154.

34. Jin C, Zhang G, Zhang Y, Hua P, et al. Isoalantolactone induces intrinsic apoptosis through p53 signaling pathway in human lung squamous carcinoma cells. PLoS One. 2017; 12(8): e0181731. doi: 10.1371/journal.pone.0181731.