مقاله پژوهشی
مجله سلول و بافت (علمی - پژوهشی)
جلد۱۲، شماره ۱، بهار۱۴۰۰

بررسی اثر منتول بر القای آپوپتوزیس و بیان ژن‌های Bax و Bcl_2 در سلول‌های سرطانی کولون رده CT-26

سمیه خضری .M.Sc[1]، جواد بهارآرا .Ph.D*[1]، الهه امینی .Ph.D[2]

۱- دانشگاه آزاد اسلامی، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی، مرکز تحقیقات بیولوژی کاربردی تکوین جانوری، مشهد، ایران
۲- دانشگاه خوارزمی، دانشکده علوم زیستی، گروه علوم جانوری، تهران، ایران

* پست الکترونیک نویسنده مسئول: baharara@mshdiau.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۷/۱ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۳/۲۳

چکیده

هدف: هدف از این مطالعه بررسی اثرات آپوپتوتیکی منتول بر سلول‌های سرطان کولون رده‌ی CT-26 می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش تجربی آزمایشگاهی سلول‌های سرطانی کولون رده‌ی CT-26 با غلظت‌های ۱ تا ۵ میلی‌مول از منتول به‌مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت تیمار شدند. میزان زیست‌پذیری سلول‌های سرطانی با آزمون MTT محاسبه شد. رنگ‌آمیزی DAPI جهت بررسی القای آپوپتوزیس استفاده شد و میزان بیان ژن‌های Bax و Bcl_2 توسط تکنیک Real Time-PCR بررسی شد.

نتایج: داده‌های تست MTT نشان داد منتول به‌صورت وابسته به‌دوز و زمان باعث مهار تکثیر سلول‌های سرطانی می‌شود. رنگ‌آمیزی IPAD نشان داد که منتول منجر به‌تراکم و شکست در کروماتین می‌شد. نتایج بررسی RCP -emiT laeR نشان داد بیان ژن xaB در غلظت ۳ میلی‌مول از منتول و بیان ژن $_2$lcB در غلظت ۲ میلی‌مول از منتول نسبت به کنترل افزایش می‌یابد.

نتیجه‌گیری: یافته‌ها نشان داد منتول سبب القای آپوپتوزیس در سلول‌های سرطانی کولون CT-26 می‌شد. بنابراین استفاده از این مونوترپن می‌تواند به‌عنوان یک استراتژی امیدوار کننده در مطالعات کلینیکی سرطان کولون مورد توجه قرار گیرد.

واژگان کلیدی: منتول، آپوپتوزیس، سرطان کولون، Bax، Bcl2

مقدمه

امروزه سرطان یکی از علل عمده مرگ‌ومیر در سراسر جهان می‌باشد، در ایران سرطان بعد از بیماری‌های قلبی-عروقی و تصادفات سومین عامل مرگ‌ومیر به‌حساب می‌آید (۱). آژانس بین المللی تحقیقات سرطان در مورد آمار جهانی سرطان (GLOBOCAN 2020) و شیوع و مرگ‌ومیر سرطان در مورد ۳۶ سرطان در ۱۸۵ کشور ۱۹/۳ میلیون مورد جدید سرطان را در سال ۲۰۲۰ گزارش داده است. در این میان سرطان پستان در خانم‌ها (۱۱/۷ درصد)، سرطان ریه (۱۱/۴ درصد)، سرطان کولورکتال (۱۰ درصد)، سرطان پروستات (۷/۳ درصد)، و سرطان معده (۵/۶ درصد)، بیش‌ترین میزان سرطان را به‌خود اختصاص داده است. دررابطه با سرطان کولون، ۶ درصد مورد جدید و ۵/۸ درصد افزایش مرگ و میر در سال ۲۰۲۰ گزارش شده است (۲).

بیماری سرطان با پیشرفت غیرطبیعی و رشد کنترل نشده سلول‌ها همراه است و می‌تواند تغییراتی را نیز در سلول‌های سالم ایجاد کند که شامل توانایی تحریک رگ‌زایی، خودکفایی در سیگنال‌های رشد، عدم محدودیت در همانندسازی، متاستاز و مقاومت به آپوپتوزیس می‌باشد (۳). سرطان کولورکتال یکی از شایع‌ترین انواع سرطان‌ها در دنیاست، چهارمین علت مرگ‌ومیر در مردان و دومین علت مرگ‌ومیر بر اثر سرطان در زنان به‌شمار می‌رود هر چند که تعداد افراد مبتلا روز به روز در حال افزایش است (۴). در ایجاد سرطان کولون مهم‌ترین و عمده‌ترین علل آن، سن، داشتن سابقه‌ی فامیلی، رژیم غذایی، مصرف دخانیات، مصرف الکل و عدم تحرک می‌باشد (۵).

آپوپتوزیس مرگ فیزیولوژیک و حیاتی سلول است که به‌منظور کنترل، تکامل و هومئوستازی بافت در سلول‌ها رخ می‌دهد و در شرایط طبیعی سبب حذف سلول‌های پیر، آسیب دیده، اضافی و مضر می‌شود (۶). هرگونه اختلال در روند آپوپتوزیس منجر به‌بیماری می‌شود، بنابراین بسیاری از روش‌های درمانی سرطان براساس ایجاد آپوپتوزیس در سلول‌های سرطانی ایجاد می‌شود (۷). پروتئین Bax به‌عنوان پروتئین کلیدی در آپوپتوزیس به‌حساب می‌آید و توسط عوامل مختلف در مسیر داخلی آپوپتوزیس عمل می‌کند، هم‌چنین پروتئین Bcl_2 یک اثر آنتی آپوپتوتیک در پاسخ به‌محرک‌های مختلف آپوپتوزیس از طریق جلوگیری از رها شدن سیتوکروم C از میتوکندری دارد؛ بدین ترتیب Bax و Bcl_2 از جمله ژن‌های مهم دخیل در مسیر میتوکندریایی آپوپتوزیس به‌شمار می‌روند (۸).

در سال‌های اخیر به‌رغم پیشرفت‌های زیاد در درمان سرطان، ظهور رو به‌افزایش مقاومت سلول‌های سرطانی به‌شیمی درمانی و آثار جانبی زیاد آن کماکان وجود دارد، از این رو استفاده از گیاهان دارویی و محصولات طبیعی برای درمان انواع بیماری‌ها از جمله سرطان بسیار امیدوار کننده بوده است و مطالعات نشان داده‌اند که گیاهان قادرند به‌علت داشتن خواص آنتی اکسیدانتی سمیت داروها را کاهش داده و اثرات مضر شیمیایی آن‌ها را از بین ببرند (۹).

کورکومین ماده موثره و ترکیب اصلی گیاه زردچوبه می‌باشد که اثرات ضدالتهابی و ضدمیکروبی و هم‌چنین ضدسرطانی آن به‌اثبات رسیده است (۱۰). شرکت تجاری دانش بنیان (اکسیر نانو سینا) گیاه زردچوبه را با نام تجاری سیناکورکومین جهت درمان التهاب‌های مفصلی، گوارشی، دهان و پوست و هم‌چنین جهت پیش‌گیری از ابتلا به‌انواع سرطان‌ها و کاهش دهنده عوارض شیمی درمانی و پرتو درمانی به بازار ارائه کرده است.

ازجمله گیاهان دارویی مهم تیره نعناعیان هستند که دارای ترکیباتی از متابولیت‌های ثانویه از جمله: منتول، منتون، ایزومنتون، منتوفوران، نئومنتول، لیمونن، سینئول و پولگون است. دراین مطالعه از منتول به‌عنوان ترکیب فعال زیستی استفاده شده است که ماده موثره اصلی گیاه نعناع گونه‌ی *Mentha piperita* می‌باشد (۱۲-۱۱). منتول دارای ویژگی‌های

زیستی ازجمله: ضدخارش، ضددرد، ضدعفونی کننده و ضدالتهاب است و به‌طور گسترده در ترکیبات غذایی و تولیدات دارویی مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۳).

در مطالعه‌ای که توسط Wang و همکاران (۱۴) برروی اثر منتول در مهار و مرگ سلول‌های سرطانی پروستات رده‌ی DU14 انجام گرفت مشخص شد که منتول مهاجرت سلول‌های سرطانی را مهار کرده، از رشد سلول‌های سرطانی جلوگیری می‌کند و سبب القای آپوپتوزیس در سلول‌های سرطانی می‌شود.

باتوجه به‌اثرات درمانی متعدد منتول در این مقاله و اهمیت تاثیر ترکیبات طبیعی در مهار رشد سلول‌های سرطانی، هدف از انجام این پژوهش آزمایشگاهی بررسی اثر ضدتوموری و آپوپتوزیسی منتول بر سلول‌های سرطانی کولون رده‌ی CT-26 است.

مواد و روش‌ها

روش MTT آزمونی جهت بررسی سمیت سلولی: در این پژوهش رده‌ی سلولی CT-26 از مرکز تحقیقات بیولوژی کاربردی دانشگاه آزاد اسلامی مشهد تهیه شد و در محیط کشت RPMI1640 (Bioidea,Iran) حاوی ۱۰ درصد FBS (Gibco,USA)، و نیز ۱ درصد آنتی‌بیوتیک (استرپتومایسین-پنی سیلین)-(Gibco,USA) کشت داده شد و در انکوباتور با شرایط دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، CO_2 ۵ درصد و رطوبت ۹۵ درصد نگه‌داری شد. سلول‌های سرطانی CT-26 با تعداد ۵×۱۰^{۵} درون چاهک‌های پلیت ۹۶ کشت داده شد. پس از ۲۴ ساعت و چسبیدن سلول‌ها به‌کف پلیت، چاهک‌ها به‌دو گروه کنترل و تیمار (غلظت‌های ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ میلی مول از منتول) تقسیم شدند و بررسی اثر منتول به‌مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت صورت گرفت. درنهایت، میزان جذب نوری توسط دستگاه اسپکتروفتومتری (Epoch, Bio Tek, USA) در طول موج ۵۷۰ نانومتر اندازه‌گیری شد و درصد زیست‌پذیری سلول‌ها با استفاده از معادله ۱۰۰×(ODکنترل/ODتست) محاسبه و غلظت مهاری (IC_{50}) نیز تعیین شد (۱۴).

رنگ‌آمیزی هسته‌ای DAPI: DAPI (4,6-diamidino-2phenylindole) یک رنگ فلورسنت است که برای مشاهده هسته سلول استفاده می‌شود و می‌تواند اتصال قوی و محکمی با محل بازهای A-T در دو رشته DNA برقرار کند (۷). برای انجام این تست ابتدا تعداد ۱×۱۰^{۵} سلول سرطانی CT-26 درون پلیت کشت داده شد و بعد از گذشت ۲۴ ساعت سلول‌ها با غلظت‌های (۱ تا ۵ میلی‌مول از منتول) مورد تیمار قرار گرفتند و در نهایت بعد از گذشت ۲۴ ساعت رنگ آمیزی DAPI صورت گرفت و توسط میکروسکوپ فلورسانس مورد بررسی قرار گرفت.

بررسی بیان ژن: میزان بیان ژن‌های پروآپوپتوزی Bax و آنتی‌آپوپتوزی Bcl_2 بااستفاده از روش Real Time-PCR مورد ارزیابی قرار گرفت. در ابتدا RNA با استفاده از کیت استخراج RNA (pars tous, Iran) استخراج شد. سپس برطبق شیوه نامه cDNA (pars tous , Iran) سنتز cDNA انجام گرفت و توسط کیت سایبرگرین تست Real Time-PCR صورت گرفت (۱۶). در این مطالعه پرایمرهای مورد استفاده برای ژن‌های Bax و Bcl_2 به‌عنوان ژن هدف و ژن Beta actin به‌عنوان کنترل داخلی در نظر گرفته شد. در جدول ۱ توالی پرایمرهای طراحی شده نشان داده شده است.

جدول ۱: توالی پرایمرها

ژن	sense	Anti sense
Bax	TCATGGGCTGGACACTGGACTTC	GAGCGAGGCGGTGAGGACTC
Bcl2	GCACCTGACGCCCTTCACC	ACATCTCCCTGTTGACGCTCTC
Beta actin	GCTCTCCCTCACGCCATCC	TCACGCACGATTTCCCTCTCAG

درنهایت بااستفاده از دستگاه Bio Rad Real time- PCR (ساخت آمریکا)، تحت نرم‌افزار cfx96 بیان ژن‌های Bax و Bcl_2 در سلول‌های سرطانی کولون رده‌ی CT-26 در گروه کنترل و تیمارشده نسبت به‌کنترل داخلی Beta actin مورد بررسی قرار گرفت.

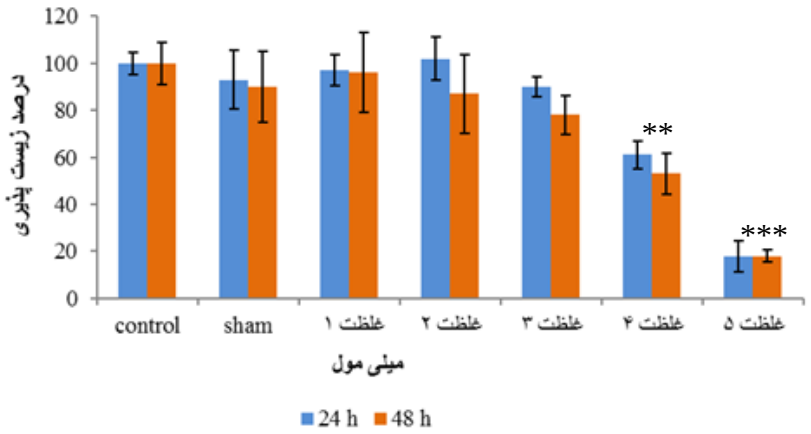
آنالیز آماری

در این پژوهش داده‌ها توسط نرم افزار SPSS-22 وآزمون‌های آماری t-test در سطح معنی‌داری $p<۰/۰۵$ تجزیه و تحلیل شد، سپس نمودارها توسط نرم‌افزار excel رسم شدند.

نتایج

بررسی سمیت سلول

آزمون MTT به‌منظور ارزیابی تاثیر منتول برروی رشد و تکثیر سلول‌های سرطانی کولون رده‌ی CT-26 انجام گرفت. نتایج پس از تیمار ۲۴ ساعت بیان‌گر تاثیر غلظت ۴ و ۵ میلی‌مول از منتول بر بقای سلول‌های سرطانی کولون بود، درحالی‌که پس از تیمار ۴۸ ساعت، مهار بقای وابسته به غلظت در سلول‌های سرطان کولون رده‌ی CT-26 تحت تیمار با غلظت‌های ۲ تا ۵ میلی‌مول از منتول مشاهده شد. جذب نوری به‌دست آمده از سلول‌های تیمار شده با غلظت‌های مختلف منتول و تعیین غلظت مهاری مشخص کرد که غلظت ۴ میلی‌مول از منتول منجر به مرگ بیش از ۵۰ درصد از سلول‌ها شده است (نمودار ۱).



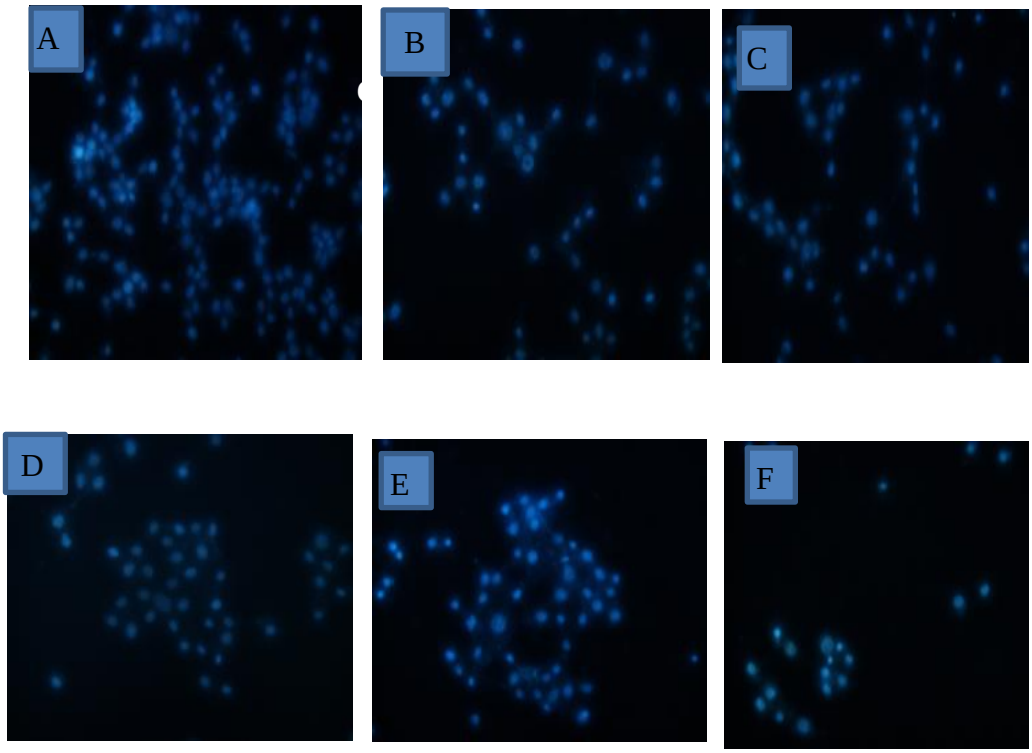
نمودار ۱: ارزیابی اثر سیتوتوکسیک غلظت‌های مختلف منتول (۱ تا ۵ میلی‌مول) بر بقا سلولی سرطان کولون رده‌ی CT-26 در مقایسه با کنترل توسط روش MTT پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت تیمار. نتایج به‌صورت میانگین ±SD ارائه شده است.

** در سطح $p<۰/۰۱$

*** در سطح $p<۰/۰۰۱$ معنی دار است.

رنگ آمیزی هسته‌ای DAPI

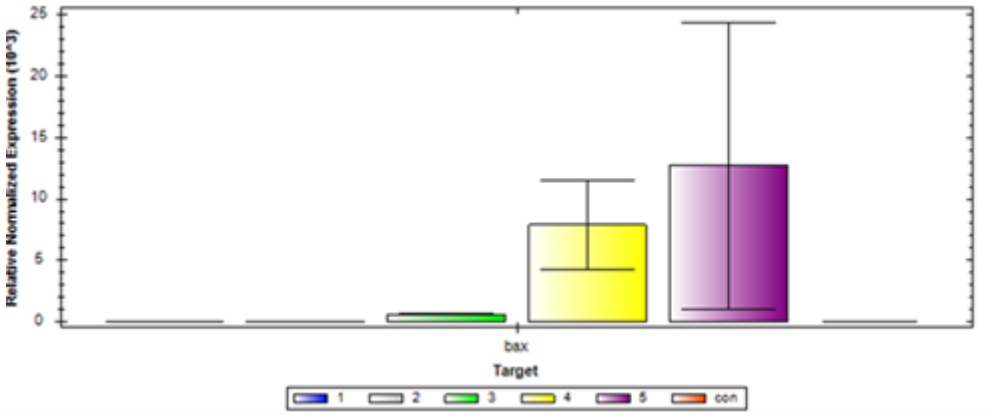
نتایج حاصل از این تست نشان داد که هسته‌ها در سلول‌های سرطانی CT-26 پس از تیمار با منتول و گذشت ۲۴ ساعت و افزایش غلظت ماده تیماری از حالت طبیعی که به‌صورت سالم و بدون چروکیدگی است. خارج و به‌صورت قطعه قطعه درآمدند که بیان‌گر وقوع آپوپتوز در این سلول‌ها است (شکل ۱).



شکل ۱: رنگ آمیزی DAPI. A : گروه کنترل، سلول‌ها سالم هستند و شکل خود را حفظ کرده‌اند. تصاویر B,C,D)گروه تیمار با غلظت‌های به‌ترتیب ۱و۲و۳ میلی‌مول از منتول که تغییر خاصی در هسته سلول‌ها مشاهده نشد. E) گروه تیمار شده با غلظت ۴ میلی‌مول از منتول که سلول‌ها کوچکتر و فشرده هستند که بیان‌گر قطعه قطعه شدن کروماتین است. F) گروه تیمار شده با غلظت ۵ میلی‌مول از منتول، در این تصویر هسته‌ی بیشتر سلول‌های سرطانی قطعه قطعه شده و دچار مرگ سلولی شدند. (بزرگ‌نمایی ×۱۰۰)

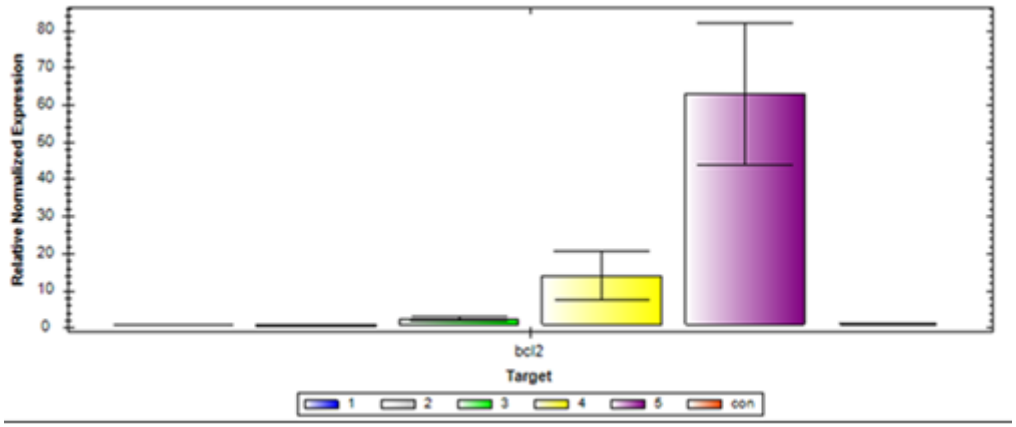
بررسی بیان ژن

تغییر در بیان ژن آپوپتوزی Bax و آنتی‌آپوپتوزی Bcl_2 در سلول‌های سرطانی کولون تیمار شده با غلظت‌های ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ میلی‌مول از منتول با استفاده از روش Real Time-PCR پس از گذشت ۲۴ ساعت ارزیابی شد. نتایج نسبت بیان ژن‌های Bax و Bcl_2 نسبت به ژن کنترل در رده‌ی سلولی سرطان کولون تیمار شده نشان می‌دهد که بیان ژن آپوپتوتیکی Bax افزایش داشته است (نمودار ۲)، هم‌چنین افزایش بیان ژن آنتی‌آپوپتوتیکی Bcl_2 مشاهده می‌شود (نمودار ۳).



نمودار ۲: بیان ژن Bax در سلوهای سرطانی کولون رده‌ی CT-26

در این نمودار افزایش بیان ژن Bax مشاهده می‌شود.



نمودار ۳: بیان ژن Bcl_2 در سلول‌های سرطانی کولون رده‌ی CT-26

در این نمودار افزایش بیان ژن Bcl_2 مشاهده می‌شود.

بحث

گیاهان دارویی به‌علت همراه داشتن ترکیبات طبیعی و اثر گذار که نسبت به داروهای شیمیایی عوارض جانبی و سمیت کم‌تری دارند مورد توجه بسیار قرار گرفتند و از آن‌جایی‌که هدف اصلی در پیش‌گیری از سرطان توسط گیاهان و مواد طبیعی، مهار یا کند کردن فرآیند سرطان‌زایی است استفاده از گیاهان دارویی روز به روز افزایش یافته است (۱۷). بیش‌تر گیاهانی دارویی که در طبیعت وجود دارند دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانتی و ضدسرطانی می‌باشند که نسبت به سایر روش‌های درمانی نظیر شیمی‌درمانی، پرتودرمانی و هورمون درمانی بیش‌تر مورد توجه قرار گرفتند (۱۸). در مطالعه حاضر به بررسی اثر منتول موجود در نعناع فلفلی بر القای آپوپتوزیس و مرگ سلولی در سلول‌های سرطانی کولون رده CT-26 پرداخته شد. نتایج بررسی‌های حاصل از آزمون MTT نشان داد که اثر منتول بر القای آپوپتوزیس در سلول‌های سرطانی کولون در دو بازه‌ی زمانی ۲۴ و ۴۸ ساعت با افزایش زمان و غلظت سمیت بیش‌تری ایجاد می‌کند و سبب کاهش تعداد سلول‌های زنده در

غلظت‌های بالاتر از غلظت میانه مهاری می‌شود که البته در بازه زمانی ۴۸ ساعت این تفاوت در غلظت‌های زیر ۴ میلی‌مول از منتول معنی‌دار نیست. مقایسه نمودارهای گروه‌های تجربی در دو بازه‌ی زمانی(۴۲ و ۸۴ ساعت) نشان داد که کم‌ترین درصد زیست‌پذیری مربوط به غلظت ۵ میلی‌مول از منتول می‌باشد. موضوع دیگری که در این پژوهش مورد بررسی قرار گرفت اثر منتول بر القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی کولون رده‌ی 62-TC است. القای آپوپتوزیس یکی از مهم‌ترین روش‌های بدون عارضه جهت مهار رشد و مرگ سلول‌های سرطانی است و از آن‌جایی‌که سلول‌های سرطانی از مرگ برنامه‌ریزی شده سلول یا آپوپتوزیس فرار می‌کنند یکی از دلایل آن می‌تواند تغییر در بیان ژن‌هایی باشد که در تنظیم این فرآیند دخیل هستند. بنابراین اغلب عوامل ضدسرطانی با القای آپوپتوزیس می‌توانند آثار درمانی خود را اعمال کنند (۱۹). بیش‌تر سلول‌هایی که دچار آپوپتوزیس می‌شوند تغییرات مورفولوژیکی متعددی ازجمله: انقباض سلولی، از دست دادن چسبندگی به ماتریکس خارج سلولی، تراکم کروماتین‌ها، از هم گسیختگی هسته و قطعه قطعه شدن هسته از خود نشان می‌دهند (۲۰). به‌دلیل اهمیت آپویتوز در سرکوب سلول‌های سرطانی در سال‌های اخیر توجه بسیاری از پژوهشگران به‌بررسی مسیرهای سیگنالینگ و تغییرات بیان ژن‌های دخیل در القای آپوپتوزیس معطوف شده است. در این پژوهش جهت مشاهده تغییرات مورفولوژیک هسته به‌منظور بررسی اثر منتول بر القای آپوپتوزیس از روش رنگ‌آمیزی DAPI استفاده شد. نتایج حاصل از رنگ‌آمیزی بعد از ۴۲ ساعت نشان داد که توانایی القای آپوپتوزیس در سلول‌های تیمار شده با افزایش غلظت منتول افزایش می‌یابد؛ به‌نحوی که قطعه قطعه شدن هسته‌ی سلول‌های سرطانی در نمونه‌های تحت تیمار با غلظت‌های ۴ و ۵ میلی‌مول از منتول نسبت به گروه کنترل به‌خوبی مشخص بود. هم‌چنین در این مطالعه جهت بررسی اثر منتول بر مسیرهای مولکولی وابسته به آپوپتوزیس و تغییرات بیان ژن‌های آپوپتوزیس Bax , Bcl_2 از روش laeRReal Time-PCR استفاده شد.

نتایج حاصل از این تست نشان داد که با افزایش غلظت منتول بیان ژن آنتی‌آپوپتوزیس Bcl_2 افزایش یافته است؛ هم‌چنین بیان ژن پروآپوپتوزیس Bax در سلول‌های تحت تیمار با منتول افزایش یافته است. می‌توان نتیجه گرفت که منتول می‌تواند در سلول‌های سرطانی کولون رده‌ی CT-26 سبب القای آپوپتوز شود. مرتبط با پژوهش حاضر، Li و همکاران (۲۱) به‌بررسی اثر زیست‌پذیری منتول بر سلول‌های سرطانی مثانه رده‌ی T-24 پرداختند و دریافتند که با افزایش دوز منتول میزان توانایی زیست‌پذیری سلول‌های سرطانی کاهش می‌یابد، آن‌ها بیان کردند منتول با القای دپلاریزاسیون در غشای میتوکندری از طریق کانال یونی سبب مرگ سلول‌های سرطانی مثانه در رده‌ی سلولی T-24 انسانی می‌شود، هم‌چنین آن‌ها پیشنهاد کردند که می‌توان از منتول به‌عنوان مکمل در داروهای شیمی‌درمانی استفاده کرد. نتایج حاصل از پژوهش آن‌ها با نتایج پژوهش حاضر هم‌سو می‌باشد. Liang و همکاران (۲۲) به‌بررسی اثر منتول بر روند آپوپتوزیس در سلول‌های سرطانی مغز استخوان با استفاده از روش رنگ‌آمیزی DAPI پرداختند که نتایج پژوهش آن‌ها نیز نشان داد افزایش غلظت منتول سبب قطعه قطعه شدن هسته سلول‌های سرطانی شده و از طریق القای آپوپتوز اعمال اثر می‌کند. این نتایج نیز هم‌سو با یافته‌های تحقیق حاضر بیان‌گر اثر ضدسرطانی منتول است. در رابطه با اثر ضدسرطان موجود در نعناع، در پژوهشی Jia و همکاران (۲۳) به‌بررسی اثر آپوپتوزی D-Limonene که یکی از مونوترپن‌های مشابه منتول موجود در نعناع می‌باشد بر سلول‌های سرطانی کولون رده‌ی LS174T پرداختند. نتایج بررسی آن‌ها نشان داد که افزایش دوز D-Limonene سبب کاهش بیان ژن Bcl2 و افزایش بیان ژن Bax در سلول‌های سرطانی می‌شود.

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این پژوهش آزمایشگاهی نشان داد منتول به‌دلیل داشتن خاصیت سمیت سلولی بالا رشد و تکثیر سلول‌های سرطانی کولون رده‌ی CT-26 را مهار کرده و با القای آپوپتوزیس سبب افزایش بیان ژن آپوپتوزی Bax و آنتی‌آپوپتوزیسی

Bcl_2 و در نتیجه سبب مرگ سلول‌های سرطانی CT-26 کولون می‌شود. لذا با توجه به‌نتایج به‌دست آمده منتول می‌تواند در مطالعات بالینی برروی انسان سرطان کولون مورد ارزیابی قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از لطف و مساعدت کلیه همکاران محترم مرکز تحقیقات بیولوژی کاربردی تکوین جانوری دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد که در اجرای این طرح همکاری داشتند تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

1. Seyedalipour B, Pourakbar E, Taravati A. The Cytotoxic effect of ethanolic extract of Pistacia khinjuk leaf on HeLa and MCF-7 cancerous cell lines. JRUMS. 2016; 14 (11) :939-952.
2. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBAL estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancer in 185 countries. CA cancer J clin. 2021; 71(3): 209-249.
3. Vadayeh Kheiry E, Parivar K, Baharara J, Fazly Bazzaz BiBi S, et al. The effect of fistin on inducing cell death on colon cancer CT-29 cell line. The quarteriy journal of animal physiology and development. 2018;41(2):50-79.
4. Dolatkhah R, Somi MH, Bonyadi MJ, Kermani IA, et al. Colorectal cancer in Iran: Molecular Epidemiology and Screening Strategies. J Cancer Epidemiol. 2014; 2015 (2015):10.
5. Granados-Romero JJ, Valderrama-Treviño AI, Contreras-Flores AH, Barrera-Mera B, et al. Colorectal cancer. Int J Res Med Sci. 2017; 5(11): 4667–4676.
6. Nachmias B, Ashhab Y, Ben-Yehuda D. The inhibitor of apoptosis protein family (IAPs): an emerging therapeutic target in cancer. Semin Cancer Biol 2004.14(4): 231-243.
7. Pfeffer CM, Singh AT. Apoptosis: A Target for Anticancer Therapy. Int J Mol Sci. 2018; 19(2): 448.
8. Afkar S, Karimzadeh GH, Jalali Javaran M. Gene expression pattern of key genes in menthol biosynthesis pathway in different organs of peppermint (Mentha piperita). Plant Gen Res 2015; 2 (1) :1-10.
9. Agarwal N, Majee C, Chakraborthy GS. Natural herbs as anticancer drugs. Int J Pharm Tech Res. 2012;4(3):1142-1153.
10. Hosseinimehr SJ. A review of preventive and therapeutic effects of curcumin in patients with cancer. Clin Exc. 2014; 2 (2) :50-63.
11.Rahimi Y, Taleei AR, Ranjbar M. Investigation of lim, medh gene expression level and morpho-physiological changes of Mentha piperiat L. in response to drought Iranian journal of agricultural scinces2017;48(2):507-516.
12. Nourafcan H, Kalantari1 Z, Sefidkon F**.** The effect of methanol and ethanol foliar application on essential oil composition of peppermint. Agroecology Journal 2018; 14;(2): 9-18.

13. Seif sahandi M, Mehrafarin A, Khalighi-Sigaroodi F, Sharifi M, et al. Review on anatomical, phytochemical and pharmacological properties of peppermint (Mentha piperita L.). J Med Plants. 2018; 1(69): 16-33.
14. Wang Y, Wang X, Yang Z, Zhu G, et al. Menthol inhibits the proliferation and motility of prostate cancer DU145 cells. Pathology and Oncology Research 2012; 18(4): 903–910.
15. Oka Y, Naomoto Y, Yasouka Y, Hatano H, et al. Apoptosis in cultured human colon cancer cells indused by combined treatments with 5 fluorouracil, tumor necrosis factor alpha and interferon alpha. Jpn J Clin Oncol. 1997; 27(4): 231-235.
16. Shandiz SAS, Farasati S, Saeedi B, Baghbani-Arani F, et al. Up regulation of KAI1 gene expression and apoptosis effect of imatinib mesylate in gastric adenocarcinoma (AGS) cell line. Asian Pac J Trop Dis. 2016; 6(2): 120-125.
17. Forouzandeh F, Salimi S, Naghsh N, Zamani N, et al. Evaluation of anti-cancer effect of Peganum harmala L hydroalcholic extract on human cervical carcinoma epithelial cell line (HeLa). J Shahrekord Univ Med Sci. 2014; 16(4):1-8.
18. Shukla Y, Singh M. Cancer preventive properties of ginger: a brief review. Food Chem Toxico. 2007: 45(5): 683-690.
19. Shokrolahi F, Aliasgari E, Mirzaie A. Cytotoxic effects of titanium dioxide nanoparticles on colon cancer cell line (HT29) and analysis of caspase-3 and 9 gene expression using Real Time PCR and flow cytometry. Iran South Med J. 2019; 21(6): 426-438.
20. Goldar S, Khaniani MS, Derakhshan SM, Baradaran B. Molecular mechanisms of apoptosis and roles in cancer development and treatment. Asian Pac J Cancer Prev. 2015; 16(6): 2129-2144.
21. Li Q, Wang X, Yang Z, Wang B, et al. Menthol induces cell death via the TRPM8 channel in the human bladder cancer cell line T24. Oncology 2009;77(6):335-341.
22. Liang J, Zhu Y, Ling C, Qin J, et al. Menthol-modified BSA nanoparticles forglioma targeting therapy using an energy restriction strategy. NPG Asia Materials 2019; 10(36): 30201-30213.
23. Jia SS, Xi GP, Zhang M, Chen YB, et al. Induction of apoptosis by D-limonene is mediated by inactivation of Akt in LS174T human colon cancer cells. Oncol Rep. 2013; 29(1): 349-54.

Journal of Cell & Tissue (JCT)
Spring 2021; 12(1) *Original Article*

Evaluation of the effect of menthol on apoptosis induction and Bax and Bcl2 gene expression in the CT-26 colon cancer cell line

Khezri S[3] M.Sc., Baharara J[1*] Ph.D., Amini E[4] Ph.D.

1. Department of Biology, Faculty of Sciences, Mashhad Islamic Azad University, Mashhad, Iran.
2. Department of Animal Biology, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran.

* Email corresponding author: baharara@mshdiau.ac.ir

Received: 22 Sep. 2020 Accepted: 13 Jun. 2021

Abstract

Aim: This study aimed to investigate the apoptotic effects of menthol on CT-26 colon cancer cells.

Material and Methods: In this experimental study, CT-26 colon cancer cells were treated with 1 to 5 mM menthol for 24 and 48 h. The viability of colon cancer cells was calculated by MTT assay. DAPI staining was used to evaluate apoptosis induction and the expression of Bax and Bcl2 genes was evaluated by Real-time-PCR technique.

Results: The results from the MTT assay showed that menthol inhibits CT26 cell growth in a dose and time-dependent manner. The results from DAPI staining indicated that menthol leads to condensation and breakdown in chromatin. The results of real-time PCR showed that expression of Bax increased at 3 mM concentration of menthol and Bcl2 gene expression increased in cells treated with 2 mM concentration of menthol compared to control.

Conclusion: The results showed that menthol induces apoptosis in CT-26 colon cancer cells. Therefore, the use of this monoterpene can be considered as a promising strategy in clinical studies of colon cancer.

Keywords: Menthol, Apoptosis, Colon cancer, Bax, Bcl2.