

Research Paper

Effect of Fluorouracil Combined With Harmine on Induction of Apoptosis in Apoptosis Induction in Pancreatic Cancer Cells (AsPC-1) and the Expression of Apoptotic Genes (BAX, P53, Caspase-3, and Caspase-9)



Fereshte Sirjani¹ , *Khadije Shahrokhbadi¹ , Javad Baharara²

1. Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran.
2. Research Center for Animal Development Applied Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran.



Citation Sirjani F, Shahrokhbadi Kh, Baharara J. [Effect of Fluorouracil Combined With Harmine on Induction of Apoptosis in Apoptosis Induction in Pancreatic Cancer Cells (AsPC-1) and the Expression of Apoptotic Genes (BAX, P53, Caspase-3, and Caspase-9) (Persian)]. *Complementary Medicine Journal*. 2022; 12(2):172-187. <https://doi.org/10.32598/cmja.12.2.1152.1>

<https://doi.org/10.32598/cmja.12.2.1152.1>



Article Info:

Received: 12 Feb 2022

Accepted: 19 Jul 2022

Available Online: 01 Jul 2022

Keywords:

Pancreatic
Neoplasms, Harmine,
Fluorouracil, Caspases

ABSTRACT

Objective Pancreatic cancer is one of the deadliest cancers related to the digestive system in the world. Due to the increasing resistance of cancer cells to chemotherapy and its side effects, there is a need for drugs with fewer side effects and natural origin. In this study, the effect of harmine combined with fluorouracil on apoptosis induction in pancreatic cancer cells (AsPC-1) and the expression of apoptotic genes was investigated.

Methods In this experimental study, MTT assay was used to study the cytotoxic effects. Annexin V/propidium iodide test and DAPI staining method were used to determine the type of cell death. The expression of apoptotic genes (P53, Bax, Caspase-3, and Caspase-9) was measured by real-time PCR. The data were analyzed using one-way ANOVA in SPSS software, version 16. The significance level was set at 0.05.

Results The results of MTT assay showed that the use of harmine at 20 µg/mL concentration combined with 10 µg/mL fluorouracil significantly reduced the growth (IC50) of AsPC-1 cells. The results of DAPI staining and annexin V/propidium iodide test showed the induction of apoptosis in treated samples. In addition, the results of real-time PCR showed that the expression of BAX, P53, Caspase-3 and Caspase-9 genes increased in the treated groups compared to the control group.

Conclusion The combined use of harmine and fluorouracil can induce apoptosis in pancreatic cancer cells due to high cytotoxicity and reduce the concentration of chemotherapy drugs. Therefore, this method can be used along with other treatment methods for pancreatic cancer.

* Corresponding Author:

Khadije Shahrokhbadi, PhD.

Address: Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran.

Tel: +98 (915) 5086805

E-mail: shahrokhbady@yahoo.com

Extended Abstract

Introduction

For many years, cancer has affected many people and is known as a leading cause of death worldwide. This disease is considered a serious medical problem both in developed and less developed countries. The results of a survey based on the latest national cancer registration data in Iran predicted a 43% increase in the cases of cancer from 2017 to 2025 in Iran. Iran is located in a area with moderate risk of cancer based on the global cancer map. Pancreatic cancer is the most common type of cancer in the current century; it is one of the deadliest cancers related to the digestive system in the world. The most common treatment method for pancreatic cancer is surgery combined with chemotherapy.

Today, research on natural products has increased due to the increasing demand in the field of complementary medicine, which have low side effects and high safety. The treatment of diseases and the reduction of their symptoms by using herbal extracts has received more attention due to lower unwanted side effects and toxicity compared to synthetic compounds. Some of the compounds obtained from plants have even been used as models or precursors for making effective products with more effectiveness and less toxicity. Harmine is a beta-carboline alkaloid that is found naturally in many plants, but the main source of it is the pecan plant. It seems that the use of natural compounds obtained from plants along with the use of chemical drug can be more effective and useful. This study aims to assess the synergistic effect of fluorouracil combined with harmine on induction of apoptosis in AsPC-1 cell line and the expression of apoptotic genes (BAX, P53, Caspase-3, Caspase-9).

Methods

In this study, the AsPC-1 cell line was prepared from the cell bank of Pasteur Institute of Iran and cultured in RPMI1640 medium. When the density of cells reached 80%,

the cytotoxicity of different concentrations of harmine and fluorouracil and their combination on human pancreatic cancer cells was evaluated by MTT method. For this purpose, the cells were cultured with a density of 2×10^4 cells in a 96-well plate. 24 hours later, the cells were treated with different concentrations of harmine and fluorouracil and their combination for 24 hours. After this period, cytotoxicity was evaluated. By using the DAPI staining method, it is possible to confirm the cytotoxic and antiproliferative effect of harmine, fluorouracil and their combination on ASPC-1 cells. First, 2×10^5 cells were cultured in each well of a 6-well plate for 24 hours in an incubator. Then the cells were exposed to harmine, fluorouracil, and their combination. It should be noted that the doses used in the DAPI test were determined based on the results of the MTT test and the IC₅₀ calculated for the cells. After 24 hours, they were fixed with methanol for 10 minutes and then stained with DAPI for 10 minutes. Next, apoptotic nuclei were evaluated and photographed using a fluorescent microscope. Apoptosis was evaluated by annexin-propidium iodide diagnostic kit. In this regard, after 24 hours of culture in the plate, the cells were treated with harmine, fluorouracil and their combination for 24 hours. Then, the supernatant of the control group and the three treatment groups were transferred to Eppendorf and centrifuged at 4500 rpm for 8 minutes. Binding Buffer 1X, Annexin V-FITC and propidium iodide were added to the samples. Then, they were incubated at room temperature and in the dark, and its graphs were plotted using a flow cytometer. For gene expression assessment, 1×10^6 human pancreatic cancer cells were cultured for 24 hours after cell counting. Then, they were treated with harmine, fluorouracil, and their combination at specific concentrations for 24 hours. Next, RNA was extracted based on the protocol of the kit and the concentration was determined by the nanodrop method using a spectrophotometer. Afterwards, the extracted RNA was converted into cDNA. A pair of primers was designed by Oligo 7 software for each of the study genes and the internal control gene (Table 1). Then, the amount of CG, temperature of the primer, and their specific connection were checked on the NCBI website and BLAST algorithm. Finally, the ex-

Table 1. The used primers in Real-Time PCR

Gene	Sens	Antisense
BAX	TTT GCT TCA GGG TTT CAT CCA	CTC CAT GTT ACT GTC CAG TTC GT
Caspase-3	AGA CAG ACA GTG GTG TTG ATG	GTT CAT CCA GTC GCT TTG TGC
Caspase-9	CCA GAG ATT CGC AAA CCA GAG	CAA TGT GAA CCT CTG CCG TGA
p53	TTG CCG TCC CAA GCA ATG GA	TCT GGG AAG GGA CAG AAG ATG

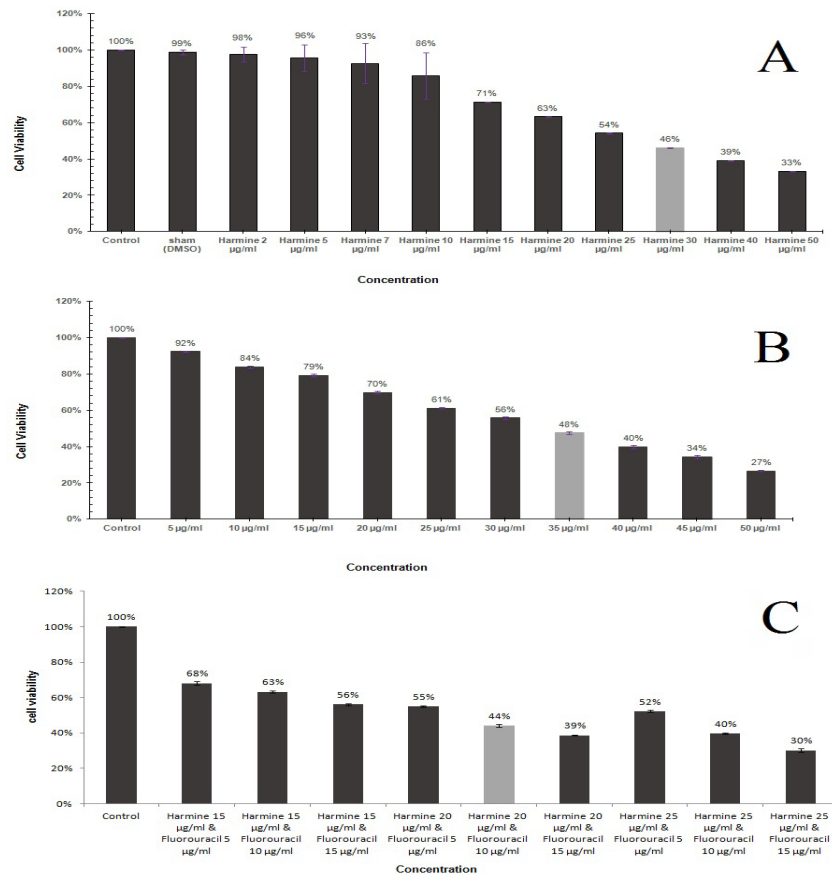


Figure 1. Viability of AsPC-1 cells exposed to different concentrations of harmine (A), fluorouracil (B), and their combination (C).

pression of apoptotic genes caspase-3, caspase-9, BAX and p53 was investigated using the SYBR green fluorescent stain with Real-Time PCR method in Bio Rad device.

3. Results

The results showed that, among the studied concentrations, 30 µg/ml harmine, 35 µg/ml fluorouracil, and the combination

of 10 µg/ml fluorouracil and 20 µg/ml harmine caused the death of half of the cells (Figure 1).

Morphological results showed that 24 hours after treatment with 30 µg/ml harmine, almost half of the cells left the polyhedral state and became spherical. In treatment with 35 µg/ml fluorouracil, the cells were rounded and out of the normal shape. This rounded shape was also observed in the

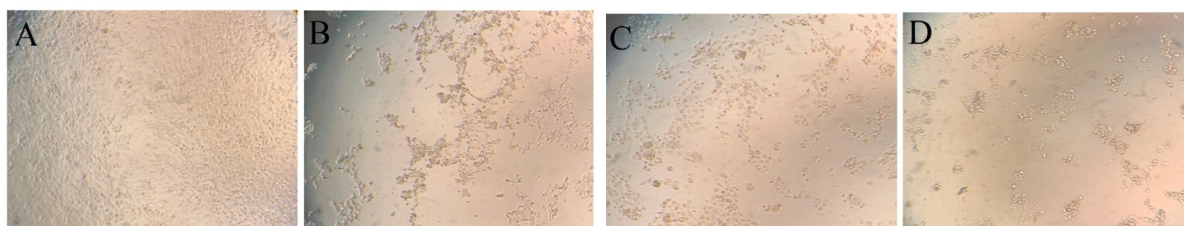
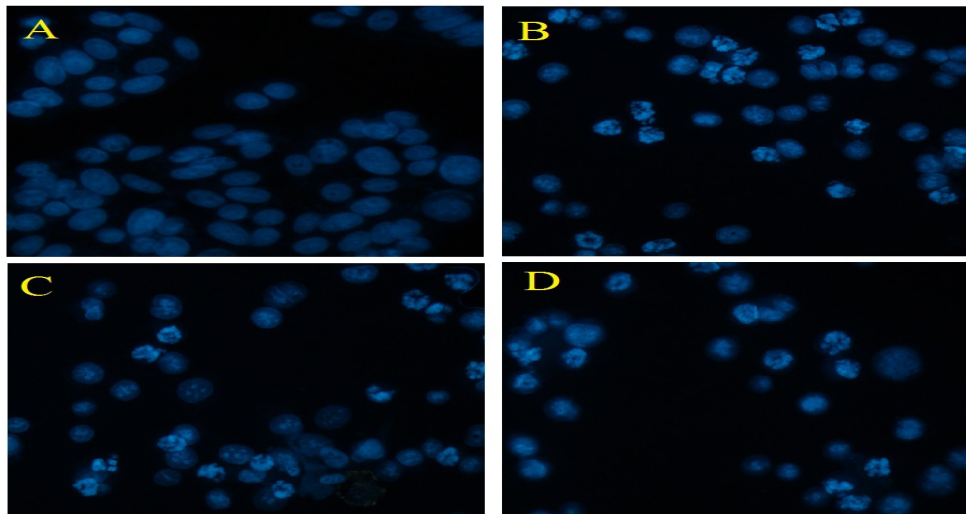


Figure 2. Morphology of AsPC-1 cells (inverted microscope, ×20 magnification)

(A) control group, (B) treated with 30 µg/ml harmine, (C) treated with 35 µg/ml fluorouracil, (D) treated with 20 µg/ml harmine + 10 µg/ml fluorouracil. The mentioned concentrations were determined based on the IC50 values from the MTT assay.



Complementary Medicine Journal
Arak University of Medical Sciences

Figure 3. Nucleus of AsPC-1 cells stained with DAPI.

(A) control group, (B) treated with 30 µg/ml harmine, (C) treated with 35 µg/ml fluorouracil, (D) treated with 20 µg/ml harmine + 10 µg/ml fluorouracil. Fragmentation and wrinkling of nuclei are observed in each treated samples.

combined group (20 µg/ml harmine + 10 µg/ml fluorouracil) (Figure 2).

The results of DAPI staining test showed that in AsPC-1 cells, immediately after and 24 hours after treatment, the nuclei were fragmented and the shape of the nuclei was out of normal form and wrinkled, which indicates the occurrence of

apoptosis in these cells. In the control group, the nuclei were healthy and intact (Figure 3).

The results of annexin 5-propidium iodide test showed that, while 92% of the cells were alive in the control group, about 40% were alive and 52% were apoptotic in the harmine group with a concentration of 30 µg/ml. In the cells

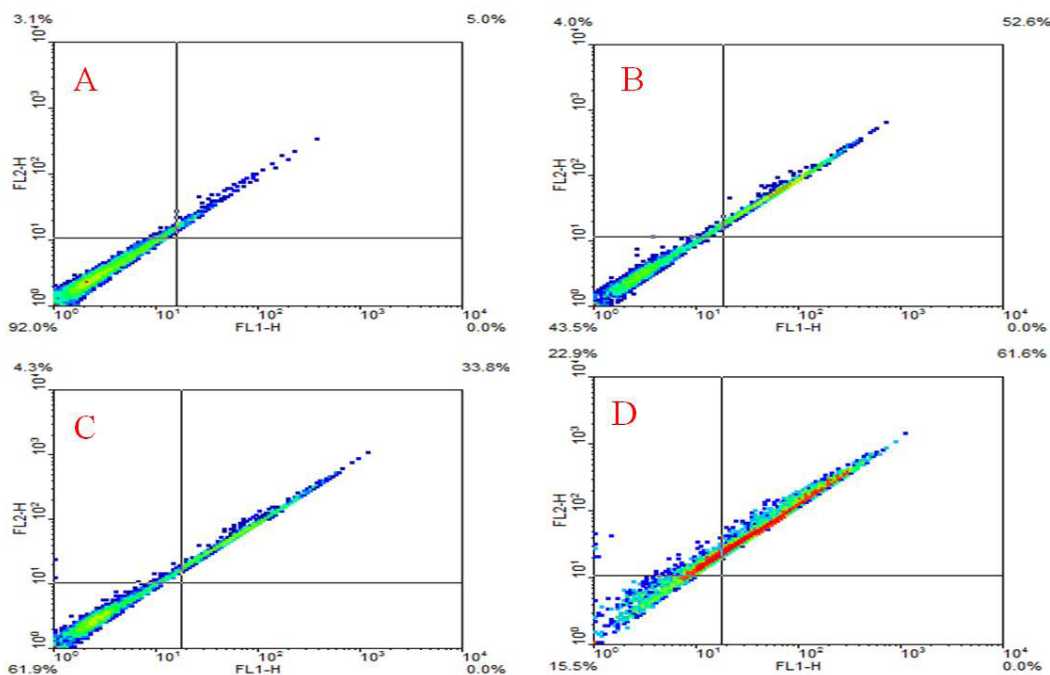


Figure 4. Flow cytometry results.

(A) control group, (B) treated with 30 µg/ml harmine, (C) treated with 35 µg/ml fluorouracil, (D) treated with 20 µg/ml harmine + 10 µg/ml fluorouracil.

Complementary Medicine Journal
Arak University of Medical Sciences

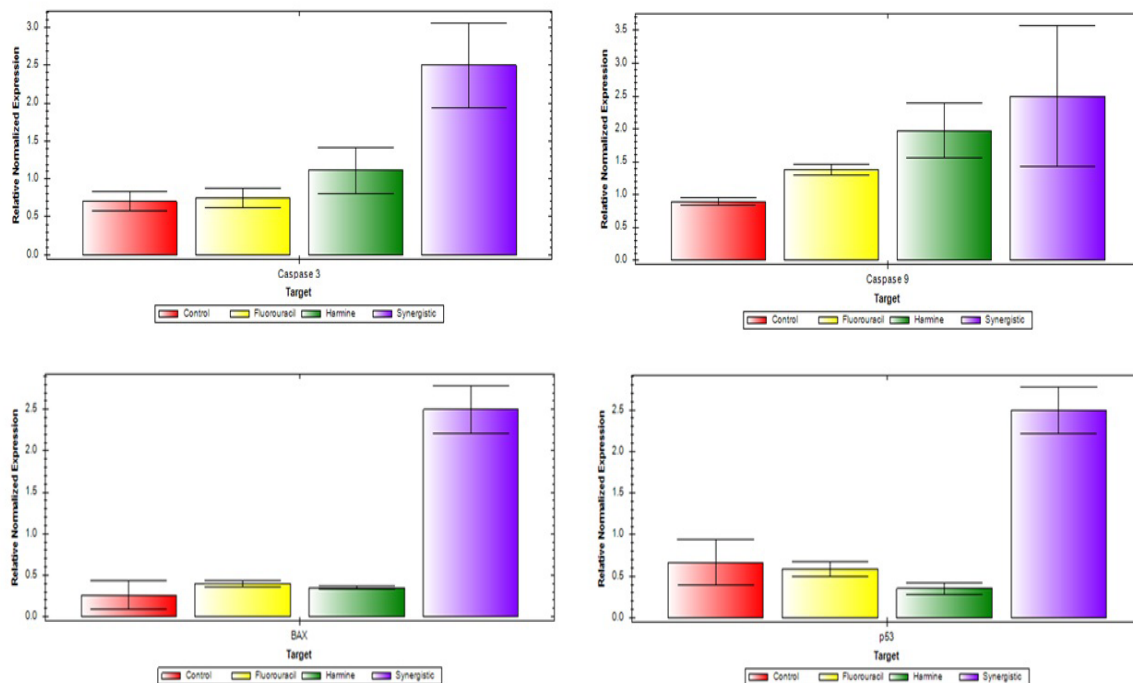


Figure 5. Expression analysis of caspase-3, caspase-9, BAX and P53 genes in different study groups

treated with 35 µg/ml fluorouracil, about 35% of the cells had undergone apoptosis. In the cells treated both harmine and fluorouracil, about 60% of the cells underwent apoptosis and only about 15% were alive (Figure 4).

Figure 4 shows the expression results of the study genes under the influence of harmine, fluorouracil and their combination compared to the control group. All four studied genes showed the significant synergistic effect of harmine and fluorouracil ($p < 0.05$), which caused a significant increase in gene expression. The results related to the expression of caspase-3 and caspase-3 genes showed that although there was also an increase in the harmine and fluorouracil treatment groups, the increase in the synergistic group was only significant ($p < 0.05$). In BAX and P53 genes, a significant increase in expression was seen only in the synergistic group; treatment with harmine and fluorouracil alone could not cause significant changes in gene expression.

Ethical Considerations

Compliance with ethical guidelines

All ethical principles were considered in this article. The participants were informed of the purpose of the research and its implementation stages. They were also assured about the confidentiality of their information and were free to leave the study whenever they wished, and if desired, the research results would be available to them.

Funding

This study was extracted from the master thesis (No. 162374163) of the first author. It was not funded by any organizations.

Authors' contributions

All authors equally contributed to preparing this article.

Conflicts of interest

The authors declared no conflict of interest.

Acknowledgements

The authors would like to thank the personnel of Research Institute in [Kharazmi University](#) for their cooperation.

مقاله پژوهشی

بررسی هم‌افزایی داروی فلوروراسیل و هارمین در القای آپوپتوز رده سلولی AsPC-1 و بیان ژن‌های آپوپتوتیک

فرشته سیرجانی^۱، * خدیجه شاهرخ‌آبادی^۱، جواد بهارآرا^۲

۱. گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران.

۲. مرکز تحقیقات تکون جانوری بیولوژی کاربردی، دانشکده علوم، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران.

Use your device to scan and read the article online



Citation Sirjani F, Shahrokhbabadi Kh, Baharara J. [Effect of Fluorouracil Combined With Harmine on Induction of Apoptosis in Apoptosis Induction in Pancreatic Cancer Cells (AsPC-1) and the Expression of Apoptotic Genes (BAX, P53, Caspase-3, and Caspase-9) (Persian)]. *Complementary Medicine Journal*. 2022; 12(2):172-187. <https://doi.org/10.32598/cmja.12.2.1152.1>

doi <https://doi.org/10.32598/cmja.12.2.1152.1>

چکیده

اطلاعات مقاله:

تاریخ دریافت: ۲۲ بهمن ۱۴۰۰

تاریخ پذیرش: ۲۸ تیر ۱۴۰۱

تاریخ انتشار: ۱۰ تیر ۱۴۰۱

هدف: سرطان پانکراس یکی از کشنده‌ترین سرطان‌های مربوط به سیستم دستگاه گوارش در جهان محسوب می‌شود. با توجه به افزایش مقاومت سلول‌های سرطانی به شیمی‌درمانی و عوارض جانبی آن، نیاز به داروهایی با عوارض جانبی کمتر و همچنین دارای منشأ طبیعی احساس می‌شود.

روش‌ها: در این تحقیق تجربی به بررسی اثر هارمین و استفاده توأم آن با فلوروراسیل برای القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی پانکراس، رده سلولی AsPC-1 پرداخته شد. برای مطالعه اثرات سایتوتوکسیک از روش رنگ‌سنجی و سمیت سلولی برای بررسی تعیین نوع مرگ سلولی از روش رنگ‌آمیزی DAPI (4,6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride) و تست Annexin V/PI (Annexin-V Propidium Iodide) استفاده شد. میزان بیان ژن‌های آپوپتوزی Caspase-3، BAX، P53، Caspase-9 با روش Real time-PCR اندازه‌گیری شد. داده‌ها با روش آماری (آزمون واریانس یک‌طرفه آنووا) در سطح معناداری $P < 0/05$ و با نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ آنالیز شد.

یافته‌ها: یافته‌های حاصل از روش MTT نشان داد کاربرد توأم هارمین با غلظت ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و فلوروراسیل با دز ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر سبب کاهش رشد (IC_{50} , $P < 0/05$) رده AsPC-1 شد. نتایج به دست آمده از رنگ‌آمیزی DAPI و تست انکسین القای آپوپتوز را در نمونه‌های تحت آزمایش نشان داد. همچنین نتایج تست ریل‌تایم نیز نشان داد بیان ژن‌های P53، کاسپاز ۳، BAX و کاسپاز ۹ در گروه‌های آزمایش نسبت به گروه کنترل افزایش معنادار ($P < 0/05$) یافته است.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد کاربرد هم‌زمان هارمین و فلوروراسیل به دلیل داشتن سیتوتوکسیسیته بالا باعث القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی پانکراس و کاهش غلظت مصرفی داروی شیمی‌درمانی می‌شود. بنابراین می‌توان آن را به‌عنوان کاندیدایی جهت همراهی با داروی سرطان پیشنهاد کرد.

کلیدواژه‌ها:

سرطان پانکراس، هارمین، فلوروراسیل، کاسپاز

* نویسنده مسئول:

دکتر خدیجه شاهرخ‌آبادی

نشانی: مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد مشهد، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی.

تلفن: +۹۸ (۹۱۵) ۵۰۸۶۸۰۵

رایانامه: shahrokhbabady@yahoo.com

مقدمه

ناخواسته و سمیت کمتر در مقایسه با ترکیبات سنتزی بیش از پیش مورد توجه قرار گرفته است و حتی برخی از ترکیبات به دست آمده از گیاهان به علت دارا بودن ویژگی‌های منحصر به فرد در ساختمان شیمیایی خود به عنوان الگو یا پیش ساز در جهت ساخت ترکیبات مؤثره با اثردهی بیشتر و سمیت کمتر مورد استفاده قرار گرفته‌اند [۸].

هارمین (C13H12ON2) یک آلکالوئید از دسته بتا کربولین است که به طور طبیعی در بسیاری از گیاهان یافت می‌شود، اما عمده ترین منبع آن گیاه اسپند معمولی با نام علمی Pega-num Harmala است که به طیف گسترده‌ای از خواص دارویی هارمین شامل خواص ضد سرطان، ضد التهاب، آنتی‌اکسیدان، ضد افسردگی و ضد میکروبی توجه شده است [۹]. با توجه به نکات گفته شده در خصوص سرطان و درمان‌های شیمیایی و همچنین اثرات ماندگار شیمی درمانی به نظر می‌رسد استفاده از ترکیبات طبیعی گیاهی در کنار داروی شیمیایی باعث اثرات درمانی مؤثرتر و مفیدتری باشد. از جمله ژن‌های آپوپتوتیک مورد مطالعه در این تحقیق ژن Bax، ژن P53 و ژن‌های کاسپاز ۳ و ۹ است.

ژن P53 از مهم‌ترین مهارکننده‌های چرخه تکثیر سلولی است که عموماً آن را با نام محافظ ژنوم معرفی می‌کنند. روش عمل این مولکول بدین صورت است که با ایجاد وقفه در مرحله G2 باعث مهار چرخه سلولی شده و بدین صورت با القای آپوپتوز از ایجاد تومور جلوگیری می‌کند. تخریب DNA عامل اصلی فعالیت این مولکول است. از جمله پروتئین‌های کلیدی در روند آپوپتوز، پروتئین Bax است که فعالیت آن به عوامل موجود در مسیر داخلی آپوپتوز بستگی دارد که همراه با پروتئین ضد آپوپتوزی Bcl2 جزء ژن‌های مهم دخیل در مسیر میتوکندریایی آپوپتوز به حساب می‌آید.

کاسپازها انواعی از پروتئازهای سیستئین اسپاراتات مربوط به مسیر آپوپتوز هستند که در تنظیم و اجرای آپوپتوز نقش مهمی ایفا می‌کنند. نام کاسپازها از عملکرد آن‌ها (Cysten Spartate Proteinase) گرفته شده است. این خانواده در پستانداران ۱۴ عضو دارد که ۱۱ عضو آن‌ها آنزیم‌های انسانی هستند. کاسپازها براساس عملکردشان به ۲ نوع آغازگر شامل کاسپازهای ۸، ۹ و ۱۰ و اجرایی شامل کاسپازهای ۳، ۶ و ۷ دسته‌بندی می‌شوند. مسیر بیرونی شامل کاسپازهای ۸ و ۱۰ و مسیر داخلی شامل کاسپاز ۹ هستند که هر ۲ مسیر هم‌گرا بوده و از کاسپازهای اجرایی استفاده می‌کنند که به طور آبشاری فعال شده و موجب انهدام سلول‌ها می‌شود. در بسیاری از مطالعات دیده شده که تغییر در عملکرد کاسپازها احتمالاً می‌تواند با ایجاد سرطان در ارتباط باشد. هدف از این مطالعه، بررسی اثرات هم‌افزایی داروی فلوروراسیل و هارمین در القای آپوپتوز رده سلولی سرطان پانکراس (AsPC-1) و بیان ژن‌های آپوپتوتیک (P53، Bax و کاسپاز ۳ و ۹) است.

سال‌های زیادی است که بیماری سرطان افراد متعددی را تحت تأثیر قرار داده و به عنوان عامل اصلی مرگ‌ومیر در سراسر جهان شناخته شده است. این مشکل هم در کشورهای توسعه یافته و هم در کشورهای کمتر توسعه یافته جزء مسائل جدی درمانی به شمار می‌رود [۱]. سرطان پانکراس شایع‌ترین سرطان قرن و یکی از کشنده‌ترین سرطان‌های مربوط به سیستم گوارش در جهان است، به طوری که میزان مرگ‌ومیر ناشی از آن بسیار بالاست و به علت علائم ناخوشایند مانند متاستاز و همچنین مقاومت به شیمی درمانی، موجب کسب رتبه چهارم در مرگ‌ومیر شده است [۲].

آمارها حاکی از این است که احتمالاً این میزان مرگ‌ومیر افزایش پیدا می‌کند و حتی امکان دارد تا سال ۲۰۳۰ به دومین عامل مرگ‌ومیر تبدیل شود [۳]. نتایج مطالعات براساس آخرین داده‌های ملی ثبت سرطان در ایران مبتنی بر کل جمعیت کشور (با پوشش ۱۰۰ درصدی)، افزایش ۴۳ درصدی موارد جدید بروز سرطان‌ها از سال ۹۶ تا سال ۱۴۰۴ در مقایسه با دهه پیش از آن (۱۳۹۵) را پیش‌بینی کرده است. همچنین براساس همین مطالعه ایران در منطقه «خطر متوسط» نقشه جهانی سرطان قرار دارد.

متداول‌ترین روش‌های درمان این بیماری جراحی، شیمی درمانی، رادیوتراپی، ایمنی‌تراپی و هورمون‌تراپی است، اما بیشترین روش‌های درمانی که برای سرطان پانکراس استفاده می‌شود، عمدتاً شامل جراحی همراه با شیمی درمانی است [۴]. داروهای شیمی درمانی رایج درمان سرطان پانکراس رژیم مبتنی بر فلوروراسیل، ۵-فلوروراسیل^۱، جمسیتابین^۲ و ناب پاکلیتاکسل است [۵].

اگرچه شیمی درمانی در بیشتر رژیم‌های ضدسرطانی یک روال معمول برای درمان محسوب می‌شود، اما در حال حاضر با توانایی سلول‌های سرطانی در ایجاد مقاومت در برابر داروهای شیمی درمانی معمولی، یکی از چالش‌برانگیزترین مشکلات در درمان سرطان است. همچنین با وجود پیشرفت قابل توجه در تولید داروهای ضدسرطان، برخی عوارض جانبی مانند ریزش مو، آسیب به کبد، کلیه، مغز استخوان و مقاومت ذاتی یا اکتسابی به این داروها هنوز حل نشده باقی مانده‌اند [۶].

امروزه تحقیقات روی فرآورده‌های طبیعی به دلیل افزایش تقاضا در زمینه طب مکمل که اثرات جانبی کم و ایمنی بالایی دارند، افزایش یافته است [۷]. در این بین، درمان بیماری‌ها و کاهش علائم آن‌ها با بهره‌گیری از عصاره‌های گیاهی به سبب عوارض

1. 5-Fluorouracil
2. Gemcitabine

مواد و روش‌ها

کشت سلولی و تعیین سمیت سلولی

رده سلولی ASPC-1 از بانک سلولی انستیتو پاستور تهران تهیه و در محیط کشت (RPMI1640 Bioidea, Iran) با ۱۰ درصد FBS و ۱ درصد آنتی‌بیوتیک در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد دی‌اکسیدکربن کشت داده شد. با رسیدن تراکم سلول‌ها به ۸۰ درصد، سمیت سلولی غلظت‌های مختلف هارمین (۲، ۵، ۷، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۳۰، ۴۰ و ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و فلورووراسیل (۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۳۰، ۳۵، ۴۰، ۴۵ و ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و ترکیب توأم آن‌ها (غلظت‌های ۵، ۱۰ و ۱۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر از داروی فلورووراسیل همراه با غلظت‌های مؤثر هارمین، از جمله ۱۵، ۲۰ و ۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) روی سلول‌های سرطان پانکراس انسانی رده ASPC-1 با روش (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) MTT ارزیابی شد.

از تمام غلظت‌ها به‌عنوان گروه‌های موردمطالعه همراه با یک گروه به‌عنوان کنترل استفاده شد. ابتدا تست‌های MTT با چند بار تکرار انجام شد، نتایج آنالیز شد و سپس بهترین غلظت‌ها از هارمین و فلورووراسیل به‌عنوان غلظت‌های مؤثر در آزمایش هم‌افزایی استفاده شد [۱۹]. برای این منظور سلول‌ها با تراکم 2×10^4 سلول در پلیت ۹۶ خانه (با تکرار n برابر ۴) کشت داده شدند. ۲۴ ساعت پس از کشت، سلول‌ها با غلظت‌های مختلف هارمین و فلورووراسیل و ترکیب توأم آن‌ها ۲۴ ساعت آزمایش شدند. پس از این مدت، سمیت سلولی با روش MTT ارزیابی شد. نتایج توسط آزمون آماری آنووا با سطح معناداری $P < 0.05$ بررسی و آنالیز شد.

رنگ‌آمیزی DAPI

با استفاده از روش رنگ‌آمیزی (4,6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride) DAPI می‌توان به تأیید تأثیر سیتوتوکسیک و آنتی‌پرولیفراتیو هارمین، فلورووراسیل و ترکیب توأم آن‌ها روی سلول‌های ASPC-1 پرداخت. ابتدا 2×10^5 سلول درون هر چاهک پلیت ۶ خانه به مدت ۲۴ ساعت در داخل انکوباتور کشت شدند. سپس سلول‌ها در مجاورت برای هارمین (۳۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر)، فلورووراسیل (۳۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و توأم (۱۰ میکروگرم فلورووراسیل همراه با ۲۰ میکروگرم هارمین) قرار گرفتند.

دُزهای استفاده‌شده در آزمایش DAPI با استفاده از نتایج تست MTT و میزان IC50 محاسبه‌شده برای سلول‌ها به دست آمد. بعد از ۲۴ ساعت با متانول به مدت ۱۰ دقیقه فیکس شدند و سپس با رنگ DAPI به مدت ۱۰ دقیقه رنگ‌آمیزی شده و سپس

هسته‌های آپوپتوزی با استفاده از میکروسکوپ فلوروسنت ارزیابی و عکس‌برداری شد [۲۰].

آزمون فلوسایتومتري

ارزیابی آپوپتوز توسط کیت تشخیصی انکسین پروپودیوم بدایید انجام شد. بدین ترتیب که سلول‌ها پس از ۲۴ ساعت کشت درون پلیت تحت آزمایش با هارمین (۳۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر)، فلورووراسیل (۳۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و توأم (۱۰ میکروگرم فلورووراسیل همراه با ۲۰ میکروگرم هارمین)، به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفتند. سپس محیط رویی گروه کنترل و ۳ گروه آزمایش به اپندورف منتقل و در دور ۴۵۰۰ rpm و به مدت ۸ دقیقه سانتریفیوژ شدند. با خارج کردن محیط رویی به هر نمونه ۵۰۰ میکرولیتر 1X Binding Buffer اضافه کرده و سپس ۵ میکرولیتر Annexin V-FITC و ۵ میکرولیتر پروپودیوم بدایید تهیه‌شده از شرکت Abcam ایالات متحده به هر نمونه اضافه شد. سپس در دمای اتاق به مدت ۵ دقیقه در تاریکی انکوبه شده و برای رسم نمودارهای آن به‌وسیله دستگاه فلوسایتومتري اقدام شد [۱۰].

بیان ژن‌های آپوپتوزی

پس از شمارش سلولی میزان 1×10^6 سلول‌های ASPC-1 سرطان پانکراس انسانی ۲۴ ساعت کشت داده شدند و سپس با هارمین و فلورووراسیل و به‌صورت توأم با غلظت‌های مشخص ۲۴ ساعت آزمایش شدند. سپس RNA براساس پروتکل کیت استخراج RNA شرکت Parstous ایران استخراج و تعیین غلظت کمی RNA به روش نانودراپ توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (Ep-och, BioTek, Winooski, VT, United States) انجام شد.

سپس RNA استخراج‌شده به cDNA تبدیل شد که براساس پروتکل کیت سنتز (Parstous, Iran) cDNA و با دستگاه ترموسایکلر، شرکت سازنده Bioer چین انجام شد. برای سنتز cDNA مقدار لازم از RNA آنزیم و بافر به حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر در میکروتیوب تهیه و ابتدا ۱۰ دقیقه در دمای ۲۵ درجه و سپس ۶۰ دقیقه در دمای ۴۷ درجه سانتی‌گراد در دستگاه ترموسایکلر، انکوبه شد. جهت توقف واکنش از دمای ۸۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه استفاده شد. پس از انجام واکنش میکروتیوب حاوی cDNA به ظرف یخ در دمای ۴ درجه منتقل شد. همچنین برای هر یک از ژن‌های اختصاصی مورد مطالعه و ژن کنترل داخلی یک جفت پرایمر، طراحی شد (جدول شماره ۱).

پرایمرهای اختصاصی توسط نرم‌افزار الیگو ۷ طراحی و سپس میزان CG دمای پرایمر و اتصال اختصاصی آن‌ها در سایت NCBI بررسی و BLAST شید و در نهایت، بیان ژن‌های آپوپتوزی Bax، کاسپاز ۳، کاسپاز ۹ و p53 با استفاده از رنگ فلوروسنت سایبرگرین (Parstous, Iran) با روش Real Time-PCR در

جدول ۱. پرایمرهای مورد استفاده در تکنیک Real Time-PCR

ژن	حس	ضد حس
BAX	TTT GCT TCA GGG TTT CAT CCA	CTC CAT GTT ACT GTC CAG TTC GT
کاسپاز ۳	AGA CAG ACA GTG GTG TTG ATG	GTT CAT CCA GTC GCT TTG TGC
کاسپاز ۹	CCA GAG ATT CGC AAA CCA GAG	CAA TGT GAA CCT CTG CCG TGA
p53	TTG CCG TCC CAA GCA ATG GA	TCT GGG AAG GGA CAG AAG ATG



شدند و شکل هسته‌ها از حالت نرمال خارج و چروکیده می‌شود که بیانگر وقوع آپوپتوز در این سلول‌هاست. این در حالی است که در گروه کنترل هسته‌ها سالم و یکپارچه هستند.

تعیین نوع و میزان مرگ سلولی القا شده حاصل از آزمون Annexin V-FITC

همان‌طور که در تصویر شماره ۳ نشان داده می‌شود، نتایج آزمون انکسین ۵-پروپیدیوم پدیدان نشان داد در حالی که در گروه کنترل ۹۲ درصد سلول‌ها زنده بودند، در گروه هارمین با غلظت ۳۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر حدود ۴۰ درصد زنده و ۵۲ درصد دچار آپوپتوز شده‌اند. در سلول‌های تحت آزمایش با غلظت ۳۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در حدود ۳۵ درصد از سلول‌ها دچار آپوپتوز شده بودند و سلول‌های تحت آزمایش با هم‌افزایی هارمین و فلورووراسیل حدود ۶۰ درصد سلول‌ها دچار آپوپتوز شدند و تنها حدود ۱۵ درصد زنده‌اند. با رسم نمودارها درصد سلول‌های زنده در سمت چپ پایین و درصد سلول‌هایی که در مراحل اولیه آپوپتوز قرار دارند در سمت راست پایین و درصد سلول‌ها در مرحله آپوپتوز ثانویه در سمت راست بالا و درصد سلول‌هایی که به سمت نکروز رفته‌اند در سمت چپ بالا مشخص می‌شود [۱۰].

نتایج بررسی تغییرات بیان ژن

تصویرهای شماره ۴ و ۵ نتایج بیان ژن‌های مورد مطالعه تحت تأثیر هارمین، فلورووراسیل و ترکیب توأم را در مقایسه با گروه کنترل نشان می‌دهد. تصویر شماره ۴ بیان ژن‌ها را به تفکیک و تصویر شماره ۶ هر ۴ ژن را در یک تصویر نشان می‌دهد. در هر ۴ ژن مورد مطالعه اثر هم‌افزایی هارمین و فلورووراسیل افزایش معنادار بیان ژن را نشان می‌دهد، سطح معناداری $P < 0.05$ در نظر گرفته شده است. نتایج مربوط به بیان ژن‌های کاسپاز ۳ و ۹ نشان می‌دهد اگرچه در گروه آزمایش با هارمین و آزمایش با فلورووراسیل نیز افزایش بیان دیده می‌شود، اما در گروه هم‌افزایی هارمین و فلورووراسیل این افزایش برای کاسپاز ۳ برابر با $P = 0.03$ و معنادار است و برای کاسپاز ۹ نیز مقدار $P = 0.029$ را نشان می‌دهد. در ژن‌های BAX و P53 افزایش بیان معنادار فقط در گروه هم‌افزا دیده می‌شود و آزمایش با هارمین

سلول‌های AsPC-1 سرطان پانکراس انسانی توسط دستگاه Bio Rad (Bio Rad CFX, United States) بررسی شد. برنامه دمایی مورد استفاده شامل دناتوراسیون اولیه دمای ۹۴ درجه به مدت ۱۵ دقیقه، سپس ۴۰ سیکل شامل آنلینگ در دمای ۵۶ درجه به مدت ۳۰ ثانیه و سنتز در دمای ۷۲ درجه به مدت ۳۰ ثانیه انجام شد. در آنالیز بیان ژن‌ها از نرم‌افزار CFX و فرمول (اختلاف میانگین $\Delta\Delta Ct$ cycle of threshold) استفاده شد [۱۵].

یافته‌ها

نتایج بررسی سمیت با آزمون MTT

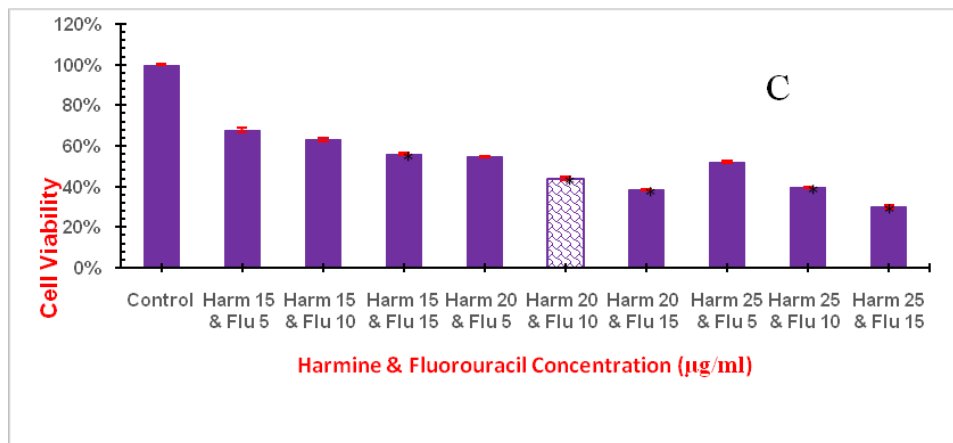
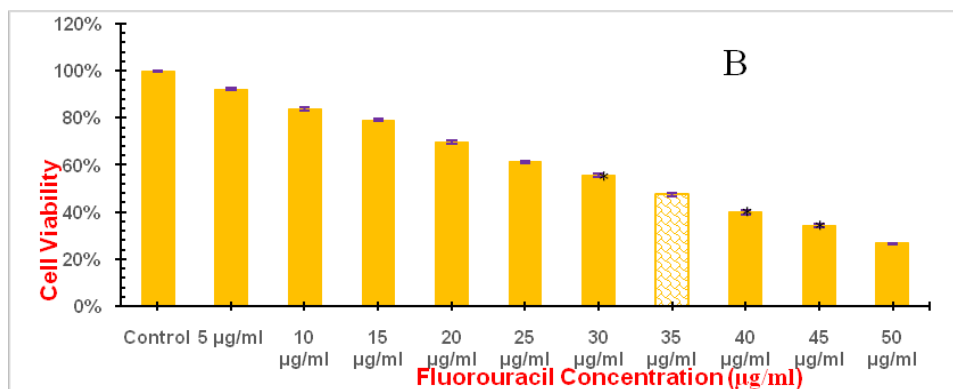
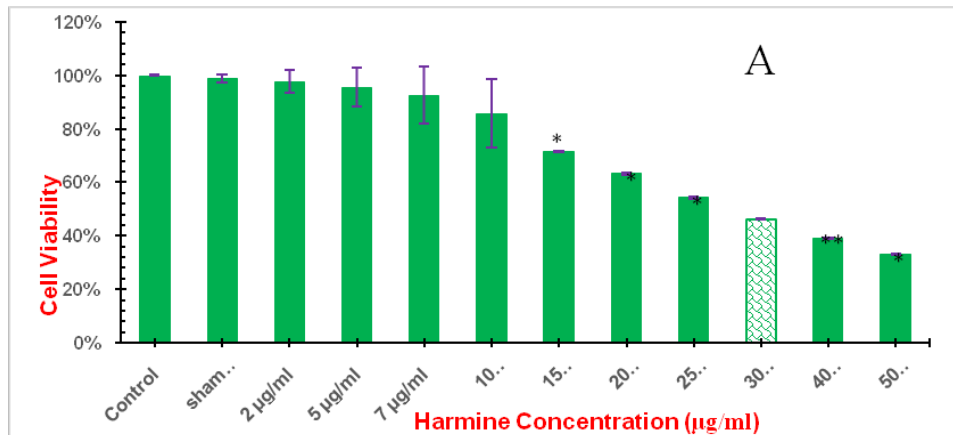
نتایج نشان داد بین غلظت‌های مورد مطالعه هارمین، غلظت ۳۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و برای فلورووراسیل، غلظت ۳۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر و در حالت توأم غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر دارو همراه با غلظت ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از هارمین باعث مرگ نیمی از سلول‌ها (IC_{50}) شده است (تصویر شماره ۱). در مقابل سلول‌های سرطانی، از سلول‌های نرمال (L929) برای اطمینان از اثربخشی آزمایش‌ها استفاده شد. نتایج برای رعایت اختصار گزارش نشده است.

نتایج بررسی مورفولوژی سلولی

نتایج حاصل از مورفولوژی نشان داد ۲۴ ساعت پس از آزمایش در غلظت ۳۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر هارمین تقریباً نیمی از سلول‌ها از حالت چندوجهی خارج شده و کروی می‌شوند. همچنین در غلظت ۳۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر فلورووراسیل نیز سلول‌ها گرد شده و از حالت نرمال خارج می‌شوند که این حالت گرد شدن در گروه هم‌افزایی با غلظت ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از هارمین و ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از داروی فلورووراسیل نیز مشاهده شد.

نتایج بررسی هسته سلولی با رنگ DAPI

همان‌طور که در تصویر شماره ۲ نشان داده می‌شود نتایج حاصل از رنگ فلورسنت DAPI نشان داد در سلول‌های AsPC-1 پس از آزمایش و بعد از گذشت ۲۴ ساعت هسته‌ها قطعه قطعه



تصویر ۱. مورفولوژی سلول‌های (ASPC-۱) آزمایش شده. (A) گروه کنترل، (B) آزمایش با غلظت ۰.۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر هارمین، (C) آزمایش با غلظت ۵۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر از داروی فلوروراسیل، (D) آزمایش با غلظت ۰.۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر از هارمین و ۰.۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر از داروی فلوروراسیل. غلظت‌های ذکر شده از نتایج IC₅₀ تست MTT به دست آمده است. درشت‌نمایی ۲۰ برابر اینورت میکروسکوپ.

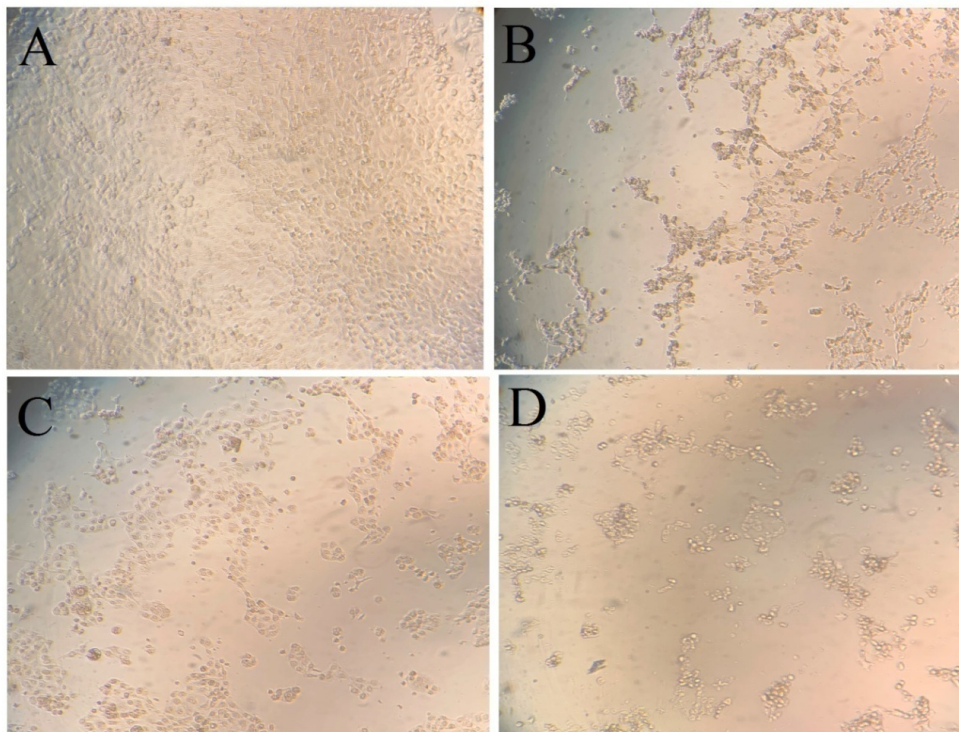
غلظت نمونه‌هایی از RNA استخراج‌شده به روش نانودراپ را نشان می‌دهد.

بحث

در این پژوهش تجربی برای بررسی اثرات سیتوتوکسیک هارمین، فلوروراسیل و ترکیب هم‌افزایی این ۲ ماده روی تکثیر

و فلوروراسیل به‌تنهایی نتوانسته تغییرات معنادار بیان ژن را باعث شود. این نتایج نشان می‌دهد ترکیب و کاربرد هم‌زمان داروی فلوروراسیل و هارمین به‌طور معناداری ($P < 0.05$) باعث افزایش بیان ژن‌های موردنظر شده است.

تصویر شماره ۷ نتایج کیفی نمونه‌هایی از RNAهای استخراج‌شده روی ژل آگارز و همچنین جدول شماره ۲ نتایج

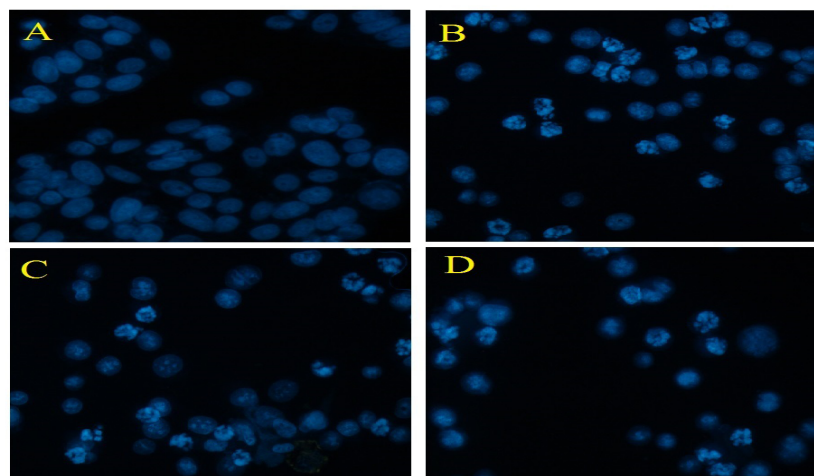


مجله طب مکمل
دانشگاه علوم پزشکی اراک

تصویر ۲. درصد حیات سلول‌های ASPC-1 در مجاورت با غلظت‌های ۰.۲، ۰.۵، ۰.۷، ۱.۰، ۱.۵، ۲.۰، ۳.۰، ۴.۰ و ۵.۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از هارمین (A) غلظت‌های ۰.۱، ۰.۵، ۱.۰، ۲.۰، ۳.۰، ۴.۰، ۵.۰ و ۵.۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر از فلوراسیل، (B) غلظت‌های ۰.۱ و ۰.۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر از داروی فلوراسیل به همراه غلظت‌های ۰.۲، ۰.۵، ۱.۰ و ۲.۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از هارمین و (C) سطح معناداری $P < 0.05$.

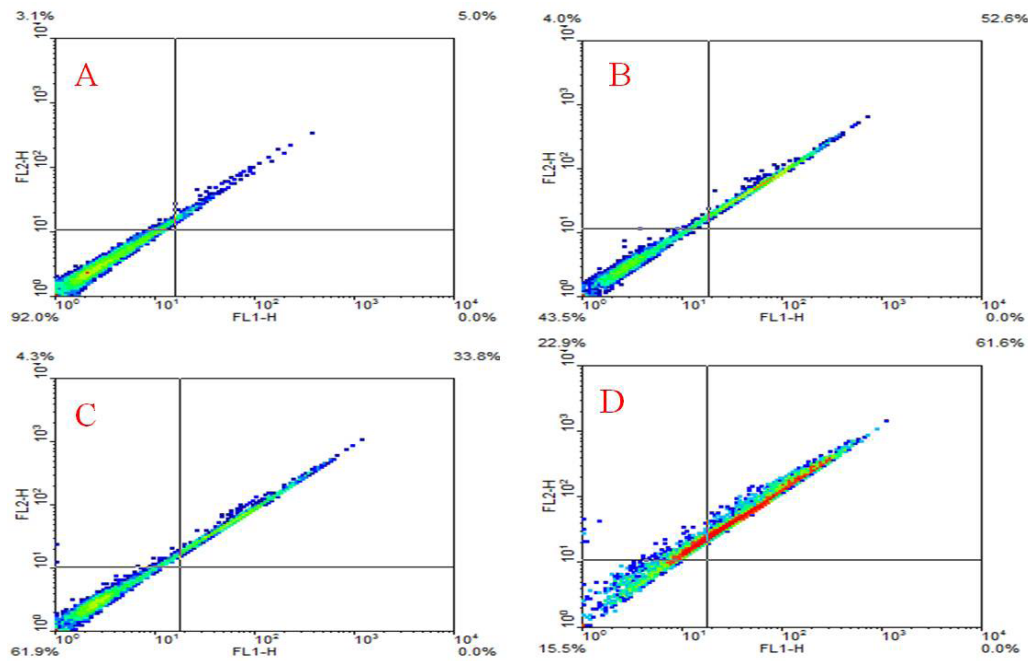
نتایج حاصل از آزمون MTT نشان داد آزمایش سلول‌ها هم توسط هارمین و هم فلورویوراسیل و همچنین در حالت هم‌افزایی می‌تواند به صورت وابسته به دُز موجب کاهش زیست‌پذیری و افزایش سیتوتوکسیک شود. در تمام موارد از سلول‌های نرمال

سلول‌های سرطانی پانکراس رده ASPC-1 از آزمون MTT و برای بررسی آپوپتوز در سلول‌های تحت آزمایش از آنالیز فلوسایتومتری و رنگ‌آمیزی DAPI استفاده شد و در نهایت، تغییرات در میزان بیان ژن‌های آپوپتوزی کاسپاز ۳، کاسپاز ۹، BAX و P53 بررسی شد.



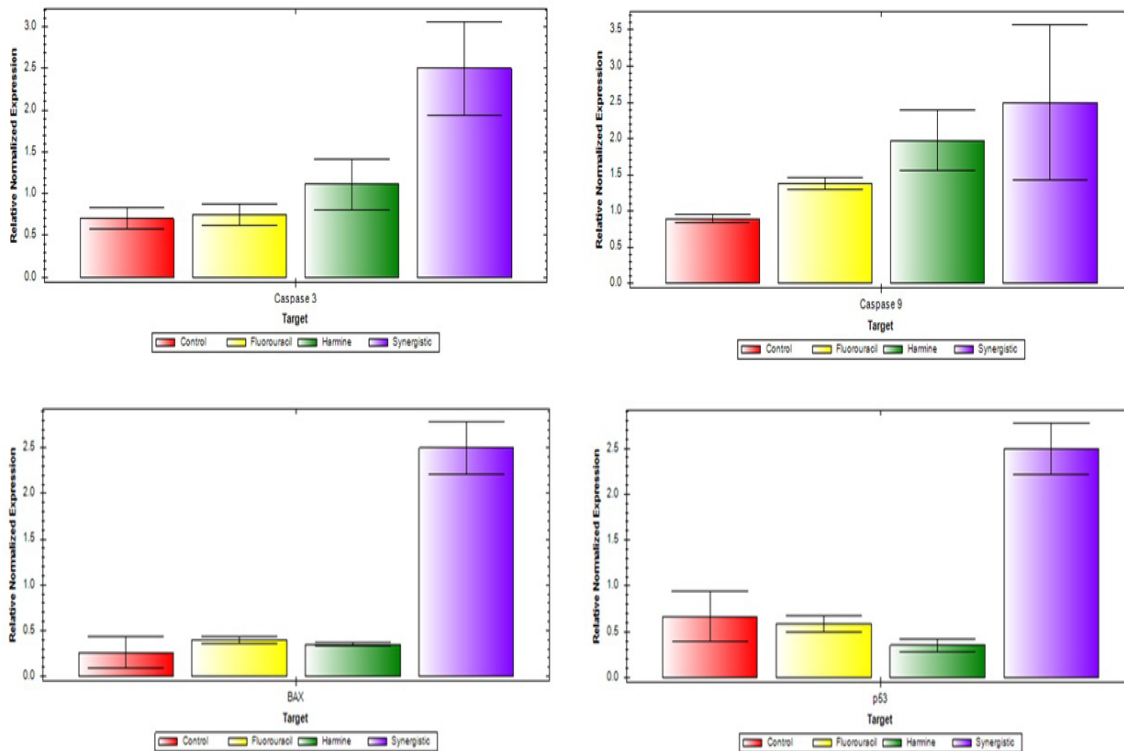
مجله طب مکمل
دانشگاه علوم پزشکی اراک

تصویر ۳. هسته سلول‌های ASPC-1 رنگ‌شده با رنگ (IPAD.A) گروه کنترل، (B) آزمایش با غلظت ۰.۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر هارمین، (C) آزمایش با غلظت ۵.۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر از داروی فلورویوراسیل و (D) آزمایش با غلظت ۰.۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر از هارمین و ۰.۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر از داروی فلورویوراسیل. در هر یک از نمونه‌های آزمایش شده قطعه قطعه شدن و چروکیدگی هسته‌ها مشاهده می‌شود.



مجله طب مکمل
دانشگاه علوم پزشکی اراک

تصویر ۴. آنالیز فلوسایتومتري
(A) گروه کنترل، (B) غلظت ۰۳ میکروگرم بر میلی لیتر هارمین، (C) غلظت ۵۳ میکروگرم بر میلی لیتر از داروی فلوروراسیل، (D) غلظت ۰۲ میکروگرم بر میلی لیتر از هارمین و ۰۱ میکروگرم بر میلی لیتر از داروی فلوروراسیل.



مجله طب مکمل
دانشگاه علوم پزشکی اراک

تصویر ۵. آنالیز بیان ژن های کاسپاز ۳، کاسپاز ۹، BAX و P53 در گروه های کنترل، غلظت ۰۳ میکروگرم بر میلی لیتر هارمین، غلظت ۵۳ میکروگرم بر میلی لیتر داروی فلوروراسیل و گروه هم افزایی با غلظت ۰۲ میکروگرم بر میلی لیتر هارمین و ۰۱ میکروگرم بر میلی لیتر فلوروراسیل.

جدول ۲. نتایج نانودراب

غلظت (µg/ml)	نمونه
۰/۹۸۷	کنترل
۰/۸۲۲	آزمایش با هارمین
۰/۵۱۹	آزمایش با فلوراسیل
۰/۷۳۴	آزمایش توأم



باعث ۵۰ درصد کشتندگی می‌شود. برای فلورویوراسیل این عدد ۳۵ میکروگرم و برای غلظت توأم ۲۰/۱۰ میکروگرم بود.

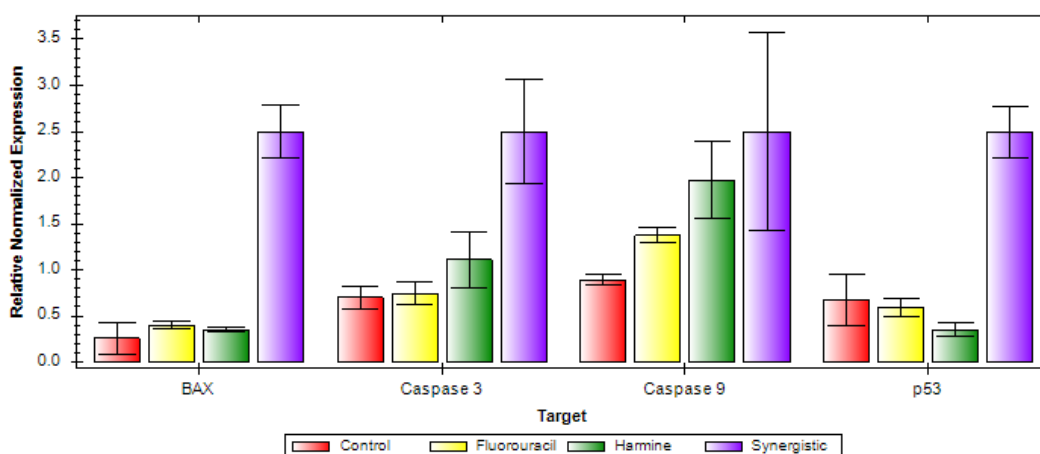
بررسی تغییرات انجام‌شده روی هسته سلول‌ها با رنگ‌آمیزی DAPI نشان داد در گروه‌های آزمایشی هارمین با غلظت ۳۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، فلورویوراسیل با غلظت ۳۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر و هم‌افزایی با غلظت ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از هارمین و ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از داروی فلورویوراسیل، هسته سلول‌ها قطعه قطعه و چروکیده شده که نشان‌دهنده آپوپتوز است.

پیش‌تر در سال ۲۰۱۹ دینگ و همکاران، اثر مهاری هارمین روی سلول‌های سرطان سینه را با رنگ‌آمیزی فلوروسنت DAPI بررسی کردند. نتایج این بررسی به این صورت بود که تراکم کروماتین و تکه‌تکه شدن هسته‌ای در سلول‌های MDA-MB-231 و MCF-7 تحت درمان با هارمین به مدت ۲۴ ساعت مشهود بود که نشان‌دهنده آپوپتوز است [۱۳]. در تحقیق دیگری که اثر هم‌افزایی رزوراترول و داروی فلورویوراسیل بررسی شده بود، اثر آپوپتوزی این ترکیب‌ها را روی سلول‌های سرطان پوست

L929 در کنار سلول‌های سرطانی تست انجام شد که نتایج آن گزارش نشده است. در مطالعه گائو و همکاران مشخص شد غلظت‌های مختلف هارمین می‌تواند اثر سیتوتوکسیک بر سلول‌های سرطانی تخمدان (SKOV-3) داشته باشد و به روش وابسته به غلظت جلوی رشد این سلول‌ها را بگیرد [۱۱].

در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۲۱ میلکزآرک انجام داد، روی اثر هم‌افزایی داروی شیمی‌درمانی فلورویوراسیل و یک آنالوگ سولفورافان (حاصل از کلم بروکلی) روی چندین رده سلولی سرطان پروستات (PC-3 و LNCaP) و کولون (HT-29 و Caco-2) انجام شد، مشخص شد زمانی که داروی شیمی‌درمانی و آنالوگ سولفورافان با هم ترکیب شوند، می‌تواند در فواصل زمانی ۲۴ و ۷۲ ساعت و با افزایش غلظت باعث کاهش رشد در رده‌های سلولی مذکور شود و این کاهش رشد، نسبت به زمانی که به‌تنهایی به کار برده شدند، بیشتر بود [۱۲].

مطالعات ما همسو با مطالعات گذشته اثرات مثبت هارمین را به‌خصوص در ترکیب با دارو نشان می‌دهد [۱۲]. نتایج ما نشان داد در میان غلظت‌های مختلف هارمین مقدار ۲۰ میکروگرم



تصویر ۶. آنالیز بیان ژن‌های کاسپاز ۳، کاسپاز ۹، BAX و P53 در یک نمودار. گروه‌های کنترل، غلظت ۰۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر هارمین، غلظت ۵۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر داروی فلورویوراسیل و گروه هم‌افزایی با غلظت ۰۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر هارمین و ۰۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر فلورویوراسیل.

پانکراس را با استفاده از آزمون Annexin تأیید کند. مقاومت به داروهای شیمی‌درمانی از مشکلات درمان سرطان است، از جمله در سرطان کولون مقاومت به داروی فلوروپوراسیل از مشکلات درمان این بیماری است. در این راستا در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۲۱ انجام شد، ترکیب توأم کورکومول جداشده از ریشه *Rhizoma Curcumae* و فلوروپوراسیل بر رده سلولی سرطان کولون HCT116 که مقاوم به فلوراسیل است، بررسی شد. نتایج حاصل از آزمون Annexin V/PI نشان داد هنگام استفاده توأم از ۲ ترکیب مذکور سلول‌ها دچار آپوپتوز می‌شوند و این میزان نسبت به استفاده به‌تنهایی از کورکومول بیشتر بود و مقاومت به فلوروپوراسیل نیز برداشته شده است [۱۶]. نتایج حاصل از مطالعه حاضر نیز همسو با مطالعه گائو و همکاران در زمان آزمایش توأم میزان آپوپتوز ایجادشده نسبت به آزمایش به‌تنهایی بیشتر بود.

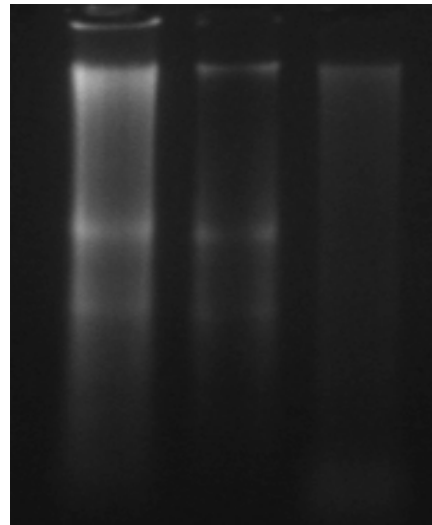
نتایج تغییرات بیان ژن‌های آپوپتوزی نشان داد هارمین، فلوروپوراسیل و استفاده توأم این ۲ ماده موجب افزایش معنادار بیان ژن‌های کاسپاز ۳، کاسپاز ۹ و Bax شود و در ارتباط با ژن p53 ترکیب هم‌افزایی موجب افزایش بیان این ژن شد.

طی مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۱ توسط همسا و کونن انجام شد به بررسی اثر آپوپتوزی هارمین بر سرطان پوست رده سلولی B16F-10 پرداختند. در این پژوهش آن‌ها بیان ژن‌های آپوپتوزی همچون کاسپاز ۳، Bcl2، Bax، p53 و کاسپاز ۹ به روش RT-PCR اندازه‌گیری کردند. نتایج این آزمون مشخص کرد هارمین با افزایش بیان ژن Bax و فعال کردن ژن‌های p53، کاسپاز ۳، کاسپاز ۹ و همچنین کاهش بیان ژن Bcl2 می‌تواند سبب ایجاد آپوپتوز در سلول‌های سرطان پوست شود [۱۷].

در تحقیق حاضر مشابه و همسو با مطالعه ذکرشده هارمین، فلوروپوراسیل و در حالت هم‌افزایی موجب افزایش بیان ژن‌های کاسپاز ۳، Bax و کاسپاز ۹ شد و در حالت استفاده هم‌زمان هارمین و فلوروپوراسیل موجب افزایش بیان ژن p53 شد. در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۹ توسط لطیف و همکاران انجام شد، اثر هم‌افزایی رزوراترول و داروی فلوروپوراسیل بر بیان ژن p53 روی رت‌های دارای سرطان کولون ارزیابی و مشخص شد زمانی که به‌صورت ترکیبی از این ۲ ماده و به‌صورت هم‌زمان استفاده شد، موجب تنظیم افزایشی در بیان ژن p53 شد [۱۸]. همه این موارد بیانگر این نکته است که استفاده از فرآورده‌های گیاهی در کنار داروی شیمیایی می‌تواند اثربخشی درمان را در سلول‌های سرطانی مؤثرتر کند.

نتیجه‌گیری

یافته‌های این تحقیق نشان می‌دهد هارمین و داروی فلوروپوراسیل به‌تنهایی به‌دلیل داشتن خاصیت سیتوتوکسیسیته بالا سبب مهار و مرگ سلول‌های سرطانی پانکراس شده و هنگامی که به‌صورت هم‌زمان مصرف شد از میزان داروی فلوروپوراسیل



تصویر ۷. نمونه‌هایی از استخراج RNA



با رنگ‌آمیزی فلورسنت DAPI بررسی کردند. نتایج این بررسی نشانگر تراکم کروماتین و تکه تکه شدن هسته‌ای، در سلول‌های سرطان پوست تحت درمان با رزوراترول، داروی فلوروپوراسیل و کاربرد به‌صورت هم‌زمان به مدت ۲۴ ساعت مشهود بود، تکه تکه شدن و تراکم کروماتین که نشان‌دهنده آپوپتوز است در کاربرد هم‌زمان رزوراترول و فلوراسیل بیشتر مشهود بود [۱۴].

در پژوهش پیش‌رو نیز نتایج آزمون DAPI نشان داد سلول‌های رده ASPC-1 که با هارمین، فلوروپوراسیل و آزمایش توأم این دو هسته‌های تکه تکه شده و کروماتین‌های فشرده داشتند و این اثر آپوپتوزی در گروه آزمایش توأم نسبت به استفاده هر یک به‌تنهایی بیشتر بود که این نتایج با مطالعه ذکرشده همسو است.

به‌نظر می‌رسد کاربرد توأم هارمین و دارو می‌تواند اثرات مؤثر داروی فلوروپوراسیل را تا ۳ برابر غلظت کمتر افزایش دهد. این نتیجه در جهت تغییر درمان از سمت شیمیایی کامل به طرف استفاده از مواد مؤثر گیاهی و هم‌زمان داروی شیمیایی برای اثربخشی بیشتر و جلوگیری از اثرات بالقوه درمان‌های شیمیایی تأکید می‌شود. به‌ویژه اینکه لی در این زمینه مطالعاتی در سال‌های ۲۰۲۰ و ۲۰۲۱ انجام داده است.

طی پژوهشی که در سال ۲۰۲۰ لی و همکاران انجام دادند از هارمین به‌عنوان یک داروی ضدسرطان برای درمان سرطان کلورکتال در موش استفاده شد. لی و همکاران سلول‌های سرطانی کلورکتال را تحت آزمایش با هارمین به مدت ۲۴ ساعت قرار دادند و سپس به‌وسیله رنگ‌آمیزی دوگانه Annexin V-FITC/PI مشاهده کردند که سلول‌های سرطانی تحت آزمایش با غلظت‌های خاصی از هارمین دچار آپوپتوز ثانویه شده است [۱۵].

نتایج حاصل از پژوهش ما نیز همانند مطالعه لی و همکاران توانست ایجاد آپوپتوز در سلول‌های سرطانی رده ASPC-1



کاسته، اما همچنان سیتوتوکسیسیته بالایی را منجر شد که همچنان می‌تواند آپوپتوز را در سلول‌های سرطانی القا کرده و از رشد آن‌ها جلوگیری کند. این بدان معناست که حضور هارمین از میزان داروی شیمیایی می‌کاهد و بنابراین می‌تواند اثرات جانبی کاربرد داروی شیمیایی را به فراوانی کاهش دهد که البته نیاز به تحقیق و مطالعه بیشتر، خصوصاً در *in vivo* دارد.

از موارد محدودیت پژوهش می‌توان به محدودیت در کاربرد مقدار داروی شیمیایی و میزان سمیت آن اشاره کرد. همچنین پیشنهاد می‌شود داروهای شیمیایی دیگر و همچنین ژن‌های کلیدی دیگر در مسیر سرطان‌زایی بررسی و مقایسه شوند.

ملاحظات اخلاقی

پیروی از اصول اخلاق پژوهش

در این مقاله کلیه اصول اخلاقی در نظر گرفته شده است. شرکت کنندگان از هدف تحقیق و مراحل اجرای آن مطلع شدند. آنها همچنین از محرمانه بودن اطلاعات خود اطمینان داشتند و می‌توانستند هر زمان که بخواهند مطالعه را ترک کنند و در صورت تمایل، نتایج تحقیق در اختیار آنها قرار خواهد گرفت.

حامی مالی

این مقاله برگرفته از پایان‌نامه کارشناسی ارشد نویسنده اول و تصویب‌شده در دانشکده علوم دانشگاه آزاد اسلامی با کد ۱۶۲۳۷۴۱۶۳ است و حامی مالی ندارد.

مشارکت نویسندگان

همه نویسندگان به طور یکسان در تهیه این مقاله مشارکت داشتند.

تعارض منافع

بنابر اظهار نویسندگان این مقاله تعارض منافع ندارد.

تشکر و قدردانی

از تمام همکاران در گروه زیست‌شناسی و پژوهشکده خوارزمی تشکر و قدردانی می‌شود.



References

- [1] Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2015; 65(2):87-108. [DOI:10.3322/caac.21262] [PMID]
- [2] Kanji ZS, Gallinger S. Diagnosis and management of pancreatic cancer. *Canadian Medical Association Journal*. 2013; 185(14):1219-26. [Link]
- [3] Salem AA, Mackenzie GG. Pancreatic cancer: A critical review of dietary risk. *Nutrition Research*. 2018; 52:1-13. [DOI:10.1016/j.nutres.2017.12.001] [PMID]
- [4] Sara JD, Kaur J, Khodadadi R, Rehman M, Lobo R, Chakrabarti S, et al. 5-fluorouracil and cardiotoxicity: A review. *Therapeutic Advances in Medical Oncology*. 2018; 10:1758835918780140. [DOI:10.1177/1758835918780140] [PMID] [PMCID]
- [5] Rouanet M, Lebrin M, Gross F, Bournet B, Cordelier P, Buscail L. Gene therapy for pancreatic cancer: Specificity, issues and hopes. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017; 18(6):1231. [DOI:10.3390/ijms18061231] [PMID] [PMCID]
- [6] Shahbazfar AA, Zare P, Mohammadpour H, Tayefi-Nasrabadi H, Emami SJ. Combination therapy enhanced the antitumor activity of artemisinin-iron in lung cancer Calu-6 cells. *European Journal of Oncology*. 2017; 22(1):31-7. [Link]
- [7] Cheng MH, Hsieh CL, Wang CY, Tsai CC, Kuo CC. Complementary therapy of traditional Chinese medicine for blood sugar control in a patient with type 1 diabetes. *Complementary Therapies in Medicine*. 2017; 30:10-13. [DOI:10.1016/j.ctim.2016.09.007] [PMID]
- [8] Ergin V, Hariry RE, Karasu C. Carbonyl stress in aging process: Role of vitamins and phytochemicals as redox regulators. *Aging and Disease*. 2013; 4(5):276-94. [DOI:10.14336/AD.2013.0400276] [PMID] [PMCID]
- [9] 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 Journal of Pharmacology*. 2018; 13(3):203-13. [DOI:10.3329/bjpv.v13i3.34990]
- [10] Balaji N, Devy AS, Sumathi MK, Vidyakshmi S, Kumar GS, D'Silva S. Annexin v - affinity assay - apoptosis detection system in granular cell ameloblastoma. *Journal of International Oral Health*. 2013; 5(6):25-30. [PMID] [PMCID]
- [11] Gao J, Zhu H, Wan H, Zou X, Ma X, Gao G. Harmine suppresses the proliferation and migration of human ovarian cancer cells through inhibiting ERK/CREB pathway. *Oncology Reports*. 2017; 38(5):2927-34. [DOI:10.3892/or.2017.5952] [PMID]
- [12] M Milczarek M, Pogorzelska A, Wiktorska K. Synergistic interaction between 5-FU and an analog of sulforaphane-2-oxohexyl isothiocyanate-in an in vitro colon cancer model. *Molecules*. 2021; 26(10):3019. [DOI:10.3390/molecules26103019] [PMID] [PMCID]
- [13] Ding Y, He J, Huang J, Yu T, Shi X, Zhang T, et al. Harmine induces anti-cancer activity in breast cancer cells via targeting TAZ. *International Journal of Oncology*. 2019; 54(6):1995-2004. [DOI:10.3892/ijo.2019.4777]
- [14] Dun J, Chen X, Gao H, Zhang Y, Zhang H, Zhang Y. Resveratrol synergistically augments anti-tumor effect of 5-FU in vitro and in vivo by increasing S-phase arrest and tumor apoptosis. *Experimental Biology and Medicine (Maywood)*. 2015; 240(12):1672-81. [DOI:10.1177/1535370215573396] [PMID] [PMCID]
- [15] Li Z, Chen L, He C, Han Y, Han M, Zhang Y, et al. Improving anti-tumor outcomes for colorectal cancer therapy through in situ thermosensitive gel loading harmine. *American Journal of Translational Research*. 2020; 12(5):1658-71. [PMID] [PMCID]
- [16] Gao J, Hou D, Hu P, Mao G. Curcumin increases the sensitivity of colon cancer to 5-FU by regulating Wnt/ β -catenin signaling. *Translational Cancer Research*. 2021; 10(5):2437-50. [DOI:10.21037/tcr-21-689] [PMID] [PMCID]
- [17] Hamsa TP, Kuttan G. Harmine activates intrinsic and extrinsic pathways of apoptosis in B16F-10 melanoma. *Chinese Medicine*. 2011; 6(1):11 [DOI:10.1186/1749-8546-6-11] [PMID] [PMCID]
- [18] Abdel Latif Y, El-Bana M, Hussein J, El-Khayat Z, Farrag AR. Effects of resveratrol in combination with 5-fluorouracil on N-methylnitrosourea-induced colon cancer in rats. *Comparative Clinical Pathology*. 2019; 28(5):1351-62. [DOI:10.1007/s00580-019-02967-2]
- [19] Diao E, Ren D, Liu T, Zhang J, Hu W, Hou H. Ozone detoxification of patulin in aqueous solution and cytotoxic evaluation using human hepatic carcinoma cells. *Toxicol*. 2018; 155:21-26. [DOI:10.1016/j.toxicol.2018.10.004] [PMID]
- [20] Truter D, Chellan N, Strijdom H, Webster I, Rawstorne J, Kotzé SH. Histomorphological changes in the pancreas and kidney and histopathological changes in the liver in male Wistar rats on antiretroviral therapy and melatonin treatment. *Acta Histochemica*. 2018; 120(4):347-55. [DOI:10.1016/j.acthis.2018.03.006] [PMID]