



بررسی اثرات سمیت بایکالین بر رده های سلولی سرطان کولورکتال C26 و CT26

بهاره جعفری^۱، احمدرضا بهرامی^{۱،۲،۳}، مریم مقدم متین^{۱،۲،۳*}

۱. گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

۲. گروه پژوهشی تشخیصی ها و درمان های نوین، پژوهشکده فناوری زیستی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

۳. گروه پژوهشی سلول های بنیادی و پزشکی بازساختی، سازمان جهاد دانشگاهی خراسان رضوی، مشهد، ایران

E-mail: BaharehJafari1993@gmail.com

چکیده

سرطان کولورکتال یکی از شایع ترین سرطان ها در جهان می باشد. با وجود پیشرفت های قابل توجهی که در زمینه ی تشخیص و درمان این سرطان صورت گرفته، این بیماری همچنان دومین عامل مرگ و میر ناشی از سرطان در دنیا است. در دهه های اخیر به منظور کشف ترکیبات دارویی جدید با خواص ضدسرطانی، توجه زیادی به گیاهان می شود. در این میان، بایکالین، فلاونوئید موجود در *Scutellaria baicalensis* به عنوان یک عامل ضدسرطان قوی شناخته شده است. در این مطالعه، اثرات سمیت بایکالین بر روی سلول های سرطان کولورکتال موشی C26 و CT26 با روش MTT مورد بررسی قرار گرفت. بایکالین موجب مهار رشد سلول های C26 و CT26 به ترتیب با مقادیر IC_{50} $82/04 \mu M$ و $44/68 \mu M$ شد. این نتایج نشان دادند که بایکالین اثرات ضدسرطانی قوی بر روی سلول های سرطان کولورکتال دارد و می تواند یک داروی بالقوه و موثر برای درمان سرطان باشد.

کلمات کلیدی: سرطان کولورکتال، ترکیبات گیاهی، بایکالین، C26، CT26

مقدمه

سرطان کولورکتال دومین عامل مرگ و میر ناشی از سرطان و سومین سرطان شایع در جهان می باشد (۳). شیمی درمانی، یکی از معمول ترین درمان ها برای این بیماری، با وجود موفقیت های چشم گیری که در درمان انواع سرطان ها داشته است؛ همواره با دو مشکل اساسی شامل مقاومت دارویی سلول های سرطانی و اثرات جانبی بر سلول های سالم مواجه می باشد (۲۱). به همین دلیل امروزه توجه زیادی به سوی پزشکی گیاهی معطوف گردیده است (۸).

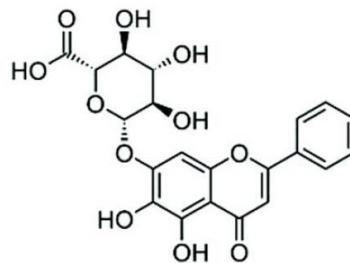
اکثر ترکیبات گیاهی دارای خواص ضدسرطانی با عوارض جانبی به نسبت کمتری بوده و اساس بسیاری از داروها بر پایه ی ترکیبات طبیعی می باشد (۱۴). تحقیقات زیادی نشان داده اند که فلاونوئیدها، پلی فنول های طبیعی موجود در بسیاری از میوه ها و سبزیجات، فواید زیادی برای سلامت انسان دارند. یکی از گیاهان دارویی که به منظور درمان بیماری های مختلف به طور گسترده در کشورهای آسیایی مورد استفاده قرار می گیرد؛ *Scutellaria baicalensis* نام دارد. بسیاری از قابلیت های دارویی این گیاه از جمله خواص ضدالتهابی، ضدباکتریایی، ضدویروسی و ضدسرطانی، به ترکیبات فلاونوئیدی موجود در ریشه ی آن شامل بایکالین، بایکالین و وگونوزید نسبت داده می شود (۲، ۱۵، ۱۶، ۱۸ و ۲۰).

سومین همایش بین المللی و یازدهمین همایش ملی بیوتکنولوژی جمهوری اسلامی ایران

۱۰ لغایت ۱۲ شهریور ماه ۱۳۹۸ - مرکز همایش های رازی



بایکالین (5, 6-dihydroxy-7-O-glucuronide flavone) (شکل ۱) مهم ترین فلاونوئید موجود در ریشه گیاه *S. baicalensis* می باشد. بسیاری از مطالعات حاکی از اثرات ضدسرطانی این ترکیب در سرطان های مختلف شامل: سرطان های پستان، پروستات، کبد، مثانه و کولورکتال می باشند (۴، ۵، ۷، ۱۹ و ۲۴). اما تاکنون مطالعه ای که به طور اختصاصی بر روی رده های سلولی سرطان کولورکتال C26 و CT26 انجام شده باشد، گزارش نشده است. در این مطالعه اثرات ضدسرطانی بایکالین بر روی رده های سلولی C26 و CT26 مورد بررسی قرار گرفت و مشاهده گردید که بایکالین به طور موثری رشد این سلول ها را مهار می کند. نتایج این مطالعه نشان می دهد که بایکالین اثرات ضدسرطانی قابل ملاحظه ای بر رده های سلولی سرطان کولورکتال دارد و می تواند یک داروی موثر و بالقوه در درمان سرطان باشد.



شکل ۱: ساختار شیمیایی بایکالین (۲۴).

مواد و روش ها

بایکالین با خلوص ۹۰٪ از شرکت تیناب شیمی خاورمیانه (خراسان رضوی، ایران) خریداری و در DMSO^۱ استریل حل شد. رده های سلولی سرطان کولورکتال C26 و CT26 در محیط کشت RPMI-1640 حاوی ۱۰٪ سرم جنینی گاو کشت و در دمای ۳۷°C با رطوبت ۹۵٪ و CO₂ ۵٪ گرمخانه گذاری شدند. زندهمانی و رشد سلول ها با روش MTT مورد بررسی قرار گرفت. سلول ها (به تعداد ۱×۱۰^۴ سلول به ازای هر چاهک) در ظروف ۹۶ خانه کشت و پس از گذشت ۲۴ ساعت، غلظت های مشخص از بایکالین به چاهک ها اضافه شد. بعد از ۴۸ ساعت گرمخانه گذاری، محیط کشت چاهک ها با محیط کشت تازه ی حاوی محلول MTT با غلظت ۵ mg/ml (به ازای هر چاهک ۲۰ μl محلول MTT) جایگزین و به مدت ۳ ساعت در دمای ۳۷°C نگهداری شدند. در نهایت، بلورهای فورمازان تشکیل شده در چاهک ها با DMSO حل و جذب آن ها در طول موج ۵۹۵ nm خوانده شد. تمام آزمایش ها سه مرتبه و در هر مرتبه با سه تکرار انجام گرفت. نتایج با استفاده از نرم افزار آماری GraphPad Prism 8 بررسی گردید.

نتایج و بحث

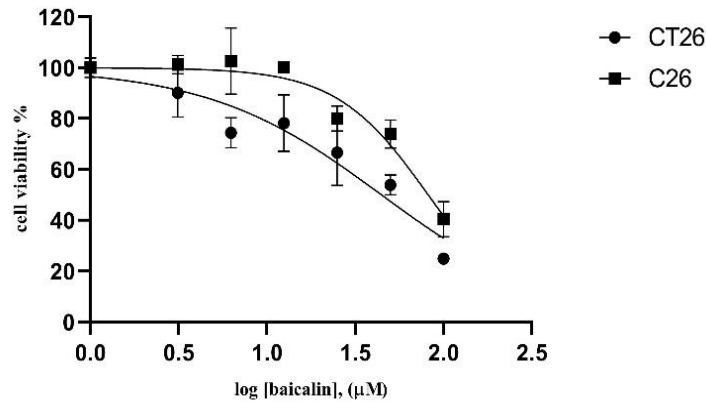
در این مطالعه تاثیر غلظت های مختلف بایکالین بر زندهمانی سلول های C26 و CT26 در طی ۴۸ ساعت با استفاده از روش MTT مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد بایکالین در مسیری وابسته به غلظت موجب مرگ سلول های C26 و CT26 شد. پس از گذشت ۴۸ ساعت گرمخانه گذاری، بایکالین در غلظت های ۸۲/۰۴ μM و ۴۴/۶۸ μM به ترتیب مرگ نیمی از سلول های C26 و CT26 را موجب گردید (شکل ۲).

^۱ Dimethyl sulfoxide
دبیرخانه همایش: کیلومتر ۱۵ اتوبان تهران - کرج، شهرک علم و فناوری پژوهش، بلوار پژوهش،
پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، ساختمان فناوری - تلفکس: ۰۲۱-۴۴۷۸۷۴۱۶ - همراه: ۰۹۳۵۷۷۴۴۶۱۰



سومین همایش بین المللی و یازدهمین همایش ملی بیوتکنولوژی جمهوری اسلامی ایران

۱۰ لغایت ۱۲ شهریور ماه ۱۳۹۸ - مرکز همایش های رازی



شکل ۲: اثرات سمیت بایکالین بر روی رده های سلولی C26 و CT26. سلول ها توسط غلظت های سریالی $125-3/100$ μM بایکالین به مدت ۴۸ ساعت تیمار شدند.

سرطان کولورکتال، دومین عامل مرگ و میر ناشی از سرطان در جهان، سالانه موجب مرگ ۶۰۰۰۰۰ نفر می گردد (۱۷). با وجود اینکه میزان بروز این سرطان در کشورهای توسعه یافته، به دلیل افزایش امکانات غربالگری و درمان، کاهش یافته است؛ اما تحقیقات نشان می دهند بار سرطان کولورکتال در کشورهای در حال توسعه که با ترویج سبک زندگی غربی مواجه هستند، روبه افزایش می باشد (۳، ۱۲ و ۲۳). باتوجه به اینکه درمان های موجود شامل شیمی درمانی، پرتودرمانی و جراحی هریک دارای معایبی از جمله مقاومت دارویی، سمیت سلولی و امکان بازگشت مجدد تومور هستند (۱۱، ۲۱)؛ بنابراین پیدا کردن جایگزینی با عوارض جانبی کمتر و اثرگذاری بیشتر در اولویت قرار می گیرد.

در طی ۳۰ سال گذشته تقریباً ۸۰٪ داروهای ضدسرطان از ترکیبات طبیعی بدست آمده است؛ این ترکیبات به دلیل عوارض جانبی به نسبت کمتری که دارند، بسیار مورد توجه قرار گرفته اند (۹، ۱۴). گیاه *S. baicalensis* یکی از گیاهان دارویی پرکاربرد در کشورهای آسیایی به ویژه چین، کره و ژاپن می باشد. بایکالین به عنوان فلاونوئید گلیکوزیدی موجود در ریشه ی این گیاه دارای خواص ضدالتهابی (۲۶)، ضدباکتریایی (۱۳)، ضدویروسی (۶) و نیز ضدسرطانی می باشد.

مطالعات بسیاری اثرات ضدسرطانی بایکالین را در سرطان های مختلف نشان داده اند. در سرطان پروستات، بایکالین در غلظت $6/108$ μM موجب مرگ نیمی از جمعیت سلولی LNCaP شد (۵). در سرطان کبد، این اثر ضدسرطانی به مراتب بیشتر بود به طوری که در غلظت 25 μM بایکالین، نیمی از سلول های SK-Hep1 دچار مرگ سلولی شدند (۴). همچنین مطالعاتی که روی سرطان های مثانه، پستان و کولورکتال انجام گرفت، نشان دهنده ی اثرات ضدسرطانی بایکالین بودند، اگرچه که مقادیر IC_{50} در بررسی انجام شده روی سلول های سرطان کولورکتال انسانی SW620 به نسبت بالا (200 μM) بود (۷، ۱۹ و ۲۴). نتایج مطالعه پیش رو نیز مطابق با مطالعات پیشین، حاکی از اثرات ضدسرطانی بالقوه بایکالین بر رده های سلولی C26 و CT26 می باشد. در این بررسی برخلاف نتایج حاصل از مطالعه Wang و همکاران (۲۵) که در آن بایکالین اثر سمیت بر رده ی سلولی MCF-7 نداشت، هیچ گونه اثر محرک رشد ناشی از تاثیر ماده در سلول های C26 و CT26 مشاهده نشد.

سومین همایش بین المللی و یازدهمین همایش ملی بیوتکنولوژی جمهوری اسلامی ایران

۱۰ لغایت ۱۲ شهریور ماه ۱۳۹۸ - مرکز همایش های رازی



ایران به عنوان کشوری در حال توسعه با پیری جمعیت و ترویج سبک زندگی غربی مواجه می باشد؛ بنابراین انتظار می رود بار سرطان کولورکتال در سال های آینده در کشور افزایش یابد (۱، ۱۰ و ۲۲). مشکلات درمان های حاضر و همچنین نیاز به درمان های مکمل به دلیل پیچیدگی های سرطان، توجه را به سوی ترکیبات گیاهی معطوف کرده است (۲۵). نتایج این مطالعه نشان داد که بایکالین اثرات ضدسرطانی قوی بر روی سلول های سرطان کولورکتال دارد. با توجه به اینکه این ترکیب اثر سمیتی بر سلول های فیبروبلاست پوست انسان (HFF) ندارد (۲۵)؛ بنابراین می تواند یک داروی بالقوه و موثر برای درمان سرطان باشد. همچنین نتایج این مطالعه زمینه برای انجام آزمایش های دورن تنی بر روی موش های BALB/c را فراهم کرد چراکه رده های سلولی C26 و CT26 مشتق از موش های BALB/c هستند.

منابع

1. **Abdifard, E., Amini, S., Bab, S., Masroor, N., Khachian, A., & Heidari, M.** (2016). "Incidence trends of colorectal cancer in Iran during 2000-2009: A population-based study". *Medical Journal of the Islamic Republic of Iran*, **30**:382-388.
2. **Arweiler, N.B., Pergola, G., Kuenz, J., Hellwig, E., Sculean, A., & Ausschill, T.M.** (2011). "Clinical and antibacterial effect of an anti-inflammatory toothpaste formulation with *Scutellaria baicalensis* extract on experimental gingivitis". *Clinical Oral Investigations*, **15**(6): 909-913.
3. **Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A.** (2018). "Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries". *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, **68** (6): 394-424.
4. **Chang, W.H., Chen, C.H., and Lu, F.J.** (2002). "Different effects of baicalein, baicalin and wogonin on mitochondrial function, glutathione content and cell cycle progression in human hepatoma cell lines". *Planta Medica*, **68**(2): 128-132.
5. **Chen, S., Ruan, Q., Bedner, E., Deptala, A., Wang, X., Hsieh, T., et al.** (2001). "Effects of the flavonoid baicalin and its metabolite baicalein on androgen receptor expression, cell cycle progression and apoptosis of prostate cancer cell lines". *Cell Proliferation*, **34**(5): 293-304.
6. **Chen, X., Zhang, C.** (2012). "Inhibitory role of baicalin on human herpes virus type 6 in vitro". *Procedia engineering*, **37**:75-78.
7. **Chung, H., Choi, H.S., Seo, E.K., Kang, D.H., and Oh, E.S.** (2015). "Baicalin and baicalein inhibit transforming growth factor- β 1-mediated epithelial-mesenchymal transition in human breast epithelial cells". *Biochemical and Biophysical Research Communication*, **458**(3):707-713.
8. **Cort, A., Ozben, T.** (2015). "Natural product modulators to overcome multidrug resistance in cancer". *Nutrition and Cancer*, **67**(3):411-423.
9. **Cragg, G.M., Grothaus, P.G., & Newman, D.J.** (2009). "Impact of natural products on developing new anti-cancer agents". *Chemical Reviews*, **109**(7):3012-3043.
10. **Daroudi, R., Vahdatimanesh, Z., Zendehdel, K., Akbari Sari, A., Farhan, F., Nahvijou, A., et al.** (2017). "Economic burden of colorectal cancer in Iran in 2012". *Medical Journal of the Islamic Republic of Iran*, **31**(1):768-773.
11. **Dennert, G., Horneber, M.** (2006). "Selenium for alleviating the side effects of chemotherapy, radiotherapy and surgery in cancer patients". *Cochrane Database of Systematic Reviews*, **19**(3): CD005037.
12. **Fidler, M. M., Soerjomataram, I., & Bray, F.** (2016). "A global view on cancer incidence and national levels of the human development index". *International Journal of Cancer*, **139**(11): 2436-2446.
13. **Gao, X., Guo, M., Zhang, Z., Shen, P., Yang, Z., & Zhang, N.** (2017). "Baicalin promotes the bacteriostatic activity of lysozyme on *S. aureus* in mammary glands and neutrophilic granulocytes in mice". *Oncotarget*, **8**(12):19894-19901.
14. **Gordaliza, M.** (2007). "Natural products as leads to anticancer drugs". *Clinical & translational oncology: official publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico*, **9**(12): 767-776.

دبیرخانه همایش: کیلومتر ۱۵ اتوبان تهران - کرج، شهرک علم و فناوری پژوهش، بلوار پژوهش، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، ساختمان فناوری - تلفکس: ۰۲۱-۴۴۷۸۷۴۱۶ - همرا: ۰۹۳۵۷۷۴۴۶۱۰



سومین همایش بین المللی و یازدهمین همایش ملی بیوتکنولوژی جمهوری اسلامی ایران

۱۰ لغایت ۱۲ شهریور ماه ۱۳۹۸ - مرکز همایش های رازی



15. **Ji, S., Li, R., Wang, Q., Miao, W.J., Li Z.W., Si, L.L. et al.** (2015). "Anti-H1N1 virus, cytotoxic and Nrf2 activation activities of chemical constituents from *Scutellaria baicalensis*". *Journal of Ethnopharmacology*, **176**:475–484.
16. **Kim, E.H., Shim, B., Kang, S., Jeong, G., Lee, J.S., Yu, Y.B., et al.** (2009). "Anti-inflammatory effects of *Scutellaria baicalensis* extract via suppression of immune modulators and MAP kinase signaling molecules". *Journal of Ethnopharmacology*, **126**(2): 320-331.
17. **Kolligs, F.T.** (2016). "Diagnostics and Epidemiology of Colorectal Cancer". *Visceral medicine*, **32**(3):158-164.
18. **Li, C., Lin, G., Zuo, Z.** (2011). "Pharmacological effects and pharmacokinetics properties of Radix *Scutellariae* and its bioactive flavones". *Biopharmaceutics & Drug Disposition*, **32**(8):427–445.
19. **Lin, C., Tsai, S.C., Tseng, M.T., Peng, S.F., Kuo, S.C., Lin M.W., et al.** (2013). "AKT serine/threonine protein kinase modulates baicalin-triggered autophagy in human bladder cancer T24 cells". *International journal of oncology*, **42**(3): 993-1000.
20. **Li-Weber, M.** (2009). "New therapeutic aspects of flavones: The anticancer properties of *Scutellaria* and its main active constituents Wogonin, Baicalein and Baicalin". *Cancer Treatment Reviews*, **35**(1): 57-68.
21. **Panczyk, M.** (2014). "Pharmacogenetics research on chemotherapy resistance in colorectal cancer over the last 20 years". *World Journal of Gastroenterology*, **20**(29):9775–9827.
22. **Rafieemanesh, H., Pakzad, R., Abedi, M., Kor, Y., Moludi, J., Towhidi, F., et al.** (2016). "Colorectal cancer in Iran: Epidemiology and morphology trends". *Experimental and clinical sciences journal*, **15**:738–744.
23. **Siegel, R.L., Miller, K.D., and Jemal, A.** (2019). "Cancer statistics, 2019". *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, **69**(1):7–34.
24. **Tsai, Y.C., Chen, W.C., Kuo, T.H., and Tzeng, Y.S.** (2012). "Baicalin induces apoptosis in SW620 human colorectal carcinoma cells *in vitro* and suppresses tumor growth *in vivo*". *Molecules*, **17**(4): 3844-3857.
25. **Wang, C.Z., Zhang, C.F., Chen, L., Anderson, S., Lu, F., & Yuan, C.S.** (2015). "Colon cancer chemopreventive effects of baicalein, an active enteric microbiome metabolite from baicalin". *International Journal of Oncology*, **47**(5):1749-1758.
26. **Ye, C., Li, S., Yao, W., Xu, L., Qiu, Y., Liu, Y., et al.** (2016). "The anti-inflammatory effects of baicalin through suppression of NLRP3 inflammasome pathway in LPS-challenged piglet mononuclear phagocyte". *Innate immunity*, **22**(3):196-204.



Investigating cytotoxic effects of baicalin on colorectal cancer cell lines C26 and CT26

Bahareh Jafari¹, Ahmad Reza Bahrami^{1,2,3}, Maryam M. Matin^{1,2,3*}

¹ Department of Biology, Faculty of Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

² Novel Diagnostics and Therapeutics Research Group, Institute of Biotechnology, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

³ Stem Cell and Regenerative Medicine Research Group, Iranian Academic Center for Education, Culture and Research (ACECR), Khorasan Razavi Branch, Mashhad, Iran

E-mail: Baharehjafari1993@gmail.com

Abstract

Colorectal cancer (CRC) is one of the most common cancers worldwide. Despite significant progress has made in diagnosis and treatment strategies, CRC is still the 2nd major cause of cancer related deaths in the world. In the last decades, natural products have received attention for discovery of novel anticancer therapeutic agents. Baicalin, a flavonoid found in *Scutellaria baicalensis*, has been regarded as a potent anticancer agent. In this study, cytotoxic effects of baicalin on mouse C26 and CT26 CRC cells was examined by MTT assay. Baicalin showed antiproliferative effects in C26 and CT26 cells with IC₅₀ values of 82.04 μ M and 44.68 μ M, respectively. These results suggest that baicalin has potent anticancer effects against colorectal cancer cells and could be considered as a potential and effective drug for cancer therapy.

Key words: colorectal cancer, natural products, baicalin, C26, CT26