تاثیر ضد تکثیری و پروآپوپتوتیک فراکشن های قارچ پلئوروتوس فلوریدا بر سلول‌های سرطان کولون HT-29

دکتر محمود محمودی : استاد ایمونولوژی، مرکز تحقیقات ایمونولوژی، پژوهشکده بوعلی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران.
Email: mahmoudim@mums.ac.ir
شهرزاد زمانی تقی زاده رابع: کارشناس ارشد ایمونولوژی، مرکز تحقیقات ایمونولوژی، پژوهشکده بوعلی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران.
Email: zamanish2@mums.ac.ir
دکتر رویا یارایی: دانشیار ایمونولوژی، گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران. Email: ryaraee@yahoo.com
زهرا سیادت: کارشناس ارشد تغذیه، گروه بیوشیمی و تغذیه، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران.
Email: siadatz1@mums.ac.ir
* **دکتر طوبی غضنفری:** استاد ایمونولوژی، مرکز تحقیقات تنظیم پاسخ های ایمنی، دانشکده پزشکی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران (* مولف مسؤل).
Email: tghazanfari@yahoo.com

تاریخ وصول: ۸۸/۱۱/۲۱ تاریخ پذیرش: ۸۹/۱۱/۲۳

چکیده

زمینه و هدف: مصرف قارچ خوراکی پلئوروتوس فلوریدا از زمان قدیم به علت ارزش های تغذیه ای و اثرات درمانی مورد توجه بوده است. از آنجایی که در بررسی های مختلف تاثیر ضد تکثیری عصاره و فراکشن های مختلف جدا شده از این قارچ بر رده سلول های سرطانی گزارش شده است، این تحقیق با هدف جداسازی فراکشن های جدید از این قارچ و بررسی تاثیر آن ها بر کشندگی سلول های سرطان کولون انجام گرفت.

روش‌کار: در این مطالعه بنیادین، فراکشن های R5، R10، R30 و R100 از عصاره آبی بدنه قارچ پلئوروتوس فلوریدا جدا شدند. تاثیر بازدارندگی این فراکشن ها بر رشد و تکثیر سلول های سرطان کولون (HT-29) و سلول های فیبروبلاستی لثه انسانی (HGF) توسط روش کالریمتری MTT بررسی شد. الگوی مرگ القا شده (آپوپتوز و نکروز) در سلول های سرطانی توسط رنگ آمیزی با انکسین V و پروپیدیم آیوداین تعیین شد. نتایج حاصله با استفاده از نرم افزار آماری SPSS ۱۳و آزمون ANOVA مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

یافته ها: تمامی فراکشن های مورد بررسی به طور وابسته به غلظت، تاثیر مهاری قابل توجهی بر سلول های سرطان کولون (HT-29) داشتند ولی تاثیر ضد تکثیر سلولی کمتری بر سلول های فیبروبلاستی غیر سرطانی (HGF) نشان دادند. مقادیر IC_{50} فراکشن های R5، R10، R30 و R100 به ترتیب ۴۶٪، ۸٪ و ۴٪ بود. فراکشن های R100 و R30 بیشترین تاثیر مهاری را داشتند. فراکشن های R5، R10، R30 و R100 جدا شده از قارچ خوراکی پلئوروتوس فلوریدا تکثیر و بقای سلولی را عمدتاً با واسطه القای آپوپتوز اولیه به میزان ۱۸٪، ۴۹٪، ۴۶٪ و ۷۲٪ کاهش داد.

نتیجه گیری: با توجه به یافته های فوق در مورد حساسیت کمتر سلول های طبیعی در مقایسه با رده سرطانی در برابر فراکشن های R5، R10، R30 و R100 و نیز تاثیرقابل توجه آن ها بر تکثیر و بقای سلول های سرطانی کولون از طریق القای آپوپتوز، این فراکشن ها می‌توانند ترکیبات مناسبی برای بررسی در پیشگیری یا درمان سرطان کولون باشند.

کلیدواژه‌ها: پلئوروتوس فلوریدا، تاثیر ضد تکثیری، رده سلولی سرطان کولون (HT-29)

مقدمه

قارچ‌های خوراکی از زمان قدیم به علت دارا بودن ارزش تغذیه‌ای و اثرات درمانی در رژیم غذایی مورد استفاده قرار گرفته‌اند.[۱-۴] زیرگونه‌های پلئوروتوس را عمدتاً قارچ های صدفی می نامند. این قارچ حدوداً ۴۰ زیرگونه دارد و یکی از آن ها پلئوروتوس فلوریدا نام دارد که نوعی قارچ صدفی خوراکی است که به طور وسیعی در سرتاسر دنیا کشت می‌شود و اثرات ضد سرطانزایی، تنظیم کنندگی سیستم ایمنی، ضدانعقادی، کاهش‌دهنده قند خون و ضد ویروسی دارد.[۵-۹]

تاثیر ضد سرطانی قارچ های پلئوروتوس

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-05-17]

گزارش‌شده است. پلئوروتوس فلوریدا اثرات ضدمهاری در سرطان کولون ناشی از دی متیل هیدرازین در رات داشت.[۱۰] عصاره متانولی آن رشد تومورهای توپر ناشی از رده سلولی EAC را در موش نژاد Swiss albino مهار کرد.[۱۱] عصاره محلول در آب گرم بدنه پلئوروتوس فلوریدا حاوی سه نوع پلی ساکارید مختلف می باشد که در مدل موشی کارسینومایی فعالیت ضد توموری داشتند.[۱۲] تلاش‌ها بر آن است که از قارچ ها و متابولیت‌های آن ها برای درمان بیماری های انسان استفاده گردد و امروزه قارچ ها به عنوان یکی از عوامل ضد توموری برای کاربردهای کلینیکی درنظر گرفته می شود.[۱۳]

آپوپتوز به عنوان یک فعالیت سلولی ضروری جهت حفظ تعادل فیزیولوژیک بدن نقش ایفا می‌کند. همچنین آپوپتوز از طریق حذف سلول‌های آسیب دیده و غیر طبیعی به عنوان یک مکانیسم محافظتی علیه سرطانزایی عمل می‌کند.[۱۴و۱۵] آپوپتوز راه حل‌هایی را برای درمان ضد سرطانی موثر فراهم کرده است و تاکنون ترکیبات بسیاری گزارش شده‌اند که از طریق القای آپوپتوز اثرات ضد سرطانی دارند.[۱۶] بنابراین، امروزه یکی از استراتژی‌های جالب توجه که در شیمی درمانی سرطان مورد توجه قرار گرفته است مداخلات دارویی است که بتوانند مرگ سلول های پره نئوپلاستیک یا بدخیم را از طریق القای آپوپتوز میانجی کند.[۱۷] شواهد بسیار نشان می دهند که ترکیبات بسیاری در گیاهان خوراکی وجود داشته و فعالیت ضد توموری خود را از طریق القای آپوپتوز القا می‌کنند.[۱۸و۱۹]

باتوجه به اینکه قارچ های خواکی به علت ارزش غذایی و نیز اثرات مختلف درمانی به طور وسیعی استفاده می‌شوند، لذا جداسازی اجزای مختلف موجود در آن ها و بررسی اثرات تنظیم کنندگی آن‌ها ضروری است. در این راستا، در این پژوهش فراکشن های مختلفی از قارچ خوراکی پلئوروتوس فلوریدا جداسازی شد و تاثیر آن ها بر میزان کشندگی سلول های سرطان کولون بررسی شد. لذا، با توجه به اهمیت القای مرگ آپوپتوتیک در سلول‌های سرطانی توسط ترکیبات ضد سرطانی موثر، برای دستیابی به هدف جداسازی فراکشن‌های جدید و موثر از این قارچ خوراکی پرمصرف و نیز ارزیابی مکانیسم تاثیر کشندگی این فراکشن ها از طریق بررسی القای نوع مرگ سلولی القا شده در سلول های سرطانی کولون تصمیم به انجام این پژوهش گرفته شد.

روش کار

تهیه فراکشن ها از قارچ پلئوروتوس فلوریدا: ۴۲/۵ گرم از قارچ فلوریدا با ۱۵۵ سی‌سی آب دیونیزه مقطر مخلوط شد. محلول حاصله به مدت ۲۰ دقیقه با دور ۱۴۰۰۰ g سانتریفوژ شد و ذرات نامحلول حذف شدند. عصاره حاصله توسط سیستم‌های فیلتر سانتریفوژی Amicon Ultra-4 (ACFD) فراکشنه شد. بدین منظور، عصاره آبی فلوریدا از فیلترهای ۱۰۰k، ۳۰k، ۱۰k و ۵k عبور داده شد و سوپ رویی آن برای انجام مطالعات بعدی استفاده شد. در هر مرحله سوپ رویی جمع آوری شده و محلول از یک فیلتر به فیلتر بعدی عبور داده شد.

کشت سلول

رده سلول های سرطانی کولون (HT-29) و سلول‌های فیبروبلاست لثه انسانی (HGF) از بانک سلولی انستیتوپاستورایران خریداری شدند. سلول‌ها در فلاسک های حاوی محیط کشت DMEM غنی شده با FCS ۱۰٪، ۱۰۰U/ml پنی سیلین و ۱۰۰µg استرپتومایسین کشت داده شده و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد در انکوباتورCO_2 دار نگهداری شدند. برای انجام تست ها سلول ها توسط تریپسین-EDTA 0.1 درصد از ته فلاسک جدا شدند و پس از شستشو برای انجام تست ها مورد استفاده قرار گرفتند.

سنجش میزان تاثیر ضد تکثیری: به منظور بررسی تاثیر فراکشن های جدا شده از عصاره بدنه قارچ صدفی پلئوروتوس فلوریدا بر تغییر در میزان رشد، تکثیر و بقای سلول های مورد بررسی از روش کالری متری MTT استفاده شد.[۲۰] بدین منظور تعداد $۱۰^۴ \times ۱$ عدد سلول در هر چاهک میکروپلیت

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-05-17]

۹۶ خانه ای ریخته شده و در حجم نهایی ۲۰۰میکرولیتر با فراکشن های R5، R10، R30 و R100 جدا شده در غلظت های مختلف ۲/۵ تا ۷۵ درصد (حجمی/حجمی) در محیط کشت تیمار شدند. برای هر غلظت سه چاهک اختصاص داده شد. سه چاهک نیز به عنوان کنترل بدون تیمار مورد بررسی قرار گرفت. بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون آزمون MTT انجام شد. بدین منظور، ۵۰ میکرولیتر از محلول MTT (۲ میلی گرم در ۱میلی‌لیتر PBS) به هر چاهک افزوده شد و پلیت به مدت ۳ ساعت دیگر در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد در تاریکی انکوبه شد. سپس مایع رویی هر چاهک خارج شده و ۲۰۰ میکرولیترDMSO به هر چاهک اضافه شد تا بلورهای تشکیل شده در ته چاهک به طور کامل حل شوند. پلیت به مدت ۱۰دقیقه در دمای اتاق قرار داده شده و سپس جذب نوری هر چاهک با استفاده از دستگاه خواننده الیزا در طول موج ۵۴۵ نانومتر در مقابل بلانک (DMSO) قرائت شد. از سلول های تیمار نشده به عنوان کنترل استفاده شد. در واقع میزان تکثیر سلول های کنترل ۱۰۰ درصد درنظر گرفته شد و میزان تاثیر ضد تکثیری غلظت های محتلف فراکشن ها با سلول های تیمار نشده مقایسه شدند. نتایج به صورت درصد زنده بودن سلولی گزارش شدند.

بررسی نوع مرگ سلولی (آپوپتوز و یا نکروز): به منظور تعیین نوع مرگ سلولی القا شده (آپوپتوز و یا نکروز) در سلول های سرطان کولون (HT-29) از روش رنگ آمیزی با انکسین V کونژوگه با FITC (انکسین FITC- V) و پروپیدیوم یوداین (PI) استفاده شد. در طی مراحل اولیه آپوپتوز، فسفولیپید فسفاتیدیل سرین غشای پلاسمایی که از سطح داخلی غشا به سمت خارجی حرکت می کند که جذب بسیار بالایی برای پروتئین انکسین V دارد.

در این روش پروتئین انکسین V با ترکیب فلورسنت FITC کونژوگه شده است. PI نیز به DNA متصل می شود. با استفاده از این روش نوع مرگ سلول های سرطانی به صورت درصد نکروز، درصد آپوپتوز اولیه و درصد آپوپتوز ثانویه مشخص شد. بدین منظور، تعداد ۲×۱۰^{۵} سلول در هر چاهک پلیت ۶ خانه ای ریخته شده و با یک شب انکوبه شدن به ته چاهک چسبیدند. سپس فراکشن‌های R5، R10، R30 و R100 در غلظت‌های مختلف ۲/۵ تا ۷۵ درصد (حجمی/حجمی) در محیط کشت اضافه شدند. بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون، سلول های چسبیده توسط محلول تریپسین-EDTA 0.1 درصد از ته چاهک ها جدا شده و همراه سلول های شناور در محیط کشت چاهک با PBS سرد و بافر کلسیم (HEPES، NaCl، CaCl2) شستشو داده شدند. سلول ها به مدت ۵ دقیقه در تاریکی با انکسین V FITC- و PI انکوبه شده و توسط دستگاه فلوسایتومتری (Ex.=488nm; Em.=530nm) مورد بررسی قرار گرفتند. جمعیت سلولی انکسین V FITC- مثبت و PI منفی به عنوان آپوپتوز اولیه، جمعیت سلولی انکسین FITC- V مثبت و PI مثبت به عنوان آپوپتوز ثانویه یا نکروز پس آپوپتوتیک و جمعیت سلولی انکسین FITC- V منفی و PI مثبت به عنوان نکروز درنظر گرفته شدند.

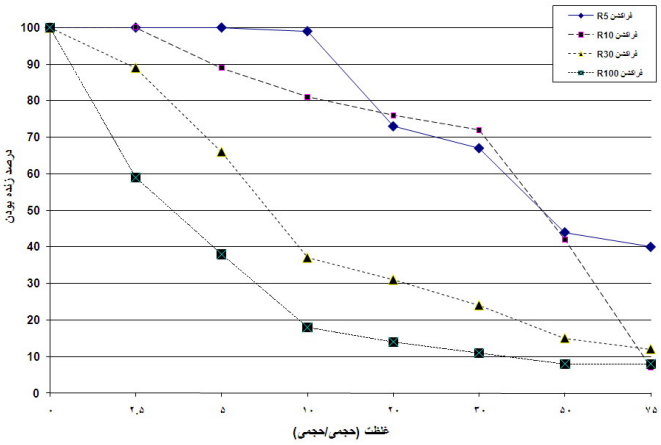
آنالیز آماری نتایج حاصله: در این مطالعه بنیادین، نتایج حاصله با استفاده از نرم افزار آماری SPSS و آزمون ANOVA مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

یافته ها

تاثیر ضد تکثیری فراکشن های جدا شده از پلئوروتوس فلوریدا

در اولین مرحله بررسی، تاثیر فراکشن های R5، R10، R30 و R100 جدا شده از عصاره بدنه قارچ صدفی پلئوروتوس فلوریدا بر میزان رشد، تکثیر و بقای سلول های سرطان کولون (HT-29) و سلول‌های فیبروبلاستی لثه (HGF) بررسی شد. سلول ها به مدت ۲۴ ساعت با غلظت‌های مختلف فراکشن ها تیمار شدند و میزان تاثیر ضد تکثیری سلول‌ها با استفاده از تست MTT بررسی شد. تیمار سلول‌ها با فراکشن های جدا شده از پلئوروتوس

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-05-17]

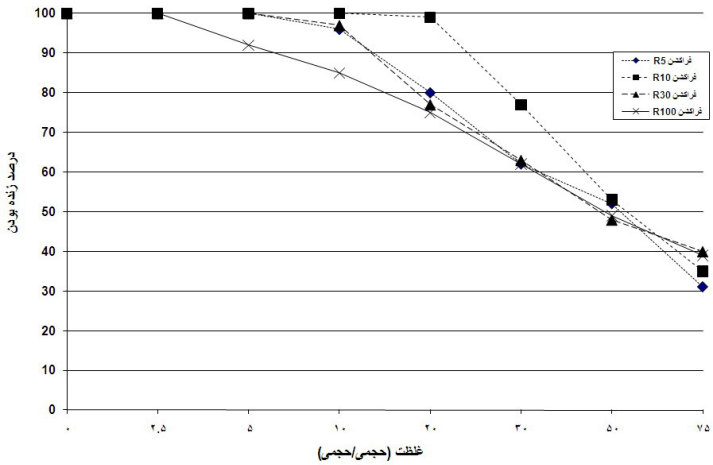


نمودار ۱. تاثیر مهاری فراکشن های R5، R10، R30 و R100 جدا شده از قارچ خوراکی پلئوروتوس فلوریدا بر درصد زنده بودن سلول های سرطان کولون (HT-29).

فلوریدا میزان تاثیر ضد تکثیری سلول‌های HT-29 را به طور وابسته به غلظت کاهش داد (نمودار ۱). مقادیر IC_{50} (غلظتی که تکثیر سلولی را تا ۵۰ درصد مهار کند) فراکشن‌های R5، R10، R30 و R100 به ترتیب به میزان ۴۶٪، ۴۶٪، ۸٪ و ۹٪ بود. به علاوه، میزان تاثیر ضد تکثیری فراکشن ها بر سلول های غیر سرطانی فیبروبلاستی HGF نیز ارزیابی شد (نمودار۲). مقایسه تاثیر ضد تکثیری فراکشن ها بر سلول های HT-29 و HGF نشان داد که فراکشن‌های جدا شده از پلئوروتوس فلوریدا تاثیر ضد سرطانی انتخابی دارد. مرگ سلولی با تغییرات مورفولوژیک ازجمله کاهش حجم سلولی و گرد شدن سلولی همراه بود. سلول‌های غیرسرطانی HGF نسبت به فراکشن های مورد بررسی حساسیت بسیار کمتری داشتند.

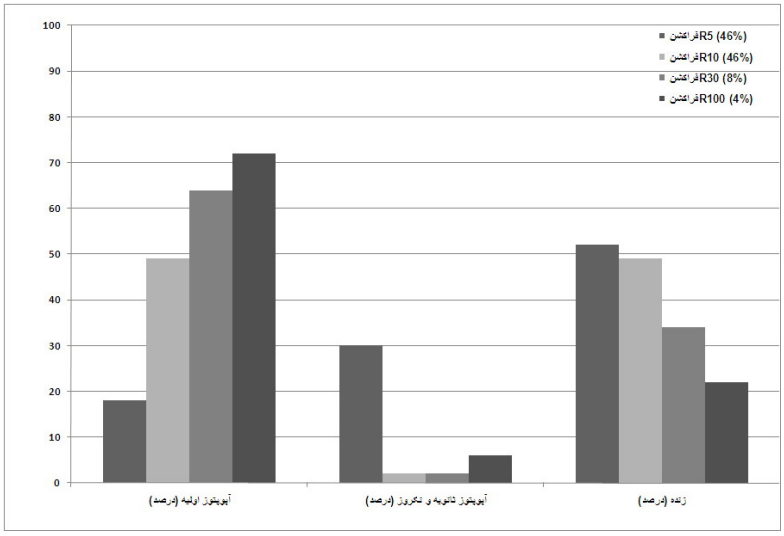
نمودار ۱ تاثیر ضد تکثیری فراکشن های R5، R10، R30 و R100 جدا شده از قارچ خوراکی پلئوروتوس فلوریدا بر سلول های سرطان کولون (HT-29) را نشان می دهد. سلول ها با غلظت های ۲/۵ تا ۷۵ درصد از فراکشن ها به مدت ۲۴ ساعت تیمار شدند. نتایج به صورت درصد زنده بودن سلولی گزارش شدند.

در نمودار ۲ تاثیر ضد تکثیری فراکشن های R5، R10، R30 و R100 جدا شده از قارچ خوراکی پلئوروتوس فلوریدا بر سلول های فیبروبلاستی (HGF) نشان داده شده است. سلول ها با



نمودار ۲. تاثیر مهاری فراکشن های R5، R10، R30 و R100 جدا شده از قارچ خوراکی پلئوروتوس فلوریدا بر درصد زنده بودن سلول های فیبروبلاستی (HGF).

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-05-17]



نمودار ۳. القای آپوپتوز توسط فراکشن های R5، R10، R30 و R100 جدا شده از قارچ پلئوروتوس فلوریدا بر رده سلولی HT-29.

غلظت‌های ۲/۵ تا ۷۵ درصد از فراکشن ها به مدت ۲۴ ساعت تیمار شدند. نتایج به صورت درصد زنده بودن سلولی گزارش شدند.

تاثیر فراکشن های جدا شده از پلئوروتوس فلوریدا بر الگوی مرگ سلولی

ازفلوسایتومتری جهت ارزیابی تغییرات آپوپتوتیک سلول های تیمار شده استفاده شد. بر طبق بخش مواد و روش کار، برای بررسی آپوپتوز در سلول های سرطانی کولون کنترل و تیمار شده از رنگ آمیزی با انکسین V (جهت ردیابی فسفاتیدیل سرین غشایی سلول های آپوپتوتیک) و PI (جهت ردیابی سلول های غیر زنده) استفاده شد. نتایج به صورت تعداد سلول های انکسین V (+) بیانگر آپوپتوز اولیه، PI (+) بیانگر نکروز و هر دو مثبت بیانگرآپوپتوز ثانویه گزارش شدند (نمودار ۳).

میزان آپوپتوز در سلول های HT-29 در نمودار ۳ نشان داده شده است. نتایج حاصله افزایش قابل توجه القای آپوپتوز اولیه را بعد از تیمار با فراکشن‌های R5، R10، R30 و R100 به ترتیب به مقادیر ۱۸٪، ۴۹٪، ۶۴٪ و ۷۲٪ نشان داد. تنها تیمار با فراکشن R5 سبب القای آپوپتوز ثانویه / نکروز پس آپوپتوتیک به طور محسوس ۳۰٪ شد.

در نمودار ۳ القای آپوپتوز توسط فراکشن های R5، R10، R30 و R100 جدا شده از قارچ پلئوروتوس فلوریدا بر سلول های سرطان کولون HT-29 نشان داده شده است. سلول‌ها با غلظت‌های ۲/۵ تا ۷۵ درصد از فراکشن‌ها به مدت ۲۴ ساعت تیمار شدند. نتایج به صورت درصد زنده بودن سلولی گزارش شدند.

بحث و نتیجه گیری

سرطان بزرگ ترین عامل مرگ و میر در میان زنان و مردان است. امروزه از روش های درمانی متعددی برای درمان سرطان ها استفاده می شود ولی متأسفانه در اکثر موارد پاسخ به درمان بسیار ضعیف بوده و اغلب با اثرات جانبی نامطلوب همراه می باشد. همچنین مقاومت به داروهای ضد سرطانی موجود نیز مشاهده شده است. بنابراین، تحقیق در جهت تولید داروهایی با کارایی بیشتر و سمیت کمتر امری ضروری است. ترکیبات طبیعی بسیاری با اثرات بیولوژیکی متنوع وجود دارند که حدود ۷۵ ٪ از داروهای ضد سرطانی را در علم داروسازی نوین شامل می شوند. بسیاری از این ترکیبات از گیاهان مشتق شده و در درمان سرطان‌های مختلف موثرند.[۲۱و۲۲]

یک استراتژی برای پیشگیری از ایجاد سرطان کولون جستجو برای یافتن ترکیبات خوراکی است که منجر به مرگ سلول های سرطانی شده کولون شوند. قارچ ها از نظر تغذیه ای جزو غذاهای

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-05-17]

عملکردی بوده و بارزترین تاثیر پزشکی قارچ ها و متابولیت های آن ها که توجه عموم را به خود جلب کرده است، تاثیر ضد توموری آن ها می باشد.[۵و۱۳] از آنجایی که مطالعات قبلی تاثیر مهاری عصاره قارچ پلئوروتوس فلوریدا را بر سلول های سرطانی نشان داده اند، عصاره آبی و نیز فراکشن های جدا شده از این قارچ می توانند داوطلبین مناسبی برای پیشگیری و یا درمان سرطان باشند.[۱۳-۱۰] بنابراین، در این مطالعه فراکشن های R5، R10، R30 و R100 از عصاره بدنه قارچ صدفی پلئوروتوس فلوریدا جدا شدند. تاثیر ضد تکثیری این فراکشن‌ها بر سلول های سرطان کولون (HT-29) و سلول‌های فیبروبلاستی غیر سرطانی HGF ارزیابی شد.

در یک مطالعه یک فراکشن پروتئینی تغلیظ شده از قارچ صدفی پلئوروتوس فلوریدا جدا شد و تاثیر ضد سرطانی آن بر رده های سلولی سرطانی مختلف و نیز القای آپوپتوز در آن ها ارزیابی شد. نتایج این بررسی نشان دادند که غلظت کشنده ۵۰٪ (IC_{50}) این فراکشن بر سلول های سرطان کولون (HT-29) ۵۵/۲ میکروگرم در میلی لیتر بود. همچنین تا ۲۰/۳۰ درصد سبب القای آپوپتوز شد.[۲۳] همچنین در مطالعه دیگری، محققان فراکشن محلول در آب گرم را از قارچ صدفی پلئوروتوس فلوریدا جدا کردند و تاثیر آن را بر کشندگی و القای آپوپتوز در سلول های سرطان کولون (HT-29) ارزیابی نمودند. در این گزارش، میزان کشندگی سلولی و نیز القای آپوپتوز در سلول‌های سرطان کولون HT-29 بعد از ۷ روز تیمار با غلظت ۰/۵ ٪ از فراکشن های جداسازی شده بسیار بالا بود.[۲۴]

در مقایسه با مطالعات قبلی، فراکشن های جداسازی شده و بررسی شده در تحقیق حاضر به ویژه فراکشن های R30 و R100 اثرات کشندگی و نیز القای آپوپتوز قابل توجهی در مقایسه با مطالعات قبلی نشان دادند. فراکشن های بررسی شده توسط این تحقیق تاثیر ضد تکثیری وابسته به غلظت بر سلول های توموری HT-29 داشتند و فراکشن های R100 و R30 تاثیر ضد تکثیری بیشتری بر سلول های سرطان کولون نسبت به سایرین داشتند. بنابراین این نتایج گزارش‌های مطالعات قبلی را تایید کردند که در آن‌ها اختصاصیت عصاره قارچ پلئوروتوس فلوریدا بر سلول های سرطانی گزارش شده بود.

همچنین نتایج بررسی توسط تکنیک فلوسایتومتری نشان داد که از آنجایی که درصد بالایی از سلول ها از نظر رنگ آمیزی با انکسین V مثبت بودند، بنابراین مهار تکثیر سلول های سرطان کولون توسط این فراکشن ها عمدتاً با واسطه القای آپوپتوز اولیه بود. فراکشن های جدا شده سبب مهار قوی تکثیر و بقای سلول های سرطانی HT-29 شدند، ولی تاثیر ضد تکثیری قابل توجهی بر سلول‌های غیرسرطانی فیبروبلاستی HGF نداشتند که این امر اختصاصیت فراکشن ها را برای سلول‌های سرطانی نشان داد. در این بررسی، میزان القای آپوپتوز اولیه توسط فراکشن های R5، R10، R30 و R100 به ترتیب ۱۸٪، ۴۹٪ ، ۶۴٪، و ۷۲٪ بود. بنابراین فراکشن های R100 و R30 بیشتر از سایرین سبب القای آپوپتوز اولیه شدند و تنها تیمار با فراکشن R5 سبب القای قابل توجه آپوپتوز ثانویه / نکروز پس آپوپتوتیک ۳۰٪ شد.

به طور خلاصه، در این تحقیق فراکشن های جدیدی از قارچ خوراکی پلئوروتوس فلوریدا جداسازی شد که تاثیر ضد سرطانی امیدوار کننده و اختصاصی بر سلول های سرطان کولون (HT-29) داشتند. این تاثیر با افزایش غلظت ارتباط مستقیم داشت و عمدتاً با واسطه القای آپوپتوز اولیه میانجی شد. نتایج این مطالعه جای امیدواری برای دستیابی به موادی که به طور اختصاصی سلول های سرطانی را مورد هدف قرار می‌دهند، فراهم کرد. این نتایج پیشنهاد می‌کنند که مطالعات بیش تری در خصوص مکانیسم های تاثیر قارچ های خوراکی، جداسازی فراکشن های مختلف از آن ها و بررسی تاثیر ضد سرطانی و مکانیسم تاثیر آن ها بر سلول‌های سرطانی و در مدل های حیوانی انجام گردد و در نهایت با کارآزمایی بالینی در انسان اثرات دقیق آن مشخص شود، تا ضمن اثبات اثرات آن در انسان، با مطالعات بیشتر و جداسازی و شناسایی مواد موثره ضد سرطانی در آن ها بتوان اقدام به تهیه فرمولاسیون‌های دارویی خاص نمود.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-05-17]

فهرست منابع

1. Poucheret P, Fons, F, Rapior S. Biological and pharmacological activity of higher fungi: 20-year retrospective analysis. Mycologie; 2006. 27(4): 311-33.

2. Farr DF. Mushroom industry: diversification with additional species in the United States. Mycologia; 1983. 75: 351-60.

3. Mizuno T. Food function and medicinal effect of mushroom fungi. Food Ingred J; 1993. 158: 8-23.

4. Molitoris HP. Mushrooms in medicine. Folia-Microbiol Praha; 1994. 39: 91-98.

5.Wasser SP, Weis AL. Medicinal properties of substances occurring in higher Basidio-mycetes mushrooms: Current perspective. Int J Med Mush; 1999. 1: 31-62.

6. Eisenhur R, Fritz D. Medicinally effective and health promoting compounds of edible mushrooms. Garten brau wissen schaft; 1991. 56: 266-70.

7. Chang ST, Miles PG. Mushroom biology a new discipline. Mycologist; 1992. 6: 64-65.

8. Chang R. Functional properties of edible mushrooms. Nutr Rev; 1996. 54: 91-93.

9. Chang ST. In: Hand Book of Applied Mycology; Arora, DK, Mukerji KG, Marth EH, eds. New York: Marcel Dekker; 1991. p.221-40.

10. Bobek P, Galbavy S, Ozdin L. Effact of oyster mushroom (pleurotus ostreatus) on pathological changes in dimethylhydrazine-induced rat colon cancer. Oncology reports; 1998. 5: 727-30.

11. Jose N, Janardhanan KK. Antioxidant and anti-tumor activity of Pleurotus florida. Curr Sci; 2000. 79: 941-43.

12. Ikekawa T, Uehara N, Maeda Y, Nskanishi M, Fukuoka F. Antitumor activity of aqueous extract of some edible mushrooms. Cancer Res; 1969. 29: 734-35.

13. Franz G. Polysaccharides in Pharmacy: Current Applications and Future Concepts. Planta Med; 1989. 55: 493-97.

14. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. Nature; 2000. 407: 770-76.

15. Brown JM, Wouters BG. Apoptosis, p53, and tumor cell sensitivity to anticancer agents. Cancer Res; 1999. 59: 1391-99.

16. Kamesaki H. Mechanisms involved in chemotherapy-induced apoptosis and their implications in cancer chemotherapy. Int J Hematol; 1998. 68: 29–43.

17. Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. Science; 1995. 267: 1456-62.

18. Clement MV, Hirpara JL, Chadhury SH, Parviz S. Chemopreventive agent resveratol, a natural product derived from grapes, triggers CD95 signaling-dependent apoptosis in human cells. Blood; 1998. 2: 999.1002.

19- Yang GY, Liao J, Kim K, Yurkow EJ, Yang CS. Inhibition of growth and induction of apoptosis in human cancer cell lines by polyphenols. Carcinogenesis; 1998. 19: 611.16.

20. Mosmann T. Rapid colometric assay for cellular growth and survival: application to proliferation cytotoxicity assay. J Immunol Methods; 1983. 65: 55-63.

21. Newman DJ, Cragg GM, Sanders KM. Natural products as source of new drugs over the period 1981-2002, J Nat Prod; 2003. 66: 1022

22. Srivastara V, Negi AS, Gupta MM, Khanuja SPS. Plant-based anticancer molecules: a chemical and biological profile of some important leads, Bioorg Med Chem; 2005. 5: 449.

23. Maiti S, Bhutia SK, Mallick SK, Kumar A, Khadgi N, Maiti TK. Anti-proliferative and immunostimulatory protein fraction from edible mushrooms. Environ Toxicol Pharmacol; 2008. 26: 187-91.

24. Lavi I, Friesem D, Geresh S, Hadar Y, Schwartz B. An aqueous polysaccharide extract from the edible mushroom Pleurotus ostreatus induces anti-proliferative and pro-apoptotic effects on HT-29 colon cancer cells. Cancer Letters; 2006. 244: 61–70.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-05-17]

Original Article

Anti-proliferative and pro-apoptotic effects of fractions from Pleurotus florida on HT-29 colon cancer cells

Mahmoud Mahmoudi, PhD. Professor of Immunology, Immunology Research Center, Bu-Ali Research Institute, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran.
Shahrzad Zamani Taghizadeh Rabe. MSc in Immunology, Immunology Reaserch Center, Bu-Ali Research Institute, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran.
Roya Yaraee, PhD. Associate Professor of Immunology, School of Medicine, Shahed University, Tehran, Iran.
Zahra Siadat. MSc in Nutrition, School of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashad, Iran.
***Tooba Ghazanfari, PhD.** Professor of Immunology, Immunoregulation Research Center, School of Medicine, Shahed University, Tehran, Iran (*Corresponding author). Email: tghazanfari@yahoo.com

Abstract

Background: Edible mushroom, *Pleurotus florida* (*P.florida*) has been used by mankind in ancient times because of its nutritional values and medicinal benefits. Cytotoxicity of fractions isolated from *P.florida* has been reported. The aim of this study was to isolate some fractions from *P.florida* and evaluate its cytotoxicity effects on colon cancer cells.

Methods: In this basic study, R5, R10, R30 and R100 fractions were prepared from *P.florida* and their cytotoxicity activity were evaluated on HT-29 and HGF cell lines. Also, pattern of cell death was determined. Tumoral (HT-29) and non-tumoral (HGF) cells were treated with various concentrations of isolated fractions. MTT assay was used for the evaluation of cell viability. Pattern of cell death was determined using annexin V and propidium iodine staining followed by FACS analyses. Obtained results were analyzed by SPSS software using ANOVA test.

Results: R5, R10, R30 and R100 fractions inhibited cell viability of HT-29 cells in a concentration-dependent manner, but had less cytotoxicity on normal fibroblast-like cells (HGF). Their IC_{50} values were 46%, 46%, 8% and 4%, respectively. R30 and R100 had the most anti-inhibitory effect. These fractions inhibited cell viability mostly via induction of early apoptosis in colon cancer HT-29 cells at 18%, 49%, 64% and 72%.

Conclusion: Our results showed less sensitivity to R5, R10, R30 and R100 fraction in normal cells in comparison to tumoral cells. These fractions also had significant cytotoxic effect on colon cancer cells. Thus, isolated fractions may be considered candidates as chemotherapeutic agents in cancer treatment in future.

Keywords: *Pleurotus florida*, Anti-proliferative effect, Apoptosis, HT-29

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-05-17]