

## تاثیر ضد تکثیری و پروآپوپتوتیک فراکشن های قارچ پلئوروتوس فلوریدا بر سلول های 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 پذیرش: ۸۹/۱۱/۲۳

تاریخ وصول: ۸۸/۱۱/۲۱

### 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. **روش کار:** 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 لته 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 آبوداین تعیین شد. نتایج حاصله با استفاده از نرم افزار آماری SPSS ۱۳ و 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<sub>50</sub> فراکشن های R5، R10، R30 و R100 به ترتیب ۴۶٪، 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 تاثیر قابل توجه آن ها بر تکثیر و بقای سلول های سرطانی کولون از طریق القای آپوپتوز، این فراکشن ها می توانند ترکیبات مناسبی برای بررسی در پیشگیری یا درمان سرطان کولون باشند.

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

### مقدمه

قارچ های خوراکی از زمان قدیم به علت دارا بودن ارزش تغذیه ای و اثرات درمانی در رژیم غذایی مورد استفاده قرار گرفته اند.<sup>(۱-۴)</sup> زیرگونه های 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 می شود و اثرات ضد سرطانی، تنظیم کنندگی سیستم ایمنی، ضدانعقادی، کاهش دهنده قند خون و ضد ویروسی دارد.<sup>(۵-۹)</sup> تاثیر ضد سرطانی قارچ های پلئوروتوس

موثر، برای دستیابی به هدف جداسازی فراکشن‌های جدید و موثر از این قارچ خوراکی پرمصرف و نیز ارزیابی مکانیسم تاثیر کشندگی این فراکشن‌ها از طریق بررسی القای نوع مرگ سلولی القا شده در سلول‌های سرطانی کولون تصمیم به انجام این پژوهش گرفته شد.

### روش کار

**تهیه فراکشن‌ها 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 سانتریفیوژ شد و ذرات نامحلول حذف شدند. عصاره حاصله توسط سیستم‌های فیلتر سانتریفیوژی 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 سلول‌های سرطانی کولون (HT-29) و سلول‌های فیبروبلاست لته انسانی (HGF) از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران خریداری شدند. سلول‌ها در فلاسک‌های حاوی محیط کشت DMEM غنی شده با FCS ۱۰٪، ۱۰۰U/ml پنی سیلین و ۱۰۰µg استرپتومایسین کشت داده شده و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور CO<sub>2</sub> دار نگهداری شدند. برای انجام تست‌ها سلول‌ها توسط تریپسین-EDTA 0.1 درصد از ته فلاسک جدا شدند و پس از شستشو برای انجام تست‌ها مورد استفاده قرار گرفتند.

**سنجش میزان تاثیر ضد تکثیری:** به منظور بررسی تاثیر فراکشن‌های جدا شده از عصاره بدنه قارچ صدفی پلئوروتوس فلوریدا بر تغییر در میزان رشد، تکثیر و بقای سلول‌های مورد بررسی از روش کالری متری MTT استفاده شد.<sup>(۲۰)</sup> بدین منظور تعداد  $1 \times 10^4$  عدد سلول در هر چاهک میکروپلیت

گزارش شده است. پلئوروتوس فلوریدا اثرات ضد‌مهارى در سرطان کولون ناشی از دی‌متیل‌هیدرازین در رات داشت.<sup>(۱۰)</sup> عصاره متانولی آن رشد تومورهای توپیر ناشی از رده سلولی EAC را در موش نژاد Swiss albino مهار کرد.<sup>(۱۱)</sup> عصاره محلول در آب گرم بدنه پلئوروتوس فلوریدا حاوی سه نوع پلی‌ساکارید مختلف می‌باشد که در مدل موشی کارسینومایی فعالیت ضد توموری داشتند.<sup>(۱۲)</sup> تلاش‌ها بر آن است که از قارچ‌ها و متابولیت‌های آن‌ها برای درمان بیماری‌های انسان استفاده گردد و امروزه قارچ‌ها به عنوان یکی از عوامل ضد توموری برای کاربردهای کلینیکی در نظر گرفته می‌شود.<sup>(۱۳)</sup>

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.<sup>(۱۴و۱۵)</sup> آپوپتوز راه‌حلی را برای درمان ضد سرطانی موثر فراهم کرده است و تاکنون ترکیبات بسیاری گزارش شده‌اند که از طریق القای آپوپتوز اثرات ضد سرطانی دارند.<sup>(۱۶)</sup> بنابراین، امروزه یکی از استراتژی‌های جالب توجه که در شیمی درمانی سرطان مورد توجه قرار گرفته است مداخلات دارویی است که بتوانند مرگ سلول‌های پره نئوپلاستیک یا بدخیم را از طریق القای آپوپتوز میانجی کنند.<sup>(۱۷)</sup> شواهد بسیار نشان می‌دهند که ترکیبات بسیاری در گیاهان خوراکی وجود داشته و فعالیت ضد توموری خود را از طریق القای آپوپتوز القا می‌کنند.<sup>(۱۸و۱۹)</sup>

باتوجه به اینکه قارچ‌های خاکی به علت ارزش غذایی و نیز اثرات مختلف درمانی به طور وسیعی استفاده می‌شوند، لذا جداسازی اجزای مختلف موجود در آن‌ها و بررسی اثرات تنظیم‌کنندگی آن‌ها ضروری است. در این راستا، در این پژوهش فراکشن‌های مختلفی از قارچ خوراکی پلئوروتوس فلوریدا جداسازی شد و تاثیر آن‌ها بر میزان کشندگی سلول‌های سرطان کولون بررسی شد. لذا، با توجه به اهمیت القای مرگ آپوپتوتیک در سلول‌های سرطانی توسط ترکیبات ضد سرطانی

درصد آپتوتوز اولیه و درصد آپتوتوز ثانویه مشخص شد. بدین منظور، تعداد  $10^5 \times 2$  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، سلول‌های چسبیده توسط محلول تریپسین-EDTA 0.1 درصد از ته چاهک‌ها جدا شده و همراه سلول‌های شناور در محیط کشت چاهک با PBS سرد و بافر کلسیم (HEPES، NaCl، CaCl<sub>2</sub>) شستشو داده شدند. سلول‌ها 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 آپتوتوز اولیه، جمعیت سلولی انکسین V-FITC مثبت و PI مثبت به عنوان آپتوتوز ثانویه یا نکروز پس آپتوتیک و جمعیت سلولی انکسین V-FITC منفی و PI مثبت به عنوان نکروز در نظر گرفته شدند.

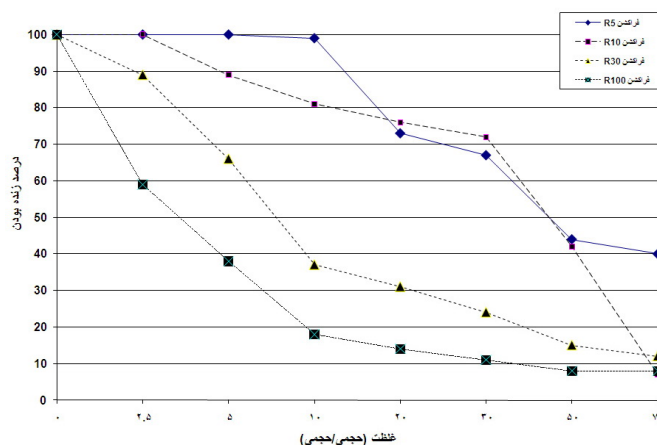
**آنالیز آماری نتایج حاصله:** در این مطالعه بنیادین، نتایج حاصله با استفاده از نرم افزار آماری SPSS و آزمون ANOVA مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

#### یافته‌ها

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

۹۶ خانه ای ریخته شده و در حجم نهایی ۲۰۰ میکرولیتر با فراکشن‌های R5، R10، R30 و R100 جدا شده در غلظت‌های 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 ۱ میلی لیتر 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 میکرولیتر DMSO به هر چاهک اضافه شد تا بلورهای تشکیل شده در ته چاهک به طور کامل حل شوند. پلیت به مدت ۱۰ دقیقه 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 سلول‌های تیمار نشده به عنوان کنترل استفاده شد. در واقع میزان تکثیر سلول‌های کنترل ۱۰۰ درصد در نظر گرفته شد و میزان تأثیر ضد تکثیری غلظت‌های مختلف فراکشن‌ها با سلول‌های تیمار نشده مقایسه شدند. نتایج به صورت درصد زنده بودن سلولی گزارش شدند.

**بررسی نوع مرگ سلولی (آپتوتوز و یا نکروز):** به منظور تعیین نوع مرگ سلولی القا شده (آپتوتوز و یا نکروز) در سلول‌های سرطان کولون (HT-29) از روش رنگ آمیزی با انکسین V-FITC (کونژوگه با FITC-انکسین V) و پروپیدیوم یوداین (PI) استفاده شد. در طی مراحل اولیه آپتوتوز، فسفولیپید فسفاتیدیل سرین غشای پلاسمایی که از سطح داخلی غشا به سمت خارجی حرکت می‌کند 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 می‌شود. با استفاده از این روش نوع مرگ سلول‌های سرطانی به صورت درصد نکروز،



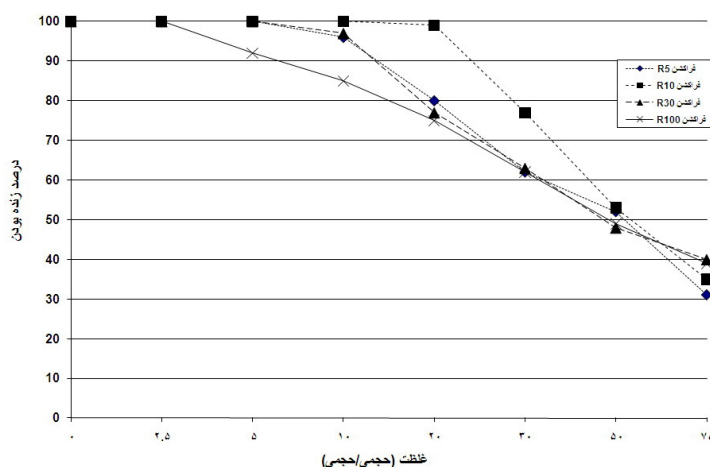
نمودار ۱. تاثیر مهاري فراکشن های R5، R10، R30 و R100 جدا شده از قارچ خوراکی پلئوروتوس فلوریدا بر درصد زنده بودن سلول های سرطان کولون (HT-29).

HGF نسبت به فراکشن های مورد بررسی حساسیت بسیار کمتری داشتند.

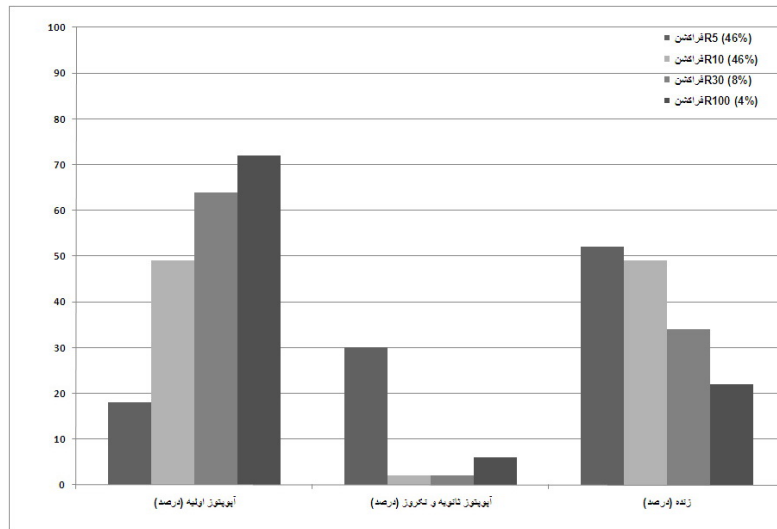
نمودار ۱ تاثیر ضد تکثیری فراکشن های R5، R10 و R30 جدا شده از قارچ خوراکی پلئوروتوس فلوریدا بر سلول های سرطان کولون را (HT-29) نشان می دهد. سلول ها با غلظت های ۲/۵ تا ۷۵ درصد از فراکشن ها به مدت ۲۴ ساعت تیمار شدند. نتایج به صورت درصد زنده بودن سلولی گزارش شدند.

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

فلوریدا میزان تاثیر ضد تکثیری سلول های 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) فراکشن های R5، R10، R30 و R100 به ترتیب به میزان ۰.۴۶٪، ۰.۴۶٪، ۰.۸٪ و ۰.۹٪ بود. به علاوه، میزان تاثیر ضد تکثیری فراکشن ها بر سلول های غیر سرطانی فیروپلاستی HGF نیز ارزیابی شد (نمودار ۲). مقایسه تاثیر ضد تکثیری فراکشن ها بر سلول های HT-29 و HGF نشان داد که فراکشن های جدا شده از پلئوروتوس فلوریدا تاثیر ضد سرطانی انتخابی دارد. مرگ سلولی با تغییرات مورفولوژیک از جمله کاهش حجم سلولی و گرد شدن سلولی همراه بود. سلول های غیرسرطانی



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



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

پلئوروتوس فلوریدا بر سلول‌های 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 نتیجه‌گیری

سرطان بزرگ‌ترین عامل مرگ و میر در میان زنان و مردان است. امروزه از روش‌های درمانی متعددی برای درمان سرطان‌ها استفاده می‌شود ولی متأسفانه در اکثر موارد پاسخ به درمان بسیار ضعیف بوده و اغلب با اثرات جانبی نامطلوب همراه می‌باشد. 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 می‌شوند. بسیاری از ترکیبات از گیاهان مشتق شده و در درمان سرطان‌های مختلف موثرند.<sup>(۲۲ و ۲۱)</sup>

یک استراتژی برای پیشگیری از ایجاد سرطان کولون جستجو برای یافتن ترکیبات خوراکی است که منجر به مرگ سلول‌های سرطانی شده کولون شوند. قارچ‌ها از نظر تغذیه‌ای جزو غذاهای

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

### تأثیر فراکشن‌های جدا شده از پلئوروتوس فلوریدا بر الگوی مرگ سلولی

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

میزان آپتوز در سلول‌های HT-29 در نمودار ۳ نشان داده شده است. نتایج حاصله افزایش قابل توجه القای آپتوز 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 آپتوز ثانویه / نکرور پس آپتوتیک به طور محسوس ۳۰٪ شد.

در نمودار ۳ القای آپتوز توسط فراکشن‌های R5، R10، R30 و R100 جدا شده از قارچ

مطالعات قبلی را تایید کردند که در آن‌ها اختصاصیت عصاره قارچ پلئوروتوس فلوریدا بر سلول‌های سرطانی گزارش شده بود.

همچنین نتایج بررسی توسط تکنیک فلوسایتومتری نشان داد که از آنجایی که درصد بالایی از سلول‌ها از نظر رنگ آمیزی با انکسین V مثبت بودند، بنابراین مهار تکثیر سلول‌های سرطان کولون توسط این فراکشن‌ها عمدتاً با واسطه القای آپوپتوز اولیه بود. فراکشن‌های جدا شده سبب مهار قوی تکثیر و بقای سلول‌های سرطانی HT-29 شدند، ولی تاثیر ضد تکثیری قابل توجهی بر سلول‌های غیرسرطانی فیبروبلاستی HGF نداشتند که این امر اختصاصیت فراکشن‌ها را برای سلول‌های سرطانی نشان داد. در این بررسی، میزان القای آپوپتوز اولیه توسط فراکشن‌های R5، R10، R30 و R100 به ترتیب ۱۸٪، ۴۹٪، ۶۴٪ و ۷۲٪ بود. بنابراین فراکشن‌های 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 فراکشن‌های جدیدی از قارچ خوراکی پلئوروتوس فلوریدا جداسازی شد که تاثیر ضد سرطانی امیدوار کننده و اختصاصی بر سلول‌های 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 سلول‌های سرطانی را مورد هدف قرار می‌دهند، فراهم کرد. این نتایج پیشنهاد می‌کنند که مطالعات بیش تری در خصوص مکانیسم‌های تاثیر قارچ‌های خوراکی، جداسازی فراکشن‌های مختلف از آن‌ها و بررسی تاثیر ضد سرطانی و مکانیسم تاثیر آن‌ها بر سلول‌های سرطانی و در مدل‌های 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 آن‌ها بتوان اقدام به تهیه فرمولاسیون‌های دارویی خاص نمود.

عملکردی بوده و بارزترین تاثیر پزشکی قارچ‌ها و متابولیت‌های آن‌ها که توجه عموم را به خود جلب کرده است، تاثیر ضد توموری آن‌ها می‌باشد.<sup>(۱۳و۱۴)</sup> از آنجایی که مطالعات قبلی تاثیر مهاری عصاره قارچ پلئوروتوس فلوریدا را بر سلول‌های سرطانی نشان داده‌اند، عصاره آبی و نیز فراکشن‌های جدا شده از این قارچ می‌توانند داوطلبین مناسبی برای پیشگیری و یا درمان سرطان باشند.<sup>(۱۰-۱۳)</sup> بنابراین، در این مطالعه فراکشن‌های R5، R10، R30 و R100 از عصاره بدنه قارچ صدفی پلئوروتوس فلوریدا جدا شدند. تاثیر ضد تکثیری این فراکشن‌ها بر سلول‌های 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 رده‌های سلولی سرطانی مختلف و نیز القای آپوپتوز در آن‌ها ارزیابی شد. نتایج این بررسی نشان دادند که غلظت کشنده ۵۰٪ (IC<sub>50</sub>) این فراکشن بر سلول‌های سرطان کولون (HT-29) ۵۵/۲ میکروگرم در میلی لیتر بود. همچنین تا ۲۰/۳۰ درصد سبب القای آپوپتوز شد.<sup>(۲۳)</sup> 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 سلول‌های 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 فراکشن‌های جداسازی شده بسیار بالا بود.<sup>(۲۴)</sup>

در مقایسه با مطالعات قبلی، فراکشن‌های جداسازی شده و بررسی شده در تحقیق حاضر به ویژه فراکشن‌های R30 و R100 اثرات کشندگی و نیز القای آپوپتوز قابل توجهی در مقایسه با مطالعات قبلی نشان دادند. فراکشن‌های بررسی شده توسط این تحقیق تاثیر ضد تکثیری وابسته به غلظت بر سلول‌های توموری HT-29 داشتند و فراکشن‌های R100 و R30 تاثیر ضد تکثیری بیشتری بر سلول‌های سرطان کولون نسبت به سایرین داشتند. بنابراین این نتایج گزارش‌های

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 resveratrol, 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 colorimetric 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.

## 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 wissenschaft*; 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. Effect 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.

## 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.

**Shahzad Zamani Taghizadeh Rabe.** MSc in Immunology, Immunology Research 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, Mashhad, 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<sub>50</sub> 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