**Research Paper**

# Evaluation of the Effects of Coumarin on Apoptotic Genes Expression in Lung and Colorectal Cancer Cells

**Elham Hoveizi[1*], Kiavash Hushmandi[2]**

1. Associate Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
2. Doctor of Veterinary Medicine (Graduated), Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

**Received:** 2021/07/25 **Accepted:** 2021/11/02

## Abstract

**Introduction:** In recent years, researchers have considered the anticancer activity coumarins, due to their powerful biological activity and poor toxicity that can neutralize the side effects induced by radiotherapy. The aim of this study was to investigate the cytotoxic effects of coumarin on HT-29 and A549 cancer cells.

**Materials and Methods:** In this experimental study, the stoke of coumarin was prepared and then for 1,3, and 5 days at concentrations of¬5, 10, 15, 20, and 25 µM the cells were treated and evaluated on viability days and morphology of the cells indefinite days. The IC50 concentration of coumarin was calculated using MTT assay in two cell lines. Also, the expression of the involved genes in apoptosis such as Bax, Bad, and Bcl-2 was evaluated by the qRT_PCR method. Data were analyzed by a one-way ANOVA test.

**Results:** The results showed that coumarin reduced the viability and proliferation of HT-29 and special A549 cells by dose and time significantly ($P \leq 0.001$), as well as the viability rate of cells in treated cells on the fifth day, significantly decreased compared to the control group ($P < 0.05$). Morphological changes such as reduced chromatin density, cell turnover were also noticeably observed in the cells. Also, molecular results showed that coumarin could significantly increase the expression of Bax, Bad genes and decrease the expression of Bcl-2 gene expression. That these genetic changes in A549 cells were significantly greater than HT-29.

**Conclusion:** Coumarin is capable of anti-proliferative activity and induces apoptosis effectively against colon and lung cancer cells.

***Corresponding Author:** Elham Hoveizi
**Address:** Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
**Tel:** 06133331045
**E-mail:** e.hoveizi@scu.ac.ir

**Keywords:** Apoptosis, Colorectal cancer, Coumarin,Cytotoxicity, Lung carcinoma.

**How to cite this article:** Hoveizi E., Hushmandi K. Evaluation of the Effects of Coumarin on Apoptotic Genes Expression in Lung and Colorectal Cancer Cells, Journal of Sabzevar University of Medical Sciences, 2022; 29(3):330-343.

Copyright © 2022 Sabzevar University of Medical Sciences. This work is licensed under a Creative Commons Attribution- Non Commercial 4.0 International license (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/). Non-commercial uses of the work are permitted, provided the original work is properly cited.

Published by Sabzevar University of Medical Sciences.

## Introduction

One of the most common cancers is colorectal cancer. Among the factors contributing to the incidence of colorectal cancer are genetic and environmental factors such as inappropriate diets, obesity, smoking, and alcohol abuse. Among the general processes for the effective treatment of cancers are inhibition of DNA synthesis, control of free radical production, regulation of cell cycle, as well as induction of apoptosis, cell death and autophagy. Apoptosis is a regulated process of cell death that occurs in response to various stressors such as physiological, pathological or cytotoxic stimuli in the body. As a result, active stimulation and induction of this process is particularly an interesting strategy for the treatment of many cancers.

Previous studies have shown that coumarin compounds can play an effective role in inducing cell death. Coumarin as a natural cyclic compound, which belongs to the family of benzopyrones and consists of benzene and pyrone rings, is used in a variety of therapeutic applications, including anti-plasmodial treatment of malaria, anti-thrombotic, anti-cancer and antibacterial activities and also used as a potent antioxidan.

Previous studies led us to investigate the Effects of Coumarin on Apoptotic Genes Expression in Lung and Colorectal Cancer Cells.

## Methodology

### Cell culture

HT-29 and A549 cells were purchased from Pasteur Institute of Tehran cell bank then cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Gibco, USA), containing 10% FBS (Fetal bovine serum, Gibco, USA) and incubated at 5% CO2, 95% humidity and 37℃. When cell density in the flask reached 80%, cell passage was performed using trypsin / EDTA (0.25%, Gibco, USA).

### Cell viability assay

Cell viability, as well as IC50, were determined by MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay. The yellow salt is water-soluble tetrazolium, which is reduced by succinate dehydrogenase of living and active cell mitochondria to a color compound of insoluble formazan, which is dissolved in an organic solvent such as DMSO and the color intensity is proportional to 570 nm. This method is a fast, cheap, and suitable method for many samples. Briefly, a number of 1 × 104 cells/wells were cultured on a 96-well plate containing normal medium and incubated for 24 h. The cells were treated with 5, 10, 15, 20, and 25 µM of coumarin and cell viability was assessed at day 1, 3 and 5.

### Microscopy and photography

The cells were stained with Giemsa stain. The morphological evaluation of the cells, compared to control (untreated) and IC50-treated groups of coumarin after 24-48 h of using a digital camera which was attached to invert microscope (Olympus, Japan), was done with objective lens 20 and microscopic images of each cell in control and treatment groups were compared.

### RNA extraction and qRT-PCR

The most basic step in obtaining reliable RT-PCR reaction data is to extract RNA of appropriate quality and quantity. The purity of the RNA extracted from the cell is very important for making the synthesized cDNA. The single-stranded structure of RNA compared to DNA, as well as the reduction of RNase stability to DNase, results in the use of all devices, including sterile gloves, masks, and autoclaved microtubes, etc., at all stages of extraction. In this study, Ht-29 and A549 cells were cultured in a 6-cell plate (200,000 cells per well) and incubated and 24 hours after cell treatment, the cells were used to extract RNA.

For RNA isolation, Trizol-lysed cell extract was centrifuged twice in chloroform for 15 min at 12,000 rpm at 4℃ and washed with isopropanol. Finally, the solution was dissolved in 75% ethanol and centrifuged at 7500 rpm for 8 minutes, then dried and the resulting RNA was dissolved in water. DNA contaminations were eliminated using RNase-free DNase. A nanodrop was used to measure RNA, properties, and size of RNAs at the wavelengths of 280/260 and 280/230 nm. Using Taq Man Reverse Transcription Kit (QIAGEN, Japan) was synthesized according to the kit protocol, 1µg of RNA purified with the Random Hexamer Primer mixed with dNTP mixture and for 5 min at 65℃, then incubated and quickly transferred onto the ice. Thereafter, buffer and the ribonuclease inhibiting protein and enzyme was added and placed in a thermocycler. For each sample, 40 ng of synthesized cDNA by Power SYBER Green master mix (QIAGEN, Japan) was done in the final volume of 10µl and 0.5 µl of each primer (Table 1) using Real-Time PCR. CT data

analysis of each sample was performed using StepOne software and normalized by using GAPDH (housekeeping control) gene. To estimate the fold change in Bcl-2, Bax, and Bad gene expression compared to the GAPDH gene in control samples (untreated) were compared to those treated with coumarin and each experiment was repeated three times. Designed primers for each gene were selected from the NCBI.

### Statistical analysis

Statistical analysis of the data was performed using SPSS software version 18 (IBM SPSS, Armonk, NY, and ANOVA). Charts were plotted using Microsoft Excel 2016 software and differences were considered significant at the level of $p<0.05$.

## Result

### Evaluation of coumarin IC50 in the cells

In the cell viability assay using MTT assay, the IC50 of coumarin was determined to be 25 µM in 24 h for treated cells. The results showed that the cytotoxic effects of this compound on the viability of HT-29 cells were dose-dependent and the cell viability decreased with increasing the concentration of coumarin ($P <0.05$). The cell viability, based on MTT assay in treated cells with 5, 10, 20, and 25 µM concentration of coumarin for the cells, was 93, 87, 72, 58 and 47%, respectively, as shown in figure 2A ($P <0.05$).

### Evaluation of the cell viability with coumarin on day 1, 3, and 5

The viability rate of cancer cells in the group treated with coumarin (IC50: 25 µM) was compared with each other. The viability rate of HT-29 cells treated with coumarin on day 1, 3, 5 was 50%, 44%, and 40%, respectively. Also, the viability rate of A549 cells treated with coumarin on day 1, 3, 5 was 50%, 38%, and 31%, respectively ($P\leq0.05$). The cell viability of both groups was significantly decreased on day 5 compared to day 3 and day 1. Also, 3-day-treated cells showed a lower viability rate than 1-day-treated cells. These data suggest that the effects of these compounds are time-dependent. Also, A549 cells showed a more significant decrease in cancer cell viability in all three periods (day 1, 3 and 5) than HT-29 cells($P\leq0.05$).

### Morphology of HT-29 cells

The control cells and treated cells with IC50 concentration of coumarin were stained with Giemsa staining and examined by invert microscopy. In this type of staining, chromatin compaction, nuclear shrinkage and cell shrinkage, confirmed cell death and apoptosis in the cells treated with coumarin. According to these images, morphological changes were more pronounced in the cells treated with coumarin.

### Real-Time RT-PCR analysis of apoptosis-related gene expression in the cells

The results showed that increased expression of Bax and Bad genes and decreased expression of Bcl2 gene in the cells under 24-hour treatment with IC50 concentration of coumarin were significantly different compared to control group ($P\leq0.001$), indicating a simultaneous induction of apoptosis in the cells treated with these compounds for 24 hours. Also, according to the results, the aforementioned genes were significantly increased in coumarin-treated A549 cells compared to HT-29 cells.

## Discussion

Cancer is one of the most widespread malignant diseases worldwide. One of the most common cancers is colorectal cancer. As the rate of aging in non-industrialized countries increases, the number of cases of the disease is also rapidly increasing. It is a public health problem in most parts of the world, with different epidemiological features around the world. Among the factors contributing to the incidence of colorectal cancer are genetic and environmental factors such as inappropriate diets, obesity, smoking, and alcohol. The first step in the development of this cancer and the formation of adenomas is the uncontrolled proliferation of intestinal epithelial cells, which mainly occurs as a result of apoptosis inhibition. Among the general processes for effective treatment of cancers are inhibition of DNA synthesis, control of free radical production and regulation of cell cycle, and induction of apoptosis and cell death and autophagy. Apoptosis is a regulated process of cell death that occurs in response to various stressors such as physiological, pathological or cytotoxic stimuli in the body. It is characterized by morphological changes including cell shrinkage, chromatin condensation, and apoptotic body formation. As a result, active stimulation and induction of this process is a particularly interesting strategy for the treatment of many cancers. Another important type of cell death is autophagy, autophagy is an intracellular process

that can substantially induce cellular damage by external stimuli such as chemical agents, oxidative stress and nutritional deficiencies and protect the cell in stressful conditions. This process plays an important role in life, development, differentiation, and homeostasis and is involved in a wide range of diseases including cancer, neurodegenerative diseases, and so on. Therefore, many drugs produced in the field of cancer today regulate autophagy death. It should be noted that the role of autophagy concerning cancer cells is bilateral and controversial because on the one hand autophagy can increase viability by inhibiting cell death and on the other hand it may be associated with apoptosis and induce cell death.

Coumarin is a natural compound found in a variety of herbs including licorice, lavender and, cinnamon, which has many medicinal properties. Among all of its diverse biological properties, the features such as having anti-tumor and anti-proliferative activity and its role in disease prevention comparing to other plant extracts, have led the researchers to study the properties of its compounds as cancer drugs have increased dramatically.

The present study aimed to investigate the effects of coumarin on Apoptotic Genes Expression in Lung and Colorectal Cancer Cells. In the present study, it was observed that coumarin had dose- and time-dependent cytotoxic effects on the viability of HT-29 and A549 cancer cells as well as morphological changes, including changes in nucleation, cell shrinkage, chromatin compaction by staining, confirming apoptosis. The results of this study also showed that the lethal effect of these compounds was dose- and time-dependent, which intensified with increasing dose as well as treatment time. In confirmation of morphological observations, the results of qRT-PCR and western blotting also showed an increase in the expression of proapoptotic genes. In a study in 2017, Wang et al. investigated the induction of caspase-dependent apoptosis and autophagy by a coumarin hybrid compound on lung cancer cells and concluded that this compound inhibited the expression of the Bcl2 gene in the apoptotic pathway and activated Bax gene expression. Also, in the cells treated with coumarin, the double-layered membrane of the autophagosome, especially autophagic vacuoles, has been observed, and finally the study demonstrated that like most chemotherapy drugs, coumarin hybrid has been able to run the autophagy pathway in lung cancer cells. Many studies have been performed on the anti-tumor and cytotoxic effects of coumarin, confirming our results in this study, for instance, and several researchers found some natural coumarin compounds which induced apoptosis in cancer cells. The effect of the coumarin synthesized product (5-P-chlorophenyl-2-benzo 5, 6-coumarin-3-yelthylidene aminothiazole) in an in vivo and in vitro study, was also evaluated. This syntactic compound had activity against Ehrlich ascites carcinoma in mice and also had a cytotoxic effect on human cancer cells MCF-7, PC3, HepG2, and HCT-116. Also, the expression of the P53 gene in the mice treated with coumarin, was increased compared to the control group.

## Conclusion

The results showed that coumarin reduced the viability and proliferation of HT-29 and special A549 cells by dose and time significantly ($P \leq 0.001$), moreover, it has been observed that the viability rate of the treated cells on the fifth day, significantly decreased compared to the control group ($P < 0.05$). Morphological changes, such as reduced chromatin density and cell turnover, were also noticeably observed in the cells. Also, molecular results showed that coumarin could significantly increase the expression of Bax and Bad genes and decrease the expression of Bcl-2 gene. Coumarin is capable of anti-proliferative activity and induces apoptosis effectively against colon and lung cancer cells.

## Acknowledgment

The authors are sincerely grateful to Shahid Chamran University of Ahvaz (Ahvaz, Iran) Research Council for the financial support of this research (Grant number: 1398).

**Conflict of Interest:** The author declares no competing financial interest.

مقاله پژوهشی

# بررسی اثر کومارین بر بیان ژن‌های دخیل در آپوپتوز در سلول‌های سرطانی ریه و کولورکتال

الهام حویزی[1*] ، کیاوش هوشمندی[2]

۱. دانشیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
۲. دانش‌آموخته دکتری حرفه‌ای دامپزشکی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهیدچمران اهواز، اهواز، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۵/۰۳ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۸/۱۱

* نویسندهٔ مسئول: الهام حویزی
نشانی: گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
تلفن: ۰۶۱۳۳۳۳۱۰۴۵
رایانامه: e.hoveizi@scu.ac.ir
شناسه ORCID: 0000-0002-3285-5682
شناسه ORCID نویسنده اول: 0000-0002-3285-5682

## چکیده

**زمینه و هدف:** در سال‌های اخیر، محققان به دلیل فعالیت بیولوژیکی بالاو سمیت کم، بر فعالیت ضدسرطانی کومارین تمرکز کرده‌اند که می‌توانند عوارض جانبی ناشی از پرتودرمانی را خنثی کنند. هدف‌از مطالعه حاضر، بررسی تأثیرات سیتوتوکسیک کومارین بر سلول‌های سرطانی رده‌های HT-29 و A549 می‌باشد.

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه تجربی، استوک کومارین تهیه و سلول‌ها با غلظت‌های ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰ و ۲۵ میکرومولار آن تیمار شدند و در روزهای ۱، ۳ و ۵ روز پس از تیمار، بقا و مورفولوژی سلول‌ها ارزیابی شد. غلظت IC50 کومارین با استفاده از روش MTT در دو رده سلولی محاسبه گردید. همچنین بیان ژن‌های درگیر درآپوپتوز همچون Bax, Bad و Bcl-2 با روش qRT_PCR ارزیابی شد. یافته‌ها با استفاده از روش آماری‌واریانس یک‌طرفه تحلیل گردید

**یافته‌ها:** نتایج نشان داد که کومارین به‌صورت وابسته به دوزو زمان، میزان بقا و تکثیر سلول‌های HT-29 و A549 را به‌طور معنی-داری ($P\leqslant0.001$)کاهش می‌دهد همچنین درصد بقای سلولی در سلول‌های تیمارشده در روز پنجم نسبت به گروه کنترل، به‌شدت کاهش یافت که نسبت به نمونه‌های روز اول و سوم هم کاهش معنی‌دار را نشان داد ($P\leqslant0.001$). تغییرات موروفولوژی همچون کاهش تراکم سلولی، گردشدن و چروکیدگی سلول‌ها نیز به‌طور محسوسی در سلول‌های تیمار شده مشاهده شد. همچنین، نتایج مولکولی نشان داد که کومارین توانست سبب افزایش معنی‌دار بیان ژن‌های Bax, Bad و کاهش بیان ژن Bcl-2 گردد که این تغییرات ژنی در سلول‌های A549 به‌طور معنی‌داری بیشتر از HT-29 بود.

**نتیجه‌گیری:** کومارین قادر است فعالیت ضدتکثیری و القای آپوپتوزی مؤثری در برابر سلول‌های سرطانی کولون و ریه داشته باشد.

**کلیدواژه‌ها:**
سیتوتوکسیسیته، کومارین، سرطان کلورکتال، سرطان ریه، آپوپتوز

## ۱. مقدمه

سرطان یک فرایند چند مرحله‌ای است که در مراحل اولیه ممکن است سرعت توسعه این بیماری کند و معمولاً بدون علائم باشد و در ادامه سریع و پیش‌رونده گردد [۱]. سرطان کولون شایع‌ترین سرطان دستگاه گوارش و سومین سرطان شایع در مردان و زنان به‌خصوص در کشورهای در حال توسعه می‌باشد[۲]. سرطان کولون غالباً در انسان در مرحله اول توسط تکثیر شدید و بدون کنترل سلول‌های اپیتلیوم ایجاد می‌گردد که درنهایت منجر به شکل‌گیری آدنوم می‌شود که به‌طور عمده در نتیجه چرخه سلولی کنترل‌نشده یا توقف آپوپتوزسلول‌های سرطانی ایجاد می‌گردد [۳ , ۴]. سرطان ریه نیز به‌عنوان سردسته علت‌های مرگ در میان انواع سرطان‌ها شناخته می‌شود، به‌طوری که در ۸۶ درصد موارد، بیماران ظرف مدت ۵ سال پس از تشخیص فوت کرده‌اند و علت ۲۹ درصد کل مرگ‌های ناشی از سرطان، این بدخیمی است [۵]. حدود ۷۰ درصد علت بروز این سرطان، جهش در بیان ژن‌ها می‌باشد. جهش در ژن پروتئین سرکوبگر تومور باعث تکثیر بی‌رویه سلول، آسیب DNA و سرطانی شدن سلول می‌شود [۶]. در این راستا، با وجود راه‌کارها و تحقیقات متنوع، فرایندهای پیش‌گیری و درمان‌های رایج هنوز

Copyright © 2022 Sabzevar University of Medical Sciences. This work is licensed under a Creative Commons Attribution- Non Commercial 4.0 International license (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/). Non-commercial uses of the work are permitted, provided the original work is properly cited.
Published by Sabzevar University of Medical Sciences.

رضایت‌بخش نمی‌باشد و چاره‌اندیشی مؤثرتری را طلب می‌کند [۷] همچنین باور قوی بر نوع رژیم غذایی و تأثیر آن در ابتلا به سرطان وجود دارد، از این رو رژیم غذایی، عامل مهمی در بروز انواع سرطان‌ها به‌ویژه سرطان کلون می‌باشد [۸].

در این میان، مطالعه بر فلانوئیدها به دلیل فعالیت‌های بیولوژیک مختلف این مولکول‌ها در سال‌های اخیر رو به رشد است [۹]. کومارین‌ها گروهی از ترکیبات پلی فنولی طبیعی هستند که به‌طور عمده در خانواده‌های Rutaceae و Apiaceae یافت می‌شوند. در این میان نشان داده شده است که 7-isopentenyloxycoumarin که دسته‌ای از این گروه می‌باشد، تأثیرات امیدبخش ضدسرطانی، ضدالتهابی، ضدقارچی و ضدباکتریایی دارد [۱۰]. در دهه گذشته مشخص شد ترکیبات پلی فنولی علاوه بر فعالیت ضدالتهابی، آنتی‌اکسیدانی، دارای اثر ضدتکثیری و محرک آپوپتوز در سلول‌های سرطانی می‌باشند که به دلیل این ویژگی‌های قوی مورد توجه محققان بوده‌اند [۱۱،۹]. تحقیقات نشان می‌دهد استفاده ازکومارین، از تکثیر آدنوکارسینوم معده انسان به‌واسطه تحریک آپوپتوز ممانعت می‌کند [۱۲]. در مطالعه‌ای گزارش شده است که پی-کوماریک اسید می‌تواند در حفاظت قلب موش صحرایی در مقابل استرس اکسیداتیو ناشی از دوکسوروبیسین مؤثر باشد [۱۳]. ترکیبات کومارین در سال‌های اخیر به دلیل فعالیت‌های بیولوژیکی مختلف، اهمیت فراوانی یافته‌اند. مطالعات فعالیت بیولوژیکی قبلی بر مشتقات کومارین نشان داد که این ترکیبات خاصیت ضدتومور دارند. تأثیرات آنتی‌اکسیدانی قوی و محافظتی در برابر استرس اکسیداتیو همراه با مهار گونه‌های فعال اکسیژن نیز برای هیدروکسی کومارین‌ها گزارش شده است. مطالعات نشان می‌دهد ترکیبات ۳ و ۴-هیدروکسی کومارین سبب مهار تکثیر سلولی در رده سلولی سرطان معده می‌شوند. بررسی مکانیسم عمل کومارین نشان داد که ترکیبات کومارین می‌توانند بر رشد و متابولیسم سلول‌های تومور انسانی MCF-7 مؤثر باشند. همچنین مطالعات نشان داد که برخی ترکیبات کومارین با کاهش بیان Bcl-2، خاصیت ضدتکثیری و مهارکننده رشد سلول‌ها را دارند. کومارین و مشتقات آن، از مهارکننده‌های ویژه و آلوستریک MEK1/2 هستند و همچنین با تأثیر بر سایر سیگنالینگ‌های سلولی سبب کنترل فعالیت آنها می‌شوند؛ بنابراین با توجه به تأثیرات مستقیم و چشم‌گیر ترکیبات کومارین بر سیگنالینگ‌های مولکولی مؤثر در روند رشد، تکثیر و بقای سلولی و تأثیر بر ردوکس سلولی و از سوی دیگر عوارض جانبی ترکیبات مشتق‌شده از گیاهان مانند کومارین نسبت به داروها و ترکیبات شیمیایی، هرگونه مطالعه در این زمینه را ضروری می‌کند.از این رو پیرو مطالعات صورت گرفته و همچنین کمبود بررسی تأثیر کومارین بر رده‌های سرطانی A59 و HT-29، مطالعه حاضر با هدف بررسی تأثیرات سیتوتوکسیک و ضدسرطانی کومارین با توجه به مشکلات موجود در رابطه با استفاده از داروهای شیمیایی برای درمان سرطان و تأثیرات جانبی کمتر داروهای گیاهی بر سلول‌های سرطانی رده‌های HT-29 و A549 می‌باشد.

## ۲. مواد و روش‌ها

این مطالعه از نوع تجربی می‌باشد که در آزمایشگاه تحقیقاتی کشت سلول گروه زیست‌شناسی دانشکده علوم دانشگاه شهید چمران اهواز طی سال‌های ۱۳۹۸-۱۳۹۷ روی سلول‌های سرطانی ریه و کولون انسانی رده A459 و HT-29 انجام شد (کد اخلاق: EE/97.24.3.70419/Scu.ac.ir).

### ۱.۲. آماده‌سازی کومارین

برای تهیه غلظت‌های ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰ و ۲۵ میکرومولار از کومارین (Sigma, UAS) مقدار لازم از آن را برای هر غلظت، در ۱ سی‌سی محیط کشت DMEM حل و پس از فیلتر کردن با کمک ۰/۲۲ سرسرنگی، در یخچال (دمای ۴ درجه سانتی‌گراد) تا زمان استفاده نگهداری شدند [۲۱-۲۳].

### ۲.۲.کشت و پاساژ سلولی

در این مطالعه، ابتدا رده سلولی آدنوکارسینوما کولورکتال انسانی HT29 و رده سلول‌های غیرکوچک سرطانی ریه A549 از بانک سلولی انستیتو پاستور تهران خریداری شد و پس از شمارش با لام نئوبار و تعیین درصد بقا با استفاده از رنگ‌آمیزی تریپان بلو در محیط کشت DMEM (Gibco, USA Dulbecco's modified Eagle's medium) حاوی ۱۰ درصد FBS (Fetal bovine serum, Gibco, USA) کشت شدند. سپس در انکوباتور (شرکت سینا، ایران) با CO2 ۵ درصد، ۹۵ درصد رطوبت و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری و تکثیر گردیدند. زمانی که تراکم سلول‌ها در فلاسک به ۸۰ درصد رسید، پاساژ سلولی با استفاده از آنزیم ترپسین/EDTA (Gibco, USA) انجام شد و سلول‌ها با تعداد تقریبی cells/well ۱۰۴ ×۱ در پلیت ۹۶ چاهکی محتوی محیط DMEM کشت شدند [۱۹،۴].

### ۳.۲. بررسی مورفولوژیکی سلول‌ها

برای بررسی مورفولوژیکی سلول‌ها، در هرکدام از دو نوع سلول، از گروه کنترل (سلول‌های HT-29 و A549 که با کومارین تیمار نشدند) و گروه-های تیمار شده با غلظت‌های ۵، ۱۰، ۱۵،۲۰، ۲۵ میکرومولارکومارین پس از ۱ و ۳ و ۵ روز با دوربین دیجیتال متصل به میکروسکوپ معکوس با عدسی شیئی X ۲۰ عکس گرفته شد و تصاویر میکروسکوپی برای هر سلول در گروه‌های کنترل و تیمار بررسی و مقایسه شدند.

### ۴.۲. نحوه آماده‌سازی رنگ گیمسا و بررسی تغییرات سلول‌ها

ابتدا رنگ گیمسا (Giemsa, USA) با غلظت ۴ درصد آماده شد (به‌طوری که ۴ گرم از پودر گیمسا در ۱۰۰ سی‌سی آب مقطر حل شد) و سپس بعد از ۱۰ دقیقه به‌وسیله کاغذ صافی واتمن فیلتر شد. متانول به‌عنوان ثابت‌کننده رنگ‌آمیزی به‌کار گرفته شد. رنگ‌آمیزی به این نحو است که متانول به مدت ۵ دقیقه روی سلول‌ها قرار گرفت و سپس متانول خارج شد و میزان µl ۱۰۰ رنگ به مدت ۲۰ دقیقه جایگزین متانول گردید و سپس با PBS شستشو داده شد. به‌منظور ارزیابی تغییرات هسته و موفولوژی سلول‌های رده A459 و HT-29 با استفاده از رنگ گیمسا، این سلول‌ها با تعداد تقریبی cells/well ۱۰۴ ×۱ در پلیت ۹۶ چاهکی در محیط کشت DMEM حاوی غلظت IC50 (غلظت ۲۵ و ۲۰ میکرومولار به‌ترتیب به‌عنوان IC50 HT-29 و A549) از محلول کومارین به مدت ۴۸ ساعت کشت شدند سپس محیط رویی سلول‌ها خارج گردید. سلول‌ها با PBS شسته و با متانول تثبیت شدند. سپس با رنگ گیمسا رنگ‌آمیزی شدند و مورفولوژی سلولی زیر میکروسکوپ اینورت بررسی گردید [۴، ۵].

### ۲. ۵. ارزیابی بقای سلولی

به‌منظور تعیین IC50 از ارزیابی فعالیت حیاتی سلول از آزمون احیای MTT 3-(4, 5 Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltertrazolium (Bromide) استفاده شد. اساس این آزمون احیای MTT به رنگ فورمازون در حضور آنزیم‌های دهیدروژناز می‌باشد. میزان فورمازون تولید شده، شاخصی از فعالیت حیاتی و زنده‌مانی سلول می‌باشد. بدین منظور پس از تیمار سلول‌ها با غلظت‌های ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵ میکرومولار از کومارین به مدت ۱، ۳ و ۵ روز، سلول‌ها برای آزمون بقا سنجیده شدند. بدین صورت که ابتدا سلول‌ها به تعداد cells/well ۱۰۴ ×۱ در پلیت ۹۶ خانه کشت و با کومارین با غلظت‌های معین کشت شدند. در روزهای تعیین‌شده، محیط هر چاهک خارج و ۹۰ میکرولیتر محیط تازه به‌صورت جداگانه به هر چاهک از پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای منتقل شد و سپس ۱۰ میکرولیتر MTT (۰/۰۰۵ گرم MTT در ۱۰۰۰میکرولیتر PBS) افزوده گردید و حداقل۳ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس محلول MTT خارج و به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر دی متیل سولفوکساید (Merck, USA, 100%) افزوده شد. ۲۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه انکوبه و مخلوط شدند و پس از آن، جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۵۷۰ نانومتر با استفاده از دستگاه الیزا ریدر (Stat fax 2100, Florida, USA) اندازه‌گیری شد. شایان ذکر است که از سلول‌های تیمارنشده در هر دو رده سلولی به عنوان نمونه کنترل استفاده شد [۱۴].

### ۲. ۶. استخراج RNA و انجام qRT-PCR

در مطالعه حاضر، پس از کشت سلول‌های HT-29 و A549 و تیمار ۲۴ ساعته با غلظت IC50 کومارین الگوی بیان mRNA ژن‌های Bcl-2، Bax و Bad با استفاده از روش qRT-PCR انجام شد. برای جداسازی RNA سلول‌ها ابتدا با ترپسین جدا و پس از شستشو به کمک QIAzol به مدت ۵ دقیقه لیز شدند سپس برای استخراج RNA و شستشوهای بیشتر به‌منظور خلوص بالاتر از کلروفورم و ایزوپروپانول خنک و سپس از اتانول ۷۵ درصد استفاده شد. سپس با استفاده از اتانول رسوب به‌وجودآمده حل گردید و به مدت ۸ دقیقه با دور rpm۷۵۰۰ سانتریفوژ و سپس در زیر هود خشک شد و RNA حاصل در آب ۵۰ میکرولیتر آب بدون RANas حل گردید. از دستگاه نانودرآپ برای اندازه‌گیری غلظت RNA و سنجش کیفیت RNAها در طول موجهای ۲۶۰/۲۸۰ نانومتر استفاده شد. به‌وسیله کیت سنتز cDNA (Taq Man Reverse Transcription Kit (کیاژن، ژاپن) و پیرو دستورالعمل شرکت سازنده، ۱ میکروگرم از RNA تخلیص‌شده با پرایمر راندم هگزامر، dNTP mixture و مخلوط به مدت ۵ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس، بافر، پروتئین مهارکننده ریبونوکلئاز و آنزیم افزوده شد و دستگاه ترموسایکلر قرار داده شد. برای هر نمونه ۴۰ نانوگرم از cDNA سنتز شده با استفاده از Power SYBER Green master mix (کیاژن، ژاپن) در حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر و ۰/۵ میکرولیتر از هر پرایمر (جدول ۱) توسط دستگاه Real Time (ABI, Applied Biosystems, USA) PCRانجام شد. تحلیل داده‌های سیکل آستانه (CT) هر نمونه با استفاده از نرم‌افزار StepOne انجام پذیرفت و نرمالیزاسیون با استفاده از ژن GAPDH انجام گرفت. پرایمرهای طراحی‌شده برای هر ژن از سایتHttp: // www . ncbi. nlm. nih. gov استخراج شد[ ۱۵].

**جدول ۱. توالی‌های آغازگر استفاده شده**

| Name | Primer Sequence (5'→3') | Tm (C) |
|---|---|---|
| BAX (F) | GCTGGACATTGGACTTCCTC | |
| BAX (R) | ACCACTGTGACCTGCTCCA | 58/5 |
| BAD (F) | CGGAGGATGAGTGACGAGTT | |
| BAD (R) | CCACCAGGACTGGAAGACTC | 58/3 |
| BCL-2 (F) | GATGGGATCGTTGCCTTATGC | |
| BCL-2 (R) | CCTTGGCATGAGATGCAGGA | 58/8 |
| GAPDH (F) | GCAAGAGCACAAGAGGAAGA | 57 |
| GAPDH (R) | ACTGTGAGGAGGGGAGATTC | |

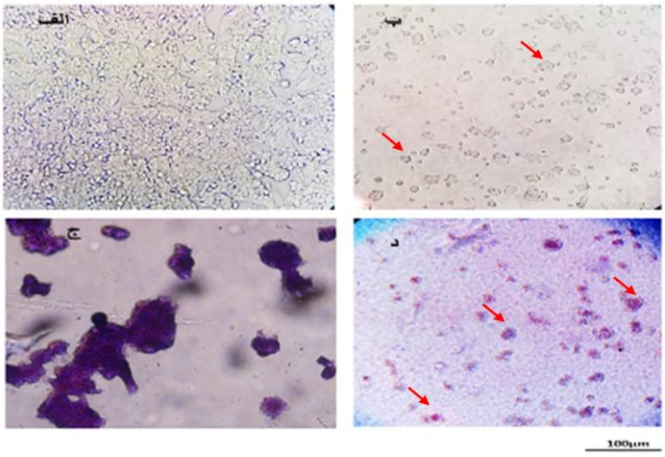
### ۲. ۷. بررسی آماری

به‌منظور تحلیل آماری داده‌های به‌دست‌آمده، از نسخه ۱۸نرم‌افزار SPSS(IBM SPSS, Armonk, NY, USA) و آزمون آماری تحلیل واریانس یک‌طرفه (ANOVA) با آزمون توکی استفاده شد. نمودارها با کمک نرم‌افزار Microsoft Excel 2013 (Microsoft Corp., Redmond, WA, USA) رسم و تفاوت‌ها در سطح P<۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

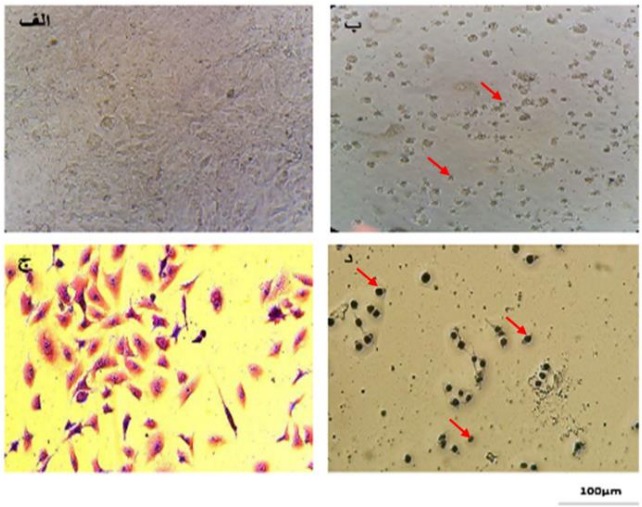
## ۳. یافته‌ها

### ۳ . ۱. مورفولوژی سلولی

سلول‌های سرطانی رده کولورکتال انسانی HT-29 و رده سلولی سرطانی ریه A549 با کمک میکروسکوپ اینورت مشاهده و بررسی شدند و مشخص شد که در غلظت‌های مختلف، کومارین به‌صورت وابسته به دوز و زمان، سبب تغییرات محسوسی در شکل و حالت سلول‌ها در مقایسه با نمونه کنترل گردید. این تغییرات شامل کاهش قابل‌توجه حجم سلولی و گرد شدن سلولی بود و همچنین گرانولاسیون سلولی مشاهده شده بود که با افزایش دوز و زمان تیمار، این تغییرات برجسته‌تر نیز شدند (شکل۱ و ۲).




**شکل ۱. بررسی مورفولوژی سلول‌های رده HT-29(کولون) با میکروسکوپ اینورت- الف- سلول‌های نرمال HT-29 - ب- سلول‌های تیماریافته HT-29 با غلظت IC50 کومارین پس از ۲۴ ساعت - ج- سلول‌های نرمال HT-29 با رنگ‌آمیزی گیمسا -د- سلول‌های تیماریافته HT-29 با غلظت IC50 کومارین پس از ۲۴ ساعت با رنگ‌آمیزی گیمسا.**

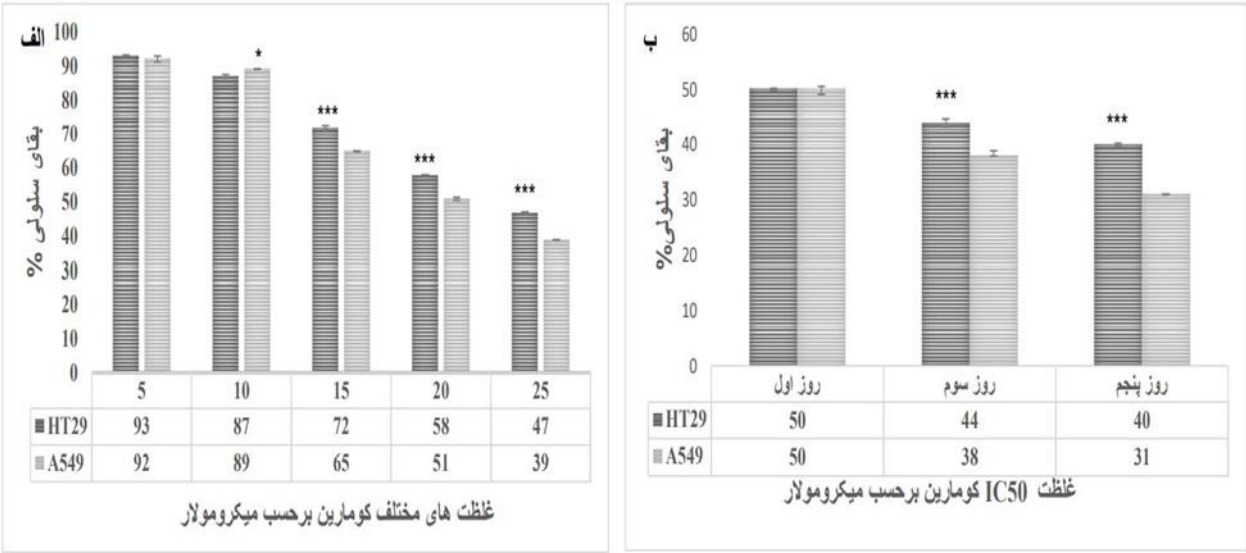



**شکل ۲. بررسی مورفولوژی سلول‌های رده A549 (ریه) با میکروسکوپ اینورت. الف- سلول‌های نرمال A549. ب- سلول‌های تیماریافته A549 با غلظت IC50 کومارین پس از ۲۴ ساعت. ج- سلول‌های نرمال A549 با رنگ‌آمیزی گیمسا. د- سلول‌های تیماریافته A549 با غلظت IC50 کومارین پس از ۲۴ ساعت با رنگ‌آمیزی گیمسا.**

### ۳. ۲. ارزیابی بقای سلولی

مقایسه درصد زنده‌مانی سلول‌ها با روش MTT انجام گرفت و درصد بقای سلول‌های سرطانی رده HT-29 و A549 تیمارشده با غلظت‌های مختلف کومارین در روزهای موردآزمایش نسبت به نمونه کنترل بررسی شد. براساس نتایج آزمون MTT غلظت ۲۵ میکرومولار و غلظت ۲۰ میکرومولار کومارین در مدت زمان ۲۴ ساعت به‌عنوان IC50 به‌ترتیب برای سلول‌های HT-29 و A549 تعیین گردید. درصد زنده ماندن سلول‌ها براساس آزمون بقا در سلول‌های تیمارشده با غلظت‌های ۵، ۱۰، ۲۰، و۲۵ میکرومولار کومارین برای سلول‌های رده HT-29 به‌ترتیب ۹۳، ۸۷، ۷۲، ۵۸ و ۴۷ درصد بود. همچنین برای سلول‌های A549 به‌ترتیب ۹۲، ۸۹، ۶۵، ۵۱ و ۳۹ درصد بود که در نمودار ۱ نشان داده شده است. همان‌گونه که داده‌ها نشان داد بقای هر دو رده سلولی تحت تیمار با کومارین به‌طور معنی‌داری نسبت به نمونه کنترل، کاهش یافت (P<0.001) و همچنین حساسیت سلول‌های A549 نسبت به سلول‌های HT-29 برای کومارین در غلظت ۵ میکرومولار معنی‌دار نبود و در غلظت ۱۰ میکرومولار با P<0.05 و در غلظت‌های ۱۵ تا ۲۵ با P<0.001 به‌طور معنی‌داری بیشتر بود (شکل۳-الف).

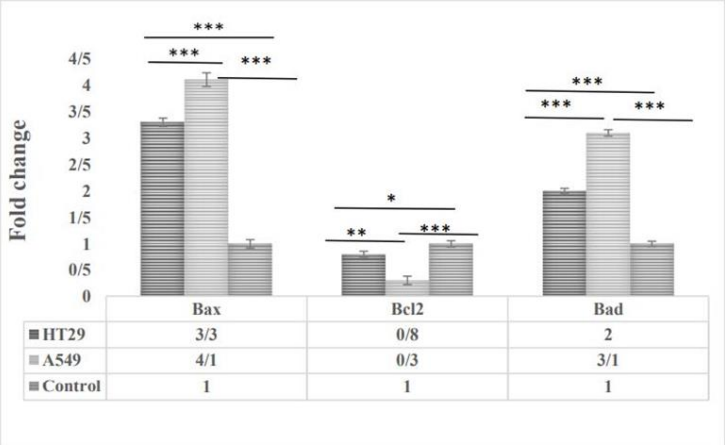
همچنین درصد زنده‌مانی سلول‌ها با روش MTT نشان داد که سلول‌های سرطانی HT-29 و A549 پس از تیمار با غلظت IC50 کومارین در روز اول نسبت به گروه کنترل، کاهش معنی‌داری داشته‌اند. بقای سلول‌ها پس از در معرض قرار گرفتن با همان غلظت‌ها در روز سوم نسبت به گروه کنترل و همچنین نسبت به روز اول تیمار به‌صورت معنی‌داری کاهش یافت. درصد زنده بودن سلول‌ها در گروه‌های موردآزمایش در روز پنجم نسبت به گروه کنترل و سایر روزها به‌شدت کاهش یافت که نسبت به نمونه کنترل و نمونه‌های روز اول و سوم، کاهش معنی‌دار را نشان داد (P<0.001) (شکل ۳-ب).




**شکل ۳. الف- تأثیرات غلظت‌های مختلف کومارین بر بقای سلول‌های HT-29و A549 با استفاده از آزمون MTT و تعیین غلظت ۲۵ و ۲۰ میکرومولار به‌ترتیب به‌عنوانIC50 سلول¬های HT-29 و A549. ب- تأثیرات غظت IC50 کومارین بر بقای سلول‌های رده HT29 و A459. بررسی بقا با روش MTT در روزهای ۱، ۳ و ۵ پس از تیمار با کومارین انجام گرفت (*P<0.05 ,**P<0.01,***P<0.001).**

### ۳. ۳. بیان mRNA نشانگرهای آپوپتوز در سلول‌های تیمار شده با استفاده از qRT-PCR

نتایج حاصل از qRT-PCR برای سلول‌های سرطانی رده A549 وHT-29 تیمارشده با غلظت‌های IC50 کومارین بعد از ۲۴ ساعت نشان‌دهنده افزایش معنی‌دار بیان ژن‌های Bad, Bax (P<۰/۰۰۱) و کاهش ژن Bcl-2 در مقایسه با نمونه کنترل بودند که این کاهش برای سلول‌های A549 با P<۰/۰۰۱ معنی‌دار و برای سلول‌های HT-29 با P<۰/۰۵ معنی‌دار بود. همچنین مطالعات مولکولی تأیید کرد که بیان ژن‌های آپوپتوزی در سلول‌های A549 به‌طور معنی‌داری نسبت به سلول‌هایHT-29 افزایش یافته بود که برای ژن‌های Bax و Bad با P<۰/۰۰۱ و برای ژن Bcl-2 با P<۰/۰۱ بررسی شد (شکل ۴).




**شکل ۴. میانگین بیان ژن‌های Bad, Bax و Bcl-2 اندازه‌گیری‌شده با qRT-PCR در سلول‌های HT-29 و A549 تیمارشده با غلظت IC50 کومارین (غلظت ۲۵ میکرومولار و غلظت ۲۰ میکرومولار به‌ترتیب سلول‌های HT-29 و A549) پس از ۲۴ ساعت.**

**(در این نمودار بیان ژن‌های کنترل ۱ در نظر گرفته شده است). (*P<0.05 ,**P<0.01,***P<0.001).**

## ٤. بحث و نتیجه‌گیری

ترکیبات فنولی موجود در میوه‌ها و سبزی‌ها و فراورده‌های آنها به فنل‌های ساده، اسیدهای فنلی، مشتقات هیدروکسی سینامیک وفلانوئیدها طبقه‌بندی می‌شوند. محققان عملکرد بسیاری از ترکیبات فنولی را به‌منزله ترکیبات آنتی‌اکسیدان قوی گزارش کرده‌اند [۱۶]. از آنجایی که پیشرفت سرطان، ارتباط نزدیکی با استرس اکسیداتیو دارد تحقیقات بسیاری نشان می‌دهد که بعضی از این ترکیبات فنولی به‌طور ویژه در درمان برخی سرطان‌های خاص از طریق راه‌کارهایی از جمله ممانعت از سنتز DNA، تعدیل در تولید رادیکال‌های آزاد، تنظیم چرخه سلولی و تغییر مسیرهای آپوپتوز مؤثر باشند [۱۷]. به دلیل ویژگی‌های سلامتی‌بخش این ترکیبات آنتی‌اکسیدانی و نقش آنها در پیشگیری از بیماری‌ها، علاقه محققان به بررسی خواص این ترکیبات به‌عنوان داروهای ضدسرطان به‌طور چشمگیری افزایش یافته است. هدف از انجام این مطالعه، بررسی تأثیر کومارین بر القای آپوپتوز سلول‌های سرطانی کولون رده HT-29 و سرطان ریه رده A549 است. نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان‌دهنده کاهش بقای سلولی و مهار رشد سلول‌های سرطانی ریه و کولون توسط کومارین در دوز بالا می‌باشد؛ به‌طوری که غلظتی از کومارین که پس از ۲۴ ساعت سبب سمیت پنجاه درصدی سلول‌ها شد برای سلول‌های سرطان ریه و کولون به‌ترتیب در دوزهای ۲۰ و ۲۵ میکرومولار دیده شد. همچنین نتایج این مطالعه حاکی از آن است که اثر کشندگی کومارین وابسته به نوع سلول، دوز و زمان تیمار بود؛ به‌طوری که در این مطالعه که بقای سلولی تا روز پنجم بررسی شد، سلول‌های سرطانی ریه به‌طور معنی‌داری حساسیت بیشتری به کومارین در مقایسه با سلول‌های سرطانی کلون در هر سه روز موردمطالعه (یعنی روزهای اول، سوم و پنجم) نشان دادند و همچنین با افزایش دوز (تا ۲۵ میکرومولار) و همچنین زمان تیمار (تا روز پنجم) میزان تحریک آپوپتوز توسط کومارین در هر دو رده سلولی موردمطالعه به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. آپوپتوز، یک فرایند تنظیم‌شده مرگ سلولی است که باعث حذف سلول‌های آسیب‌دیده یا ناخواسته بدون تخریب در ارگانیسم‌ها، به‌منظور کنترل رشد و ثابت نگاه داشتن شرایط محیط داخل بدن می‌گردد و از طریق تغییرات ریخت‌شناسی از جمله چروک‌خوردگی سلولی، متراکم شدن کروماتین و تشکیل اجسام آپوپتوتیک مشخص می‌گردد [۱۸]. در نتیجه، تحریک و القای فعال این فرایند به‌صورت اختصاصی، راه‌کاری جالب توجه برای درمان بسیاری از سرطان‌ها است [۱۹]. نتایج حاصل از qRT-PCR این مطالعه برای سلول‌های سرطانی رده A549 وHT-29 تیمارشده با غلظت‌های تعیین شده کومارین نیز

نشان‌دهنده افزایش معنی‌دار بیان ژن‌های Bad, Bax وکاهش معنی‌دار ژن Bcl-2 درمقایسه با نمونه کنترل (بدون هیچ گونه تیمار) بودند که با این مکانیسم، بقای سلول‌های سرطانی، کاهش چشم‌گیری داشت.

در مطالعه‌ای مشابه درخصوص اثر ضدتکثیری عصاره هیدوروالکی گیاهی حاوی ترکیبات فنولی مانند دارچین در مقایسه با داروی سیکلوفسفامید بر سرطان ریه، بیان شده که عصاره دارچین توانسته است مرگ سلولی را در سلول‌های سرطانی رده A459 افزایش دهد و همچنین بیان ژن‌های القاکننده آپوپتوز را افزایش دهد [۱۹]. در این مطالعه، سلول‌های انتخابی مشابه این مطالعه، سلول‌های A549 بودند و در تشابه تحقیق ما عصاره گیاهی محتوی ترکیبات فنلی بالا، سبب افزایش بیان نشانگرهای آپوپتوزی و کاهش ژن BCL2 گردیده است. همچنین مزارعی و همکاران (۲۰۱۸) در مطالعه‌ای در مورد تعیین خواص آنتی‌اکسیدانی گیاهان، فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاهان موردمطالعه که شامل افنسطین، اویشن، بابونه، برنجاسف، بنه، بومادران، درمنه، زعفران، زوفا، کاکوتی و کلپوره بود را غالباً به حضور ترکیبات فنلی نسبت دادند [۲۰]. همچنین کوماریک اسید از گروه پلی فنول‌ها دارای خواص آنتی‌اکسیدانی و القای آپوپتوزی مؤثری در برابر سلول‌های سرطانی پستان رده MCF-7 گزارش شده است [۱۰]. همچنین در مطالعه‌ای نشان داده شد که ترکیبات ۷-فارنسیل اکسی کومارین که از مشتقات کومارین‌ها هستند با داشتن اثر مهاری بر آنزیم ۱۵- لیپواکسیژناز در تومورهای پروستات، باعث فعالیت ضدسرطانی می‌شوند [۲۱]. محققان در مطالعه‌ای دیگر نیز بیان کردند که ترکیباب جدید کومارین و مشتقات آن می‌تواند با مهار رشد سلولی در رده سلولی A549 و MCF-7 تأثیر ضدسرطانی بر سرطان‌های ریه و پستان بگذارند [۲۲]. در مطالعه آنها IC50 مؤثرترین ترکیبات کومارین حدود ۰/۱ میکرومولار گزارش شد که نشان‌دهنده تأثیرات قابل‌توجه، حتی بالاتر از نمونه‌های استاندارد رفرنس، مشتقات کومارین بر القای مرگ سلول‌های سرطانی می‌باشد. حقیقی و همکاران (۲۰۱۰) خاصیت ضدسرطانی یکی از مشتقات کومارینی به نام ۷-ایزوپنتیل اکسی کومارین بر سلول‌های رده TCC را بررسی کردند و نتایج آن این گونه بود که این ترکیب می‌تواند با القای آسیب DNA و افزایش تراکم کروماتین به‌عنوان عامل ضدسرطانی در سرطان مثانه باشد. در این مطالعه که در سلول‌های متفاوت از مطالعه ما یعنی سرطان مثانه انجام شده و به نقش و مکانیسم متفاوتی از مشتقات کومارینی بر توقف چرخه سلولی به‌واسطه آسیب به DNA و نقش احتمالی کاسپاز ۳ در القای اپوپتوز اشاره داشته است. هم‌سو با مطالعه حاضر، نتایج آنها نشان داد که ترکیب مشتق شده از کومارین، ماده‌ای مؤثر در توقف رشد سلول‌های سرطانی محسوب می‌شود و آنها غلظت IC50 این ترکیب را ۶۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر گزارش دادند [۲۳] که این اختلاف در غلظت‌ها به علت تفاوت در نوع سلول‌های سرطانی، خلوص و استخلاف‌های ترکیبات و شرایط متفاوت آزمایشگاهی می‌باشد. مطالعات مختلف اثر ضدتکثیری عسل را در برابر سرطان کولون به‌واسطه داشتن محتوای بالای فنلی از جمله پی-کوماریک اسید تأیید کردند [۲۴].

در بسیاری از سرطان‌ها، پروتئین‌های پروآپوپتوتیک دچار جهش و غیرفعال شدند در حالی‌که پروتئین‌های آنتی‌آپوپتوتیک بیش‌ازحد بیان می‌گردند که منجر به رشد نامطلوب تومور، پاسخ ندادن به استرس‌های سلولی، جهش‌های مضر و آسیب DNA می‌گردد. از این رو امروزه بسیاری از داروهای تولیدشده در زمینه سرطان، سبب تنظیم مرگ سلولی می‌شوند [۲۵]. مطالعات قبلی نشان می‌دهند که کومارین و مشتقات آن در درمان سرطان‌های مختلف ازجمله ملانوما بدخیم، کارسینومای سلول‌های کلیوی و سرطان پروستات به‌کار می‌رفتند. Chen و همکاران ترکیبی هیبریدی از کومارین و فنیل سولفونیل فوروکسان را سنتز کردند که فعالیت ضدتکثیری معناداری در برابر آدنوکارسینومای ریه داشت [۲۵]. Wang همچنین و همکاران در سال ۲۰۱۷، خاصیت القای آپوپتوز وابسته به Caspase و اتوفاژی توسط یک ترکیب هیبرید کومارینی بر سلول‌های سرطانی ریه را بررسی کردند و به این نتیجه رسیدند که این ترکیب، بیان ژن Bcl2 مؤثر در مسیر آپوپتوز را مهار و بیان ژن Bax را فعال کرده است همچنین در سلول‌های تحت درمان با این ترکیب کومارین، غشای دوتایی اتوفاگوزوم‌ها به‌خصوص واکوئل‌های اتوفاژیک، مشاهده شده است و در نهایت نشان دادند که همانند

بیشتر داروهای شیمی‌درمانی این ترکیب هیبرید کومارین توانسته مسیر اتوفاژی را در سلول‌های سرطانی ریه راه‌اندازی کند [۲۶]. بنابراین با توجه به نقش کومارین در القای آپوپتوز سلولی و دخالت آن در سیگنالینگ‌های مولکولی درگیر در روند رشد و بقای سلول‌ها، استفاده از داروهای مشتق‌شده از ترکیبات کومارین می‌تواند گزینه مناسبی برای تحقیقات بیشتر در آینده باشد.

نتایج به‌دست‌آمده نشان داد که کومارین به‌صورت وابسته به دوز و زمان دارای فعالیت ضدتکثیری و القای آپوپتوزی مؤثری در برابر سلول‌های سرطانی HT-29 و A549 می‌باشد. همچنین نتایج مولکولی نشان داد که کومارین توانست سبب افزایش معنی‌دار بیان ژن‌های Bax, Bad و کاهش بیان ژن Bcl-2 در سلول‌ها گردد که این تغییرات ژن‌های آپوپتوزی در سلول‌های A549 به‌طور معنی‌داری بیشتر از سلول‌های HT-29 بود. این نتایج در درک بهتر مکانسیم ضدسرطانی کومارین و پیشنهاد استفاده آن به‌صورت داروی جایگزین یا مکمل داروهای شیمیایی در درمان سرطان مفید می‌باشد.

## تقدیر و تشکر

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی مصوب دانشگاه شهید چمران اهواز با کد اختصاصی ۹۵۹ بوده که هزینه تحقیقات از محل اعتبارات پژوهانه سال ۹۸ تأمین گردیده است. نویسندگان این مقاله کمال تشکر خود را از معاونت پژوهشی و فناوری دانشگاه شهید چمران اهواز به دلیل حمایت‌های مالی اعلام می‌دارند.

## تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌کنند که هیچ‌گونه تضاد منافعی در خصوص مطالعه حاضر وجود ندارد.

## References

[1]. Xue L. Tao Y. Yuan Y. Qu W. Wang W. Curcumin suppresses renal carcinoma tumorigenesis by regulating circ-FNDC3B/miR-138-5p/IGF2 axis. Anticancer Drugs. 2021;32(7):734-744.

[2]. Taheri A. Ghaffari M. Namavari M. The Effects of Seaweed Gracilaria arcuata Extract on the Stimulation of Apoptosis in Colorectal Cancer Cell Lines. Alborz University Medical Journal. 2018;7(4):281-92.

[3]. Erkasap N. Ozyurt R. Ozkurt M. Yaşar F. Erkasap S. Ihtiyar E. The role of JAK/STAT signaling pathway and TNF-α crosstalk in human colorectal cancer. Gene Reports. 2016; 3:1-4.

[4]. Huang X. Chen C. Xu Y. Shen L. Chen Y. Su H. Infiltrating T-cell abundance combined with EMT-related gene expression as a prognostic factor of colon cancer. Bioengineered. 2021;12(1):2688-2701.

[5]. Quartuccio N. Salem A. Laudicella R. Spataro A. Chiaravalloti A. Caobelli F. Cistaro A. Alongi P. Evangelista L.The role of 18F-Fluorodeoxyglucose PET/CT in restaging patients with small cell lung cancer: a systematic review . Nucl Med Commun. 2021;42(8):839-845.

[6]. Fang T. Liang T. Wang Y. Wu H. Liu S. Xie L. Liang J. Wang C. Tan Y. Prognostic role and clinicopathological features of SMAD4 gene mutation in colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. BMC Gastroenterol. 2021;21(1):297.

[7]. Zaborowski AM. Winter DC. Lynch L.The therapeutic and prognostic implications of immunobiology in colorectal cancer: a review. Br J Cancer. 2021. doi: 10.1038/s41416-021-01475-x.

[8]. Mahdavi M. Laforest-Lapointe I. Masse E. Preventing Colorectal Cancer through Prebiotics. Microorganisms. 2021;9(6):1325.

[9]. Kolahi M. Tabande M. Saremi S. Hossaini SA. Hashemitabar M. The Study of Apoptotic Effect of p-Coumaric Acid on Breast Cancer Cells MCF-7. SSU_Journals. 2016; 24(3): 211-221.

[10]. Xu X. Yan Y. Huang W. Mo T. Wang X. Wang J. Li J. Shi S. Liu X. Tu P. Molecular cloning and biochemical characterization of a new coumarin glycosyltransferase CtUGT1 from Cistanche tubulosa. Fitoterapia. 2021:104995.

[11]. Zhu H. Ying S. Zhou B. Hu X. Liang X. Li W. Wang D. Jin H. Pan Y. Design, synthesis, and evaluation of novel coumarin-dithiocarbamate derivatives (IDs) as anti-colorectal cancer agents. J Enzyme Inhib Med Chem. 2021;36(1):593-604.

[12]. Zhang J. Feng M. Guan W. Naturally occurring aesculetin coumarin exerts antiproliferative effects in gastric cancer cells mediated via apoptotic cell death, cell cycle arrest and targeting PI3K/AKT/M-TOR signalling pathway. Acta Biochim Pol. 202١;68(1):109-113.

[13]. Rafiee Z. Zare Moaiedi M. Valizade Gorji A. Mansouri E. P-Coumaric Acid Mitigates Doxorubicin-Induced Nephrotoxicity Through Suppression of Oxidative Stress, Inflammation and Apoptosis. Arch Med Res 2020;51(1):32-40.

[14]. Mohammadi A. Vahabzadeh Z. Jamalzadeh S. Khalili T. Trimethylamine-N-oxide, as a risk factor for atherosclerosis, induces stress in J774A.1 murine macrophages. Adv Med Sci 2018; 63(1):57-63.

[15]. Shafie A. Moradi F. Izadpanah E. Mokarizadeh A. Moloudi MR. Nikzaban M. Hassanzadeh K. Neuroprotection of donepezil against morphine-induced apoptosis is mediated through Toll-like receptors. Eur J Pharmacol 2015; 764:292-7.

[16]. Sain A. Kandasamy T. Naskar D. In silico approach to target PI3K/Akt/mTOR axis by selected Olea europaea phenols in PIK3CA mutant colorectal cancer. J Biomol Struct Dyn. 2021:1-16.

[17]. Jiang D. Xu J. Liu S. Nasser MI. Wei W. Mao T. Liu X. Zou X. Li J. Li X. Basnet P. Skalko-Basnet N. Rosmanol induces breast cancer cells apoptosis by regulating PI3K/AKT and STAT3/JAK2 signaling pathways Oncol Lett. 2021;22(2):631.

[18]. Obeng E. Apoptosis (programmed cell death) and its signals - A review. Braz J Biol. 2021;81(4):1133-1143.

[19]. Mohamadi T. Hoveizi E. Comparison of antiproliferative effect of cinnamon (Cinnamomum zeylanicum) hydroalcoholic extract with cyclophosphamide medicine on A459 Cancer Cells." Razi Journal of Medical Sciences. 2018; 25(167): 211-29.

[20]. Mazarie A. Mousavi-Nik SM. Fahmideh L. Assessments of phenolic, flavonoid and antioxidant activity of aqueous, alcoholic, methanol and acetone extracts of thirteen medicinal plants. Nova Biologica Rep. 2018; 4: 299-30.

[21]. Saboormaleki S. Sadeghian H. Bahrami AR. Orafaie A. Matin MM. 7-Farnesyloxycoumarin exerts anti-cancer effects on a prostate cancer cell line by 15-LOX-1 inhibition. Archives of Iranian Medicine. 2018; 21.6: 251-259.

[22]. Ragab FA. Eissa AAM. Fahim SH. Salem MA. Gamal MA, Nissan YM. Synthesis and biological evaluation of new coumarin derivatives as cytotoxic agents. Arch Pharm 2021. doi: 10.1002/ardp.202100029.

[23]. Haghighi F. Matin M. Bahrami AR. Iranshahi M. Investigation of cytotoxicity and anti-cancer effects of 7-isopentenyloxycoumarin in vitro. Molecular Aspects of Cancer. 2010; 1:12-20.

[24]. Kędzierska-Matysek M. Stryjecka M. Teter A. Skałecki P. Domaradzki P. Florek M. Relationships between the Content of Phenolic Compounds and the Antioxidant Activity of Polish Honey Varieties as a Tool for Botanical Discrimination. Molecules. 2021; 26(6):1810.

[25]. Liu, MM. Chen XY, Huang YQ, Feng P. Guo YL. Yang G. Chen Y. Hybrids of Phenylsulfonylfuroxan and Coumarin as Potent Antitumor Agents. J. Med. Chem. 2015; 57, 9343-9356.

[26]. Wang, Q. A hybrid of coumarin and phenylsulfonylfuroxan induces caspase-dependent apoptosis and cytoprotective autophagy in lung adenocarcinoma cells. Phytomedicine. 2018; 29: 160-167.