



مقاله پژوهشی

بررسی اثر فرکشن‌های حلال چای کامبوچا بر تکثیر و القای آپوپتوز در سلول‌های سرطان کلوکیتال رده‌ی HT-29

الهام قدوسی دهنوی^۱، محمد ارجمند^{۲*}، رضا حاجی حسینی^۱، زهرا زمانی^۲، سیما نصری^۱

۱- گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، مرکز تهران شرق، تهران، ایران

۲- بخش بیوشیمی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

*مسئول مکاتبات: arjmand1@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۶/۲۰

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۳/۰۵

چکیده

نوشیدنی تخمیری که به طور سنتی حاصل تخمیر چای شیرین توسط قارچ کامبوچا است، دارای اثرات سودمندی در درمان بسیاری از بیماری‌ها به ویژه سرطان است. هدف از مطالعه‌ی حاضر بررسی اثرات فرکشن‌های مختلف چای بر میزان تکثیر و آپوپتوز بر سلول‌های سرطان کلون، HT-29 است. در مطالعه تجربی حاضر، میزان بقا و تکثیر سلولی فرکشن‌های حلال چای کامبوچا شامل فرکشن‌های کلروفورم، اتیل استات، بوتانول، هگزان و فاز آبی نهایی در غلظت‌های (۰-۹۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) بوسیله روش MTT و تست کلونیک مورد بررسی قرار گرفت. میزان آقاء آپوپتوز توسط تست قطعه قطعه شدن DNA و روش فلوسایتومتری بررسی گردید. فرکشن‌های آبی و بوتانولی فاقد اثرات سمیت سلولی بودند. IC50 تعیین شده برای فرکشن‌های اتیل استات، کلروفورم و هگزان بعد از ۲۴ ساعت به ترتیب $49/63 \pm 213/1$ ، $70/11 \pm 296/2$ و $83/29 \pm 563/2$ میکروگرم بر میلی‌لیتر تعیین شد. نتایج نشان داد که مهار رشد سلولی وابسته به دوز است. غلظت IC50 از این فرکشن‌ها سبب قطعه قطعه شدن DNA شد. با بررسی آپوپتوز به روش فلوسیتومتری با این غلظت‌ها نشان داد که جزء اتیل استات باعث بروز آپوپتوز سلولی شد، در حالی که مرگی که غلظت‌های IC50 از فرکشن‌های کلروفورم و هگزان ایجاد کرده بودند بیشتر از نوع نکروز بود. فرکشن اتیل استات چای کامبوچا به صورت وابسته به دوز باعث القاء مرگ سلولی از طریق مسیر آپوپتوز شد و ممکن است مسئول خاصیت ضد آپوپتوز و ضد تکثیر مشاهده شده باشند و به نظر می‌رسد می‌تواند کاندیدای مناسبی برای جلوگیری از تکثیر سلول‌های سرطانی کلوکیتال باشد.

کلمات کلیدی: چای کامبوچا، آپوپتوز، قطعه قطعه شدن DNA، کلونیک، ضد تکثیر.

مقدمه

سرطان کلوکیتال به بیش از ۲/۲ میلیون مورد جدید و نرخ مرگ و میر آن به ۱/۱ میلیون نفر برسد (۴). افزایش شیوع و نرخ مرگ و میر سرطان کلوکیتال بین کشورهای توسعه‌یافته و در حال توسعه متفاوت است. میزان بروز و مرگ و میر سرطان کلوکیتال در

سرطان کلوکیتال (CRC) سومین علت مرگ و میر ناشی از سرطان در سراسر جهان است. آمار هشدار دهنده مرگ و میر به علت بروز سرطان کلوکیتال در سال ۲۰۱۶، در حدود ۷۰۰،۰۰۰ گزارش شده است (۲۱). پیش‌بینی می‌شود تا سال ۲۰۳۰ شیوع جهانی

تولید داروهای درمانی قوی‌تر از منابع طبیعی توجه بیشتری بشود (۱، ۴۱). توسعه گیاهان دارویی و مشتقات آن‌ها، پایه و اساس طب سنتی پیشرفته است، و امروزه، گیاهان همچنان منبع اصلی داروهای شیمیایی موجود هستند. به ویژه، محصولات طبیعی چند سال است که ستون شیمی درمانی سرطان محسوب می‌شوند (۳۶).

حتی اگر شیمی ترکیبی قادر باشد طیف گسترده‌ای از داروهای جدید و مصنوعی را ارائه دهد، با این حال محصولات طبیعی احتمالاً ترکیبات موثرتر و پرکاربردتری را برای تولید داروهای جدید با خصوصیات بیولوژیکی پیشرفته فراهم می‌کنند (۳۴، ۳۸).

کامبوچا (*Kombucha*) نوشیدنی سنتی شرقی است که از چای سبز شیرین یا سیاه با تخمیر با یک توده همزیستی (قارچ چای) متشکل از باکتری‌های اسیدی (*AAB; Komagataeibacter, Gluconobacter, Acetobacter species*) و باکتری‌های اسید لاکتیک (*LAB; Lactococcus, Lactobacillus*) و مخمرهای (*Saccharomyces, Schizosaccharomyces pomb*) *Saccharomyces, Kloeckera apiculata ludwigii* *Zygosaccharomyces bailii, cerevisiae* و *Torulaspor delbrueckii* *bruxellensis*) تهیه می‌شود (۱۰).

مصرف کامبوچا دارای فواید مختلف برای سلامتی است و دارای عملکردهای بیولوژیکی متنوع و اثرات مثبت بر سلامت انسان مانند خواص آنتی‌اکسیدان و ضد سرطان به دلیل محافظت در برابر آسیب‌های مختلف ناشی از گونه‌های رادیکال اکسیژن (ROS) و فعالیت‌های سم‌زدایی که عمدتاً به دلیل تجمع اسیدهای آلی (استیک، گلوکونیک، گلوکورونیک، لاکتیک) موجود است، می‌باشد (۲۵، ۳۲، ۴۶).

کشورهای توسعه یافته بالاتر است، اما در کشورهای کم درآمد کم و متوسط دارند، روند شیوع افزایش یافته است (۵). مانند سایر انواع سلول‌های سرطانی، سلول‌های سرطانی کولورکتال دارای علائم متداول مانند رشد غیرقابل کنترل، عدم حساسیت به مهارکننده‌های رشد، مقاومت در برابر آپوپتوز، پتانسیل بالای تکثیر و توانایی آنژیوژنز آن‌ها است که به زنده ماندن و مهاجرت به سایر قسمت‌های بدن کمک می‌کند (۳۰).

علاوه بر جراحی و رادیوتراپی، داروهای شیمی درمانی کمکی مانند اگزالیپلاتین و ۵-فلوئوروراسیل (5-Fu) معمولاً برای درمان سرطان کولورکتال استفاده می‌شوند (۴۳). با وجود استفاده مکرر از این داروهای شیمی درمانی، تعداد زیادی از عوارض جانبی نامطلوب در طول درمان از جمله درد قفسه سینه و سمیت قلبی مشاهده شده است (۱۷).

از این رو، توسعه داروهای جدید درمانی که مسیرهای مختلف سیگنالینگ سلول‌های سرطانی را مورد هدف قرار داده و به نسبت، عوارض جانبی کمتری بر سلول‌های طبیعی دارند، بسیار مورد توجه قرار گرفته‌اند (۲۹). مکانیسم آپوپتوز یکی از اصلی‌ترین راه‌های حذف سلول‌های ناخواسته است که در بدن موجودات پرسلولی و حتی تک سلولی انجام می‌شود. به هم خوردن سرعت وقوع این پدیده چه به صورت افزایشی و چه کاهش‌ی باعث ایجاد سرطان یا بیماری‌های دیگری همچون آلزایمر و پارکینسون می‌شود (۲۲). آپوپتوز و مهار تکثیر سلولی اهداف اصلی داروهای شیمی درمانی در درمان سرطان روده بزرگ است (۳۷، ۴۷).

علاوه بر عوارض جانبی، تومورهای تحت درمان این داروها ممکن است در برابر شیمی درمانی مقاومت کرده و تکثیر را طولانی‌تر کنند. برخلاف داروهای شیمی درمانی، داروهای ضد سرطان از منابع طبیعی، عوارض جانبی کمتری را نشان داده‌اند. این محدودیت‌ها تحقیقات جدیدی را ترغیب می‌کند تا بر

استریل، فیلتر شده و پس از آن شکر (۱۰ درصد) را کاملاً در چای حل کردیم. چای خنک شده (۲۵۰ میلی لیتر) در ظرف‌های شیشه‌ای ۵۰۰ میلی‌لیتری که قبلاً در دمای ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه در اتوکلاو استریل شده بودند، تقسیم شدند. سپس قارچ چای به هر کدام از این ظرف‌ها اضافه شد. روی ظرف‌ها با پارچه تمیز پوشانده و در دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۱۴ روز در شرایط کاملاً استریل انکوبه شدند. چای حاصل از تخمیر در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ، با استفاده از یک فیلتر سلولز ۰/۴۵ میکرومتر مجهز به پمپ خلاء فیلتر و توسط دستگاه روتاتوری (تبخیر کننده چرخان) تغلیظ شد. به منظور جداسازی ترکیبات بدست آمده از ماده طبیعی فوق از روش جزء بندی حلال-حلال به ترتیب با استفاده از حلال‌های آلی هگزان، کلروفرم، اتیل استات و بوتانول جداسازی صورت پذیرفت. به این صورت که به هر ۱۰ سی سی از سوسپانسیون غلیظ شده فوق در حدود ۱۰۰ سی سی حلال هگزان، کلروفرم، اتیل استات، بوتانول اضافه و به مدت ۲۴ ساعت در شیکر مخلوط شد. با استفاده از کاغذ واتمن عصاره‌ها جدا و پس از آن عصاره‌های غلیظ شده و فاز آبی باقیمانده حاوی ترکیبات قطبی توسط دستگاه تبخیرکننده چرخشی تغلیظ شده و بعد از آن توسط دستگاه آون خلاء و یا فریز درایر خشک، لیوفیلیزه و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

کشت سلولی: در این مطالعه رده‌ی سلولی سرطانی کلورکتال HT-29 از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران با کد NCBI C135 تهیه و طبق پروتکل‌های مربوطه کشت داده شد. رده‌ی سلولی خریداری و زیر هود دفریز و سپس در محیط کشت DMEM حاوی ۱۰٪ درصد FBS (سرم جنین گاوی) و آنتی‌بیوتیک پنسیلین-استروپتومايسين به نسبت (۱۷/۷٪) در انکوباتور تحت شرایط ۵٪ CO₂ دمای ۳۷ درجه و

همچنین دارای اثرات ضد میکروبی حاصل از پلی فنول‌ها و آنتی‌بیوتیک‌ها و باکتریوسین‌ها است (۳۹، ۴۶).

علاوه بر این مصرف آن به درمان بیماری‌های متابولیک مانند بیماران دیابتی، زخم معده و افرادی با کلسترول بالا کمک کرده و همچنین ادعا شده است که مصرف این چای اثرات مفیدی در کاهش درد و استرس در بیماری‌های بدخیم دارد (۳۲، ۴۶، ۴۹).

گزارش‌های متعددی در مورد خصوصیات ضد سرطان پلی فنول‌های چای سیاه موجود است. از آن جایی که چای کامبوچا از چای سیاه تهیه می‌شود، انتظار می‌رود خاصیت ضد سرطان چای سیاه را داشته باشد. اما با این وجود گزارشات معدودی برای خاصیت ضد سرطانی چای کامبوچا ارائه شده است، از این رو هدف از مطالعه حاضر، بررسی خاصیت ضد رشد و تکثیر سلولی و القاء آپوپتوزی فرکشن‌های حلال چای کامبوچا و عصاره حلال آن بر رده‌ی سلولی HT-29 سرطان کلورکتال است.

مواد و روش‌ها

آماده‌سازی چای: در ابتدا به منظور بررسی خالص بودن قارچ کامبوچا تهیه شده از منبع خانگی و همچنین بررسی عدم آلودگی آن به قارچ‌های مولد مایکوتوکسین به خصوص آسپرژیلوس، قارچ کامبوچا بر روی محیط کشت YGC آگار، محیط کشت عمومی برای رشد کپک و قارچ، کشت داده شد. به علت اسیدیته بالایی که در چای ایجاد می‌شود، مشکلی از نظر آلودگی به باکتری‌های بیماری‌زا وجود ندارد. سپس برای تهیه چای کامبوچا ابتدا ۱ لیتر آب در ظرف سالم و بدون خراش جوشانده شد. پس از برداشتن ظرف از روی شعله، چای سیاه (گلستان، تهران، ایران) به آب جوش (۱/۲ وزنی/حجم) اضافه شد و اجازه دادیم تا به مدت ۱۵ دقیقه دم بکشد و سپس توسط الک

متیل سولفوکساید، کریستال‌های فورمازان تولید شده توسط سلول‌های زنده حل شده و جذب نوری در طول موج ۵۷۰ نانومتر به وسیله دستگاه قرائت خوان الایزا خوانده شد. نتایج بر اساس مقایسه‌ی جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۷۰ نانومتر نسبت به گروه کنترل گزارش گردید. غلظتی که سبب حذف ۵۰ درصد از سلول‌های زنده گردید به عنوان IC_{50} (Half maximal inhibitory concentration) تعیین گردید.

سنجش توانایی کلونی‌زایی سلول‌های HT-29 در

حضور فرکشن‌های مختلف چای کامبوچا: پس از تعیین غلظت مناسب از دارو توسط تست MTT، توانایی کلونی‌زایی سلول‌ها در حضور غلظت‌های متفاوت از فرکشن‌های مختلف چای کامبوچا تحت بررسی قرار گرفت. بدین منظور در ابتدا تعداد 10^4 سلول در هر سانتی‌متر مکعب از فلاسک کشت سلولی، کشت داده شد. پس از اینکه سلول‌ها به فاز لگاریتمی رسیدند و از نظر چسبیدن به کف پلیت زیر میکروسکوپ اینورت بررسی گردیدند، محیط رویی سلول‌ها دور ریخته و سپس با غلظت‌های متفاوت از فرکشن‌های مختلف چای کامبوچا به مدت ۴۸ ساعت تیمار شدند. سلول‌ها تریپسینه و شمارش شده و سپس درون چاهک‌های پلیت شش‌خانه‌ای کشت داده شدند. پس از گذشت ۹ روز تعداد کلونی‌ها و راندمان کشت طبق فرمول‌های زیر محاسبه شد. کلنی‌ها با $1/10$ متیلن بلو در 50% متانول رنگ آمیزی شدند. کلونی‌های سلولی که دارای حداقل ۵۰ سلول باشند به عنوان کلونی زنده شمارش و در نهایت راندمان کشت سلولی و درصد کسر بقاء توسط فرمول‌های زیر محاسبه گردید.

راندمان کشت به صورت $(\text{تعداد کلونی‌های تشکیل شده} / \text{تعداد سلول‌های کشت داده شده}) \times 100$ درصد کسر بقاء = $(\text{تعداد کلونی‌های تشکیل شده} / \text{تعداد سلول‌های کشت داده شده}) \times 100$

رطوبت ۹۵٪ رشد داده شدند. پس از رشد سلول‌ها و پر کردن ۸۰٪ از کف فلاسک، سلول‌ها پاساژ داده شد. محیط کشت هفته‌ای سه بار تعویض و برای برداشت کردن سلول‌ها از محلول تریپسین/EDTA استفاده شد. جهت تعیین فعالیت حیاتی سلول، ۰/۱ میلی‌لیتر از محلول تریپان بلو ۰/۱ درصد (جرمی/جرمی) در ۰/۱۵ مول در PBS در یک چاهک از پلیت ۹۶ چاهکی مخلوط شد. بلافاصله با کمک یک هموسایتومتر (لام نوبار) تعداد سلول‌های رنگ گرفته به عنوان سلول‌های مرده و سلول‌های رنگ نشده به عنوان سلول زنده تعیین شد. سپس به کمک فرمول زیر درصد فعالیت حیاتی مورد محاسبه قرار گرفت.

$100 \times (\text{تعداد سلول‌های شمارش شده} / \text{تعداد سلول‌های زنده}) = \text{درصد زنده‌مانی}$

بررسی میزان سمیت سلولی فرکشن‌های مختلف چای

کامبوچا با روش MTT assay: به منظور بررسی

سمیت سلولی فرکشن‌های هگزانی، کلروفومی، اتیل استاتی و بوتانولی و آبی چای کامبوچا و تعیین IC_{50} از روش MTT -3-[(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide] استفاده شد. در ابتدا، تعداد ۵ هزار سلول در هر چاهک ۹۶ تایی پلیت سلولی کشت داده شد و به مدت ۲۴ ساعت اجازه دادیم تا سلول‌ها به کف چاهک‌ها بچسبند. سپس محیط رویی کشت با محیط جدید حاوی غلظت‌های مختلف شامل (۰، ۱۰، ۲۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ۶۰۰، ۵۰۰، ۹۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) از فرکشن‌های مختلف چای کامبوچا جایگزین شد و یک سری هم به عنوان کنترل، فقط محیط کشت خالی به سلول‌ها اضافه شد و به مدت ۲۴ ساعت انکوبه گردیدند. سپس محلول رویی محیط کشت دور ریخته شد و سلول‌ها با ۲۰ میکرولیتر رنگ MTT (محلول ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر PBS) به مدت ۴ ساعت در انکوباتور تحت شرایط کشت انکوبه شدند. آنگاه با استفاده از ۵۰ میکرولیتر دی

آزمون قطعه قطعه شدن DNA: آپوپتوز یا مرگ برنامه‌ریزی شده سلول با یک سری مشخصات ویژه از جمله بیرون‌زدگی غشاء و تراکم سیتوپلاسم و قطعه قطعه شدن DNA مشخص می‌شود. برای بررسی سنجش قطعه قطعه شدن DNA ابتدا 10^6 سلول در پلیت‌های ۶ خانه‌ای کشت داده شده و پس از ۴۸ ساعت، سلول‌ها تحت تیمار با غلظت‌های IC50 هر کدام از فرکشن‌ها قرار گرفتند و یک گروه هم به عنوان کنترل فقط با محیط کشت تیمار شد. بعد از گذشت ۲۴ ساعت انکوباسیون، پس از شستشو با PBS و تریپسینه کردن سلول‌ها در ۱۳۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. پس از خارج کردن مایع رویی به رسوب سلولی در حدود ۶۰۰ میکرولیتر بافر شامل (۱۰ میلی‌مول Hcl-Tris با pH=۷/۵، SDS ۰/۰۶٪، ۴۰۰ میلی‌مول Nacl و ۱۰۰ میلی‌مول EDTA) اضافه و سپس ۱۰ میکرولیتر RNAase به منظور حذف RNA به محلول فوق اضافه شد. سپس محلول را به مدت ۵ دقیقه انکوبه کردیم و بعد از آن به میزان ۲۰۰ میکرولیتر محلول نمک طعام ۶ مولار به منظور رسوب پروتئین‌ها به محلول اضافه و بعد از قرار دادن آن به مدت ۵ دقیقه روی یخ با سرعت ۱۶۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. محلول رویی جدا و سپس به این محلول در حدود ۶۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول اضافه و بعد از ۱۵ دقیقه قرار داده شدن بر روی یخ، دوباره با سرعت ۱۶۰۰۰ دور در دقیقه و در مدت زمان ۲۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. رسوب حاصل با ۶۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۰٪ شستشو و در دمای اتاق خشک گردید. پس از خشک شدن در دمای اتاق توسط بافر شامل (۱۰ میلی‌مول Tris-EDTA و Tris-Hcl با pH=۸) رسوب حاصل، حل گردید. نمونه DNA به دست آمده بر روی ژل آگارز ۱/۵٪ الکتروفورز و نتیجه با استفاده از ژل داک مشاهده شد.

سنجش آپوپتوز از طریق سنجش فلوسیتومتری: اساس روش فلوسیتومتری مهاجرت فسفاتیدیل سرین از غشاء داخلی به غشاء خارجی در طی مراحل ابتدایی آپوپتوز به دلیل اختلال در آنزیم ترانس لوکاز وابسته به ATP و یا فعال شدن آنزیم‌هایی مثل اسکرامبلاز (Scramblase) است. انکسین V (Annexin-FITC) در حضور کلسیم به فسفاتیدیل سرین متصل شده و از کونژوگه شدن این پروتئین با رنگ فلورسانس FITC برای ارزیابی آپوپتوز به وسیله دستگاه فلوسیتومتر استفاده می‌شود. به منظور سنجش آپوپتوز و تعداد سلول‌های آپوپتوز شده در یک جمعیت سلولی تیمار شده با غلظت‌های IC50 از فرکشن‌های مختلف چای کامبوچا و مقایسه آن با جمعیت سلولی در سلول‌های تیمار نشده، رنگ آمیزی سلول‌ها با دو رنگ پروپیدیوم یدید PI و Annexin-FITC طبق دستور کار و با کمک دستگاه فلوسیتومتری انجام گرفت. بدین صورت که سلول‌های HT-29 در تراکم 5×10^5 سلول در چاهک-های پلیت ۶ خانه کشت داده شده و پس از رسیدن به تراکم مناسب، با غلظت‌های IC50 از فرکشن‌های مختلف چای کامبوچا تیمار شدند. پس از ۲۴ ساعت، سلول‌ها تریپسینه شدند و پس از سانتریفیوژ، رسوب سلولی با محیط کشت شستشو و مجدداً در ۵۰۰ میکرولیتر بافر اتصالی (IX Binding Buffer) سوسپانسیون گردید. سپس ۵ میکرولیتر از Annexin-FITC و ۵ میکرولیتر از پروپیدیوم یدید PI (۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) به سوسپانسیون حاصل اضافه شد. پس از ۲۰ دقیقه انکوبه شدن در دمای محیط و در تاریکی، اتصال Annexin-FITC و رنگ PI با دستگاه فلوسیتومتر آنالیز شدند. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار دستگاه صورت گرفت.

تجزیه و تحلیل آماری: تمامی آنالیز داده‌ها در سه تکرار انجام شد. نتایج حاصل با استفاده از آزمون آماری ANOVA و واریانس یک طرفه و با کمک نرم افزار ۱۷

مربوط به فرکشن هگزانی و در حدود $563/2 \pm 83/29$ میکروگرم بر میلی لیتر تعیین شد.

تاثیر فرکشن‌های مختلف چای بر روی توانایی کلونی‌زایی سلول‌ها: برای ارزیابی اثر مهاري فرکشن‌های اتیل استات، کلروفرم و هگزان چای کامبوچا بر کلونی‌زایی سلول‌های HT-29، سنجش کلونی‌زایی با استفاده از معیارهای استاندارد برای یک کلنی (بیش از ۵۰ سلول یا قطر بیش از ۶۰ میکرون) انجام شد. نتایج ارائه شده در شکل ۲ و نمودار ۱ نشان داد که با افزایش غلظت در هر سه فرکشن، بقای سلولی وابسته به دوز بوده و با افزایش غلظت از بقای سلولی کاسته شده بود و تشکیل کلونی توسط فرکشن‌های اتیل استات، کلروفرم و هگزان چای کامبوچا صورت وابسته به دوز نسبت به گروه کنترل سرکوب شد.

آزمون قطعه قطعه شدن DNA: نتایج حاصل از تیمار سلول‌های سرطانی HT-29 با غلظت‌های IC50 از فرکشن‌های اتیل استات چای، کلروفرم و هگزانی و نشان داد که این دارو موجب قطعه قطعه شدن DNA ژنومی سلول‌های سرطانی می‌شود. قطعه قطعه شدن DNA ژنومی که از خصوصیات سلول‌های آپوپتوتیک است، بر روی ژل آگارز تایید شد. در حالی که تیمار سلول‌ها با غلظت $900 \mu\text{g/ml}$ جزء بوتانول و کلروفرم با کنترل تفاوتی نداشت. همان طور که در تصویر قابل مشاهده است، غلظت‌های IC50 از فرکشن‌های اتیل استات و کلروفرم و هگزان قادر به القاء برش DNA در نواحی بین کروزومی است که در مقایسه با نمونه کنترل (سلول تیمار نشده) که اثری بر روی DNA ژنومی نداشته است.

ارزیابی مهار رشد سلول‌های توموری کلورکتال توسط فرکشن‌های حلال چای با القای مرگ برنامه ریزی شده: به منظور بررسی نوع مرگ القاء شده در سلول توموری کلورکتال (مرگ سلولی یا نکروز)، آزمون Annexin-V-PI و تیمار با غلظت‌های IC50 از

SPSS و (آمریکا، V.5/01) GraphPad Prism مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و به صورت میانگین \pm انحراف استاندارد گزارش شد. در تمام بررسی‌ها سطح معناداری آزمون‌ها $p < 0/05$ در نظر گرفته شد.

نتایج

تاثیر فرکشن‌های مختلف چای بر روی توانایی زیستی سلول‌ها: بررسی میزان سمیت فرکشن‌های مختلف چای بر روی سلول‌های HT-29 در بازه زمانی ۲۴ ساعت در جدول ۱ در مقایسه با کنترل را نشان می‌دهد. با توجه به داده‌های ارائه شده از تست MTT در جدول ۱ و نتایج حاصل از مقایسه تست سمیت سلولی بین غلظت‌های مختلف از فرکشن‌های مختلف چای بر رده سلولی HT29 نشان داد که به ترتیب فرکشن کلروفرم و اتیل‌استاتی و هگزانی دارای بیشترین اثر سمیت سلولی بر روی سلول‌های HT-29 در بازه زمانی ۲۴ ساعت را داشته‌اند. براساس نتایج، درصد زنده‌مانی سلول‌های سرطانی HT-29 با غلظت فرکشن‌ها رابطه معکوس دارد و با افزایش غلظت درصد زنده مانگی کاهش می‌یابد. همچنین درصد زنده‌مانی سلول‌های سرطانی کلورکتال در مواجهه با غلظت ۹۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر جزء اتیل استاتی با درصد زنده مانگی ۰ درصد و جزء کلروفرمی با $12/42 \pm 2/39$ و جزء هگزانی با $0/12 \pm 28/48$ درصد بیشترین اثر کشندگی را بر سلول‌های سرطانی HT-29 داشت. بیشترین درصد زنده‌مانی عصاره‌های آبی و بوتانولی به ترتیب برابر با $93/67 \pm 3/45$ درصد و $93/12 \pm 1/5$ بود که درصد زنده مانگی بالا و تقریباً نسبت به گروه کنترل تفاوتی نداشت. میزان IC50 تعیین شده برای فرکشن‌های چای در جدول شماره ۱ آورده شده است. که به ترتیب کمترین میزان مربوط به فرکشن اتیل استات برابر با $1/63 \pm 213/49$ و سپس فرکشن کلروفرم در حدود $70/11 \pm 296/2$ و بیشترین آن

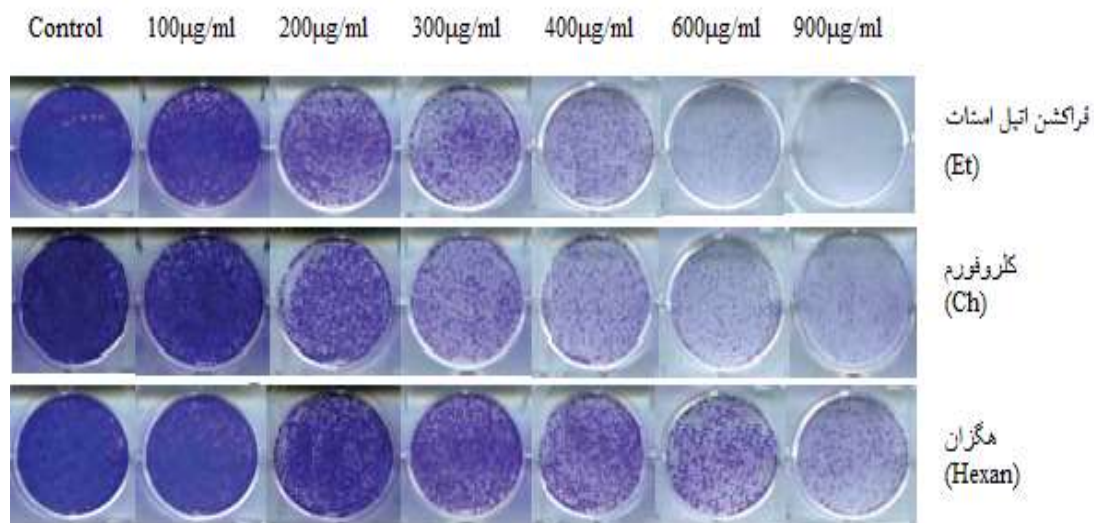
مقدار و در حدود ۱۵ درصد و در فرکشن هگزانی در حدود ۹ درصد بود. درصد سلول‌های نکروتیک در گروه‌های تیمار بیشتر از کنترل بود. ولی این مقدار در گروه تیمار شده با فرکشن اتیل استات بسیار کم و نزدیک به گروه کنترل بود. در حالی که بیشترین میزان آن مربوط به فرکشن هگزان در حدود ۳۷ درصد و بعد از آن مربوط به فرکشن کلروفرم و در حدود ۳۰ درصد بود. بررسی آزمون آنکسین نشان داد که نوع مرگی که فرکشن اتیل استات القاء می‌نماید از نوع آپوپتوز و عامل اصلی مهار بقاء سلولی است که برای ما مطلوب است. در حالی که نوع مرگ القاء شده در فرکشن هگزانی و سپس کلروفرم بیشتر از نوع نکروز است.

فرکشن‌های چای در زمان ۲۴ ساعت انجام گرفت. این آزمایش قرارگیری سلول‌ها به سمت راست نمودار بیانگر آپوپتوز و یا مرگ برنامه ریزی شده سلولی است. نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که در صد سلول‌های آپوپتوز اولیه در مقایسه با کنترل و تیمار شده با غلظت $IC_{50} = 200 \mu g/ml$ از فرکشن اتیل استات بیشتر از گروه کنترل بود. در حالی که تیمار با غلظت $IC_{50} = 300 \mu g/ml$ از فرکشن کلروفرمی و $IC_{50} = 600 \mu g/ml$ از فرکشن هگزانی آپوپتوز اولیه کمتری را نسبت به گروه کنترل از خود نشان دادند. درصد سلول‌های آپوپتوز دیررس در تمام تیمارها بیشتر از گروه کنترل بود. ولی این میزان در فرکشن اتیل استات در حدود ۳۰ درصد و در فرکشن کلروفرم نصف این

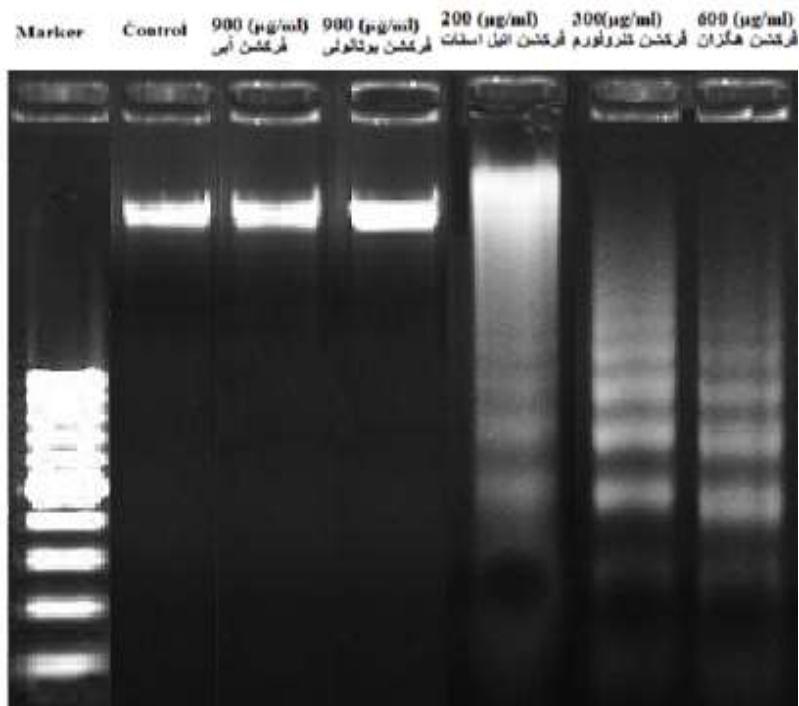
جدول ۱- درصد بقای سلولی $SD \pm$ و IC_{50} تعیین شده برای اجزاء مختلف چای.

غلظت ($\mu g/ml$)	فرکشن آبی	فرکشن بوتانولی	فرکشن اتیل استات	فرکشن کلروفرم	فرکشن هگزانی
۵۰	۹۴/۳±۶۳/۱۸	۹۵/۳±۲۸/۱۸	۸۹/۱±۶۱/۴۱	۸۲/۲±۲۴/۸۲	۹۴/۳±۷۱/۴۴
۱۰۰	۹۵/۲±۳/۶۱	۹۴/۱±۳/۰۲	۷۱/۴±۳/۲۱*	۷۹/۱±۳/۶۹	۹۰/۲±۳/۵۷
۲۰۰	۹۳/۳±۸۱/۴۱	۹۵/۲±۸۱/۰۲**	۵۲/۲±۰۳/۹۵*	۶۱/۲±۳۷/۲۳	۷۷/۱±۳/۲۸
۳۰۰	۹۵/۲±۰۳/۳۳	۹۴/۱±۲۶/۹۲*	۴۳/۲±۲۹/۱۳	۵۳/۱±۷۱/۶۱	۶۳/۳±۸۱/۲۶*
۴۰۰	۹۵/۳±۹۱/۱۲*	۹۳/۱±۱۸/۴۷	۳۹/۱±۷۴/۰۵	۴۴/۲±۳/۳۲	۵۸/۲±۳/۴۱
۶۰۰	۹۴/۱±۷۱/۶۹	۹۳/۳±۵۷/۲۶**	۱۴/۳±۳۴/۰۴	۳۴/۲±۹۱/۳۲	۴۷/۱±۶۱/۱۶
۹۰۰	۹۳/۳±۸۷/۴۸	۹۶/۴±۱/۰۵	۰	۱۲/۲±۲/۳۹*	۲۸/۱±۳۱/۱۲
IC_{50}	-	-	۲۱۳/۱±۴۹/۶۳*	۲۹۶/۲±۷۰/۱۱	۵۶۳/۲±۸۳/۲۹

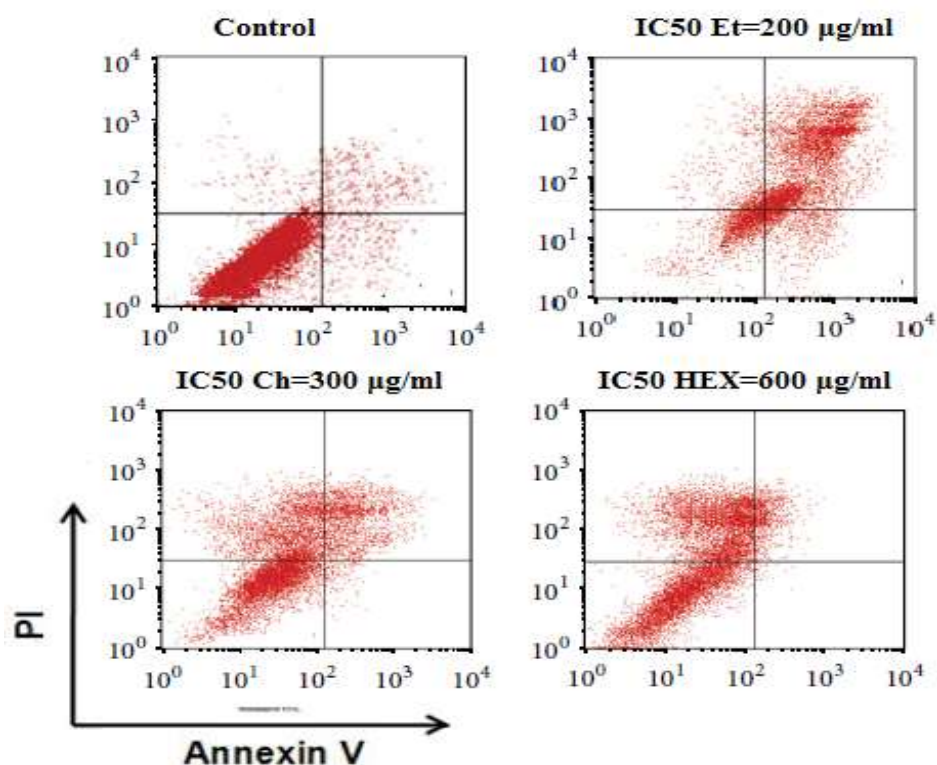
نتایج به صورت به صورت میانگین \pm انحراف معیار گزارش شد. برای جزء آبی و بوتانولی به دلیل بالا بودن درصد زنده مانده و عدم تفاوت با گروه کنترل IC_{50} تعیین نشد ($p < 0/05$ ، $p < 0/01$).



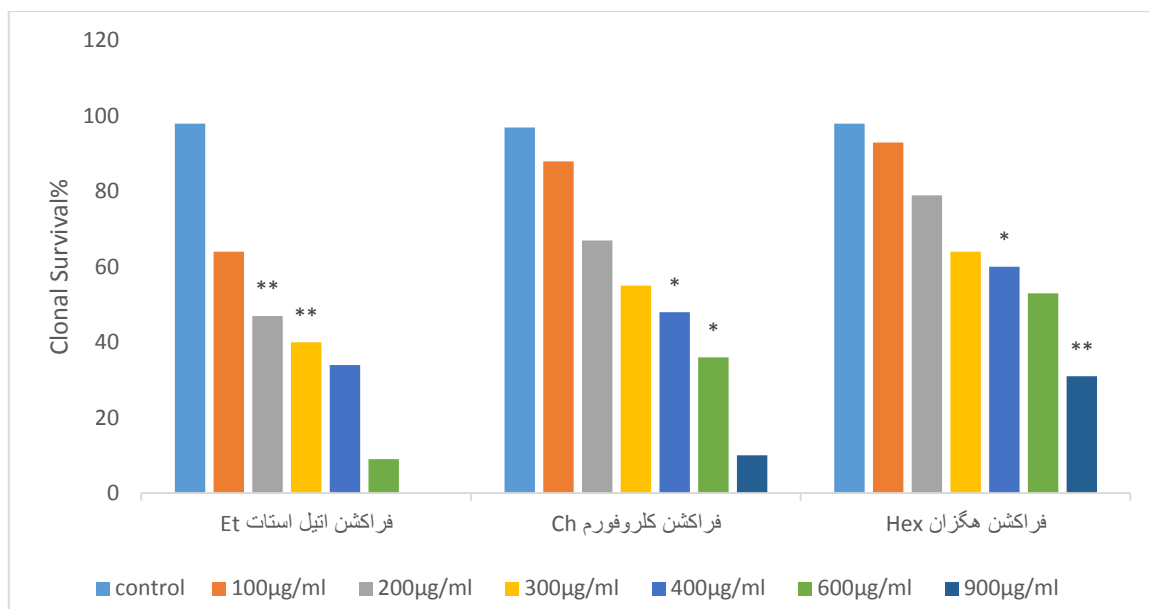
شکل ۱- تصویر کلونی‌ها پس از تثبیت و رنگ آمیزی با ۰/۰۵٪ متیلن بلو در ۰/۵۰٪ متانول رنگ آمیزی شدند. بعد از تأثیر غلظت‌های متفاوت از فرکشن‌های اتیل استات، کلروفورم و هگزان از چای کامبوچا پس از تیمار ۲۴ ساعته بر میزان توانایی کلونژنیک سلول-های HT-29 و کشت آن‌ها به مدت ۹ روز.



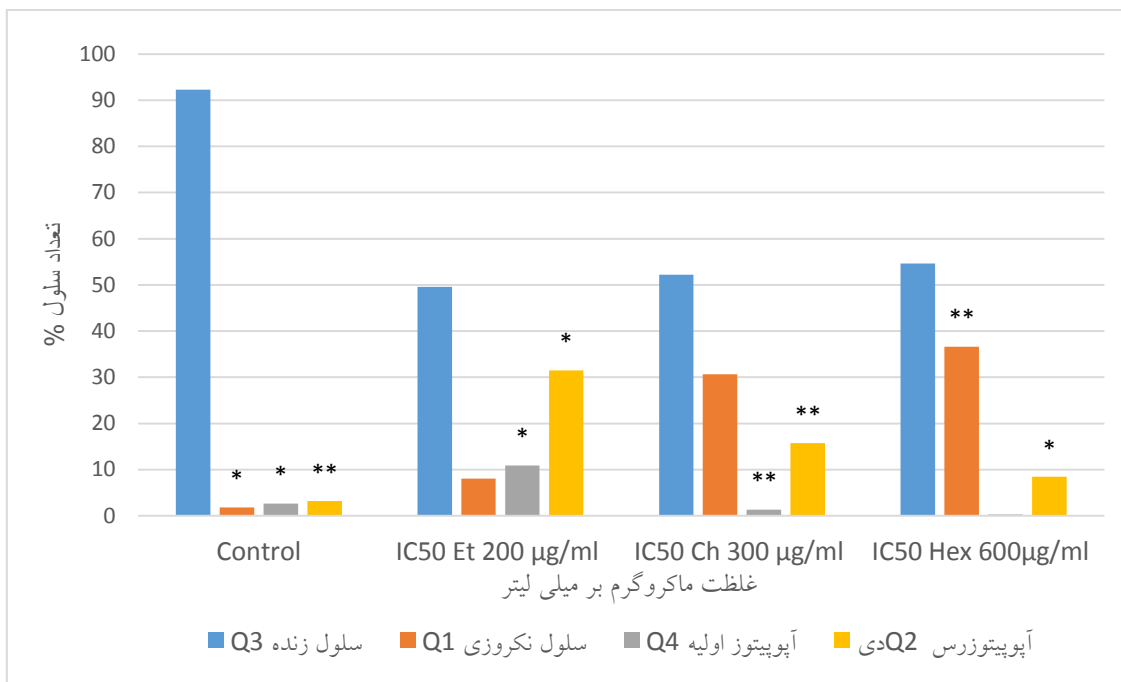
شکل ۲- تصویر ژل الکتروفورز از تست قطعه قطعه شدن DNA سلول‌های HT-29 تحت تیمار با غلظت‌های IC50 از فرکشن‌های حلال چای به مدت ۴۸ ساعت برای نشان دادن آپوپتوز.



شکل ۳- تاثیر فرکشن های چای کامبوچا بر القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی کلورکتال رده‌ی HT-29 که غلظت‌های IC50 از فرکشن‌ها به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. سلول‌های زنده (LL)، سلول‌های نکروزی (UL)، آپوپتوز اولیه (LR) و آپوپتوز انتهایی (UR).



نمودار ۱: تأثیر غلظت‌های متفاوت از فرکشن‌های اتیل استات، کلروفرم و هگزان چای کامبوچا بعد از تیمار ۲۴ ساعته بر میزان توانایی کلونی‌زایی سلول‌های HT-29 توسط تست کلونژنیک و کشت آن‌ها به مدت ۹ روز. تمام تست‌ها با سه تکرار انجام شد و آنالیز داده‌ها بر اساس میانگین \pm انحراف معیار گزارش شده است ($p < 0.05$, $** p < 0.01$).



نمودار ۲: نمودار توصیفی مقایسه میزان بروز نکروز و آپوپتوز در سلول‌ها پس از ۲۴ ساعت تیمار با IC50 فرکشن‌های اتیل استات و کلروفرم و هگزانی چای کامبوچا و سلول‌های تیمار نشده به عنوان گروه کنترل در سلول‌های سرطانی کلورکتال رده-ی HT-29 به کمک فلوسیتومتری. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

بحث

ممکن است به عنوان داروهای جایگزین یا کمک کننده در شیمی درمانی برای درمان سرطان کلورکتال مورد استفاده قرار بگیرد (۲۳). آپوپتوز یک فرایند فیزیولوژیکی است که به عنوان یک مکانیسم اساسی هموستاز سلولی و بافت عمل می‌کند. القاء آپوپتوز در سلول‌های هدف یک مکانیسم کلیدی در درمان سرطان کلورکتال است. رویکردهای درمانی جدید در سرطان روده بزرگ شامل تلاش‌های مداوم برای کشف داروهای جدید از منابع طبیعی است که هم دارای سمیت کمتری هستند و هم در مسیرهای فیزیولوژیکی آپوپتوز عمل کرده و منجر به از بین رفتن سلول‌های تومور شوند (۳۵ و ۱۹). مطالعات اپیدمیولوژیک متعددی، نقش محافظتی ترکیبات شیمیایی چای را در برابر برخی از سرطان‌های انسانی نشان داده است. گزارش شده است که

در سراسر جهان، سرطان کولورکتال یکی از مهمترین انواع در نوع خود و یکی از عوامل اصلی مرگ و میر انواع سرطان در بین زنان و مردان است. مطالعات جامع در شرایط *in vitro* و *in vivo* نشان داده است که ترکیبات طبیعی به دلیل توانایی در تعدیل فرآیندهای سرطان‌زا با تغییر مسیر بقاء سلول‌های سرطانی متعدد، امکان پیشگیری و درمان انواع سرطان‌ها به ویژه سرطان روده بزرگ را فراهم می‌کنند. درمان بالینی فعلی برای سرطان کلورکتال عمدتاً شامل جراحی و شیمی درمانی است. با این حال، به دلیل بروز عوارض جانبی و بروز مقاومت در برابر دارو، نیاز فوری به یافتن داروهای جدید و مؤثرتر برای درمان سرطان کلورکتال وجود دارد. تعداد متعددی از مطالعات نشان داده‌اند که بسیاری از محصولات طبیعی در درمان و پیشگیری سرطان کلورکتال موثر است و

تربیان بلو و سنجش کلونوژنیک جهت تعیین بقاء و رشد رده سلولی، سرطانی HT-29 تیمار شده با دوزهای مختلف از فرکشن‌های چای مورد ارزیابی و مقایسه قرار گرفتند. یافته‌های به دست آمده نشان داد که فرکشن‌های اتیل استات، کلروفرم و هگزانی چای کامبوچا به صورت وابسته به دوز و در مقایسه با کنترل دارای اثرات سایتوتوکسیک معنی‌دار بر روی سلول‌های سرطانی HT-29 بوده و سبب مهار رشد سلولی شدند. در حالی که فرکشن‌های آبی و بوتانولی فاقد اثر سایتوتوکسیک بر روی سلول‌های HT-29 بوده و با گروه کنترل تفاوت معنی‌داری نداشتند. نتایج حاصل از سه روش مورد مطالعه یکدیگر را تایید کردند. اثر سمیت سلولی و فعالیت آنتی‌پرولیفتیک چای کامبوچا بدست آمده از چای سیاه و چای مرزه زمستانی بر روی سلول‌های سرطان اپیتلیال دهانه رحم (HeLa)، آدنوکارسینوم روده بزرگ (HT-29) و آدنوکارسینومای پستان (MCF-7) با استفاده از روش رنگ سنجی سولفوردامین نشان داده شده است (۸ و ۹). همچنین اثر سیتوتوکسی غلظت‌های مختلف فراکشن‌های مختلف چای کامبوچا تهیه شده از چای سیاه بر روی رده‌های سلولی مختلف شامل سلول سرطانی ریه (A549)، سرطان استخوان (U2OS) و سرطان کلیه (0-786) و سلول آدرنا از تاج عصبی موش (PC12) بررسی و نشان دادند که فرکشن‌های اتیل استات که حاوی دی متیل ۲- (۲-هیدروکسی-۲-متیوکسی پروپیلیدن) مالونات و ویتکسین است با کاهش تهاجم سلولی، تحرک سلولی و کاهش بیان ماتریکس متالوپروتئیناز اثرات سمیت سلولی خاصی روی سلول‌های (۷۸۶۰-) کارسینوم کلیوی انسان و (U2OS) استئوسارکوم انسانی ایجاد کرده است که سبب مهار رشد سلول‌های استخوان و کلیه و همچنین افزایش مرگ و میر سلولی و کاهش قدرت تهاجمی سلول‌های سرطانی در این دو رده سلولی شد (۱۱) و

فلوین‌های موجود در چای قادر به مهار انواع خاصی از سرطان هستند (۲۴). از سویی مشخص شده که پلی فنول‌های کاتچین موجود در چای باعث مهار تکثیر و القاء آپوپتوز در سلول‌های پستانداران کشت شده از جمله سرطان روده بزرگ، سرطان ریه، سرطان پستان، ملانوما و سلول‌های لوسمی و همچنین در مدل‌های حیوانی در سرطان‌های ریه، پوست، مری، روده بزرگ و غده پستانی می‌شود. همچنین پلی فنول اپی گالوکاتچین گالات موجود در چای مانند ماشه‌ای مکانیسم آپوپتوز در سلول‌های سرطانی ریه را فعال کرده و باعث مهار رشد سلول‌های ریه ردهی H-661 می‌شود. اما خاصیت ضد سرطانی چای کامبوچا هنوز به خوبی مشخص نشده است (۱۴ و ۳۳). ادعا شده است که چای کامبوچا ضد سرطان است. چای کامبوچا سال‌هاست که بر اساس مشاهدات و توصیفات شخصی و همچنین توسط یک مطالعه جمعیتی که توسط "تحقیقات انکولوژی مرکزی" و واحد "آکادمی علوم روسیه در مسکو" در روسیه در سال ۱۹۵۱ انجام شد، نشان داد که این نوشیدنی تخمیری دارای خاصیت ضد سرطان است (۸). مکانیسم‌های ضد سرطانی احتمالی پلی فنول‌های چای و محصولات ناشی از متابولیزه شدن پلی فنول‌ها در طول تخمیر چای که توسط بیشتر محققان پذیرفته شده است، شامل مهار جهش ژن، مهار تکثیر سلول-های سرطانی، القاء آپوپتوز سلول سرطانی و خاتمه متابولیزه می‌باشد (۴۴).

از جمله اهداف این تحقیق بررسی تاثیر فرکشن‌های مختلف چای و غلظت‌های مختلف آن بر روی مهار رشد سلولی و مرگ برنامه‌ریزی شده سلول‌های سرطانی کلورکتال HT-29 بود. در مطالعه‌ی حاضر برای بررسی القای آپوپتوز توسط فرکشن‌های مختلف چای بر علیه سلول‌های رده HT-29 از روش‌های مختلفی استفاده شد. در این مطالعه روش‌های MTT،

بیشتر از گروه کنترل بود در حالی که تیمار با غلظت $600 \mu\text{g/ml}$ از فرکشن کلروفرمی و $IC_{50} = 300 \mu\text{g/ml}$ از فرکشن آپوپتوز اولیه کمتری را نسبت به گروه کنترل از خود نشان دادند. درصد سلول‌های آپوپتوز دیررس در تمام تیمارها بیشتر از گروه کنترل بود. در حالی که این میزان در فرکشن اتیل استات در حدود ۳۰ درصد و در تیمار با فرکشن کلروفرم نصف این مقدار و در حدود ۱۵ درصد و در فرکشن هگزان در حدود ۹ درصد بود و همچنین در تیمار سلول با فرکشن هگزان در صد سلول‌های نکروتیک در گروه‌های تیمار بیشتر از کنترل بود. ولی این مقدار در سلول‌های گروه تیمار شده با فرکشن اتیل استات بسیار کم و نزدیک به گروه کنترل بود. در صورتی که بیشترین میزان آن مربوط به فرکشن هگزان در حدود ۳۷ درصد و بعد از آن مربوط به فرکشن کلروفرم بود. نتایج حاصل از فلوسیتومتری نشان داد که میزان آپوپتوز در غلظت IC_{50} از فرکشن اتیل استات بالا می‌باشد، هر چند که درصد بسیار کمی هم از سلول‌ها دچار نکروز شدند، ولی این میزان نسبت به درصد سلول‌های آپوپتوز شده قابل توجه نبود. نوع مرگی که فرکشن اتیل استات القاء می‌نماید از نوع آپوپتوز و عامل اصلی مهار بقاء سلولی است که برای ما مطلوب است، در حالی که نوع مرگ القاء شده در فرکشن هگزانی و سپس کلروفرم بیشتر از نوع نکروز است. در مطالعات قبلی چای کامبوچا تهیه شده از چای سیاه سبب بروز آپوپتوز در سلول‌های سرطانی کلورکتال (HCT-116) و سلول‌های سرطانی کبد (HEpG-2) شد. همچنین چای کامبوچا تهیه شده از چای سیاه و عصاره مرکبات سبب بروز آپوپتوز در دو رده از سلول‌های سرطانی مثانه (۵۶۳۷ و T-24) شد. که این القاء آپوپتوز توسط چای از طریق تنظیم پروتئین‌های آپوپتوز، از جمله کاسپاز ۳، ۸، ۹ و PARP در سلول‌های مثانه صورت پذیرفت (۲۸).

(۲۶). علاوه بر این، چای کامبوچا به طور قابل توجهی میزان بقای سلول‌های سرطانی پروستات را با تنظیم بیان محرک‌های آنژیوژنز مانند ماتریکس متالوپروتئینازها، سیکلوسکسیژناز-۲، اینترلوکین ۸، فاکتور رشد اندوتلیال و فاکتور القایی انسان- 1α کاهش می‌دهد. این مطالعه پتانسیل چشمگیر چای کامبوچا را در مهار آنژیوژنز از طریق تغییرات در بیان محرک‌های رگ زایی نشان داد (۴۰). همچنین چای کامبوچا تهیه شده از چای سیاه دارای اثر سمیت بر سلول‌های سرطانی (HCT-116) کلورکتال و (HEpG-2) کبدی است (۳). همچنین نشان داده شد که چای کامبوچا تهیه شده با چای سیاه که به آن عصاره مرکبات اضافه شده دارای خاصیت سمیت سلولی بر دو رده سلول‌های سرطانی مثانه T-24 و 5637 است (۲۸).

قطعه قطعه شدن DNA از شاخصه‌های مورفولوژیک در آپوپتوز می‌باشد. در مرحله بعد آپوپتوز با تیمار سلول‌ها با IC_{50} هر سه فرکشن موثر چای و انجام سنجش DNA Fragmentation ثابت شد. نتایج حاصل از این تست نشان داد که این غلظت‌ها در هر سه فرکشن باعث شکست و قطعه قطعه شدن DNA و القاء آپوپتوز در رده سلولی HT-29 شده است. الگوی تیمار سلول‌ها با غلظت بالای $900 \mu\text{g/ml}$ جزء بوتانول و آبی هیچ گونه شکست و قطعه قطعه شدن DNA را نشان نداد و با نمونه کنترل تفاوتی را از خود نشان ندادند که در راستای تایید نتایج بدست آمده در تست سمیت سلولی این دو فرکشن بود. از سویی دیگر مهمترین مکانیسم مولکولی مورد استفاده در درمان داروهای ضد سرطان، مرگ سلولی برنامه ریزی شده یا آپوپتوز در روش شیمی درمانی است (۱۶). نتایج حاصل از فلوسیتومتری در این تحقیق نشان می‌دهد که در صد سلول‌های آپوپتوز اولیه تیمار شده با غلظت $IC_{50} = 200 \mu\text{g/ml}$ از فرکشن اتیل استات

سلولی و آپوپتوزی بخش اتیل استات چای کامبوچا در مطالعه حاضر باشند.

نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که فرکشن اتیل استات از فرکشن حلال چای کامبوچا سبب مهار رشد و تکثیر سلول‌ها و القاء آپوپتوز و افزایش مرگ برنامه ریزی شده سلولی در سلول‌های سرطانی کلورکتال شده است که این اثر می‌تواند ناشی از مالونات و ویتکسین موجود در این فرکشن باشد. این یافته‌ها حاکی از این است که می‌توان امیدوار بود که با در آینده با مطالعات بیشتر چای کامبوچا به عنوان یک منبع بالقوه در پیشگیری، درمان و القاء مرگ سلولی در سلول‌های سرطان کلورکتال مورد استفاده قرار داد.

با توجه به نتایج پژوهش حاضر پیشنهاد می‌شود، مطالعه با رعایت اصول اخلاقی در حیوانات آزمایشگاهی تکرار شود. همچنین، با توجه به این که استفاده از اجزاء مختلف چای با ترکیبات شیمیایی مختلف در روند بررسی خواص ضدسرطانی محدودیت ایجاد می‌کند، بنابراین پیشنهاد می‌شود با توجه به نتایج بدست آمده، مطالعات دیگری در مورد بررسی ترکیبات شیمیایی و اثرات تک تک آن‌ها بر روی سلول‌های سرطانی و مدل‌های حیوانی هدف مورد بررسی قرار بگیرد.

تقدیر و تشکر

نتایج موجود حاصل بخشی از پایان نامه مصوب دانشجویی دانشگاه پیام نور تهران شرق می‌باشد که با همکاری صمیمانه اساتید و پرسنل بخش بیوشیمی انسیتو پاستور تهران به ثمر رسیده است.

منابع

1. Aggarwal B.B., Harikumar K.B. 2009. Potential therapeutic effects of curcumin, the anti-inflammatory agent, against neurodegenerative, cardiovascular,

این یافته‌ها بیانگر این مطلب است که فرکشن اتیل استات می‌تواند سلول‌های سرطانی را به سوی آپوپتوز پیش برد و از تکثیر آنها جلوگیری کند. در مطالعه جایابالان و همکاران، در آنالیز جزء اتیل استات از چای سیاه کامبوچا نشان داد که این فرکشن حاوی دی متیل ۲- (۲-هیدروکسی-۲-متیوکسی پروپیلیدن) مالونات و ویتکسین است (۲۶). وجود ویتکسین در چای سیاه گزارش شده است (۷). ویتکسین، یک ترکیب طبیعی مشتق شده از فلاونوئیدها است و به عنوان یک داروی سنتی چینی برای درمان انواع بیماری‌ها مورد استفاده قرار گرفته است (۷). همچنین مشخص شده که خاصیت آنتی اکسیدانی و ضد التهابی ویتکسین، اثرات محافظتی قابل توجهی در برابر ایسکمی میوکارد که موجب آسیب به جریان مجدد خون است، دارد (۲ و ۷). همچنین ثابت شده است که ویتکسین به عنوان مهار کننده رشد سلول‌های سرطانی در انواع سلول‌های سرطانی مانند سرطان سینه، پروستات، تخمدان و مری و همچنین بر سلول‌های سرطانی کوریوکارسینوما دارد و این خاصیت ضد سرطانی آن بواسطه القاء آپوپتوز در این سلول‌های سرطانی می‌باشد (۲ و ۴۲). از سویی اپی‌کاتشین گالات، استرهای گالات شناخته شده‌ای هستند که به راحتی می‌توانند به مولکول‌های کوچکتر تقسیم شوند. کاتچین موجود در منابع طبیعی مانند برگ چای دارای خاصیت آنتی اکسیدانی قوی و ضد سرطانی از طریق القاء آپوپتوز می‌باشد (۴۱ و ۴۹). همچنین کاتچین هیدرات باعث القای آپوپتوزی وابسته به کاسپاز و P53 در سلول‌های سرطانی MCF-7 و HCT116 می‌شود (۲ و ۲۷). پس می‌توان انتظار داشت که مالونات گلوکوزید به دی متیل-۲- (۲-هیدروکسی ۲-۲-متیوکسی پروپیلیدن) مالونات جدا شود و بنابراین دی متیل ۲- (۲-هیدروکسی-۲-متیوکسی پروپیلیدن) مالونات و ویتکسین ممکن است مسئول اثرات سمیت

- Bioactivity of lemon balm kombucha. *Food and Bioprocess Technology*, 5(5): 1756-1765.
10. Chakravorty S., Bhattacharya S., Chatzinotas A., Chakraborty W., Bhattacharya, D., Gachhui R. 2016. Kombucha tea fermentation: Microbial and biochemical dynamics. *International Journal of Food Microbiology*, 220: 63-72.
 11. Choi H.J., Eun J. S., Kim B.G., Kim S. Y., Jeon H., Soh Y. 2006. Vitexin, an HIF-1 α Inhibitor, Has Anti-Metastatic Potential in PC12 Cells. *Molecules and Cells*, 22(3):
 12. De Roos J., De Vuyst L. 2018. Acetic acid bacteria in fermented foods and beverages. *Current opinion in biotechnology*, 49: 115-119.
 13. Dickson M.A., Schwartz, G.K. 2009. Development of cell-cycle inhibitors for cancer therapy. *Current Oncology*, 16(2): 36.
 14. Dufresne C., Farnworth E. 2000. Tea, Kombucha, and health: a review. *Food research international*, 33(6): 409-421.
 15. Elmore S. 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology*, 35(4): 495-516.
 16. Engelhardt U.H., Finger A., Kuhr S. 1993. Determination of flavone C-glycosides in tea. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*, 197(3): 239-244.
 17. Focaccetti C., Bruno A., Magnani E., Bartolini D., Principi E., Dallaglio K., Albini A. 2015. Effects of 5-fluorouracil on morphology, cell cycle, proliferation, apoptosis, autophagy and ROS production in endothelial cells and cardiomyocytes. *PloS one*, 10(2): e0115686.
 18. Frankfurt O.S., Krishan A. 2003. Apoptosis-based drug screening and detection of selective toxicity to cancer cells. *Anti-cancer drugs*, 14(7): 555-561.
 - pulmonary, metabolic, autoimmune and neoplastic diseases. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 41(1): 40-59.
 2. Alshatwi A.A. 2010. Catechin hydrate suppresses MCF-7 proliferation through TP53/Caspase-mediated apoptosis. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 29(1): 1-9.
 3. Anboutaleb A., Soheir S., Abdel Salam N.M. 2017. Antimicrobial and antiproliferative, pro-apoptotic actions of kombucha fermented solution against colon and hepato cancer line. *World Journal of Pharmaceutical and Life Sciences*, 32(3): 120-132
 4. Antoni S., Ferlay J., Soerjomataram I., Znaor A., Jemal A., Bray F. 2017. Bladder cancer incidence and mortality: a global overview and recent trends. *European Urology*, 71(1): 96-108.
 5. Arnold M., Sierra M.S., Laversanne M., Soerjomataram I., Jemal A., Bray F. 2017. Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. *Gut*, 66(4): 683-691.
 6. Benarba B., Pandiella A. 2018. Colorectal cancer and medicinal plants: Principle findings from recent studies. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 107: 408-423.
 7. Bhardwaj M., Paul S., Jakhar R., Kang S.C. 2015. Potential role of vitexin in alleviating heat stress-induced cytotoxicity: Regulatory effect of Hsp90 on ER stress-mediated autophagy. *Life sciences*, 142: 36-48.
 8. Cetojevic-Simin D.D., Bogdanovic G.M., Cvetkovic D.D., Velicanski A.S. 2008. Antiproliferative and antimicrobial activity of traditional Kombucha and Satureja montana L. Kombucha. *J. BUON*, 13(3): 395-401.
 9. Četojević-Simin D.D., Velićanski A.S., Cvetković D.D., Markov S.L., Mrđanović J.Ž., Bogdanović V.V., Šolajić S.V. 2012.

27. Kemp K., Griffiths J., Campbell S., Lovell K. 2013. An exploration of the follow-up needs of patients with inflammatory bowel disease. *Journal of Crohn's and Colitis*, 7(9): e386-e395.
28. Kim C.I., Shin S.S., Park S.S. 2016. Growth inhibition and induction of apoptosis in human bladder cancer cells induced by fermented citrus Kombucha. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, 45(10): 1422-1429.
29. Koosha S., Alshawsh M.A., Looi C. Y., Seyedan A., Mohamed Z. 2016. An association map on the effect of flavonoids on the signaling pathways in colorectal cancer. *International Journal of Medical Sciences*, 13(5): 374.
30. Koosha S., Mohamed Z., Sinniah A., Alshawsh M.A. 2019. Investigation into the Molecular Mechanisms underlying the Anti-proliferative and Anti-tumorigenesis activities of Diosmetin against HCT-116 Human Colorectal Cancer. *Scientific Reports*, 9(1): 1-17.
31. Korir M.W., Wachira F.N., Wanyoko J.K., Ngure R.M., Khalid R. 2014. The fortification of tea with sweeteners and milk and its effect on in vitro antioxidant potential of tea product and glutathione levels in an animal model. *Food Chemistry*, 145: 145-153.
32. Leal J.M., Suárez L.V., Jayabalan R., Oros J.H., Escalante-Aburto A. 2018. A review on health benefits of kombucha nutritional compounds and metabolites. *CyTA-Journal of Food*, 16(1): 390-399.
33. Liang Y.C., Chen Y.C., Lin Y.L., Lin-Shiau S.Y., Ho C.T., Lin J.K. 1999. Suppression of extracellular signals and cell proliferation by the black tea polyphenol, theaflavin-3, 3'-digallate. *Carcinogenesis*, 20(4): 733-736.
34. Mann J. 2002. Natural Products in Cancer Chemotherapy: past, present and future—Nature Reviews. *Cancer*, 2: 145.
19. Fulda S. 2010. Modulation of apoptosis by natural products for cancer therapy. *Planta medica*, 76(11): 1075-1079.
20. Li G., Lou H.X. 2018. Strategies to diversify natural products for drug discovery. *Medicinal Research Reviews*, 38(4): 1255-1294.
21. Gandomani H.S., Yousefi S.M., Aghajani M., Mohammadian-Hafshejani A., Tarazoj A.A., Pouyesh V., Salehiniya H. 2017. Colorectal cancer in the world: incidence, mortality and risk factors. *Biomedical Research and Therapy*, 4(10): 1656-1675.
22. Honardoost M., Soleimanjahi H., Rajaei F. 2013. Apoptosis: programmed cell death. *Journal of Qazvin University of Medical Sciences*, 17(3): 48-57.
23. Huang X.M., Yang Z.J., Xie Q., Zhang Z.K., Zhang H., Ma J.Y. 2019. Natural products for treating colorectal cancer: A mechanistic review. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 117:109-142.
24. Huh S.W., Bae S.M., Kim Y.W., Lee J.M., Namkoong S.E., Lee I.P., Ahn W.S. 2004. Anticancer effects of (-)-epigallocatechin-3-gallate on ovarian carcinoma cell lines. *Gynecologic oncology*, 94(3): 760-768.
25. Jayabalan R., Malbaša R.V., Lončar E.S., Vitas J.S., Sathishkumar M. 2014. A review on kombucha tea-microbiology, composition, fermentation, beneficial effects, toxicity, and tea fungus. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(4): 538-550.
26. Jayabalan R., Chen P. N., Hsieh Y.S., Prabhakaran K., Pitchai P., Marimuthu S., Yun S.E. 2011. Effect of solvent fractions of kombucha tea on viability and invasiveness of cancer cells—characterization of dimethyl 2-(2-hydroxy-2-methoxypropylidene) malonate and vitexin. *Indian Journal of Biotechnology*, 10(1): 75-82.

- Gramont A. 2012. Adjuvant therapy with fluorouracil and oxaliplatin in stage II and elderly patients (between ages 70 and 75 years) with colon cancer: subgroup analyses of the Multicenter International Study of Oxaliplatin, Fluorouracil, and Leucovorin in the Adjuvant Treatment of Colon Cancer trial. *Journal of Clinical Oncology*, 30(27): 3353-3360.
44. Troiani T., Martinelli E., Napolitano S., Vitagliano D., Ciuffreda L.P., Costantino S., De Palma R. 2013. Increased TGF- α as a mechanism of acquired resistance to the anti-EGFR inhibitor cetuximab through EGFR-MET interaction and activation of MET signaling in colon cancer cells. *Clinical Cancer Research*, 19(24): 6751-6765.
45. Vermeulen K., Van Bockstaele D.R., Berneman Z.N. 2005. Apoptosis: mechanisms and relevance in cancer. *Annals of hematology*, 84(10): 627-639.
46. Vîna I., Semjonovs P., Linde R., Deniņa I. 2014. Current evidence on physiological activity and expected health effects of kombucha fermented beverage. *Journal of Medicinal Food*, 17(2): 179-188.
47. Watson, A.J. M. 2004. Apoptosis and colorectal cancer. *Gut*, 53(11): 1701-1709.
48. Yang G.Y., Liao J., Li C., Chung J., Yurkow E.J., Ho C.T., Yang C.S. 2000. Effect of black and green tea polyphenols on c-jun phosphorylation and H₂O₂ production in transformed and non-transformed human bronchial cell lines: possible mechanisms of cell growth inhibition and apoptosis induction. *Carcinogenesis*, 21(11): 2035-2039.
49. Yang Z.W., Ji B.P., Zhou F., Li B., Luo Y., Yang L., Li T. 2009. Hypocholesterolaemic and antioxidant effects of kombucha tea in high-cholesterol fed mice. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89(1): 150-156.
35. Meadows G.G. 2012. Diet, nutrients, phytochemicals, and cancer metastasis suppressor genes. *Cancer and Metastasis Reviews*, 31(3-4): 441-454.
36. Newman D.J., Cragg G.M. 2012. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *Journal of natural products*, 75(3): 311-335.
37. Palozza P., Serini S., Maggiano N., Angelini M., Boninsegna A., Di Nicuolo F., Calviello G. 2002. Induction of cell cycle arrest and apoptosis in human colon adenocarcinoma cell lines by β -carotene through down-regulation of cyclin A and Bcl-2 family proteins. *Carcinogenesis*, 23(1): 11-18.
38. Paterson I., Anderson E.A. 2005. The renaissance of natural products as drug candidates. *Science*, 310(5747): 451-453.
39. Sreeramulu G., Zhu Y., Knol W. 2000. Kombucha fermentation and its antimicrobial activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(6): 2589-2594.
40. Srihari T., Arunkumar R., Arunakaran J., Satyanarayana U. 2013. Downregulation of signalling molecules involved in angiogenesis of prostate cancer cell line (PC-3) by kombucha (lyophilized). *Biomedicine and Preventive Nutrition*, 3(1): 53-58.
41. Tan W., Lu J., Huang M., Li Y., Chen M., Wu G., Guo J. 2011. Anti-cancer natural products isolated from chinese medicinal herbs. *Chinese Medicine*, 6(1):27.
42. Tan Z., Zhang Y., Deng J., Zeng G., Zhang Y. 2012. Purified vitexin compound 1 suppresses tumor growth and induces cell apoptosis in a mouse model of human choriocarcinoma. *International Journal of Gynecologic Cancer*, 22(3): 360-366.
43. Tournigand C., André T., Bonnetain F., Chibaudel B., Lledo G., Hickish T., De