Archive of SID

بررسی اثرات عصاره هیدروالکلی جلبک *Sargassum ciliforium* بر رده سلولی سرطان کولون HT-29 و ارزیابی بیان ژنهای P_{53} و APC با روش Real time PCR

ارمغان زاهدی[۱]، طاهره ناجی[۲]* و رحیم احمدی[۳]

[۱] تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم دارویی، ،دانشکده علوم و فناوری های نوین، گروه سلولی و مولکولی

[۲] تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم دارویی، دانشکده داروسازی، گروه علوم پایه

[۳] همدان، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد همدان، گروه فیزیولوژی

تاریخ دریافت: ۹۶/۹/۱۹ تاریخ پذیرش: ۹۶/۱۱/۲۷

چکیده

سرطان روده بزرگ سومین سرطان شایع در جهان است که با نزدیک به ۱/۴ میلیون مورد جدید در ۲۰۱۲ تشخیص داده شده است. با توجه به افزایش بروز سرطان استفاده از مولکولهای جدید شیمی درمانی مورد نیاز است. بسیاری از مطالعات و تحقیقات نشان داده که سرطان روده می تواند از طریق محصولات دریایی طبیعی که دارای مقادیر بسیاری از مواد فعال بیولوژیکی با ساختارهای شیمیایی جدید و فعالیتهای دارویی جدید هستند درمان شود. هدف از این مطالعه بررسی اثرات عصاره هیدروالکلی جلبک *Sargassum ciliforium* بررده سلولی سرطان کولون HT-29 و ارزیابی بیان ژنهای P_{53} و APC با روش Real time PCR می باشد. در این پژوهش تعیین سایتوتوکسیسیته عصاره جلبک *Sargassum ciliforium* با روش MTT در۵ غلظت مختلف۱۰,۱,۰/۱,۰/۰۱,۰/۰۰۱میلی گرم بر میلی لیتر و یک گروه کنترل بر روی رده های سلولی سرطان کولون HT-29 و رده سلولی نرمال کلیه جنین انسان HEK مورد بررسی قرار گرفت. آنالیز داده ها با استفاده از نرم افزار SPSS و آزمون آماری One way ANOVA انجام شد. همچنین بیان ژنهای P_{53} و APC به روش Real time PCR ارزیابی شد. یافته ها نشان داد که عصاره جلبک *Sargassum ciliforium* در کاهش زیستایی رده سلولی سرطان روده در انسان HT_{29} وممانعت از رشد سلولهای توموری تأثیر دارد و می توان از عصاره این جلبک جهت توسعه داروهای ضد سرطانی استفاده نمود و مشخص شد که مرگ سلولی القاء شده با عصاره جلبک *Sargassum ciliforium* از طریق فعال سازی پروتئین APC می باشد.

واژه های کلیدی: سرطان روده بزرگ، رده سلولی HT-29،جلبک *Sargassum ciliforium* ، ژن APC و P_{53} ، Real time PCR

* نویسنده مسئول، تلفن:۰۹۱۲۳۷۰۴۶۷۶ ، پست الکترونیکی: tnaji2002@gmail.com

مقدمه

امروزه با توجه به افزایش بروز سرطان در کشورهای در حال توسعه و توسعه یافته استفاده از مولکولهای جدید شیمی درمانی مورد نیاز است (۷). به کارگیری عوامل طبیعی و مصنوعی برای جلوگیری یا متوقف کردن پیشرفت سرطانهای مهاجم اخیراً به عنوان یک رویکرد با پتانسیل عظیم شناخته شده است(۴). طی دهه گذشته عوامل جدید شامل محصولات دریایی طبیعی که دارای مقادیر بسیاری مواد مؤثر بیولوژیکی هستند، موجب ایمنی و بهبود و زنده ماندن بیماران با سرطان کلورکتال شده است(۸و۱۷). مهار آپاپتوز در سلولهای سرطان روده بزرگ باعث افزایش رشد تومور ترویج نئوپلاستیک و مقاومت به عوامل ضد سرطان سیتوتوکسیک می شود. بنابراین

www.SID.ir

Archive of SID

ترکیبات فعال زیستی که باعث القای آپاپتوز در سلولهای سرطانی می شود می تواند به عنوان یک عامل درمانی مؤثر مطرح شود (۱۵). مطالعات مختلف از جلبک سارگاسوم نشان داده است که مواد بیواکتیو موجود در جلبک دارای خاصیت سیتوتوکسیک و آنتی اکسیدان است. مطالعات فراوان روی جلبک قهوه ای نشان می دهد که گلیکوپروتئین موجود در سارگاسوم دارای اثرات ضدسرطانی روی سلولهای سرطانی در کولون انسان است (۱۳ و ۱۴). با توجه به اینکه سرطان کلورکتال یکی از سرطانهای شایع در کشورهای در حال توسعه و توسعه یافته است و از طرفی تأثیرات بالقوه جلبک سارگاسوم در گونه های متعدد در بهبود و اثربخشی انواع سرطان به اثبات رسیده است. است این طرح پژوهشی با هدف بررسی اثرات عصاره جلبک *Sargassum ciliforium* در رده سلولی HT-29 در سرطان کولورکتال با روش MTT و ارزیابی بیان ژنهای P_{53} و APC با روش Real time PCRانجام شد.

مواد و روشها

جمع آوری جلبک و تهیه عصاره: جلبک *Sargassum ciliforium* از مناطق جنوب ایران بندر لنگه جمع آوری شد. بعد شستن جلبک ،به مدت ۲ هفته در دمای اتاق خشک شد و پس از تمیز کردن پودر ریز به دست آمده با میزان ۳۰۰ میلی لیتر آب دیونیزه ترکیب شد و سوسپانسیون به دست آمده را به مدت ۳ ساعت جوشانده و سپس سوسپانسیون با عبور از کاغذ صافی فیلتر شد و عصاره فیلتر شده هیدروالکلی لیوفیلیزه شد و به صورت پودر درآمد. پودر به دست آمده تا زمان استفاده در یخچال نگهداری شد.

تهیه و کشت رده سلولی HT-29: رده سلولی سرطان کولون HT-29 و رده سلولی نرمال کلیه جنین انسان HEK از انستیتو پاستور ایران خریداری شد. رده سلولی HT-29 در محیط کشت DMEM به همراه سرم ۱۰ درصد FBS قرارداده شد و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر پنی سیلین و استرپتومایسین به محیط کشت اضافه شد و رده های سلولی در ۳۷ درجه سانتی گراد در داخل انکوباتور حاوی ۵ درصد CO_2 و ۱۰۰ درصد رطوبت کشت داده شد.

تهیه دارو(عصاره جلبک *Sargassum ciliforium*): ابتدا ۰/۱ گرم یا ۱۰۰ میلی گرم از دارو وزن شد سپس ۱ml از PBS برداشته و به ۰/۱ گرم از پودر لیوفیلیزه از جلبک *Sargassum ciliforium* اضافه گردید و پس از ورتکس ۹ml محیط با PBS به حجم ۱۰ml رسانده شد سپس با فیلتر سر سرنگی۰/۲ میکرون همان روز عصاره فیلتر شد و کاملاً خالص و یکنواخت گردید. عصاره تهیه شده تا زمان استفاده در فریزر نگهداری شد.

ارزیابی توکسیسیته عصاره به روش MTT: تعیین سایتوتوکسیسیته عصاره با روش MTT انجام شد در این روش غلظتهای ۱۰،۱، ۰/۱، ۰/۰۱، ۰/۰۰۱ میلی گرم بر میلی لیتر از عصاره تهیه شد و هریک از غلظتها به عنوان گروههای مستقل به هر چاهک از پلیت ۹۶ خانه ای از سلولهای HT-29 و HEK اضافه شد و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور۵ درصد CO_2 و با رطوبت ۱۰۰ درصد انکوبه شد. سپس محیط کشت رویی را خالی کرده و رنگ MTT اضافه و پلیتها با فویل آلومینیومی پیچیده و به مدت ۴ ساعت در انکوباتور انکوبه گردید. در مرحله بعد رنگ MTT را خالی و به هر چاهک DMSO اضافه کرده و به مدت ۲۰دقیقه در Shaker قرار داده شد تا کاملاً یکنواخت شود و سپس جذب نوری هر چاهک در طول موج ۵۷۰ نانومتر مشخص شد.

انجام Real time PCR برای رده سلولی HT_{29} در سه روز متوالی: فلاسک حاوی محیط کشت و سلولهای HT_{29} از انکوباتور خارج و تریپسینه شد و پس از افزودن محیط کشت سانتریفیوژ به مدت ۵ دقیقه در ۱۰۰۰دور انجام شد. سپس به دو خانه از پلیت ۶ خانه ای به هر خانه ۹۰۰λ محیط حاوی سلولهای HT_{29} و FBS۱۰۰λ اضافه شد و ۲۴

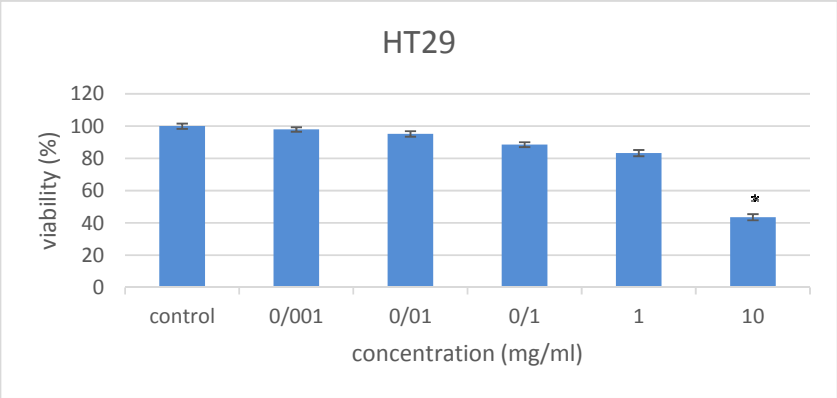
www.SID.ir

Archive of SID

ساعت در انکوباتور قرار داده شد. پلیت ۶ خانه از انکوباتور خارج و محیط رویی تخلیه و PBS اضافه و تریپسینه گردید. محتویات خانه ها به ۲ میکروتیوب منتقل و به مدت ۵ دقیقه در ۱۵۰۰ دور سانتریفیوژ انجام شد. سپس ۳۰۰λ بافر شستشو و ۳۰۰λ اتانول افزوده و پیپتاژ شد. پس از سانتریفیوژ مواد داخل ۲میکروتیوب به ستون چرخشی منتقل شد. و ۳۰ ثانیه سانتریفیوژدر ۱۲۰۰۰دور انجام شد. به ازای هر ستون چرخشی ۱۰λ Dnase و ۷۰λ بافر واکنش اضافه گردید و مخلوط شد. به هر ستون چرخشی ۵۰۰λ بافر پاک کننده اضافه شد و انکوباسیون و سانتریفیوژ انجام گردید. سپس ۵۰۰λ بافر شستشو اضافه و ۳۰ثانیه در ۱۲۰۰۰دور سانتریفیوژ انجام شد. آب Rnase free افزوده و سانتریفیوژ انجام شد. محتویات به میکروتیوب PCR منتقل و به هر کدام ۸λ از RNA دارای پرایمر به اضافه ۱λ الیگو اضافه شد و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۶۵ درجه در دستگاه PCR قرار داده شد. و بعد از دستگاه خارج کرده و ۲ دقیقه میکروتیوبها را در یخ گذاشته و بعد ۱۰λ Reaction به هر کدام اضافه شد و بعد در ۲ دما داخل دستگاه ترموسایکلر گذاشته شد. دمای ۴۲ درجه به مدت ۳۰ دقیقه و دیگری در دمای ۸۵ درجه به مدت ۵ دقیقه. پس از انجام این مراحل میکروتیوبها داخل دستگاه Real time PCR قرارداده شد. در این پژوهش واکنش Real time PCR در حجم نهایی ۲۰λ انجام شد و دوبار تکرار گردید، غلظت پرایمر ها ۱۵۰نانومولار بود. نتایج حاصل از نحوه بیان ژنها و آنالیز بیان ژن به روش نیمه کمی با فرمول ΔΔCT و با نرم افزار دستگاه RealTime PCR ABI انجام شد.

نتایج

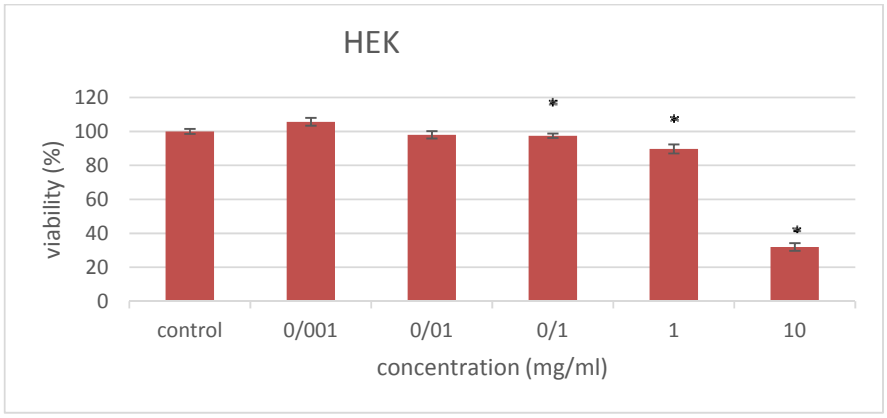
تجزیه و تحلیل داده ها با استفاده از نرم افزار SPSS و آزمون آماری One way ANOVA انجام شد. تفاوت کمیتها در سطح $P<0.05$ بررسی شد. علامت *در نمودار معنادارترین تفاوت را نسبت به گروه کنترل نشان می دهد. عصاره جلبک در رده سلولی HT-29 در غلظت ۱۰میلی گرم برمیلی لیتر و در رده سلولی HEK در غلظت ۱۰،۱، ۰/۱میلی گرم بر میلی لیتر توکسیک بود. منحنی تکثیر که نشان دهنده انجام واکنش است و منحنی ذوب که نشان دهنده تکثیر یک محصول منفرد است توسط دستگاه Real time PCR ترسیم گردید. در این پژوهش تعیین کمی بیان ژن با فرمول $2^{-\Delta\Delta CT}$ محاسبه شد.طبق محاسبه ژن APC نسبت به کنترل افزایش بیان داشته و ژن P_{53} نسبت به کنترل کاهش بیان داشته است.



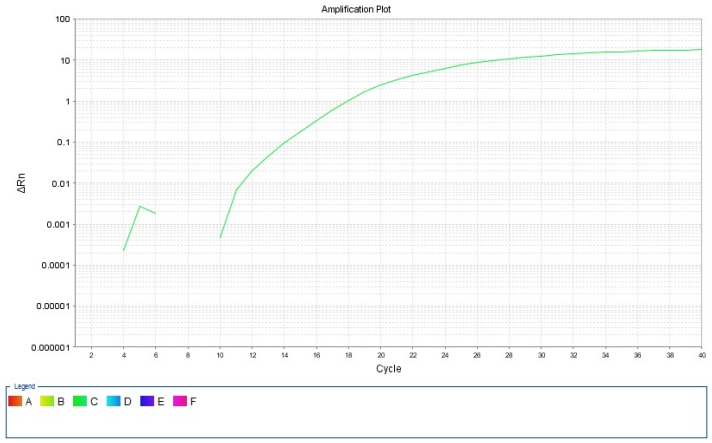
نمودار۱- درصد زیستایی رده سلولی HT-29 تیمار شده با عصاره جلبک *Sargassum ciliforium*

www.SID.ir

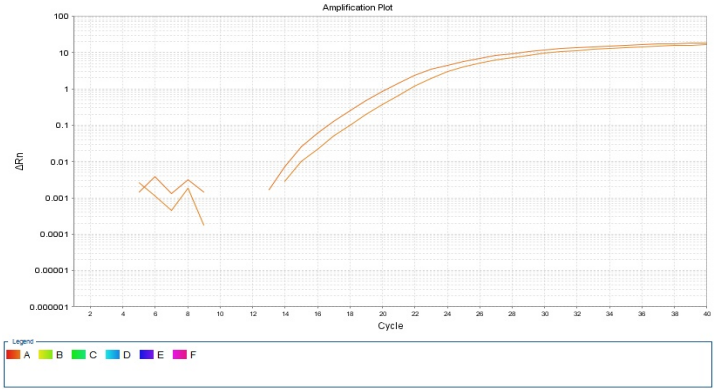
Archive of SID



نمودار۲- درصد زیستایی رده سلولی HEK تیمار شده با عصاره جلبک *Sargassum ciliforium*



نمودار۳- منحنی تکثیر ژن P_{53}



نمودار۴- منحنی تکثیر ژن APC

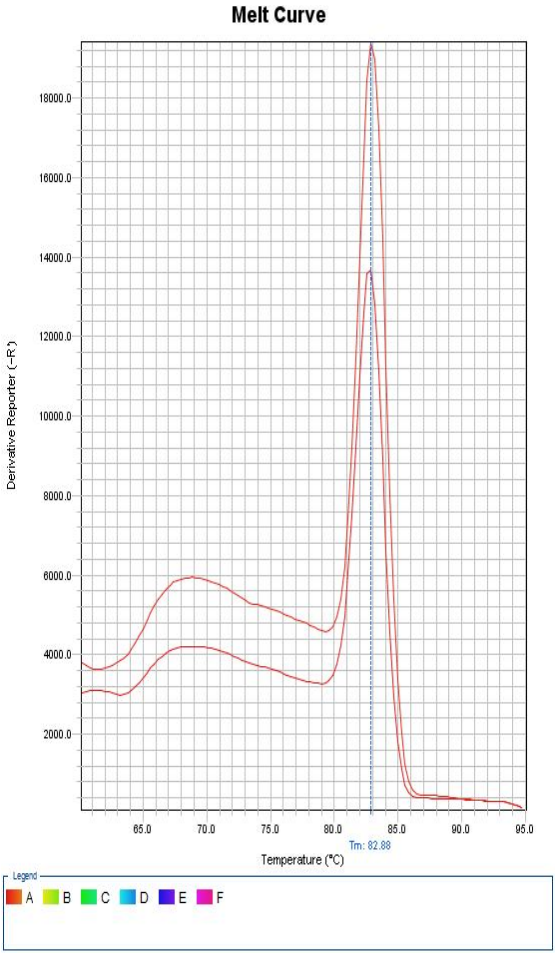
بحث

امروزه سرطان به یک بیماری همه گیر در جهان تبدیل شده است.دانشمندان در تلاش هستند تا با استفاده از روشهای متفاوت شیمی درمانی، اشعه درمانی و جراحی حال عمومی بیماران مبتلا به سرطان را ارتقاء بخشند(۶)، ولی باوجود توسعه در مداخلات درمانی، افزایش تأثیر پذیری شیمی درمانی و کاهش اثرات منفی ناشی از آن میزان مرگ و میر بیماران مبتلا به سرطان روده بزرگ

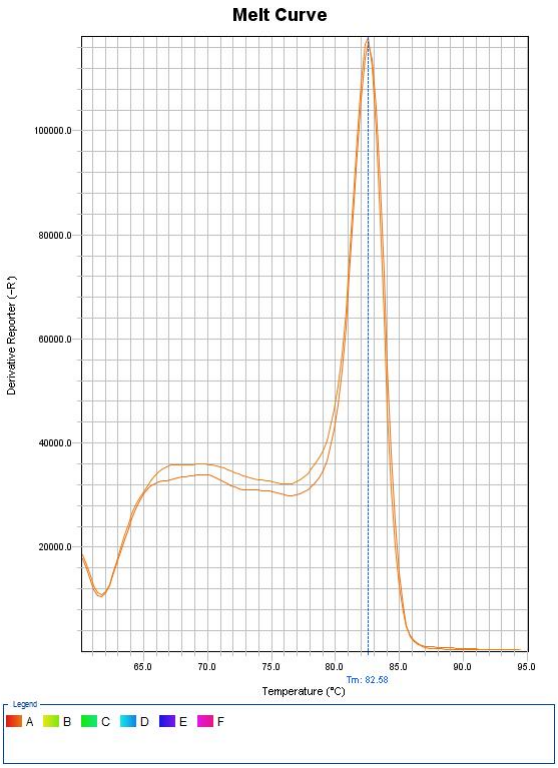
www.SID.ir

Archive of SID

همچنان بالاست(۱۲). با توجه به افزایش بروز سرطان در کشور های در حال توسعه و توسعه یافته استفاده از مواد و عصاره های گرفته شده از طبیعت به منظور القای مرگ سلولی (آپاپتوز) در سلولهای سرطانی یکی از رایج ترین راهکارهای درمانی است(۳و۱۲).

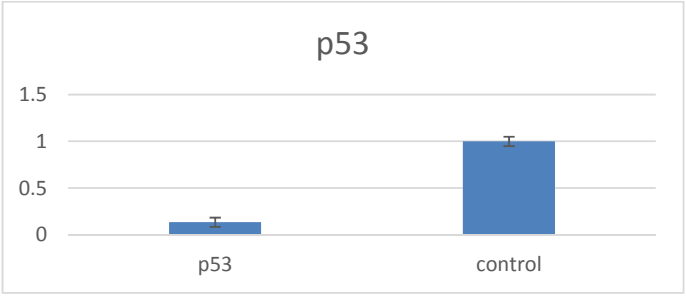


نمودار۵- منحنی ذوب ژن APC



نمودار۶- منحنی ذوب ژن P_{53}

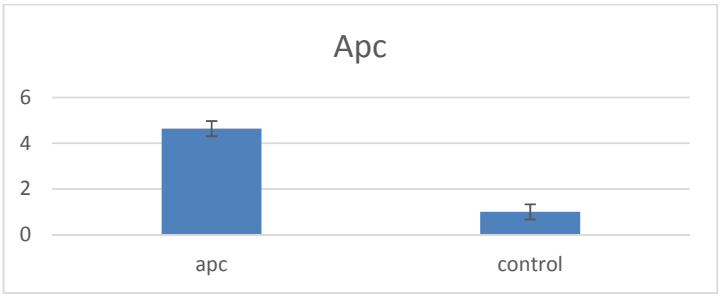
در این مطالعه اثر عصاره هیدروالکلی جلبک *Sargassum ciliforium* درروده سلولی سرطان کولون HT-29 مورد بررسی قرار گرفت. همچنین ارزیابی بیان ژنهای APC و P_{53} با روش Real time PCR انجام شد. پیشرفتهای آینده در شاخص درمانی به افزایش حساسیت سلولهای توموری به داروهای شیمی درمانی و پرتودرمانی و کاهش اثرات مخرب آنها در بافتهای طبیعی بستگی دارد.



نمودار۷- بیان ژن P_{53}

www.SID.ir

Archive of SID



نمودار۸- بیان ژن APC

از این رو استفاده از ترکیبات آنتی اکسیدانی با سمیت نسبتاً امن به همراه حساس کردن سلولها برای درمان بالقوه و مؤثر می باشد(۲). در سالهای اخیر پیشرفتهای قابل ملاحظه ای در تأثیر مواد فعال زیستی در کاهش خطر ابتلاء به سرطان صورت گرفته است که این ترکیبات از نظر شیمیایی و عملکرد زیستی دارای تنوع می باشند(۱۹). در این پژوهش از عصاره جلبک *Sargassum ciliforium* برای تیمار سلولهای سرطان روده بزرگ HT_{-29} و بررسی زیستایی آنها استفاده شده است. یکی از جهشهای شایع که در سرطان روده بزرگ غیر فعال می شود غیر فعال شدن ژن APC است و هنگامی که APC جهش نداشته باشد اغلب فعال شدن جهشها در بتا کتنین اتفاق می افتد(۱۰). جهش در APC یا بتا کتنین باید توسط جهشهای دیگر ادامه یابد تا به سمت سرطانی شدن پیش رود. با این حال حاملین جهشهای غیر فعال شدن APC خطر ابتلاء به سرطان روده بزرگ با سن حدود سال ۴۰ تقریباً ۱۰۰درصد است (۱۶). بسیاری از جهشهایی که در ژن APC ایجاد می شود باعث تولید یک پروتئین APC کوتاه، غیرطبیعی و فاقد عملکرد می شود. این پروتئین کوتاه نمی تواند از رشد بیش از حد سلولی جلوگیری کند در نتیجه منجر به تشکیل پولیپ می شود که می تواند سرطانی شود. پروتئین APC به طور معمول با کمک گلیگوژن سنتاز کیناز ۳ آلفا یا بتا (GSK-3)و از طریق تعامل با ۲۰ اسیدآمینه و تکرارهای SAMP یک کمپلکس تخریب ایجاد می کند که این مجموعه پس از ساخت قادر به اتصال به بتا کتنینها در سیتوپلاسم است. با کمک کازئین کیناز۱(CK_1) که حامل فسفوریلاسیون اولیه بتا کتنین وگلیکوژن سنتاز کیناز ۳ بتا توانایی فسفوریلاسیون بتا کتنین برای بار دوم را دارد. این اهداف بتا کتنین برای یوبی کوئیتیناسیون و تخریب به وسیله پروتئازومهای سلولی است. و این مهار کننده ها برای جا به جایی به داخل هسته به عنوان فاکتورهای رونویسی برای تکثیر ژن عمل می کنند. APC همچنین از طریق اتصال به دومین PD2 در اثبات میکروتوبول ها نقش دارد. غیر فعال شدن APC می تواند پس از واکنشهای زنجیره ای خاص در سیتوپلاسم آغاز شود (۲۰). جهش در APC اغلب در اوایل سرطانها مثل سرطان روده بزرگ رخ می دهد (۱۸).جهش در APC منجر به از دست دادن تنظیم بتا کتنین و مهاجرت سلول تغییر یافته و بی ثباتی کروموزوم می شود.حدود ۸۰ درصد سرطانهای روده بزرگ در انسان در اثر جهش ژن APC می باشد. P_{53} به عنوان نگهبان ژنوم در حفظ ثبات ژنوم از طریق جلوگیری از جهش ژنوم نقش دارد.(۱۱). ژن TP_{53} اغلب یک ژن جهش یافته است که در حدود ۵۰ درصد از سرطانهای انسانی نقش دارد و این نشان می دهد ژن TP_{53} نقش مهمی در جلوگیری از تشکیل سرطان دارد. پروتئینهایی که توسط TP_{53} کد می شوند به DNA متصل شده و در تنظیم بیان ژن برای جلوگیری از جهش ژنوم نقش دارند (۹). در سلولهای عادی P_{53} توسط تنظیم کننده منفی آن MDM_2 می شود. پس از آسیب DNA و یا تنشهای دیگر مسیرهای مختلف به تفکیک P_{53} و کمپلکس MDM_2 منجر می شود. هنگامی که P_{53} فعال می شود باعث توقف چرخه سلولی شده و اجازه می دهد از طریق تعمیر بقای سلول یا آپاپتوز

www.SID.ir

Archive of SID

القاء شود. چگونه P_{53} این مسیر را انتخاب می کند ناشناخته است. P_{53} فعال شده و به DNA متصل می شود و بیان چندین ژن از جمله Micro RNA/Mir-340/C_1P_1/WAF_1 کد گذاری می شوند. P_{21}(WAF_1) به کمپلکس G_1(CDK_1-CDK_2-CDK_6-CDK_4) متصل می شود. مولکولهای مهم برای انتقال و جا به جایی G_1 به S در چرخه فعالیت آنها را مهار می کند. وقتی P_{21}(WAF) با کمپلکس CDK_2 همکاری می کند، P_{53} جهش یافته برای مدت طولانی به DNA متصل نمی شود در نتیجه پروتئین P_{21} در دسترس نخواهد بود و نمی تواند به عنوان یک سیگنال توقف برای تقسیم سلولی عمل کند (۱). P_{53} در پاسخ به هزاران عامل استرس زا از جمله آسیب به DNA ناشی از UV یا عوامل شیمیایی مانند پراکسیدهیدروژن، استرس اکسیداتیو، شوک اسمزی، کاهش ریبونوکلئوتید و نامنظم بودن بیان انکوژن فعال می شود. پروتئینهای P_{53} جهش یافته اغلب باعث القای MDM_2 شده و باعث تجمع P_{53} در سطح بسیار بالایی می شود. علاوه بر این پروتئین P_{53} جهش یافته باعث مهار سطح پروتئین P_{53} می شود در برخی موارد جهشهای بی معنی در P_{53} باعث مختل شدن ثبات و عملکرد P_{53} می شود (۵و۲۱). در این مطالعه اثرات عصاره هیدروالکلی جلبک *Sargassum ciliforium* بر سلولهای سرطانی روده بزرگ رده HT-$_{29}$ برای اولین بار مورد بررسی قرار گرفت و در مجموع نتایج حاصل از این آزمایش تأیید می کند که عصاره این جلبک دارای فعالیت توکسیک و قابلیت مهار رشد در سلولهای سرطانی روده بزرگ رده HT-$_{29}$ می باشد. بررسی مولکولی و ارزیابی بیان ژنهای APC و P_{53} به روش Real time PCR نشان داد که مرگ سلولی القاء شده با عصاره جلبک *Sargassum ciliforium* از طریق فعال سازی پروتئین APC و افزایش بیان ژن APC که یک ژن سرکوبگر تومور به ویژه در سرطان روده می باشد.

منابع

1- Arnold, J.,David, P.(2010).The P_{53} family:a subject collection from cold spring Harbor perspectives in biology laboratory press.Molecular cancer,126:273-84.

2-Bedi, A., et al.(1995).Inhibition of apoptosis during development of colorectal cancer.Cancer Res,55:1181-1816.

3-Chan, E.W., et al.(2009).Effect of diffrent during methods on the antioxidant properties of leaves and tea of ginger species food chemistry.Biomed Res,113:166-172.

4-Ferlay, J., et al.(2013).Cancer incidence and mortality worldwide Globo CAN,IARC Cancer Base.International Agency for Research on cancer,10:48-62.

5-Hean, B.,et al.(2008). National center for Biotechnology information.united stated National institute of Health,The P_{53} tumor suppressor protein,56:93-98.

6- Hooshmand, K. , Asoodeh, A.(2016). The influence of GL-9 peptide on A549 and human and animal blood cells,Iranian J.Bio,29(4):463-473.

7-Joo, W.,Visintin, I.,Mor, G.(2013). Targeted cancer therapy Are the days of systemic chemotherapy numbered?. Biomed Res,76:308-314.

8-Kim, E.,Park, S.,Lee, J.,Park, J.(2010). Fucoidan present in brown olgae induces apoptosis of human colon cancer cells.BMC Gastroenterol,10:96-99.

9-kead, AP.,Strachan, T.(1999).Human molecular genetics 2,New York.Wiley cancer Genetics, 38:33-40.

10- lim, S., et al.(2008).Evaluation of antioxidant activity of extract from brown seaweed Sargassum siliqastrum,j.Agrictood chem,50:3862-3860.

11- Mind, DP.,Anvarian, Z.,Rudiger, SG.,Maurice, MM.(2011).Messing up disorder: How do missense mutations in the tumor suppressor APC lead to cancer?.Molecular cancer,10:47-59.

12-Michael, E., et al.(2014).Colorectal cancer aguid for journalistan colorectal treatment.Biomed Res,4:22-27.

13-Mann, J.R.,Backlund, M.G.,Dubois, R.N.(2005).Mechanism of disease In

www.SID.ir

Archive of SID

flammatory mediators and cancer prevention.Natclin practoncol,2:202-210.

14-Namvar, F.,Mahamad, R.,Baharara, J.,Balnejah, S.Z.,Fargahi, f.,Rahman, H.S.(2013). Antioxidant antiproliferative and antiangiogenesis effects of polyphenol rich seaweed (*Sargassum muticum*). Biomed Res, 604-787.

15-Pereira, D.M.,[at al].(2011).Anti proliferative activity of meroditerpenoids isolated from the brown alga stypopodium flabelliforme against several cancer cell Mar Drugs,9:852-862.

16- Smit, A.j.(2004). Medicinal and pharmaceutical uses of the seaweed natural products. Areview. J.Applphycol,16:245-262.

17-Siegel, R.,Naishadham, D.,Jemal, A.(2012).Cancer statistics.CA cancer J clin,62:10-29.

18- Stamos, JL.,Weis, WL.(2013).The β-catenin destruction complex.Cold spring Harbor perspective sin Biology,5:78-98.

19-Rodriquez, R.,Vivas, J.,Ming, B.(2012).The invasive seaweed Sargassum filcilum is on the move aling the nexican pacific coastline.Europpubmed central,55:5-17.

20- Yamamoto, N.,Fujihara, M.(1997).Anticancer effect of seaweed fraction and partical characterication of the polysacaccharide with Antitumor activity from Sargassum fulvellum.bspn EXPMED, 47:23-26.

21- Yuan, J.,Luo, K.,Zhang, L.,Cheville, JC.,Lou, Z.(2010). Usp10 regulates P_{53} localization and stability by deubiquitination P_{53} Cell,140:384-96.

www.SID.ir

Archive of SID

The Effect of Hydroalcholic extract *Sargassum ciliforium* on HT-29 colorectal cancer cell line and evaluation P_{53} and APC genes expression By using Real time PCR Technique

Zahedi A[1], Naji T[2] and Ahmadi R[3]

[1] Dept. of Molecular and Cellular Sciences , Faculty of Advanced Sciences & Technology, Pharmaceutical Sciences Branch, Islamic Azad University, Tehran , I.R. of Iran.

[2] Dept. of Basic Sciences, Faculty of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University,Tehran, I.R. of Iran.

[3] Dept. of Physiology, Islamic Azad University, Hamedan, I.R. of Iran.

Abstract

Colon cancer is the third most common cancer in the world, with nearly 1.4 million new cases diagnosed in 2012.In addition ,the incidence of this disease has increased in recent years.Due to the increased incidence of cancer, the use of new chemotherapy molecules is required. Many studies have shown that intestinal cancers can be treated through natural marine products that contain a large amount of active biological substances with new chemical structures and new drug activities. The aim of this study was the effect of hydroalcoholic extract *Sargassum ciliforium* on HT-$_{29}$ colorectal cell line and evaluation P_{53} and APC genes expression by using Real time PCR Technique . In this study , we determined *Sargassum ciliforium* extract with the MTT assay at 5 different concentrations 10-1-0.1-0.01-0.001mg/ml and control group on HT-$_{29}$ colorectal cancer cell line human embryonic kidney HEK were examined. Then optical density each well at wavelength 570nm it was found. Data analysis with spss software and One way Anova statistical test checked out. Also evaluation P_{53} and APC genes expression by using Real time PCR Technique. Our result showed that extract *Sargassum ciliforium* the effect reducation on viability in human colon cancer cell line HT-$_{29}$ and also prevent the growth of tumor cells.Results showed the extract *Sargassum ciliforium* had toxic effects in colon cancer cell line HT-$_{29}$ and this algae extract could be used to develope anti-cancer drugs and it was shown that induced cell death with *Sargassum ciliforium*

Algae extract through is the activation of APC protein.

Key words: Colon cancer,HT-$_{29}$ cell line,*Sargassum ciliforium* algae,Real time PCR,P_{53} and APC genes

www.SID.ir