

Evaluation of the Anticancer Effects of Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE) in Combination with 5-FU through the Modulation of Apoptosis-Related Gene Expression in the Colorectal Cancer Cell Line SW-742.

Mohammad Shokrzadeh ^{1,2}
 Ramin Ataee ^{3,2},
 Shaghayegh Aghajanshakeri ⁴,
 Amirhossein Salmanmahiny ⁵

¹ Professor, Department of Toxicology and Pharmacology, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences Sari, Iran

² Pharmaceutical Sciences Research Center, Hemoglobinopathy Institute, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

³ Associate Professor, Medicinal Plants Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁴ PhD in Toxicology, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁵ Pharmacy Student, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received December 28, 2024; Accepted March 12, 2025)

Abstract

Background and purpose: 5-Fluorouracil (5-FU) is a commonly used chemotherapy drug for colorectal cancer; however, resistance to it has highlighted the need for new treatment strategies. This study aimed to evaluate the effects of Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE) in combination with 5-FU by assessing the expression of apoptotic (BAX, Bcl-2) and inflammatory genes (NF-κB) in human colorectal cancer cells (SW-742).

Materials and methods: In this experimental study, SW-742 cells were exposed to varying concentrations of 5-FU (1.56, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, and 100 μM) and CAPE (1, 5, 10, 20, 50, 100, and 200 μM) for 24 and 48 hours. Mixtures of the two compounds were also tested. Cell viability and IC₅₀ were assessed. **Materials and Methods:** In this experimental study, SW-742 cells were exposed to varying concentrations of 5-FU (1.56, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, and 100 μM) and CAPE (1, 5, 10, 20, 50, 100, and 200 μM) for 24 and 48 hours. Mixtures of the two compounds were also tested. Cell viability and IC₅₀ were assessed using MTT assay. RT-PCR was employed to measure changes in the expression of apoptotic and inflammatory genes. Data were analyzed using Compusyn software and Prism Ver. 3 with one-way ANOVA.

Results: After 48 hours, a dose-dependent reduction in SW-742 cell viability was observed with combinations of 5-FU and CAPE. The Compusyn software analysis revealed a strong synergistic relationship between 5-FU and CAPE in the mixtures of 6.25 μM 5-FU (IC₃₀) + 10 μM CAPE (IC₁₀) and 6.25 μM 5-FU (IC₃₀) + 20 μM CAPE. RT-PCR analysis showed that the combination of 6.25 μM 5-FU (IC₃₀) + 10 μM CAPE (IC₁₀) significantly increased BAX expression ($P < 0.001$) compared to both 6.25 μM 5-FU (IC₃₀) alone ($P < 0.001$) and 10 μM CAPE (IC₁₀) alone ($P < 0.001$). In contrast, Bcl-2 expression was significantly reduced ($P < 0.05$) compared to 10 μM CAPE (IC₁₀) alone. Moreover, NF-κB expression was significantly lower in the combination treatment compared to both 6.25 μM 5-FU (IC₃₀) alone ($P < 0.01$) and 10 μM CAPE (IC₁₀) alone ($P < 0.01$).

Conclusion: This study demonstrated that 5-FU and CAPE act synergistically to reduce SW-742 colorectal cancer cell viability by modulating the expression of BAX, Bcl-2, and NF-κB. Given its antioxidant properties and synergistic potential, CAPE may enhance the effectiveness of 5-FU in colorectal cancer treatment.

Keywords: caffeic acid, phenethyl ester caffeic acid, 5-Fluorouracil, colorectal cancer, BAX, Bcl-2, NF-κB, cytotoxicity

J Mazandaran Univ Med Sci 2025; 35 (244): 65-77 (Persian).

Corresponding Author: Amirhossein Salmanmahiny - Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran. (E-mail: Amirhsmahiny@gmail.com)

ارزیابی اثرات ضدسرطانی فن اتیل استر کافئیک اسید [CAPE] به همراه 5-FU از طریق بیان ژن های دخیل در آپوپتوزیس بر رده سلولی سرطانی کولورکتال [SW-۷۴۲]

محمد شکرزاده^{۱،۲}رامین عطایی^{۲،۳}شقایق آقاچان شاکری^۴امیرحسین سلمان ماهینی^۵

چکیده

سابقه و هدف: ۵-فلوئوروئوراسیل (5-FU) دارویی پرکاربرد در درمان سرطان کولورکتال است که به دلیل افزایش مقاومت به شیمی درمانی نیاز به بهینه سازی اثر بخشی آن دارد. این مطالعه با هدف، ارزیابی اثرات هم افزای فن اتیل استر کافئیک اسید (CAPE) همراه با 5-FU بر بیان ژن های آپوپتوتیک (*BAX* و *Bcl-2*) التهابی (*NF-kB*) در سلول های سرطان کولورکتال SW-۷۴۲ بود.

مواد و روش ها: در این مطالعه تجربی، سلول های SW-۷۴۲ به غلظت های مختلف (5-FU از ۱/۵۶ تا ۱۰۰ μM و CAPE از ۱ تا ۲۰۰ μM) تیمار شدند. عملکرد سلولی و IC₅₀ با آزمون MTT، تغییرات بیان ژن ها با RT-PCR و سینترژسم بین 5-FU و CAPE با نرم افزار Compusyn بررسی شد. داده ها با استفاده از نرم افزار Prism Ver.3 و آنالیز واریانس یک طرفه تجزیه و تحلیل شد.

یافته ها: 5-FU IC₅₀ و CAPE پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون به ترتیب ۲۸/۲۷ ± ۰/۸۶ μM و ۸۸/۸۹ ± ۵/۴۰ μM و اندازه گیری شد. عملکرد سلولی وابسته به دوز کاهش یافت. نرم افزار Compusyn نشان داد که در دو ترکیب 5-FU ۶/۲۵ μM + CAPE (IC₁₀) ۱۰ μM و 5-FU (IC₃₀) ۶/۲۵ μM + CAPE (IC₃₀) ۲۰ μM سینترژسم وجود دارد. نتایج RT-PCR نیز نشان داد که ترکیب 5-FU (IC₃₀) ۶/۲۵ μM + CAPE (IC₁₀) ۱۰ μM قادر به افزایش قابل توجه ($P < 0/001$) بیان *BAX* نسبت به 5-FU ۶/۲۵ μM تنها ($P < 0/001$) و CAPE ۱۰ μM تنها ($P < 0/001$)، کاهش قابل توجه بیان *Bcl-2* نسبت به CAPE ۱۰ μM تنها ($P < 0/05$) و کاهش قابل توجه بیان *NF-kB* نسبت به 5-FU ۶/۲۵ μM تنها ($P < 0/01$) و CAPE ۱۰ μM تنها ($P < 0/01$) بود.

استنتاج: ترکیب غلظت های خاصی از 5-FU و CAPE سینترژسم قوی ایجاد کرده و می تواند عملکرد سلول های SW-۷۴۲ را کاهش دهد. این یافته ها امیدواری برای استفاده از CAPE در رژیم های شیمی درمانی سرطان کولورکتال به همراه 5-FU دارند.

واژه های کلیدی: کافئیک اسید، فن اتیل استر کافئیک اسید، ۵-فلوئوروئوراسیل، سرطان کولورکتال، *Bcl-2*، *NF-kB*، سمیت سلولی

E-mail: Amirhsmahiny@gmail.com

مؤلف مسئول: امیرحسین سلمان ماهینی - ساری، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، دانشکده داروسازی

۱. استاد، گروه سم شناسی و داروشناسی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۲. مرکز تحقیقات علوم دارویی، موسسه هموگلوبینوپاتی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۳. دانشیار، مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۴. دکتری تخصصی سم شناسی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۵. دانشجوی داروسازی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱۰/۸ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۴۰۳/۱۰/۹ تاریخ تصویب: ۱۴۰۳/۸/۲۲

مقدمه

یکی از سرطان‌هایی با شیوع بالا در جهان، سرطان کولورکتال (CRC) است که به ترتیب سومین و چهارمین سرطان شایع در زنان و مردان ایرانی است (۱). روش‌های معمول درمان CRC شامل جراحی، پرتو درمانی و شیمی درمانی هستند که هر یک مزایا و معایب خاص خود را دارند (۱). ریسک فاکتورهای بروز CRC شامل پیری، جنس مذکر، رژیم غذایی حاوی چربی بالا، مصرف پایین فیبر و سبک زندگی غیر فعال است. حدود ۵۰ درصد مرگ و میرهای بیماران CRC به دلیل عود و متاستاز مجدد سرطان دو سال پس از درمان می‌باشد (۲). افرادی که از بیماری التهابی روده (IBD) و سرطان مرتبط با کولیت اولسراتیو (CAC) رنج می‌برند، نسبت به جمعیت عمومی بیش‌تر در معرض خطر سرطان کولورکتال (CRC) قرار دارند (۳). با پیش گرفتن یک سبک زندگی سالم‌تر مانند خودداری از مصرف الکل و تنباکو، رسیدن به وزن مناسب، شرکت در فعالیت‌های بدنی انتخاب رژیم غذایی حاوی مقادیر کم گوشت قرمز و مقادیر زیاد فیبر، میوه و سبزیجات در پیشگیری CRC می‌تواند موثر باشد (۴). در طول یک دوره پنج ساله، میزان بقا در بیماران Stage I حدود ۹۰ درصد برآورد می‌شود، در حالی که این میزان برای بیماران Stage IV کم‌تر از ۵ درصد است. در بیش از ۷۰ درصد موارد شیوع، عوامل ژنتیکی و محیطی در انگیزه شدن سرطان CRC نقش دارند (۵). در سال ۲۰۱۸، با ۱٫۸ میلیون مورد شیوع جهانی و ۸۸۰٫۰۰۰ کشته، CRC دومین کارسینوم مرگبار جهان است. در حال حاضر، راه حل منتخب برای مقابله با سرطان کولورکتال لوکالیزه و متاستاتیک، جراحی می‌باشد (۶). در حالی که شیمی درمانی هم‌چنان یکی از گزینه‌های درمانی ممکن برای سرطان کولورکتال (CRC) است، عوارض ناخواسته‌ای مانند انتخاب‌پذیری پایین و سمیت سیستمیک اثرات، درمانی و اثربخشی کلی داروها را مختل می‌کنند (۷). پس از بررسی داده‌های آماری مختلف، مشاهده شد که رابطه

مستقیمی بین کاهش شانس بقا و تغییرات در بیان $Bcl-2$ و BAX وجود دارد، به طوری که بیان $Bcl-2$ کاهش و بیان BAX افزایش می‌یابد (۲). CRC هم‌چنان در دنیای غرب و به ویژه ایالات متحده شایع است. حدود ۵۰ درصد از بیمارانی که در آن‌ها با جراحی تومورها خارج شده‌اند، به دلیل بازگشت CRC به شکل مقاوم به درمان و متاستاتیک، فوت می‌کنند. یکی از دلایل اصلی بروز CRC متاستاتیک و مقاوم به شیمی درمانی، تشکیل تعداد کمی از سلول‌های بنیادی سرطان (CSCs) است (۸). بازگشت سریع CRC پس از جراحی، شیمی درمانی یا پرتو درمانی امری کاملاً رایج است که فرآیند شناسایی و توسعه روش‌های جدید درمانی CRC را ضروری‌تر می‌کند (۹). افزایش موارد بروز CRC به «غربی‌سازی» روزافزون رژیم‌های غذایی و شیوه زندگی در کشورهای آسیایی و آفریقایی نسبت داده شده است. رژیم‌های شیمی درمانی برای درمان سرطان کولورکتال شامل FOLFOX (5-FU فولینیک اسید + اگزالیلاتین) و FOLFIRI (5-FU فولینیک اسید + ایرینوتکان) است. با وجود گزینه‌های درمانی موجود، شانس عود بیماری هم‌چنان بالا باقی مانده است و بیش‌تر موارد عود شده دارای پیش‌آگهی ضعیفی هستند. بررسی و زیر ذره بین بردن مولکول‌هایی که مسئول بروز و پیشرفت سرطان هستند، می‌تواند به تشخیص دقیق‌تر، انتخاب درمان مناسب‌تر و مبارزه با مقاومت به شیمی درمانی کمک کند (۱۰).

رایج‌ترین داروی شیمی درمانی استفاده شده برای سرطان‌های گوارشی مانند سرطان معده، کولورکتال و پانکراس، 5-FU، یک آنتی متابولیت فلئوروپیریمیدینی است (۱۱). این دارو سیتوتوکسیسته خود را از طریق مهار آنزیم نوکلئوتید تیمیدلات سنتاز (TYMS) و هم‌چنین از طریق وارد کردن فلئورو نوکلئوتیدها به RNA و DNA القا می‌کند (۱۲). نقطه ضعف برجسته 5-FU حذف سریع آن از جریان خون (فراهمی زیستی پایین) و نیمه

عمر پلاسمایی کوتاه است. از نقاط ضعف دیگر 5-FU می‌توان به نیاز به دوز بالا و هدف‌گیری غیر اختصاصی آن اشاره کرد (۱۱). در حالی که 5-FU در ۴۰-۵۰ درصد بیماران CRC موفق بوده، اما در افزایش بقای بیماران (بدون بازگشت سرطان) تأثیر قابل توجهی نداشته است. به همین دلیل و دلایل مشابه، شناسایی روش‌های جدیدی برای افزایش اثربخشی 5-FU در طول دوره درمانی ضروری است (۱۳). هم‌چنین مشاهده شد که بخشی از بیماران CRC نسبت به شیمی درمانی با 5-FU مقاوم هستند و بیش‌تر بیماران سالم پس از درمان، مقاومت به 5-FU پیدا می‌کنند و این ضرورت نوآوری در روش مصرف 5-FU را حتی بیش‌تر می‌کند (۱۲).

یکی از ترکیبات فعال پروپولیس (رزین بی‌رنگ و بسیار چسبنده‌ای که توسط زنبورها از گیاهان جمع‌آوری می‌شود) CAPE (فن اتیل (۳-۴، ۳-دی هیدروکسی فیل) اکریلات) یک ترکیب فنولی با پیوند استری است و این ترکیب به کمک نفوذپذیری بالای خود به راحتی می‌تواند وارد سلول‌ها شود (۱۴). گروه‌های هیدروکسیل در حلقه کاتکول CAPE باعث بسیاری از اثرات بیولوژیکی مختلف آن مانند فعالیت‌های ضد التهابی، آنتی‌اکسیدانی، ضد ویروسی، ضد باکتریایی، سیستم ایمنی، ضد سرطانی و ترمیم زخم است (۱۵). بررسی‌های آزمایشگاهی (in vitro) نشان داده‌اند که CAPE اثرات ضد سرطانی بر سلول‌ها و تومورهای سرطان ریه، معده، کولورکتال، کبد، پانکراس، دهانه رحم و ملانوماهای بدخیم دارد (۱۶). CAPE سمیت قابل توجهی برای سلول‌های سالم در مقایسه با سلول‌های سرطانی ایجاد نمی‌کند و همین ویژگی آن را به یک کاندید عالی برای آینده درمان سرطان تبدیل می‌کند (۱۷). در مطالعه‌ای بر اثرات CAPE بر سلول‌های سرطان پستان مشاهده شد که مهار رشد سلول‌های سرطانی توسط CAPE ناشی از تأثیر آن بر فاکتور رونویسی هسته‌ای NF-κB است. هم‌چنین دیده شد که CAPE قادر است رشد سرطان پستان را از طریق مهار فاکتور رشد فیروبلاست نوع ۲

(FGF-2) کاهش دهد (۱۶). با توجه به خواص آنتی‌اکسیدانی ترکیب CAPE و افزایش روزافزون مقاومت به داروی 5-FU در بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال و به تبع آن نیاز به رژیم‌های شیمی درمانی نوین، این مطالعه به اثر ترکیب 5-FU+CAPE بر رده سلولی سرطان کولورکتال انسانی SW-۷۴۲ پرداخته است.

مواد و روش‌ها

کشت سلولی

در این مطالعه تجربی، با کد اخلاق IR.MAZUMS.REC.1402.348، رده سلولی SW-۷۴۲ از بانک سلولی ذخایر ملی ژنتیک خریداری و در روز اول در محیط کشت حاوی ۴۵ درصد مدیوم RPMI-1640، ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (FBS) و ۱ درصد آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین-استرپتومایسین کشت داده شد. سلول‌های کشت داده شده در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، رطوبت کافی و ۵ درصد دی اکسید کربن قرار گرفتند. به منظور جداسازی کامل سلول‌های رشد یافته، پس از رسیدن به ۸۰-۷۰ درصد رشد سلولی، به آن‌ها تریپسین-اتیلن دی آمین تترا استیک اسید (EDTA) اضافه شده و به مدت ۵ دقیقه با دور ۱۵۰۰ rpm سانتریفیوژ شدند. مایع رویی خارج شده و به سلول‌های ته نشین شده ۵ mL محیط کشت کامل (۴۵ درصد مدیوم RPMI-1640 + ۱۰ درصد FBS + ۱ درصد آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین-استرپتومایسین) اضافه و برای بهینه‌سازی رشد سلول‌ها ۱۰۰ μL L-Glutamine اضافه شد. برای بررسی میزان مصرف محیط کشت توسط سلول‌های در حال رشد، از معرف Phenol Red استفاده شد و با مصرف تدریجی آن، رنگ محیط از قرمز به زرد تغییر می‌کند. پس از روز اول و تغییر کامل رنگ مخلوط از قرمز به زرد، محیط کشت دور ریخته شده و از PhosphateBuffered Saline (PBS) برای پاک‌سازی مخلوط از سلول‌های مرده استفاده شد. برای جداسازی سلول‌های رشد کرده از کف فلاسک، از

۲ mL تریپسین به مدت بین ۵ تا ۷ دقیقه استفاده می شود. هم چنین برای بهینه سازی فعالیت تریپسین، فلاسک در انکوباتور قرار داده می شود. پس از جداسازی سلول ها، برای خنثی سازی تریپسین، PBS اضافه می شود. سلول های جدا شده سانتریفیوژ شده تا فرم پلت (Pellet) پیدا کنند. پلت های سلولی در ۱ mL از Full Medium کاملاً دیسپرس شد تا از سلول ها سوسپانسیون تهیه شود. برای تعیین درصد زنده بودن سلول های موجود در سوسپانسیون سلولی، نسبت یکسانی از تریپان بلو به سوسپانسیون سلولی اضافه می شود (از هر دو ۵۰ µL). از ۱۰۰ µL ترکیب حاصل، ۱۰ µL برداشته شد و تعداد سلول های موجود در آن با لام هموسایتومتر و میکروسکوپ نوری شمرده می شود. بعد از اطمینان از زنده بودن بیش از ۹۰ درصد سلول ها و عدم آلودگی آن ها، برای انجام تست استفاده می شوند (۱۸).

ارزیابی سمیت سلولی

آزمون MTT، تبدیل تترازولیوم برماید زرد رنگ به کریستال های ارغوانی فورامازان در سلول های زنده توسط آنزیم های سوسکسینات تترازولیم ردوکتاز میتوکندریایی می باشد. در این واکنش احیای سلولی NADPH و NADH نقش دارند (۱۹). سلول های کشت شده در پلت های ۹۶ خانه به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در معرض غلظت های مختلفی از 5-FU (۱/۵۶، ۳/۱۲۵، ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ µM) و CAPE (۱، ۵، ۱۰، ۲۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ µM) قرار می گیرند تا IC₅₀ آن ها مشخص شود. هدف از تعیین IC₅₀، مشخص کردن رنج غلظتی از دو ترکیب است که به تنهایی قادر به کاهش قابل توجه عملکرد سلولی سلول های SW-۷۴۲ نمی باشد. پس از مشخص سازی IC₅₀ دو ترکیب، در پلیتی دیگر سلول ها در معرض غلظت های متفاوت از 5-FU + CAPE قرار می گیرند تا اثر ترکیب این دو ماده بر عملکرد سلولی مشخص شود. به هر چاهک پلت ۹۶ خانه ای، ۱۰۰ µL محیط کشت حاوی ۱۰^۴ یا ۱۰^۵ عدد

سلول اضافه شد (برای هر غلظت ۳ چاهک در نظر گرفته می شود) و به مدت ۲۴ الی ۴۸ ساعت در انکوباتور قرار داده می شوند. طی زمان انکوباسیون، از چگونگی رشد و عدم آلودگی سلول ها، اطمینان حاصل شد و پس از انکوباسیون، ترکیبات مورد مطالعه با غلظت های تعیین شده به چاهک های حاوی سلول های کشت داده شده اضافه می شوند (دور تا دور پلت های ۹۶ خانه PBS ریخته شد تا از تجزیه ماده اصلی جلوگیری شود) و به مدت ۴۸ ساعت دیگر در انکوباتور قرار می گیرند. پس از ۴۸ ساعت با پیت محیط کشت و سایر مواد افزوده شد را از چاهک ها جدا کرده و سلول ها ۳ بار با ۰.۵ mL نرمال سالین شستشو شدند. به هر چاهک ۲۰ µL محلول MTT اضافه کرده و پلت های ۹۶ خانه ای را به مدت ۴ ساعت در انکوباتور گذاشته شدند. سپس محلول MTT درون چاهک ها را خارج و ۱۵۰ µL محلول DMSO به هر چاهک اضافه کرده و پلت به مدت ۱۵ دقیقه میکس گردید تا کریستال های ارغوانی به حالت محلول در آیند. در انتهای هر آزمایش در هر چاهک ۱۰۰ µL محتویات قرار دارد (۹۰ µL سلول و محیط کشت + ۱۰ µL ماده مورد مطالعه). پس از ۱۵ دقیقه و انحلال کامل فورمازان موجود در پلت ها، با استفاده از دستگاه ELISA Reader جذب کلنی های سلولی رنگ گرفته در هر چاهک در طول موج ۵۷۰ نانومتر مورد بررسی قرار گرفت و در انتها درصد زنده ماندن سلول ها محاسبه گردید.

استخراج ژن

مقداری از سلول های SW-۷۴۲ رشد یافته در فلاسک با کمک آنزیم تریپسین جداسازی کرده و پس از سانتریفیوژ و ته نشین شدن، در پلت ۶ خانه کاشته شدند (در هر چاهک باید یک میلیون سلول وجود داشته باشد). بعد از ۲۴ ساعت سلول ها در معرض ترکیبات مورد مطالعه با غلظت های معین قرار گرفتند. بعد از ۴۸ ساعت به هر چاهک ۱ mL تریزول (Trizol)

اضافه شد. محتویات چاهک به یک میکروتیوب انتقال یافته و پس از ۱۰ دقیقه، ۲۰۰ μ L کلروفرم به میکروتیوب اضافه شد تا محتویات داخل آن (DNA، RNA، و پروتئین) چند فازی شود (این مرحله Harvesting نام دارد). محتویات میکروتیوب به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شده (۱۵۰۰۰G) و به سه فاز تقسیم شدند. مواد موجود در فاز انتهای میکروتیوب مورد نیاز مطالعه نیستند. فاز وسط حاوی DNA و پروتئین بوده و فاز رویی که حاوی RNA است با یک سمپلر برداشته شد و در یک میکروتیوب جدید ریخته شد. جهت شست و شوی RNA، هم حجم آن ایزوپروپیل الکل به میکروتیوب اضافه شده و مجدداً سانتریفیوژ گردید (۱۵۰۰۰G به مدت ۱۵ دقیقه). بعد از سانتریفیوژ، RNA در انتهای میکروتیوب جمع شده و فاز رویی دور ریخته شد. سپس به میکروتیوب ۱ mL اتانول ۷۵ درصد افزوده و مجدداً به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد (۷۵۰۰G) (مرحله سانتریفیوژن هایی یک بار دیگر تکرار گردید).

بیان ژن

با توجه به در روش کار کیت استخراج RNA (محصول شرکت Roche آلمان) تعداد معینی سلول با مقداری محلول لیز ترکیب شده تا مواد وراثتی آزاد شود. پس از استخراج مواد وراثتی، برای اندازه گیری

غلظت و میزان آلودگی RNA، نانودراپ های RNA استخراج یافته در طول موج ۲۸۰/۲۶۰ توسط دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. دستگاه ترموسایکلر RNA را به Complementary DNA (cDNA) تبدیل می کند که به دلیل ناپایداری خود باید در یخ نگه داری شود. در کیت PCR ماده ای به نام PCR Master Mix وجود دارد که حاوی آنزیم های سازنده DNA از روی cDNA است. مجموعه مواد وراثتی تشکیل شده در دستگاه Real time-PCR قرار داده شد و برای رونویسی بخش مورد نظر از DNA باید از پرایمر اختصاصی استفاده شود. به ترتیب مراحل Unwinding، Annealing و Taq enzyme translation انجام شد و در میان دو رشته های DNA ساخته شده SYBR Green قرار می گیرد. با هر سیکل، تجمع مواد وراثتی مورد نظر و به دنبال آن میزان فلوئورسانس بیش تر می شود. در نهایت تعداد سیکل های PCR لازم برای ایجاد تفاوت قابل ملاحظه در میزان فلوئورسانس خوانده شده بررسی می شود که Cycle Threshold Value (CT Value) نام دارد. هر چقدر میزان CT Value بیش تر باشد، نشان می دهد مقدار ژن مورد نظر در Template اولیه کم تر بوده و بالعکس و در نهایت در دمای مد نظر به بررسی مقدار بیان ژن های دخیل در آپوپتوزیس و التهاب در مقایسه با ژن GAPDH پرداخته می شود (تصویر شماره ۱)(۲۰).

Primer sequence for use in reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction

Primer name	Sequence (5'-3')	Primer length (bp)	Product length (bp)
Bax F	TCTGACGGCAACTTCAACTG	20	124
Bax R	CCAATGTCCAGCCCATGATG	20	
BCL-2 F	TGTGTGTGGAGAGCGTCAAC	20	175
BCL-2 R	AGCCAGGAGAAATCAAACAGAGG	23	
NF- κ B F	CTCTGTGTTTGTCCAGCTTCG	21	123
NF- κ B R	GGCATGAGCTTCTGACGTTTC	21	

تصویر شماره ۱: نام، توالی و طول پرایمر های اختصاصی استفاده شده در فرآیند qPCR به همراه طول محصول

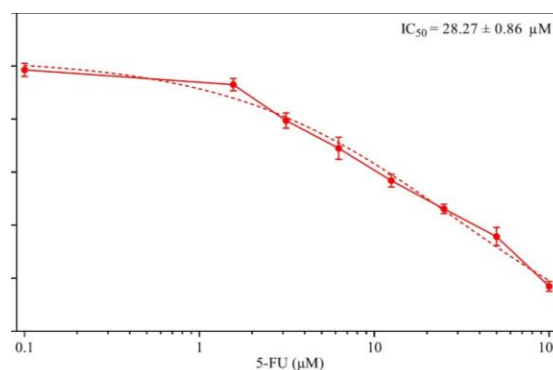
تجزیه و تحلیل آماری

کلیه محاسبات آماری برای مقایسه IC_{50} ها با نرم افزار آماری Prism Ver.3 و به روش رگرسیون غیر خطی (Nonlinear Regression) انجام شد و مقایسه داده ها با روش آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) و Post test مربوطه (Tukey-Kramer multiple comprehension test) صورت گرفت. نمودارها توسط همین برنامه گرافیکی رسم شد. به منظور آنالیز رابطه بین 5-FU و CAPE از نرم افزار Compusyn استفاده شد. در این مطالعه شاخص معنی داری ($P < 0.05$) می باشد.

یافته ها

تعیین میزان IC_{50} داروی 5-FU

سلول های SW-742 در معرض غلظت های ۱، ۵۶، ۳/۱۲۵، ۳/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ μM از 5-FU قرار گرفتند. با توجه به نمودار شماره ۱، مشاهده شد که سمیت سلولی ناشی از 5-FU با افزایش دوز، شدت قابل ملاحظه ای پیدا می کند و IC_{50} داروی 5-FU هنگام مواجه شدن با رده سلولی SW-742 به مدت ۴۸ ساعت، $28.27 \pm 0.86 \mu M$ است.



نمودار شماره ۱: نمودار محاسبه IC_{50} داروی 5-FU بر عملکرد سلول های کولورکتال SW-742

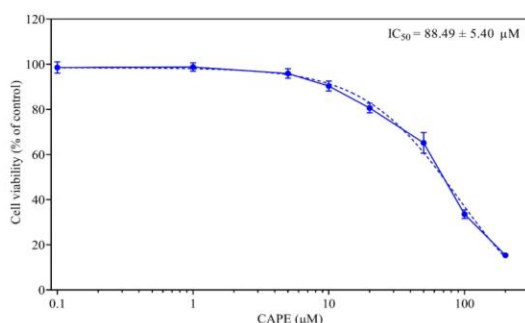
تعیین میزان IC_{50} ترکیب CAPE

سلول های SW-742 در معرض غلظت های ۱، ۵، ۲۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ μM از CAPE قرار گرفتند.

با توجه به نمودار شماره ۲، مشاهده شد که میزان سمیت سلولی ناشی از CAPE در رنج غلظتی ۷۰-۸۰ μM افزایش قابل ملاحظه ای پیدا می کند و IC_{50} ترکیب CAPE هنگام مواجه شدن با رده سلولی SW-742 به مدت ۴۸ ساعت، $88.49 \pm 5.40 \mu M$ است.

اثر CAPE به همراه 5-FU بر میزان عملکرد سلولی سلول های سرطانی کولورکتال SW-742

سلول های SW-742 بر اساس غلظتی از 5-FU که در معرض قرار گرفتند، به ۴ دسته کلی تقسیم شدند و هر گروه با ۵ دوز متفاوت از CAPE ترکیب شد. گروه ها شامل، گروه کنترل، گروه سلول های در معرض μM ۳/۱۲۵، ۳/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ μM CAPE + 5-FU با غلظت های ۱، ۵، ۱۰، ۲۰، ۵۰ و ۱۰۰ μM CAPE با غلظت های ۱، ۵، ۱۰، ۲۰، ۵۰ و ۱۰۰ μM CAPE + 5-FU ۱۲/۵ μM در معرض ۱۲/۵ μM CAPE + 5-FU با غلظت های ۱، ۵، ۱۰، ۲۰، ۵۰ μM می باشد.



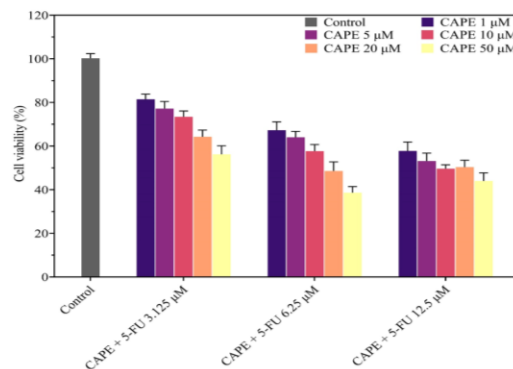
نمودار شماره ۲: نمودار محاسبه IC_{50} CAPE بر عملکرد سلول های کولورکتال SW-742

با توجه به نمودار شماره ۳، میزان عملکرد سلول های SW-742 به صورت وابسته به دوز با افزایش میزان 5-FU کاهش پیدا کرد. هم چنین داخل هر گروه میزان عملکرد سلولی به صورت وابسته به دوز با افزایش غلظت CAPE کاهش پیدا کرد (به جز یک استثنا $12.5 \mu M$ 5-FU + $20 \mu M$ CAPE که با افزایش دوز CAPE از ۱۰ به ۲۰ μM میزان سمیت سلولی ناشی از ترکیب کاهش پیدا کرد).

می‌شود که با افزایش غلظت CAPE از $20 \mu\text{M}$ به $10 \mu\text{M}$ ، رابطه بین 5-FU و CAPE از سینرژیسم (Synergism) به سینرژیسم متوسط (Moderate Synergism) تغییر می‌کند. به جز دو ترکیب ذکر شده در تمامی ترکیب‌های دیگر حاصل از ترکیب 5-FU و CAPE، رابطه بین این دو ماده در رنج سینرژیسم (Synergism) تا تقریباً افزایشی (Nearly Additive) است. به طور دقیق‌تر دو ترکیب $10 \mu\text{M}$ CAPE (IC_{10}) و $6.25 \mu\text{M}$ 5-FU (IC_{30}) و $20 \mu\text{M}$ CAPE (IC_{30}) + 5-FU (IC_{30}) حالتی هستند که به طور قطعی رابطه بین 5-FU و CAPE سینرژستیک است (شاخص CI در این دو حالت به ترتیب 0.67200 و 0.61300 محاسبه شد).

اثرات $10 \mu\text{M}$ CAPE (IC_{10}) + 5-FU (IC_{30}) $6.25 \mu\text{M}$ بر بیان ژن‌های دخیل در آپوپتوزیس سلول‌های سرطانی کولورکتال SW-۷۴۲

با توجه به نمودار شماره ۴، در گروه در معرض $10 \mu\text{M}$ CAPE + 5-FU (IC_{30}) $6.25 \mu\text{M}$ میزان BAX افزایش بسیار قابل ملاحظه‌ای نسبت به گروه $10 \mu\text{M}$ CAPE + 5-FU (IC_{30}) تنها ($P < 0.001$) و $10 \mu\text{M}$ CAPE (IC_{10}) تنها ($P < 0.001$) داشت. هم‌چنین در گروه $10 \mu\text{M}$ CAPE + 5-FU (IC_{30}) $6.25 \mu\text{M}$ بیان $Bcl-2$ کاهش قابل ملاحظه‌ای نسبت به گروه $10 \mu\text{M}$ CAPE (IC_{10}) تنها ($P < 0.05$) داشت.



نمودار شماره ۳: اثر 5-FU در غلظت‌های 3.125 ، 6.25 و $12.5 \mu\text{M}$ همراه CAPE در غلظت‌های 10 ، 20 ، 50 و $100 \mu\text{M}$ بر میزان عملکرد سلول‌های کولورکتال SW-۷۴۲

نتایج آنالیز رابطه بین دو ترکیب 5-FU و CAPE توسط نرم افزار Compusyn

با توجه به تصویر شماره ۲، در دو حالت $3.125 \mu\text{M}$ 5-FU + 5-FU (IC_{30}) $6.25 \mu\text{M}$ و $10 \mu\text{M}$ CAPE + 5-FU (IC_{30}) $6.25 \mu\text{M}$ شاخص CI به ترتیب 0.67200 و 0.61300 می‌باشد که طبق رنج‌های تعریف شده توسط نرم‌افزار Compusyn این دو حالت به ترتیب آنتاگونیسم خفیف (Slight Antagonism) و آنتاگونیسم متوسط (Moderate Antagonism) توصیف شده‌اند. مشاهده شد هنگامی که CAPE به غلظت $50 \mu\text{M}$ می‌رسد، اثرات سایتوپروتکتیو آن بر سایتوتوکسیسیته‌اش غلبه کرده و حتی تا اندازه‌ای اثرات سایتوتوکسیک 5-FU را نیز مهار می‌کند. این اثر حتی با مقایسه دو ترکیب $10 \mu\text{M}$ CAPE + 5-FU (IC_{30}) $6.25 \mu\text{M}$ و $10 \mu\text{M}$ CAPE + 5-FU (IC_{30}) $6.25 \mu\text{M}$ نیز مشاهده

CI Data for Combination treatment in Compusyn Software

Dose 5FU	Dose CAPE	Effect	CI	Range of CI	Description	Symbol
3.125	1.0	0.185	0.91367	< 0.1	Very strong synergism	=====
3.125	5.0	0.228	0.86860	0.1-0.3	Strong synergism	=====
3.125	10.0	0.265	0.89897	0.3-0.7	Synergism	=====
3.125	20.0	0.357	0.85019	0.7-0.85	Moderate synergism	=====
3.125	50.0	0.438	1.21366	0.85-0.90	Slight synergism	=====
6.25	1.0	0.327	0.76095	0.90-1.10	Nearly additive	=====
6.25	5.0	0.359	0.75641	1.10-1.20	Slight antagonism	-----
6.25	10.0	0.423	0.67200	1.20-1.45	Moderate antagonism	-----
6.25	20.0	0.514	0.61300	1.45-3.3	Antagonism	-----
6.25	50.0	0.613	0.73558	3.3-10	Strong antagonism	-----
12.5	1.0	0.422	0.94839	>10	Very strong antagonism	-----
12.5	5.0	0.468	0.84276			
12.5	10.0	0.503	0.80293			
12.5	20.0	0.496	0.99046			
12.5	50.0	0.56	1.15132			

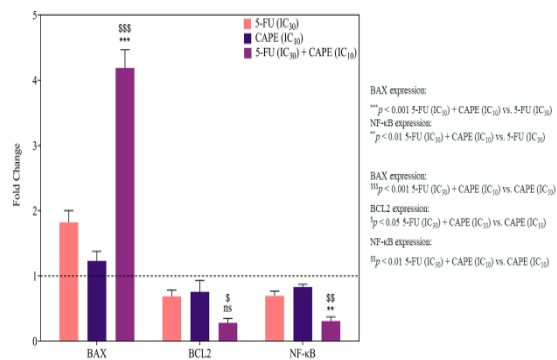


تصویر شماره ۲: بررسی اثرات ناشی از ترکیب غلظت‌های مختلف از 5-FU و CAPE به کمک نرم افزار Compusyn

هنگام مواجهه با سلول‌های سرطانی کولورکتال رده ۷۴۲-SW، از طریق بررسی میزان فعال‌سازی ژن‌های آپوپتوتیک (*BAX* و *Bcl-2*) و التهاب (*NF-κB*) بود. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که پس از قراگیری در معرض سلول‌های ۷۴۲-SW با ترکیب $5\text{-} \mu\text{M}$ / $6\text{-} \mu\text{M}$ FU (IC_{30}) بیان ژن *BAX* افزایش قابل ملاحظه و بیان ژن‌های *Bcl-2* و *NF-κB* کاهش قابل ملاحظه‌ای نسبت به گروه‌های $5\text{-} \mu\text{M}$ FU (IC_{30}) / $6\text{-} \mu\text{M}$ FU (IC_{30}) + $10\text{-} \mu\text{M}$ CAPE (IC_{10}) تنها پیدا کرد.

در مطالعه Sameni و همکاران به بررسی اثر ترکیب عصاره بره موم (حاوی CAPE) و 5-FU بر سرطان کولورکتال انگیخته شده با آزوکسی متان در موش های BALB/c پرداختند. آن ها مشاهده کردند که در گروه های تیمار شده با ترکیب عصاره پروپولیس و 5-FU میزان COX-2، iNOS، β -کاتنین، ضایعات پاتولوژیک و Aberrant crypt foci (ACI) به صورت قابل توجهی نسبت به گروه های کنترل و گروه 5-FU تنها کاهش یافت. Sameni و همکاران به این نتیجه رسیدند که از ترکیبات داخل پروپولیس می توان به عنوان یک عامل جانبی برای افزایش اثرگذاری 5-FU بر سرطان کولورکتال استفاده کرد که این نتیجه هم راستا با نتایج مطالعه حاضر است که نشان از قدرت قابل توجه CAPE (یکی از اجزای پروپولیس) در تقویت اثر 5-FU علیه سلول های سرطانی دارد (۱).

در مطالعه Falcão و همکاران در سال ۲۰۲۳ به بررسی سمیت سلولی ناشی از ترکیب انواع مختلف بره موم سبز، قرمز و قهوه‌ای، با 5-FU یا Fluphenazine در سلول‌های سرطان کولورکتال HT-۲۹ به صورت in-vitro پرداخته شد. آن‌ها نتیجه گرفتند که به طور کلی تمام انواع بره موم، قادر به تقویت اثر ضد سرطانی 5-FU علیه سلول‌های HT-۲۹ می‌باشند و رابطه بین 5-FU و انواع پروپولیس مورد مطالعه سینرژستیک می‌باشد که این نتیجه با نتیجه حاصل از مطالعه حاضر در خصوص وجود سینرژسم بین CAPE (یکی از اجزای پروپولیس) و 5-FU هم راستا می‌باشد (۲۱).



نمودار شماره ۴: اثرات (IC₃₀) 5-FU به همراه CAPE (IC₁₀) بر بیان ژن‌های دخیل در التهاب سلول‌های کولورکتال (SW-۶۲۰)، ***P<۰/۰۰۱): معنی داری تفاوت میزان بیان ژن BAX در گروه μM ۶/۲۵ (IC₃₀) 5-FU + ۱۰ μM CAPE (IC₁₀) نسبت به گروه μM ۶/۲۵ (IC₃₀) 5-FU (**P<۰/۰۱): معنی داری تفاوت میزان بیان ژن NF-κB در گروه μM ۶/۲۵ (IC₃₀) 5-FU + ۱۰ μM CAPE (IC₁₀) نسبت به گروه μM ۶/۲۵ (IC₃₀) 5-FU (\$\$P<۰/۰۰۱): معنی داری تفاوت میزان بیان ژن BAX در گروه μM ۶/۲۵ (IC₃₀) 5-FU + ۱۰ μM CAPE (IC₁₀) نسبت به گروه μM ۶/۲۵ (IC₃₀) 5-FU (\$\$P<۰/۰۱): معنی داری تفاوت میزان بیان ژن NF-κB در گروه μM ۶/۲۵ (IC₃₀) 5-FU + ۱۰ μM CAPE (IC₁₀) نسبت به گروه μM ۶/۲۵ (IC₃₀) 5-FU (\$\$P<۰/۰۰۵): معنی داری تفاوت میزان بیان ژن Bcl-۲ در گروه μM ۶/۲۵ (IC₃₀) 5-FU + ۱۰ μM CAPE (IC₁₀) نسبت به گروه μM ۶/۲۵ (IC₃₀) 5-FU ns عدم معنی داری تفاوت میان میزان بیان ژن Bcl-۲ در گروه μM ۶/۲۵ (IC₃₀) 5-FU + ۱۰ μM CAPE (IC₁₀) نسبت به گروه μM ۶/۲۵ (IC₃₀) 5-FU)

اثرات 10 μM CAPE (IC₁₀) + 5-FU (IC₃₀) 6/25 μM
بر بیان ژن دخیل در التهاب سلول‌های سرطانی کولورکتال
SW-۷۴۲

همان‌طور که در نمودار شماره ۴ مشاهده گردید، در گروه ۱۰ μM CAPE (IC₁₀) ۵-FU ۶/۲۵ μM میزان بیان NF-κB کاهش قابل ملاحظه‌ای نسبت به گروه ۵-FU ۶/۲۵ μM (IC₃₀) تنها (P<۰/۰۱) و ۱۰ μM CAPE (IC₁₀) تنها (P<۰/۰۱) داشت.

بحث

هدف از این مطالعه، مشخص کردن اثر ترکیب داروی 5-FU و CAPE و اثر هم افزای بین آن ها در

در مطالعه ای در سال ۲۰۲۱، Erdemir و Colpan به بررسی اثرات ضد سرطانی نانو ذرات پلی لاکتیک کوگلیکولیک اسید (PLGA) بارگذاری شده با کوئرستین و CAPE (QuCaNP) بر سلول های سرطانی کولورکتال HT-۲۹ پرداختند. آن ها مشاهده کردند که غلظت مهاري QuCaNP در تیمار ۲۴ ساعته و ۴۸ ساعته سلول های HT-۲۹ به ترتیب $11/2 \mu\text{g/mL}$ و $11/2 \mu\text{g/mL}$ است و نانوذرات QuCaNP به صورت قابل ملاحظه عملکرد، مهاجرت و تکثیر سلولی را کاهش داده بودند. هم چنین مشاهده کردند که میزان فعالسازی مسیر آپوپتوز میتوکندری در سلول های HT-۲۹ بعد از تیمار با QuCaNP به صورت قابل ملاحظه افزایش پیدا می کند. Erdemir و Colpan نتیجه گرفتند که QuCaNP های حاوی کوئرستین و CAPE با افزایش آپوپتوزیس قادر به مهار بهینه سلول های سرطانی HT-۲۹ می باشد که این نتیجه با مطالعه حاضر در خصوص فعالیت ضد سرطانی CAPE، همسو است. لازم به ذکر است که Erdemir و Colpan دلیل اصلی فعالیت ضد سرطانی QuCaNP ها را افزایش فعالسازی Caspase-2 (۲/۳۸ برابر)، Caspase-9 (۲ برابر) و تغییر در میزان تولید پروتئین های حیاتی اعلام کردند در حالی که مطالعه حاضر بر تغییرات در بیان ژن های *Bcl-2*، *BAX* و *Nf-κB* تمرکز داشت (۲۲).

در سال ۲۰۲۲، Amalia و همکاران به بررسی اثرات ترکیب CAPE بر سلول های سرطان سینه رده ۷-MCF به صورت تنها و به صورت ترکیبی با 5-FU پرداختند. Amalia و همکاران مشاهده کردند که پس از تیمار ۲۴ و ۴۸ ساعته سلول های ۷-MCF با CAPE غلظت های مهاري به ترتیب $6/6 \pm 1/0 \mu\text{M}$ و $2/9 \pm 6/5 \mu\text{M}$ می باشد در حالی که 5-FU به صورت تنها از خود فقط اثرات Cytostatic بروز می دهد. هم چنین مشاهده کردند که تیمار کردن سلول های ۷-MCF با ترکیب های غلظتی مختلف از 5-FU + CAPE (با نسبت ۱ به ۱۰) باعث افزایش قابل ملاحظه مرگ سلولی از

طریق القای آپوپتوز، افزایش بیان *Caspase-8* و *BAX* در ۶ ساعت اول نسبت به 5-FU تنها می شود. در تیمار ۲۴ ساعته 5-FU+CAPE اثرات سینرژیستیک با $CL=0/5$ و در تیمار ۴۸ ساعته اثرات افزایشی با $CL=1/0$ نشان می دهد. هم چنین در این مطالعه CAPE (با غلظت مهاري $120/7 \pm 6/8 \mu\text{M}$) نیز موفق به مهار آنزیم Human Dihydroorotate Dehydrogenase (*HsDHODH*) شد که به عنوان مکانیسم جدیدی در مهار سلول های ۷-MCF ثبت گردید. در نهایت، Amalia و همکاران نتیجه گرفتند که CAPE و مشتقات آن می تواند به همراه 5-FU گزینه مناسبی برای مدیریت و درمان سرطان سینه باشد که این نتیجه هم راستا با نتیجه مطالعه حاضر در خصوص وجود یک پتانسیل برای سینرژیسم بین 5-FU و CAPE و افزایش میزان آپوپتوزیس با فعالسازی بیش تر *BAX* در سلول های سرطانی می باشد (۲۳).

در سال ۲۰۲۲، Fu و همکاران به بررسی اثر ترکیب Docetaxel و CAPE علیه تکثیر و بقای سلول های سرطان پروستات مقاوم به دوستاکسل پرداختند. آن ها به این نتیجه رسیدند که ترکیب Docetaxel و CAPE قادر است به صورت قابل ملاحظه ای تکثیر و بقای سلول های سرطان پروستات مقاوم به Docetaxel را با مهار *Bcl-2*، *c-Myc* و ایجاد اختلال در متابولیسم سرکوب کند که این نتیجه با نتیجه مطالعه حاضر در خصوص اثرات ضد سرطانی CAPE و پتانسیل آن به عنوان یک عامل کمکی در مواجهه با سرطان هم سو است. هم چنین در این مطالعه مانند مطالعه حاضر، یکی از ژن های مورد بررسی *Bcl-2* بود که همانند نتایج حاصل از تحقیق حاضر، میزان بیان آن در سلول های سرطانی پس از مواجه شدن با CAPE به صورت قابل توجهی کاهش یافت (۲۴).

در سال ۲۰۲۴، Fosun و همکاران در مطالعه ای به آنالیز اثرات CAPE بر التهاب و نشانگرهای متاستاتیک القا شده توسط $\text{TNF-}\alpha$ یا Doxorubicin در Triple Negative Breast Cancer پرداختند. آن ها به این نتیجه

جایگاهی داشته باشد. با توجه به افزایش روزافزون مقاومت بیماران سرطانی به داروی 5-FU و کاهش اثرگذاری این دارو حتی در رژیم‌های ترکیبی، پیشنهاد می‌شود که در مطالعات آینده، پژوهشگران به بررسی قدرت CAPE در افزایش اثرگذاری و کاهش عوارض FU-5 در دوز Therapeutic و مطالعه‌ای بالینی بپردازند.

سپاسگزاری

این مقاله با کد اخلاق IR.MAZUMS.REC.1402.348، برگرفته از پایان‌نامه امیرحسین سلمان ماهینی دانشجوی داروسازی دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی مازندران می‌باشد. از همکاری معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مازندران در حمایت از این طرح تشکر می‌گردد.

رسیدند که CAPE قادر است التهاب ناشی از شیمی درمانی را با کاهش بیان ژن‌های پیش التهابی تنظیم شده توسط $NF-\kappa B$ شامل IL-1B، IL-6، IL-8 و $TNF-\alpha$ سرکوب کند. نتیجه این مطالعه با مطالعه حاضر در خصوص اثرات مهاري CAPE بر بیان ژن $NF-\kappa B$ در سلول‌های سرطانی هم راستا می‌باشد (۲۵).

اشاره شده است که CAPE ترکیبی است با اثرات ضد تکثیری و آپوپتوتیک در سلول‌های سرطانی و در عین حال اثرات ضد التهابی و آنتی‌اکسیدانی در سلول‌های سالم می‌باشد (۲۶). نتیجه گیری کلی در مطالعه حاضر این است که CAPE به کمک توانایی خود در برقراری رابطه سینرژسم با داروی 5-FU و تغییر دادن بیان ژن‌های دخیل در آپوپتوز و التهاب، می‌تواند در آینده رژیم‌های شیمی درمانی سرطان کولورکتال

References

1. Sameni HR, Yosefi S, Alipour M, Pakdel A, Torabizadeh N, Semnani V, Bandegi AR. Co-administration of 5FU and propolis on AOM/DSS induced colorectal cancer in BALB-c mice. *Life Sci* 2021; 276: 119390. PMID: 33794252.
2. Tang H, Yao X, Yao C, Zhao X, Zuo H, Li Z. Anti-colon cancer effect of caffeic acid p-nitro-phenethyl ester in vitro and in vivo and detection of its metabolites. *Sci Rep* 2017; 7(1): 7599.
3. Dai G, Jiang Z, Sun B, Liu C, Meng Q, Ding K, et al. Caffeic Acid Phenethyl Ester Prevents Colitis-Associated Cancer by Inhibiting NLRP3 Inflammasome. *Front Oncol* 2020; 10: 721.
4. Herrera Ramirez A, Yepes-Pérez AF, Quintero-Saumeth J, Moreno Quintero G, Naranjo T, Cardona-G W. 2022.
5. Guffey CR, Fan D, Singh UP, Murphy EA. Linking obesity to colorectal cancer: recent insights into plausible biological mechanisms. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2013; 16(5): 595-600. PMID: 23743611.
6. Vodenkova S, Buchler T, Cervena K, Veskmova V, Vodicka P, Vymetalkova V. 5-fluorouracil and other fluoropyrimidines in colorectal cancer: Past, present and future. *Pharmacol Ther* 2020; 206: 107447. PMID: 31756363.
7. Chen C, Kuo YH, Lin CC, Chao CY, Pai MH, Chiang EI, Tang FY. Decyl caffeic acid inhibits the proliferation of colorectal cancer cells in an autophagy-dependent manner in vitro and in vivo. *PLoS One* 2020; 15(5): e0232832. PMID: 32401800.
8. Park SR, Kim SR, Hong IS, Lee HY. A Novel Therapeutic Approach for Colorectal Cancer Stem Cells: Blocking the PI3K/Akt Signaling Axis With Caffeic Acid. *Front Cell Dev Biol* 2020; 8: 585987. PMID: 33425893.

9. Li L, Li C, Zhou J. Effective sustained release of 5-FU-loaded PLGA implant for improving therapeutic index of 5-FU in colon tumor. *Int J Pharm* 2018; 550(1-2): 380-387. PMID: 30040972.
10. Nishida N, Yamashita S, Mimori K, Sudo T, Tanaka F, Shibata K, et al. MicroRNA-10b is a prognostic indicator in colorectal cancer and confers resistance to the chemotherapeutic agent 5-fluorouracil in colorectal cancer cells. *Ann Surg Oncol* 2012; 19(9): 3065-3071. PMID: 22322955.
11. Yusefi M, Lee-Kiun MS, Shameli K, Teow SY, Ali RR, Siew KK, et al. 5-Fluorouracil loaded magnetic cellulose bionanocomposites for potential colorectal cancer treatment. *Carbohydr Polym* 2021; 273: 118523. PMID: 34560940.
12. Xie T, Geng J, Wang Y, Wang L, Huang M, Chen J, et al. FOXM1 evokes 5-fluorouracil resistance in colorectal cancer depending on ABCC10. *Oncotarget* 2016; 8(5): 8574. PMID: 28051999.
13. Cho YH, Ro EJ, Yoon JS, Mizutani T, Kang DW, Park JC, et al. 5-FU promotes stemness of colorectal cancer via p53-mediated WNT/beta-catenin pathway activation. *Nat Commun* 2020; 11(1): 5321. PMID: 33087710.
14. Koraneekit A, Limpaboon T, Sangka A, Boonsiri P, Daduang S, Daduang J. Synergistic effects of cisplatin-caffeic acid induces apoptosis in human cervical cancer cells via the mitochondrial pathways. *Oncol Lett* 2018; 15(5): 7397-7402. PMID: 29731891.
15. Acar T, Arayici PP, Ucar B, Coksu I, Tasdurmazli S, Ozbek T, Acar S. Host-Guest Interactions of Caffeic Acid Phenethyl Ester with beta-Cyclodextrins: Preparation, Characterization, and In Vitro Antioxidant and Antibacterial Activity. *ACS Omega* 2024; 9(3): 3625-3634. PMID: 38284065.
16. Kabala-Dzik A, Rzepecka-Stojko A, Kubina R, Jastrzebska-Stojko Z, Stojko R, Wojtyczka RD, Stojko J. Migration Rate Inhibition of Breast Cancer Cells Treated by Caffeic Acid and Caffeic Acid Phenethyl Ester: An In Vitro Comparison Study. *Nutrients* 2017; 9(10). PMID: 29048370.
17. Chen H, Guan Y, Baek SJ, Zhong Q. Caffeic Acid Phenethyl Ester Loaded in Microemulsions: Enhanced In Vitro Activity against Colon and Breast Cancer Cells and Possible Cellular Mechanisms. *Food Biophysics* 2018; 14(1): 80-89.
18. Azari A, Eslami M, Mohammadpour A, Shokrzadeh M. Evaluation of the Protective Effect of Quercetin on Normal Ovary Cells Viability Induced by Clomiphene Citrate and Correlation with p53 Gene Expression. *J Mazand Univ Med Sci* 2024; 34(234): 48-60.
19. Razavi SMA, Shokrzadeh M, Aghajanshakeri S, Ataee R. Evaluation of Synergic Effect of Nano-Micelle Curcumin and Epicatechin on Apoptosis and Proliferation of HT29 Colorectal Cancer Cell Line. *J Mazand Univ Med Sci* 2024; 34(235): 13-25.
20. Ashari S, Naghsh N, Salari Y, Barghi NG, Bagheri A. Dimethyl fumarate attenuates di-(2-ethylhexyl) phthalate-induced nephrotoxicity through the Nrf2/HO-1 and NF-κB signaling pathways. *Inflammation* 2023; 46(1): 453-467. PMID: 36195817.
21. Falcão SI, Duarte D, Diallo M, Santos J, Ribeiro E, Vale N, Vilas-Boas M. Improvement of the in vitro cytotoxic effect on HT-29 colon cancer cells by combining

- 5-fluorouacil and fluphenazine with green, red or brown propolis. *Molecules* 2023; 28(8): 3393. PMID: 37110626.
22. Colpan RD, Erdemir A. Co-delivery of quercetin and caffeic-acid phenethyl ester by polymeric nanoparticles for improved antitumor efficacy in colon cancer cells. *J Microencapsul* 2021; 38(6): 381-393. PMID: 34189998.
23. Amalia E, Diantini A, Endang Prabandari E, Waluyo D, Subarnas A. Caffeic Acid Phenethyl Ester as a DHODH Inhibitor and Its Synergistic Anticancer Properties in Combination with 5-Fluorouracil in a Breast Cancer Cell Line. *J Exp Pharmacol* 2022; 14: 243-253. PMID: 35910085.
24. Fu Y-K, Wang B-J, Tseng J-C, Huang S-H, Lin C-Y, Kuo Y-Y, et al. Combination treatment of docetaxel with caffeic acid phenethyl ester suppresses the survival and the proliferation of docetaxel-resistant prostate cancer cells via induction of apoptosis and metabolism interference. *J Biomed Sci* 2022; 29(1): 16. PMID: 35197069.
25. Fosu K, Quarshie JT, Offei NA, Serwaa A, Tuah B, Sobo AK, et al. Caffeic Acid Phenethyl Ester Suppresses Cytokine-and Chemotherapy-Induced Inflammation in Triple-Negative Breast Cancer via NF- κ B Signalling. *Nat Prod Commun* 2024; 19(11): 1934578X241298830.
26. Prades-Sagarra E, Laarakker F, Dissy J, Lieuwes N, Biemans R, Dubail M, et al. Caffeic acid Phenethyl Ester (CAPE), a natural polyphenol to increase the therapeutic window for lung adenocarcinomas. *Radiother Oncol* 2024; 190: 110021. PMID: 38000688.