Archive of SID

مجله علمی ـ پژوهشی زیست‌شناسی جانوری تجربی
سال هشتم، شماره دوم، پیاپی سی‌ام، پاییز ۱۳۹۸ (۵۰-۴۵)

خاصیت ضدسرطانی عصاره اتانولی ریشه عنصل بر سلول‌های سرطانی هلا در محیط کشت

سیما نصری[۱*]، غلامرضا امین[۲]، زهرا صدقی آزاد[۳]، معصومه بوربور[۴]، فرشته شامحمدی[۵]

۱. دانشیار گروه زیستشناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران
۲. استاد گروه فارماکوگنوزی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
۳. کارشناس ارشد، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران
۴. کارشناس ارشد، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران
۵. مربی، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۴/۳ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۵/۱۵)

چکیده

سرطان یک مسئله مهم بهداشتی و سلامتی در جهان است. سرطان گردن رحم یکی از موارد اصلی مرگ و میر ناشی از سرطان در جهان در بین زنان می باشد. استفاده از گیاهان دارویی به‌عنوان منبع طبیعی درمانی در درمان سرطان به دلیل عدم سمیت این گیاهان بر سلول‌های طبیعی در بسیاری از موارد، مورد توجه است. پژوهش حاضر به بررسی اثر عصاره اتانولی ریشه عنصل بر سلول‌های سرطانی هلا در مقایسه با سلول‌های طبیعی هک پرداخته است. پس از خشک کردن ریشه، عصاره گیری از آن به روش سوکسله صورت گرفت. سپس، سلول‌های هلا و هک با غلظت‌های ۱۰۰۰؛ ۲۰۰؛ ۱۵۰؛۱۰۰؛ ۵۰؛ ۱۰؛۱؛ ۰/۱ میکروگرم در میلی لیتر عصاره اتانولی ریشه عنصل در زمانهای ۲۴، ۴۸، ۷۲ ساعت کشت داده شدند و با تست MTT میزان زنده‌مانی آنها مشخص شد. عصاره اتانولی ریشه عنصل سبب کاهش زنده‌مانی سلول‌های هلا در دوزها و زمانهای مختلف شد ($P<0/05$). اما بر زنده‌مانی سلول‌های هک تأثیری نداشت.**بحث:** با توجه به وجود فلاوونوئیدها و گلیکوزیدهای موجود در ریشه عنصل، کاهش زنده‌مانی سلول‌های سرطانی هلا را می توان به این ترکیبات نسبت داد.

واژه‌های کلیدی: سلول سرطانی هلا، سلول هک، عصاره اتانولی ریشه عنصل، MTT.

Anticancer property of ethanolic extract of *Urginea maritima* root on Hela cancer cells in cell culture

SimaNasri[1*], GholamReza Amin[2], Sedghi Azad Zahra[3], Borbor Masomeh[4], Shahmohammadi Freshteh[5]

1. Associate Professor, Department of Biology, Payame Noor University, Tehran, Iran
2. Professor, Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
3. M. A., Department of Biology, Payame Noor University, Tehran, Iran
4. M.A., Department of Biology, Payame Noor University, Tehran, Iran
5. Instructor, Department of Biology, Payame Noor University, Tehran, Iran

(Received: Jun. 24, 2019 - Accepted: Aug. 6, 2019)

Abstract

Cancer is an important health and hygienic issue in the world. The usage of medicinal plants as a natural source of cancer treatment is considered because of the lack of toxicity of these plants, in most cases on normal cells. The aim of this study was to investigate the effect of ethanolic extract of *Urginea maritima* root on Hela cancer cells compared to Hek normal cells. After root drying, extraction was done by Soxhlet method. Then, Hela and Hek cells were cultured at concentrations of 1000, 200, 150,100,50,10,1 and 0.1 µg/ml of ethanolic extract of *Urginea maritima* root at 24, 48, 72 hours and their viability was determined by MTT test. Ethanolic extract of *Urginea maritima* root decreased the viability of Hela cells at different doses and hours ($P<0.05$) but it didn't effect on Hek cells viability. Discussion: Due to existence of flavonoids and glycosides in the *Urginea maritima* root, the reduction of Hela cells viability can be attributed to these compounds.

Keywords: ethanolic extract of *Urginea maritima* root, Hela cancer cell, Hek cell, MTT.

* نویسنده مسئول: Email:

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

سرطان عامل دوم مرگ‌ومیر بعد از بیماری‌های قلبی– عروقی است (Kooti, 2017). سرطان دهانه رحم چهارمین سرطان شایع زنان در جهان است (Vu, 2018). همچنین یکی از موارد اصلی مرگ‌ومیر ناشی از سرطان در جهان می‌باشد. به‌دلیل افزایش شیوع این سرطان درمان‌های چندگانه مورد توجه می‌باشد. پاسخ اولیه به شیمی درمانی و جراحی عموماً مثبت است، اما بیماران عموماً از عود و برگشت تومور شکایت دارند (Jun-Xiao, 2018). مهمترین مسئله در درمان سرطان تخریب سلول‌های سرطانی در حضور سلول‌های طبیعی، بدون آسیب به سلول‌های طبیعی است. به همین دلیل استفاده از منابع طبیعی مانند گیاهان برای درمان سرطان ضروری است (Rafieian-Kopaei, 2015). عنصل از گیاهان تیره آلاله بوده و به نام‌های علمی *Scilla maritime* یا *Urginea maritima* نامیده می‌شود (Zargari, 2011).

عنصل یا پیاز دشتی (پیاز موش یا اسقبل) گیاه چندساله، پیاز دار با پیازی درشت به قطر ۱۵–۵ سانتی متر، تخم‌مرغی پهن است (Mozaffarian, 2012). پیاز مرکب از فلس‌هایی است که فلس‌های خارجی آن غیرقابل استفاده و فقط بخش وسطی آن مصرف دارویی دارد. طعم آنها تند و تلخ است (Zargari, 2011).

پزشکان قدیم یونان و مصر کاملاً پیاز عنصل را می‌شناخته‌اند (Evans, 2002). عصاره متانولی گیاه در تقویت‌مو و در درمان چربی و شوره مزمن سر مؤثر است. پیاز گیاه درمان محلی قدیمی برای سرطان و تومورها است (Duke, 2007). پیاز مسهل، خلط‌آور، قی‌آور، مدر، ضدسرفه، تحریک‌کننده پوست (قرمزی و تاول) و مقوی قلب است (Akbarzadeh Pasha, 2012).

مواد و روش‌ها

عصاره گیری

جمع‌آوری عنصل از خوزستان صورت گرفت و توسط بخش هرباریوم مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع شناسایی شد. سپس اندام‌های گیاهی به‌طور کامل از هم تفکیک شدند. نمونه‌های جمع‌آوری‌شده شست‌وشو داده شده و بعد از حذف کامل آب، قسمت‌های مختلف دراتاق گرم در حدود ۳۰ درجه سانتی‌گراد، تاریکی و با تهویه مناسب خشک شدند. عصاره‌گیری به روش سوکسوله انجام شد سپس عصاره با استفاده از دستگاه تقطیر در خلأ دوار (Rotary Evaporate) تغلیظ شده و در پلیت‌های استریل دربسته و درون یخچال به دور از گرما و نور نگهداری شد تا زمان انجام آزمایش‌های کشت سلولی فرا برسد (Niazi, 2017).

کشت سلول

سلول‌های هلا (NCBI code 115) و هک (NCBI code 630) از انستیتو پاستور ایران خریداری شد و در فلاسک‌های کشت سلولی cm^2 ۲۵ از پاساژهای سلولی در محیط کشت RPMI برای سلول‌های سرطانی هلا و محیط DMEM برای سلول‌های HEK با ۱۰ درصد سرم جنین گاوی و آنتی‌بیوتیک (۱٪پنی سیلین– استرپتومایسین) در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و رطوبت کافی و میزان ۵ درصد دی‌اکسیدکربن استفاده شد. پس از پر شدن بستر فلاسک از سلول‌ها به میزان ۷۰٪ با استفاده از تریپسین-EDTA سلول‌ها از بستر جدا شده و شمارش آنها با لام نئوبار و رنگ‌آمیزی تریپان بلو انجام شد. به هر چاهک پلیت‌های ۹۶ خانه کشت تعداد ۵×۱۰^{۳}cell/well افزوده شد. پس از ۲۴ ساعت مایع رویی خالی شده و عصاره به آن اضافه شد. غلظت‌های مختلف عصاره حین اضافه‌کردن به میکروپلیت ساخته شدند. در هر پلیت یک ردیف چهارتایی غلظت صفر اسانس به‌عنوان کنترل منفی و محیط کشت خالی بدون سلول به‌عنوان بلنک قرار داده شد. به‌علاوه، یک ردیف چهارتایی نیز کلشی سین به‌عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد (Nasri, 2018).

www.SID.ir

Archive of SID

تست MTT

برای بررسی زنده‌بودن سلول‌ها از تست MTT استفاده شد. به این منظور پس از انکوباسیون سلول‌های هلا و هک با غلظت‌های ۱۰۰۰، ۲۰۰، ۱۵۰، ۱۰۰، ۵۰، ۱۰، ۱، ۰/۱ میکروگرم در میلی‌لیتر عصاره اتانولی عنصل کشت داده شدند. انتخاب غلظت‌ها بر پایه پژوهش‌های پیشین و میزان IC_{50} به‌دست‌آمده روی سلول‌های سرطانی هلا بود. طول مدت زمان تیمار سلولی با ماده مداخله شامل ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بوده است. برای انجام تست MTT، 5mg/ml از پودر MTT توسط محلول PBS رقیق شد و سپس با فیلتر استریل شد، ۲۰ میکرولیتر از آن به پلیت‌ها اضافه گردید و در انکوباتور CO_2دار قرار داده شدند. پس از گذشت ۴ ساعت، پلیت‌ها از انکوباتور خارج شده، محیط حاوی MTT خارج گردیده و به هر خانه مقدار ۲۰۰ میکرولیتر DMSO اضافه شد. بعد از حدود ۱۰ دقیقه توسط دستگاه Elisa Reader در طول موج ۶۳۰ نانومتر خوانده شد و OD[1] (جذب نوری) به‌دست آمد (Shams, 2017). برای اطمینان از صحت داده‌ها آزمایش در چهار نوبت تکرار گردید و میانگین گرفته شد. درصد سلول‌های زنده به روش زیر محاسبه گردید:

= درصد مهار سلول‌ها
۱۰۰×[(OD سلول‌های کنترل / OD سلول‌های مجاورشده باترکیب سیتوتوکسیک)− ۱]
درصد مهار سلول‌ها − ۱۰۰ = درصد سلول‌های زنده

آنالیز آماری

داده‌های حاصل از زنده‌مانی سلول‌ها بر اساس mean±S.D محاسبه شد و برای تأیید اختلاف بین گروه‌های تست و گروه کنترل از آزمون آماری آنووای یک طرفه و برای رسم نمودارها و محاسبه IC_{50} و همچنین آزمون آماری از نرم‌افزار Excel استفاده شد. سطح معنی‌داری $p\leq ۰/۰۵$ در نظر گرفته شد.

1. Optical Density

نتایج

بررسی تأثیر عصاره اتانولی ریشه عنصل در مدت ۲۴ ساعت بر سلول‌های هلا در مقایسه با سلول‌های هک

بررسی تأثیر عصاره اتانولی عنصل در مدت ۲۴ ساعت در مقایسه با گروه کنترل نشان می‌دهد که عصاره عنصل درصد زنده‌مانی سلول‌های هلا را در تمام دوزها کاهش داده است ($p<۰/۰۵$). در مقایسه با گروه دریافت‌کننده کلشی سین نیز تفاوت معنی‌دار با هیچ کدام از گروه‌ها وجود نداشته است عصاره عنصل تأثیر معنی‌داری بر زنده‌مانی سلول‌های هک نداشت (نمودار ۱).

بررسی تأثیر عصاره اتانولی ریشه عنصل در مدت ۴۸ ساعت بر سلول‌های هلا در مقایسه با سلول‌های هک

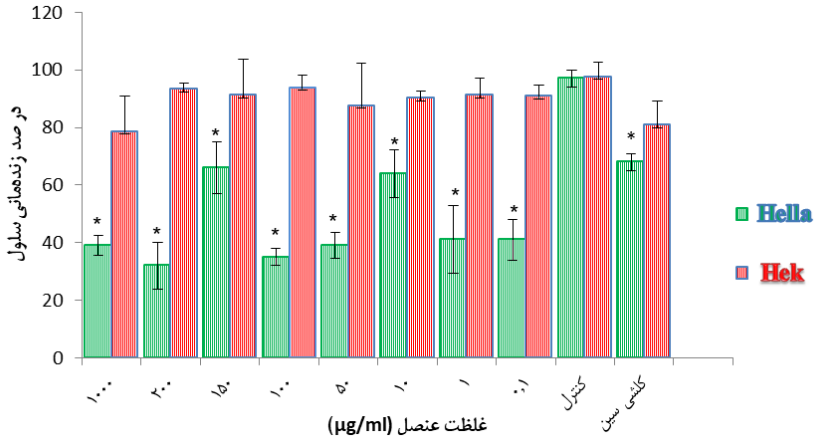
بررسی تأثیر عصاره اتانولی عنصل در مدت ۴۸ ساعت در مقایسه با گروه کنترل نشان می‌دهد که عصاره عنصل درصد زنده‌مانی سلول‌های هلا را در تمام دوزها کاهش داده است ($p<۰/۰۵$). در مقایسه با گروه دریافت‌کننده کلشی سین نیز تفاوت معنی‌دار با دو گروه (µg/ml) ۵۰، ۱۰۰ و ۱۰۰۰ وجود دارد. عصاره عنصل تأثیر معنی‌داری بر زنده‌مانی سلول‌های هک نداشت. گروه کلشی سین تفاوت معنی‌دار با گروه کنترل نشان داد ($p<۰/۰۵$) (نمودار ۲).

بررسی تأثیر عصاره اتانولی ریشه عنصل در مدت ۷۲ ساعت بر سلول‌های هلا در مقایسه با سلول‌های هک

بررسی تأثیر عصاره اتانولی عنصل در مدت ۷۲ ساعت در مقایسه با گروه کنترل نشان می‌دهد که عصاره عنصل درصد زنده‌مانی سلول‌های هلا را در تمام دوزها کاهش داده است ($p<۰/۰۵$). در مقایسه با گروه دریافت‌کننده کلشی‌سین تفاوت معنی‌داری با گروه‌های دریافت‌کننده عصاره وجود ندارد. عصاره عنصل تأثیر معنی‌داری بر زنده‌مانی سلول‌های هک نداشت. گروه کلشی سین تفاوت معنی‌دار با گروه کنترل نشان داد ($p<۰/۰۵$) (نمودار ۳).

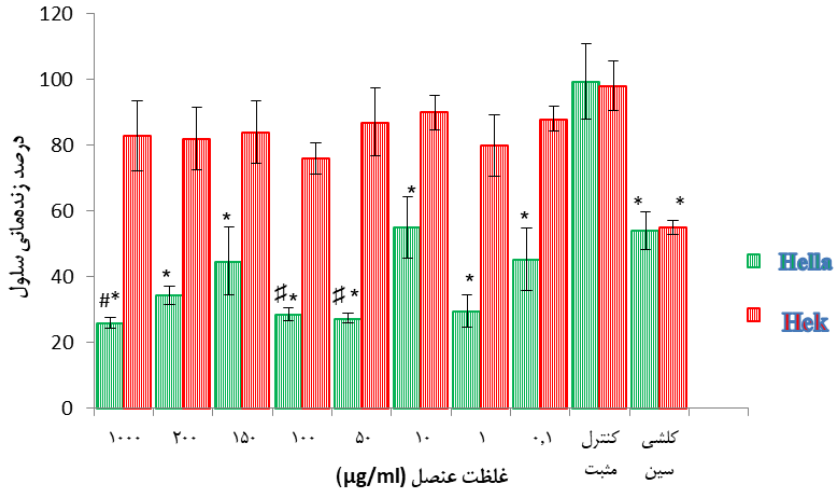
www.SID.ir

Archive of SID



نمودار ۱. درصد زنده‌مانی سلول‌های Hela و Hek پس از ۲۴ ساعت مجاورت با مقادیر مختلف عصاره اتانولی عنصل

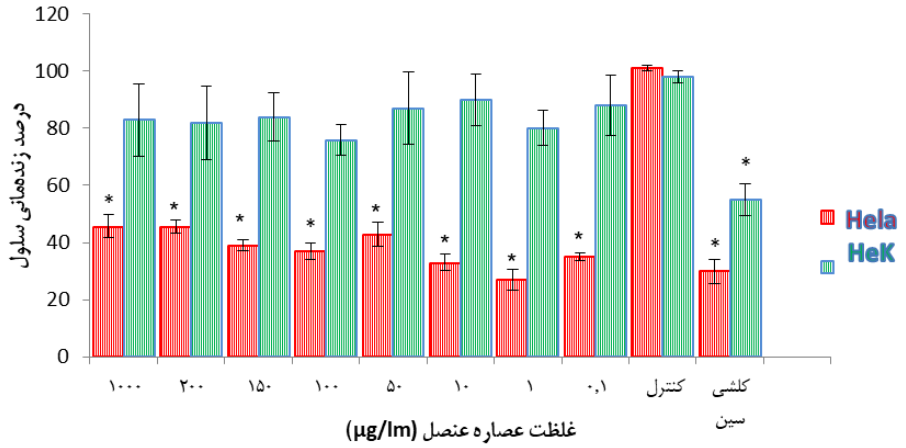
علامت * بیانگر $p< ۰/۰۵$ نسبت به گروه کنترل می‌باشد.



نمودار ۲. درصد زنده‌مانی سلول‌های Hela و Hek پس از ۴۸ ساعت مجاورت با مقادیر مختلف عصاره اتانولی عنصل

علامت * بیانگر $p<۰/۰۵$ نسبت به گروه کنترل می‌باشد.

علامت # بیانگر $p<۰/۰۵$ نسبت به گروه کلشی سین می‌باشد.



نمودار ۳. درصد زنده‌مانی سلول‌های Hela و Hek پس از ۷۲ ساعت مجاورت با مقادیر مختلف عصاره اتانولی عنصل

علامت * بیانگر $p<۰/۰۵$ نسبت به گروه کنترل می‌باشد.

www.SID.ir

Archive of SID

بحث و نتیجه‌گیری

بررسی تأثیر عصاره اتانولی عنصل در مقایسه با گروه کنترل نشان می‌دهد که عصاره عنصل درصد زنده‌مانی سلول‌های هلا را در تمام دوزها و در مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت کاهش داده است ($p<۰/۰۵$) (نمودارهای ۱، ۲ و ۳).

عنصل واجد گلوکوسیلارن آ[۱] (سیلارنین+ رامنوز+ ۲ گلوکز)، سیلارن آ[۲] (سیلارنین+ رامنوز+ گلوکز)، پروسیلاریدین آ[۳] (سیلارنین+ رامنوز)، سیلاریدین آ، سیلیگلاکوزید[۴]، سیلیفائوزید[۵]، گلوکوسیلیفائوزید[۶]، سیلیکوئلوزید[۷]، سیلاروزوید[۸]، سیلیکریپتوزئد[۹] است. فلاوونوئیدهای (دی هیدروکوئرسیتین)[۱۰]، دی هیدروکوئرسیتین- ۴′- مونوگلوکوزید[۱۱]، ایزواورینتین[۱۲]، اورینتین[۱۳]، کوئرسیتین، اسکوپارین[۱۴]، تاکسی فولین[۱۵]، ویتکسین) و استیگما سترول نیز گزارش شده است. فیتواسترول و اگزالات کلسیم نیز موجودند (Duke, 2007).

همچنین پلی‌گلیکوزیدهای کامپفرول به‌همراه C- گلیکوزیدهایی مانند ویتکسین و ایزوویتکسین[۱۶] در عنصل یافت می‌شود (Evans, 2002).

پیاز عنصل حاوی یک فروکتان مشابه اینولین به نام سینسترین می‌باشد. فروکتان مزبور به‌طور عمده از واحدهای بتا- دی- فروکتوفورانوزیل تشکیل شده است. همچنین بلورهای اگزالات کلسیم، گلوکوگالاکتان‌ها نیز در آن یافت می‌شود. مقادیر جزئی آنتوسیانین‌ها نیز وجود دارد (Duke, 2007). فلاوونوئیدها از سرطان جلوگیری می‌کنند که توسط مکانیزم‌های متفاوتی این اثر را دارند از جمله توقف سیکل سلولی، آپوپتوز و عمل آنتی‌اکسیدانتی. کوئرسیتین از آنتی‌اکسیدانت‌های قوی است. به‌علاوه، کوئرسیتین یک اثر پرو- آپویتوتیک مستقیم در سلول‌های توموری دارد و می‌تواند رشد چند رده سلول سرطانی انسان را در فازهای متفاوت سیکل سلولی مهار کند ولی تقریباً فاقد هر نوع اثر آسیب‌رسان بر سلول‌های سالم است (Gibellini, 2011).

گلیکوزیدهای سیلارن آ و پروسیلاریدین دارای اثر آنتی‌توموری می‌باشند. مشخص شده است که گلیکوزیدها لیگاند پمپ Na^+/K^+ ATPase بوده که به‌عنوان یک داروی محتمل در درمان سرطان می‌باشند. به‌علاوه، اثرات آنتی‌توموری آنها می‌تواند از طریق فعال‌کردن پاسخ‌های ایمنی اختصاصی مربوط به تومور باشد (Zanchett Schneider, 2017).

فلاوونوئید دی هیدروکوئرسیتین اثر درمانی در سرطان دارد که از طریق فعال‌ساختن اجزای پاسخ‌دهنده آنتی‌اکسیدانت و سم‌زدایی آنزیم‌های فاز ۲، مهار سیتوکروم P450 و سنتز اسیدهای چرب آزاد در مهار کارسینوژنز نقش دارد (Weidmann, 2012). از طرف دیگر، مشخص شده است که دی‌هیدروکوئرسیتین از طریق تأثیر بر سیکل سلولی و تنظیم‌کننده‌های سیکل سلولی سبب پسرفت تومور شود (Razak, 2018).

با توجه به نتایج پژوهش حاضر عصاره اتانولی ریشه عنصل دارای اثر ضدسرطانی قوی بر رده سلولی هلا می‌باشد که احتمالاً به‌دلیل وجود فلاوونوئیدها و گلیکوزیدهای موجود در آن می‌باشد.

سپاسگزاری

پژوهش حاضر حاصل طرح پژوهشی است که در معاونت پژوهشی دانشگاه پیام نور با شماره ۱۰۰۲۴۵/۲۸/د/۱۴۳ به تاریخ ۹۱/۴/۱۰ تصویب شده است.

1. Gluco scillaren A
2. Sillaren A
3. Proscillaridin A
4. Scilliglaucoside
5. Scilliphaeoside
6. Gluco Scilliphaeoside
7. Scillicoeloside
8. Scillazuroside
9. Sillicryptoside
10. Dihydroquercetin
11. Dihydroquercitin-4' monoglucoside
12. Isoorientin
13. Orientin
14. Scoparin
15. Taxifolin
16. Isovitexin

www.SID.ir

Archive of SID

REFERENCES

Akbarzadeh Pasha, H. (2012). Clinical culture and herbal medicines. Tehran, Golban Nashr; 182.

Duke, J. (2007). Herb plants culture. Translated by MohagheghZadeh A., Amozgar Z., Shams Ardekani M.R. Tehran: Rahe Kamal; 946-48.

Evans, W.C. (2002). Trease and Evans pharmacognosy. Translated by Afsharipour S. Esfahan: Esfahan Univ Med Sci; 254-256

Gibellini, L.; Pinti, M.; Nasi, M.; Montagna, J.P.; De Biasi, S.; Roat, E. (2011). Quercetin and cancer chemoprevention. Evid Based Complement Alternat Med 2011; 591356.

Jun-Xiao, Z.; Hong, W.; Chun-Yan, H.; Wei-Qiang, W.; Guang-Hua, C.; Li-Hui, W.; Liu, C. (2018). Anticancer activity of 23,24-dihydrocucurbitacin B against the hela human cervical cell line is due to apoptosis and G2/M cell cycle arrest. Experimental and Therapeutic Medicine; 15(3): 2575-2582.

Kooti, W.; Servatyari, K.; Behzadifar, M.; Asadi-Samani, M.; Sadeghi, F.; Nouri, B.; Zare Marzouni, H. (2017). Effective medicinal plant in cancer treatment, Part2: Review study. J Evid Based Complementary Altern Med; 22(4): 982-995.

Mozaffarian, V. (2012). Identification of medicinal and aromatic plants of Iran, Tehran: Farhange Moaser; 636-638.

Niazi, F.; Shahrokhabadi, K.; Tehranipour, M. (2017). The effects of Total extract Ocimumbasilicumon VEGF gene expression changes in chick embryo choioallantoic membrane angiogenesis. JSSU; 25(8):620-640.

Rafieian-Kopaei, M.; Nasri, H. (2015).On the occasion of World Cancer Day 2015: The possibility of cancer prevention or treatment with antioxidants: the ongoing cancer prevention researches. Int J Prev Med; 6: 108.

Razak, S.; Afsar, T.; Ullah, A.; Almajwal, A.; Alkholief, M.; Alshamsan, A.; Jahan, S. (2018). Taxifolin, a natural flavonoid interacts with cell cycle regulators causes cell cycle arrest causes tumor regression by activating Wnt/β-catenin signaling pathway. BMC cancer; 18: 1043

Nasri, S. (2017). Cytotoxity effect of Huthemia persica on Hela cancer cells in comparison to Hek. Experimental Animal Biology Journal; 7(1): 81-87.

Shams, E.; Javani Jouni, F.; Zafari, J.; Monajemi, R.; Abdolmaleki, P. (2017). Effect of static magnetic field on the rate of proliferation and viability in Hela cancer cells and normal fibroblasts. Horizon Med Sci.; 23(1): 7-12.

Vu, M.; Awolude, O.A.; Chuang, L. (2018). Cervical cancer worldwide. Curr Probl Cancer; 42(5): 457-465.

Weidmann, A.E. (2012). Dihydroquercetin: More than just an impurity? Eur J Pharmacol; 684(1-3): 19-26

Zanchett Schneider, N.F.; Cerella, C.; Oliveira Simoes, C.M.; Diederich, M. (2017). Anticancer and immunogenic properties of cardiac glycosides. Molecules; 22(11): 1932

Zargari, A. (2011). Medicinal plants, Tehran, Tehran University; 4: 658-7.

www.SID.ir