مقاله پژوهشی

مجله سلول و بافت (علمی - پژوهشی)
جلد ۵، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۳، ۲۶۱-۲۵۳

بررسی اثرسیتوتوکسیسیتی عصاره تام آبی و الکلی موسیر (Allium ascalonicum) بر رده سلولی 4T1 سرطان پستان موش و سلول‌های سرطان القا شده توسط DMBA در موش صحرایی و مقایسه آن با داروهای شیمی درمانی تاکسول و کربوپلاتین

احمد همتا .Ph.D*، سید محمد علی شریعت زاده .Ph.D، دکتر ملک سلیمانی .Ph.D، مریم تجلی اردکانی .MSc

-دانشگاه اراک دانشکده علوم پایه گروه زیست شناسی کدپستی ۸۳۴۹-۸-۳۸۱۵۶

* پست الکترونیک نویسنده مسئول: a-hamta@araku.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۶/۲۶ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۲/۲۸

چکیده

هدف: مطالعه حاضر با هدف بررسی اثر عصاره آبی و الکلی موسیر بر سلول‌های سرطان پستان و مقایسه آن با داروهای کربوپلاتین و تاکسول انجام شده است.

مواد و روش‌ها: ابتدا عصاره آبی و الکلی موسیر و غلظت‌های متفاوت داروهای تاکسول و کربوپلاتین تهیه شد. سپس با استفاده از روش‌های تریپان بلو و MTT، سیتوتوکسیسیتی آن‌ها در غلظت و زمان‌های مختلف بر روی سلول‌های سرطان پستان بررسی گردید و توسط رنگ‌آمیزی فلورسانت هوخست و پروپیدیوم یدید تغییرات مورفولوژیک و آپوپتوزیس در سلول‌ها بررسی شد. داده‌ها با روش آماری آنالیز واریانس یک طرفه تجزیه و تحلیل و تفاوت میانگین‌ها درسطح P< ۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج: عصاره موسیر در دامنه غلظتی (۰/۰۱ تا ۰/۰۵ گرم بر لیتر) اثر مهارکنندگی بر روی سلول‌های سرطانی داشت و تاثیر عصاره الکلی بیشتر از عصاره آبی بود. همچنین تاثیر همزمان عصاره با کربوپلاتین، باعث افزایش سیتوتوکسیسیتی کربوپلاتین شده در حالی‌که ترکیب عصاره آبی و تاکسول، باعث کاهش سایتوتوکسیسیتی تاکسول شده است.

نتیجه‌گیری: این مطالعه نشان داد که عصاره آبی و الکلی موسیر دارای اثر سیتوتوکسیسیتی بر روی سلول‌های سرطان پستان موش صحرایی می‌باشد و ترکیب عصاره آبی و الکلی با کربوپلاتین و همچنین ترکیب عصاره الکلی با تاکسول باعث افزایش سیتوتوکسیسیتی این داروها می‌شود. بدین‌ترتیب این گیاه می‌تواند به‌عنوان یک گیاه دارویی بر علیه سرطان پستان موضوع تحقیقات بیشتر قرار گیرد.

واژگان کلیدی: سیتوتوکسیسیتی، عصاره موسیر، سرطان پستان، DMBA، تاکسول، کربوپلاتین

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

سرطان همواره یکی از مشکلات عمده جوامع انسانی محسوب می‌شود . از بین سرطان‌ها، سرطان پستان شایع‌ترین سرطان در میان زنان می‌باشد (۱و۲) و اغلب موارد سرطان‌های پستان منجر به مرگ، از نوع کارسینومای مجرایی مهاجم است (۳). عوامل متعددی فرد را در معرض ابتلا به سرطان قرار می‌دهد که از بین آن‌ها می‌توان به تغییرات ژنتیکی، رژیم غذایی، شیردهی و فاکتورهای محیطی اشاره نمود. بالا بودن آمار مبتلایان به این نوع سرطان در کشورمان ضرورت انجام تحقیقات بیشتر برای پی بردن به مکانیسم‌های ایجاد سرطان و ابداع روش‌های درمانی موثرتر را آشکار می‌سازد. سرطان پستان را می‌توان در رت‌ها توسط انواع مختلفی از عوامل نظیر هورمون‌ها، پرتوهای یونیزان و مواد کارسینوژن ایجاد نمود اما یکی از پرکاربردترین روش‌های القا سرطان پستان در رت استفاده از نوعی ماده شیمیایی به‌نام ۷ و ۱۲ دی متیل بنزانتراسن می‌باشد که یک هیدروکربن آروماتیک چندحلقه‌ای است که به‌وفور در دود تنباکو یافت می‌شود (۴). از طرفی پس از سال‌ها پیشرفت در زمینه بهداشت هنوز انواع سرطان و از جمله سرطان پستان از مشکلات اساسی در اغلب کشورهاست (۵).

در این میان مصرف گسترده داروهای رایج ضدسرطان از قبیل تاکسان و آنتراسیکلین‌ها موجب ایجاد مقاومت‌های درمانی نیز می‌شود به‌طوری‌که سایر گزینه‌های درمانی را نیز محدود می‌کنند (۶).

مطالعات نشان می‌دهد که غذاها به‌خصوص غذاهای با منشا گیاهی، پتانسیل پیشگیری از حدود یک سوم سرطان‌ها را دارند (۷). انسان در طی سالیان متمادی به اثرات مختلف درمانی عصاره‌های گیاهی پی برده است. از مزیت‌های شناخته شده این عصاره‌ها عدم وجود عوارض جانبی خطرناک و گستردگی طیف اثر آن‌ها می‌باشد. از جمله این گیاهان می‌توان به اعضای گونه Allium (سیر و پیاز و موسیر) اشاره نمود (۸).

گیاه موسیر که گونه مهمی از جنس آلیوم (Allium) محسوب می‌گردد از دیرباز در بسیاری از کشورها از جمله ایران مصارف درمانی سنتی یا غذایی داشته است. این گیاه دارای خواص شناخته شده‌ای مثل اثر بر روی شاخص‌های هماتولوژیکی، پتانسیل آنتی اکسیدانتی، خواص ضد قارچ و ضد باکتریایی بوده که مورد مطالعه قرار گرفته است (۱۲-۹). علاوه بر این، ترکیب شیمیایی آن نشان می‌دهد که دارای ترکیبات زیادی مثل ارگانوسولفورها و پلی فنل‌ها بوده که بسیار مشابه ترکیبات موجود در گونه‌های هم خانواده آن می‌باشد (۱۵-۱۳). مطالعات قبلی در رابطه با اثرات ضد تکثیری و سایتوتوکسیک عصاره آبی و الکلی موسیر بر روی رده‌های سلولی سرطانی MCF-7،Hela و L-929 انجام شده است. نتایج آنها نشان می‌دهد عصاره آبی و الکلی موسیر اثرات سایتوتوکسیک مختلفی را اعمال می‌کند و IC50 عصاره برای هر رده سلولی متفاوت است (۱۶). در مطالعه حاضر اثر سایتوتوکسیسیتی عصاره آبی و الکلی موسیر بر روی رده سلولی 4T1 مورد مطالعه و بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

ابتدا رده سلولی 4T1 سرطان پستان موش از انستیتو پاستور ایران خریداری شد و برای تهیه سلول‌های القایی، پس از پایان دوره تیمار رت با DMBA- 7-12 (Dimethylbenz(a)anthracene) و رسیدن تومور به اندازه‌ی لازم، حیوان با رعایت اصول اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی توسط دی‌اتیل‌اتر بی‌هوش شد. سپس موهای ناحیه اطراف تومور با تیغ تراشیده شده و محل تشریح با استفاده از الکل ۷۰ درصد و ساولن رقیق شده استریل شد. پس از شکافتن قسمت مورد نظر تومور به‌طور کامل خارج و به زیر هود لامینار منتقل شد. از قسمت‌های داخلی‌تر تومور قطعاتی بریده شد و به فالکون‌های حاوی ۱۰ میلی‌لیتر (Salt Soution HBSS Hank's Balanced) استریل انتقال داده شد.

سپس نمونه‌ها از HBSS خارج شده و در پتری استریل قرار داده شد و به آن محیط کشت تازه افزوده شد. پس از جدا کردن خون و بافت اضافه، باقیمانده تومور با اسکالپل به ذرات بسیار ریز خرد شد (chopping) و سوسپانسیون حاصله چندین بار از سوزن سرنگ ۵ میلی‌لیتر عبور داده شد تا سلول‌ها به‌خوبی از بافت جدا شوند، سپس مخلوط به‌دست آمده به فالکون ۱۵ میلی‌لیتر منتقل شده و با دور ۲۰۰۰rpm به‌مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد، پس از آن محلول رویی دورریخته شد. به‌رسوب ته فالکون ۵ میلی‌لیتر محیط کشت (DMEM) Dulbecco's Modification of Eagles Medium کامل حاوی ۱۰ درصد FBS (Fetal bovine serum) اضافه گشت. پس از پیپتاژ کردن، ۱/۵ تا ۲ میلی‌لیتر از مخلوط همگن شده به فلاسک‌های T25 منتقل شده و حجم محیط داخل فلاسک به ۵ میلی‌لیتر رسانده شد. سپس فلاسک داخل انکوباتور CO_2 دار قرار داده

Archive of SID

www.SID.ir

شد. پس از گذشت ۲۴ ساعت محیط رویی فلاسک تخلیه و ۵ میلی‌لیتر محیط کشت تازه به فلاسک افزوده گشت.

بعد از تهیه موسیر و خشک شدن، آن‌را پودر نموده و سه مرتبه با اتانول ۹۵ درصد (به نسبت ۱به ۵) برای مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق عصاره گیری می‌شود. سپس فیلتر شده و پس از آن حلال جدا و عصاره تغلیظ گشت (۱۷). برای تهیه عصاره آبی موسیر، حدود ۱۰۰ گرم از پیازچه‌های سالم گیاه موسیر انتخاب و پوسته خارجی آن‌ها جدا شد. سپس پیازچه در یک دستگاه آسیاب برقی به‌صورت ماده نرم درآمده و پس از له شدن کامل بافت موسیر، به نسبت ۱ به ۱ آب دیونیزه استریل مخلوط و با همزن به آرامی همزده شد. پس از عصاره گیری کامل عصاره جهت صاف شدن تحت شرایط ۱۴۰۰۰دور در دقیقه به‌مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شده و مایع رویی جدا شد و با استفاده از دستگاه فریز درایر به‌صورت پودر خشک درآمده و در فریزر نگه‌داری شد و برای هر بار استفاده، مقدار مورد نیاز از آن وزن و در محیط کشت حل گردید (۱۸). برای سنجش قدرت زیستی سلول‌های تیمار شده با تاکسول،کربوپلاتین، عصاره آبی و الکلی موسیر، ابتدا سلول‌ها با تریپسین جدا و پس از سانتریفوژ، رسوب سلولی با محیط کشت تازه به حجم یک میلی‌لیتر رسید و سپس مقدار ۳۰۰ میکرولیتر ازسوسپانسیون سلولی حاصل با حجم مساوی از تریپان بلو مخلوط و به‌مدت ۲ دقیقه در انکوباتور قرار داده شد. تعداد سلول‌های زنده و مرده با لام هموسایتومتر بررسی و به‌صورت درصد بیان شد. در این روش، سلول‌های مرده به‌علت نفوذ پذیری به تریپان بلو، به‌رنگ آبی دیده شد. علاوه بر روش تریپان بلو برای بررسی قدرت زیستی سلول‌های تیمار شده از روش (۳-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide) MTT assay نیز استفاده شد. در این روش آنزیم سوکسینات دهیدروژناز در میتوکندری توانایی احیای رنگ زرد دی متیل تیازول را به بلورهای ارغوانی و نامحلول فورمازان دارد. سلول‌های سرطانی به‌مدت ۲۴ ساعت در پلیت ۹۶ خانه کشت و پس از چسبیدن این سلول‌ها به کف پلیت ۹۶ خانه با غلظت‌های مذکور از تاکسول، کربوپلاتین، عصاره آبی و الکلی موسیر تیمار و پس از زمان‌های ۴۸ و ۷۲ ساعت ۱۰ میکرولیتر MTT به‌ازای ۱۰۰ میکرولیتر از محیط کشت به چاهک‌ها اضافه و به‌مدت ۴ ساعت انکوبه شد سپس بلورهای فورمازان حاصل در DMSO حل و جذب آن توسط (enzyme-linked immunosorbent) ELISA reader (Model Bio-Rad 680) در طول موج ۵۰۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. سلول‌های چسبیده به پلیت ۲۴ خانه با دوز ۰/۱ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به‌ترتیب تاکسول و کربوپلاتین و ۰/۰۴ و ۰/۰۳ گرم بر لیتر برای عصاره آبی و الکلی به‌مدت ۴۸ ساعت تیمار شد (با توجه به نتایج آماری آزمون‌های تریپان بلو و MTT در مرحله دوزیابی و مدت زمان ۴۸ ساعت برای بررسی‌های مورفولوژی انتخاب شد). رنگ‌آمیزی کروماتین با هوخست برای مطالعه مورفولوژی هسته و پروپیدیم آیوداید همراه با هوخست برای تمایز بین سلول مرده و زنده توسط میکروسکوپ فلورسنس (Olympus, Japan) انجام گردید.

بررسی آپوپتوزیس و تغییرات مورفولوژیک سلول: در این مطالعه تغییرات آپوپتوزیس و مورفولوژیک سلول‌ها با استفاده از رنگ‌آمیزی فلورسانت هوخست و پروپیدیوم یدید بررسی شد. جهت بررسی وقوع مرگ سلولی و تشخیص آنکه مرگ سلولی از نوع آپوپتوزیس می‌باشد، از میکروسکوپ فلورسنس و رنگ‌آمیزی هوخست ۳۳۲۸۵ استفاده شد. در این رنگ‌آمیزی سلول‌های طبیعی به‌صورت رنگ آبی یکنواخت دیده می‌شوند، در صورتی‌که هسته سلول‌های دستخوش آپوپتوزیس به‌واسطه متراکم شدن کروماتین و قطعه قطعه شدن هسته، به‌طور غیر منظم و به‌صورت نقاط آبی درخشان قابل مشاهده خواهد بود. رنگ‌آمیزی با پروپیدیوم یدید نیز تخریب غشا و چروکیدگی سیتوپلاسم را نشان خواهد داد.

آنالیز آماری: با استفاده از نرم افزار آماری SPSS آنالیز واریانس یک‌طرفه ، آزمون Tukey بر روی داده‌ها انجام شد و $P<0/05$ معنی‌دار تلقی گردید.

نتایج

در این پژوهش به‌منظور یافتن غلظتی از عصاره و دارو که بتواند زیستایی سلول‌ها را تا ۵۰ درصد کاهش دهد، دوره تیمار ۴۸ و ۷۲ ساعته و محدوده‌های دوز از عصاره‌ها و داروها با توجه به مطالعات مشابه انتخاب شد (جدول ۱). بعد از انجام آزمایش‌ها، داده‌های به‌دست آمده از این آزمون‌ها نشان داد که عصاره آبی و الکلی موسیر، تاکسول و کربوپلاتین موجب کاهش چشم‌گیر توانایی زیستی سلول‌های سرطانی شدند.

Archive of SID

www.SID.ir

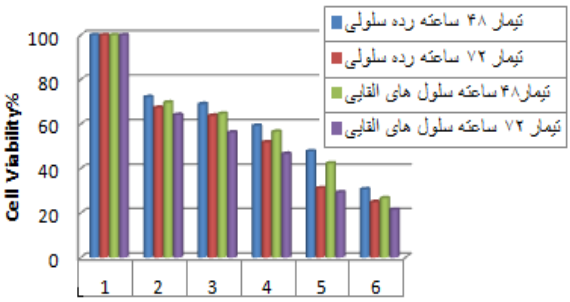
جدول۱: غلظت‌های مختلف تاکسول، کربوپلاتین، عصاره آبی و الکلی موسیر و غلظت‌های همزمان

- غلظت‌های مختلف عصاره آبی موسیر (۰/۰۱، ۰/۰۲، ۰/۰۳، ۰/۰۴، ۰/۰۵ گرم بر لیتر)
- غلظت‌های مختلف عصاره الکلی (۰/۰۱، ۰/۰۲، ۰/۰۳، ۰/۰۴، ۰/۰۵ گرم بر لیتر)
- غلظت‌های مختلف کربوپلاتین (۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ۴۰۰، ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر)
- ترکیب کربوپلاتین و عصاره: (۰/۰۱+۰/۰۱=۱۰۰)، (۰/۰۲+۰/۰۲=۲۰۰)،(۰/۰۳+۰/۰۳=۳۰۰)، (۰/۰۴+۰/۰۴=۴۰۰)، (۰/۰۵+۰/۰۵=۵۰۰)
- غلظت‌های مختلف تاکسول: (۰/۰۰۱، ۰/۰۱، ۰، ۱، ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر)
- ترکیب تاکسول و عصاره: (۰/۰۱+۰/۰۰۱=۱)، (۰/۰۲+۰/۰۱=۲)، (۰/۰۳+۰/۱=۳)، (۰/۰۴+۱=۴)، (۰/۰۵+۱۰=۵)

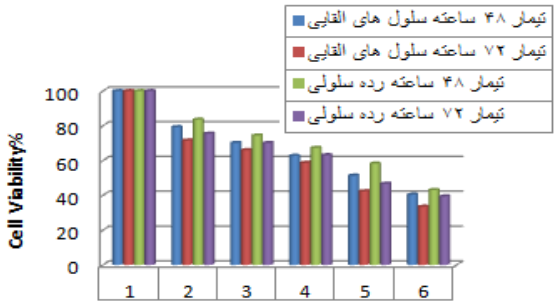
در آزمون‌های بعدی تاکسول و کربوپلاتین را به‌صورت همزمان با عصاره آبی و الکلی گیاه موسیر به‌صورت تیمارهای ۴۸ و ۷۲ ساعته بر روی سلول‌ها اثر داده (نمودار ۱) و مشاهده شد که تاثیر همزمان عصاره الکلی موسیر با داروی تاکسول به‌صورت وابسته به دوز باعث مهار بیشتر این سلول‌ها می‌شود و این عصاره باعث افزایش تاثیر تاکسول بر روی سلول‌های سرطانی می‌گردد.

در حالی‌که تاثیر همزمان عصاره آبی موسیر و تاکسول باعث کاهش سایتوتوکسیسیتی تاکسول شده و در تاثیر همزمان عصاره آبی و الکلی موسیر با کربوپلاتین، تاثیر همزمان این عصاره‌ها با کربوپلاتین، باعث افزایش سایتوتوکسیسیتی کربوپلاتین شده است.

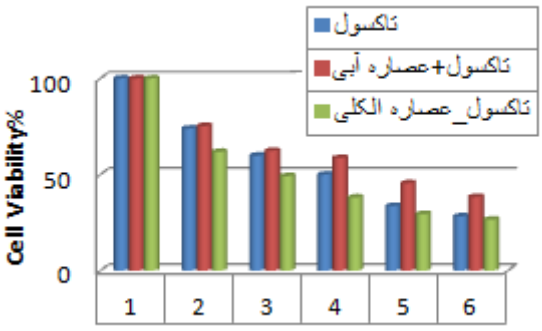
نمودار۱: مقایسه میانگین توانایی زیستی رده سلولی 4T1 و سلول‌های القایی سرطان پستان پس از تیمار با غلظت‌های مختلف عصاره آبی و الکلی، تاکسول،کربوپلاتین، تاثیر همزمان تاکسول و کربوپلاتین با عصاره‌های آبی و الکلی



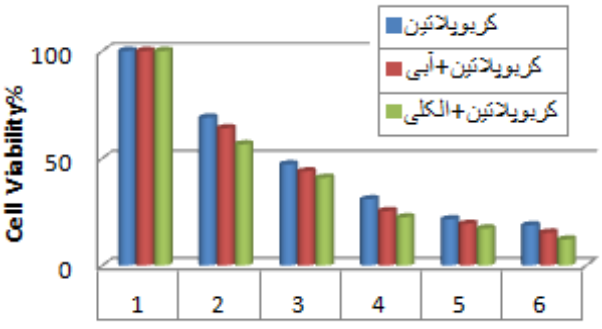
۱-۱: مقایسه ی میانگین درصد حیات سلول های القایی با DMBA و سلول های رده 4T1 در تیمار با عصاره الکلی موسیر



۱-۲: مقایسه ی میانگین درصد حیات سلول ها سلول های القایی با DMBA و سلول های رده 4T1 درتیمار با عصاره آبی موسیر



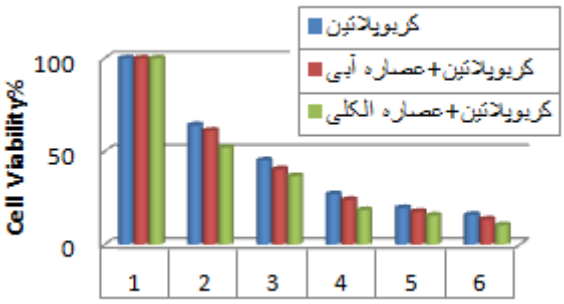
۱-۳: تیمار ۴۸ ساعته در رده سلولی 4T1



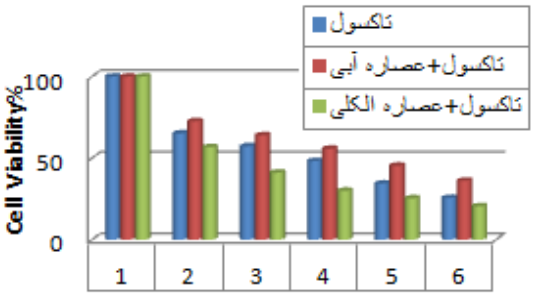
۱-۴: تیمار ۴۸ ساعته در رده سلولی 4T1

Archive of SID

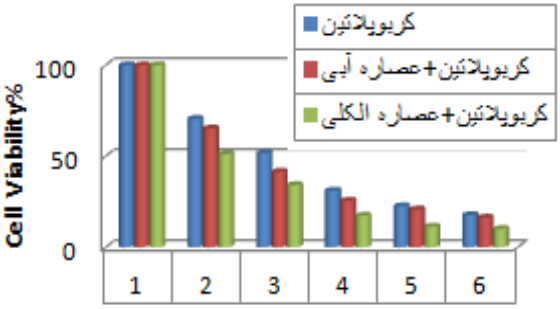
www.SID.ir



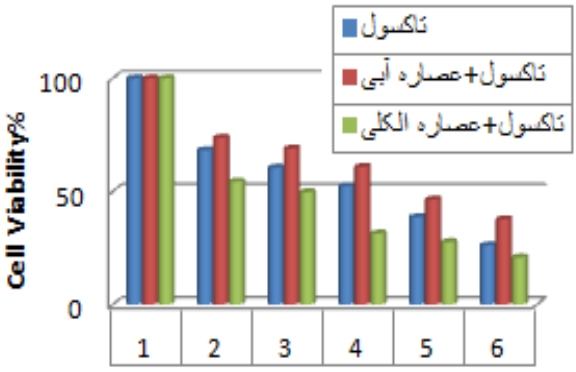
۱-۵: تیمار ۴۸ساعته در سلول های القایی با DMBA



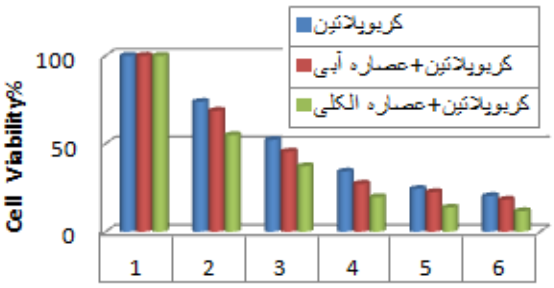
۱-۶: تیمار ۴۸ساعته در سلول های القایی با DMBA



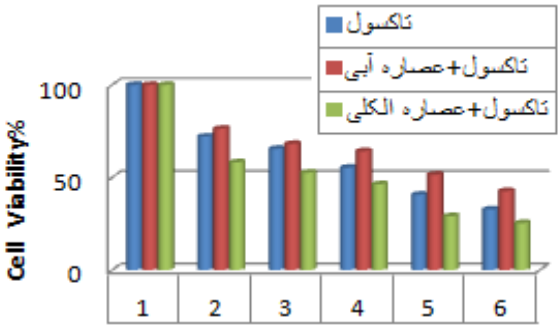
۱-۷: تیمار ۷۲ ساعته در سلول های القایی با DMBA



۱-۸: تیمار ۷۲ ساعته در سلول های القایی با DMBA



۱-۹: تیمار۷۲ ساعته در سلول های القایی با DMBA

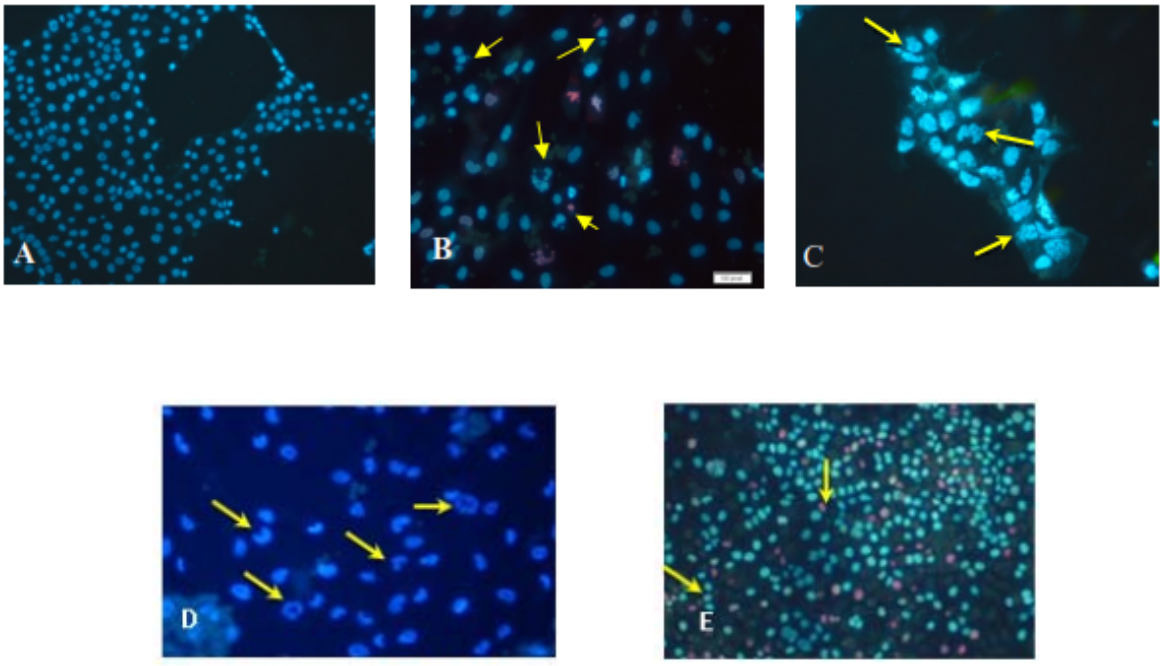


۱-۱۰: تیمار ۷۲ ساعته در رده سلولی 4T1

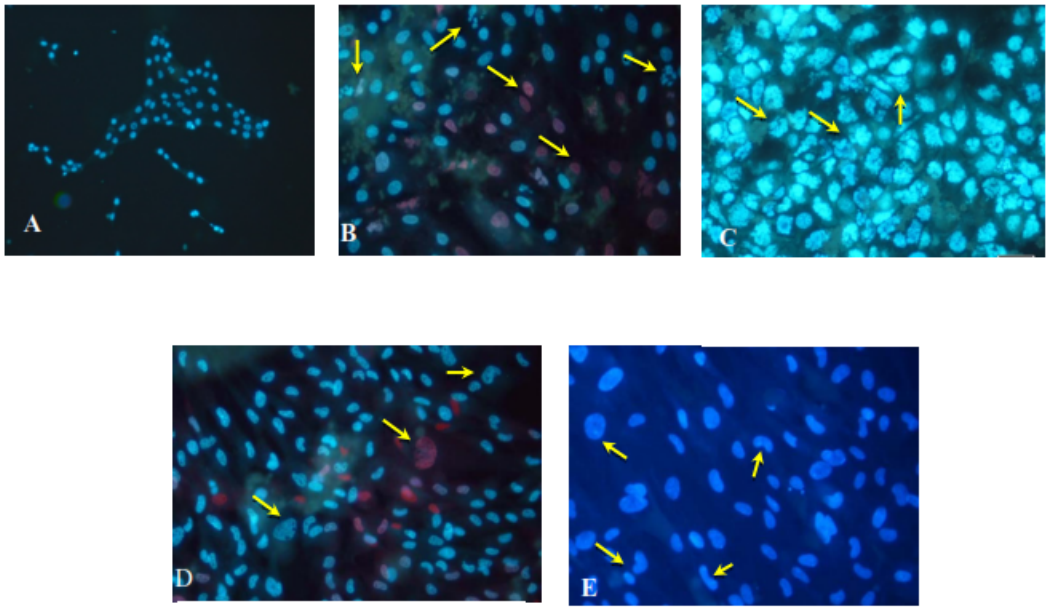
جهت بررسی مورفولوژی سلولی، سلول‌ها قبل و بعد از تیمار با عصاره‌ها به‌دقت توسط میکروسکوپ اینورت مورد بررسی قرار گرفتند. سلول‌ها قبل از تیمار با عصاره‌ها به‌صورت سالم و یکپارچه با هسته کاملا طبیعی ظاهر شدند. در این سلول‌ها پس از تیمار با غلظت‌های بالاتر و رنگ‌آمیزی با پروپیدیوم یدید، غشا سیتوپلاسم در مقایسه با سلول‌های شاهد تخریب شده بودند و رنگ PI به‌درون سلول‌های آسیب دیده (تیمار شده با غلظت‌های مختلف عصاره) راه یافته و لذا هسته این سلول‌ها به‌رنگ قرمز رنگ‌آمیزی شدند. سلول‌های شاهد (شکل‌های ۱ و ۲، A) دارای غشا پلاسمایی سالم بوده و به‌رنگ فلورسنت پروپیدیوم پوداید PI غیر قابل نفوذ بودند (شکل‌های ۱ و ۲، B و E) و هسته سلول‌های تیمار شده در رنگ آمیزی با هوخست به‌صورت متراکم و قطعه قطعه مشاهده گردید (فلش‌ها هسته‌های تغییر یافته در تیمارهای مختلف را نشان می‌دهند (شکل‌های۱ و ۲، C و D).

تغییرات مرفولوژیک سلول‌ها پس از تیمار با عصاره و دارو ، در مدت زمان ۴۸ ساعت با استفاده از رنگ فلوروسنت هوخست شامل تغییر شکل هسته در مقایسه با گروه کنترل در زیر نشان داده شده است. (شکل‌های ۱و۲).

www.SID.ir



شکل ۱ : رنگ آمیزی فلورسنس سلول‌های سرطانی القایی با استفاده از DMBA برای مدت زمان ۴۸ ساعت (بزرگنمایی × ۴۰). فلش‌ها هسته سلول هـای تغییـر یافتـه و غشا سلولی آسیب دیده (هسته قرمز رنگ) بر اثر تیمار را نشان می‌دهند. A)نمونه شاهد، B) سلول های القایی DMBA تیمار شده با غلظت ۱۰۰میکرو گرم بـر میلـی‌لیتـر کربوپلاتین و رنگ آمیزی هم‌زمان هوخست و پروپیدیوم یوداید، C) سلول‌های القایی DMBA تیمار شده با غلظت ۰/۰۱ میکرو گرو بر میلی‌لیتر تاکسول، D) سلول هـای القایی DMBA تیمار شده با غلظت ۰/۰۳ گرم بر لیتر عصاره الکلی، E) سلول‌های القایی DMBA تیمار شده بـا غلظـت ۰/۰۴ گـرم بـر لیتـر عصـاره آبـی و رنـگ آمیـزی هم‌زمان هوخست و پروپیدیوم یوداید.



شکل ۲: بررسی تغییرات مورفولوژیک و آپوپتوزیس برای مدت زمان ۴۸ ساعت در رده سلولی 4T1 (بزرگنمایی ×۴۰). فلش‌هـا هسـته سـلول‌هـای تغییـر یافتـه و غشـا سلولی آسیب دیده (هسته قرمز رنگ) بر اثر تیمار را نشان می‌دهند. A) نمونه شاهد، B) سلول های 4T1 تیمار شده با غلظت۱۰۰ میکرو گرم بـر میلـی‌لیتـر کربـوپلاتین، C) سلول‌های 4T1 تیمار شده با غلظت ۰/۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر تاکسول، D) تیمار سلول‌های 4T1 با غلظت ۰/۰۴ گرم بر لیتر عصاره آبی، E) تیمـار سـلول‌هـای 4T1 با غلظت ۰/۰۳ گرم بر لیتر عصاره الکلی موسیر.

www.SID.ir

بحث

بررسی توانایی زیستی سلول‌های سرطانی با استفاده از دو آزمون تریپان بلو و MTT نشان داد که عصاره آبی و الکلی، تاکسول و کربوپلاتین موجب کاهش چشم‌گیر توانایی زیستی سلول‌های سرطانی شدند. نتایج به‌دست آمده از هر دو آزمون در یک راستا بوده و یکدیگر را تایید نمودند.

سایر مطالعاتی که پیش از این در رابطه با اثرات سایتوتوکسیک تاکسول، کربوپلاتین، عصاره‌ی آبی و الکلی موسیر صورت گرفته است نیز توانایی این ترکیبات در کاهش توانایی زیستی سلو ل‌های سرطانی را نشان داده‌اند. مشخص شده که تاکسول با توقف رونویسی DNA در مرحله G2/M تقسیم میتوز (۱۹) و کربوپلاتین با اتصال به DNA از طریق اتصالات عرضی بین رشته‌ای و تداخل با عمل‌کرد آن (۲۰) موجب مرگ سلول‌ها می‌شود. بررسی‌های صورت گرفته بر رده‌های سلولی U373 ، A549، PC-، PC-Sh، HeLa, MCF- 7, OVG-1,HT-29 Zd(۲۱) NUGC-3 ، SC-M1(۲۲) U937، SKOV3 (۲۳) OVCAR-3 و SK-OV-3 (۲۴) همگی سایتوتوکسیسیتی بالای تاکسول و کربوپلاتین را نشان داده‌اند.

مطالعاتی که تاکنون در رابطه با اثرات ضد تکثیری و سایتوتوکسیک عصاره آبی و الکلی موسیر برروی رده‌های سلولی سرطانی Hela,MCF-7 و L-929 صورت گرفته نشان می‌دهد که این عصاره بر روی رده‌های سلولی مختلف بسته به نوع سلول اثرات سایتوتوکسیک مختلفی اعمال می‌کند و IC50 عصاره برای هر رده سلولی متفاوت است (۱۶).

تجزیه شیمیایی عصاره‌ی موسیر نشان داده است که از نظر ترکیبات شیمیایی دارای دو ترکیب گوگردی آلیسین - آلیساتین ۱و۲، فلاونوئیدهایی از قبیل کوئرستین و ساپونین‌ها می‌باشد که بخشی از خواص ضد سرطانی آن نیز ناشی از وجود همین ترکیبات می‌باشد (۲۵).

هر چند که مکانیسم مهاری موسیر به‌خوبی روشن نیست، اما نتایج برخی مطالعات نشان داده است که کوئرستین موجود در آن، اثرات ضد تکثیری خود را از طریق افزایش القای p53 و کاهش پروتئین های آنتی‌آپوپتوزی Survivin و Bcl-2 اعمال می‌کند (۱۶) و همچنین آلیسین موجود در موسیر باعث تحریک تشکیل جسم آپوپتوتیک، توقف سیکل سلولی، متراکم شدن هسته، نردبانی شدن DNA و همچنین فعال شدن کاسپاز ۳ ، ۸ و ۹ می شود (۲۶). به‌هرحال نیاز به مطالعات بیشتر برای شناسایی اثر موسیر بر روی سلول‌های سرطانی ضروری به‌نظر می‌رسد.

در این مطالعه مشخص شد که تاکسول به‌صورت وابسته به غلظت دارای اثر مهاری بر روی سلول‌های سرطانی است ولی با افزایش تیمار از ۴۸ به ۷۲ ساعت، سایتوتوکسیسیتی تاکسول کاهش می‌یابد. اختلاف در نتایج مطالعه حاضر و تحقیق انجام شده بر روی سلول‌های سرطانی MCF-7، HeLa ، A549، U373، HT-29، OVG-1، PC-Sh و PC-Zd (۲۱)، ممکن است به‌دلیل اختلاف در نوع سلول و غلظت‌های تاکسول باشد.

بر اساس نتایج به‌دست آمده از دو آزمون رنگ آمیزی تریپان بلو و رنگ سنجی MTT مشخص شد که استفاده هم‌زمان تاکسول و عصاره آبی، باعث کاهش سایتوتوکسیسیتی تاکسول شده است در حالی‌که درمورد تاثیر همزمان تاکسول و عصاره الکلی این‌چنین نبوده است.

در طی یک بررسی نشان داده شد که فلاونوئید کوئرستین فعالیت تاکسول و نوکودازول را از طریق مداخله با سیکل سلولی مهار می‌کند (۲۷). بنابراین شاید بتوان یکی از دلایل کاهش اثر سمیت تاکسول توسط عصاره آبی موسیر را ناشی از وجود کوئرستین در این عصاره دانست. همچنین در این بررسی مشخص شد که با افزایش تیمار از ۴۸ به ۷۲ ساعت، سایتوتوکسیسیتی کربوپلاتین نیز کاهش می‌یابد و استفاده هم‌زمان کربوپلاتین و عصاره آبی والکلی، اثرات سایتوتوکسیک کربوپلاتین را در سطح معنی‌داری افزایش می‌دهد.

با این وجود انجام آزمایشات بیشتری جهت آنالیز ترکیبات شیمیایی موجود در هر یک از عصاره‌ها و نوع تاثیرشان بر سلول‌های سرطانی و برهم کنش آن‌ها با داروهایی نظیر تاکسول و کربوپلاتین مورد نیاز می‌باشد.

از طرفی به‌دنبال تیمار سلول های سرطانی با عصاره موسیر در مدت زمان ۴۸ ساعت تغییرات مورفولوژیک از قبیل تغییر شکل و حباب‌دار شدن هسته و همچنین افزایش تعداد سلول‌های مرده نیز مشاهده شد که می‌تواند علت آن، فعالیت آنزیمی درون سلولی باشدکه موجب تغییر شکل سلول‌های تیمار شده باشد.

Archive of SID

www.SID.ir

نتیجه گیری

سلول‌های سرطانی القایی با استفاده از 4T1 و سلول‌های القـایی سرطان پستان پس از تیمار با غلظت‌های مختلف عصـاره آبـی و الکلی، تاکسول،کربوپلاتین، تاثیر همزمان تاکسول و کربـوپلاتین با عصاره‌های آبی و الکلی PI بەدرون سـلول‌هـای آسـیب دیـده (تیمار شده با غلظت‌های مختلف عصاره) راه یافتـه و لـذا هسـته این سلول‌ها به‌رنگ قرمز رنگ‌آمیزی شـدند. سـلول‌هـای شـاهد (شکل‌های ۱ و ۲، A) دارای غشا پلاسمایی سالم بوده و به‌رنـگ فلورسنت پروپیدیوم پوداید PI غیر قابل نفوذ بودند (شکل‌های ۱ و ۲، B و E). و هسته سلول‌های تیمار شده در رنـگ آمیـزی بـا هوخست به‌صورت متراکم و قطعه قطعه مشاهده گردید (فلش‌ها هسته‌های تغییر یافته در تیمارهای مختلـف را نشـان مـی‌دهنـد (شکل‌های۱ و ۲، C و DMBA :D برای مدت زمان ۴۸ ساعت (بزرگنمایی × ۴۰). فلش‌ها هسته سلول های تغییر یافته و غشـا سلولی آسیب دیده (هسته قرمز رنگ) بر اثر تیمار را نشـان مـی دهند. A)نمونه شاهد، B) سلول های القایی DMBA تیمار شده با غلظت ۱۰۰میکرو گرم بر میلی‌لیتر کربوپلاتین و رنگ آمیـزی هم‌زمان هوخست و پروپیـدیوم یوداید، C) سـلول هـای القـایی DMBA تیمار شده با غلظت ۰/۰۱ میکرو گـرو بـر میلـی‌لیتـر تاکسول، D) سلول های القایی DMBA تیمار شـده بـا غلظـت ۰/۰۳ گرم بر لیتر عصاره الکلی، E) سلول های القـایی DMBA MTT نشان داد که عصاره آبی و الکلی، تاکسـول و کربـوپلاتین موجب کاهش چشم‌گیـر توانـایی زیسـتی سـلول‌هـای سـرطانی شدند. نتایج به‌دست آمده از هر دو آزمون در یـک راسـتا بـوده و یکدیگر را تایید نمودند.

DNA در مرحله G2/M تقسـیم میتـوز (۱۹) و کربـوپلاتین بـا اتصال به DNA از طریق اتصالات عرضی بین رشته‌ای و تداخل با عمل‌کرد آن (۲۰) موجب مرگ سلول‌ها می‌شود. بررسی‌هـای صورت گرفته بر رده‌های سلولی U373، A549، HeLa, MCF-SC- ،NUGC-3 (۲۱) PC-Zd، PC-Sh،7, OVG-1,HT-29 SK-OV- و OVCAR-3 (۲۳) SKOV3 ، U937 (۲۲) M1 3 (۲۴) همگی‌سایتوتوکسیسیتی بالای تاکسول و کربـوپلاتین را نشان داده‌اند.

سرطانی Hela, MCF-7 و L-929 صورت گرفته نشان می‌دهـد که این عصاره بر روی رده‌های سلولی مختلف بسته به نوع سلول اثرات سایتوتوکسیک مختلفـی اعمـال مـی‌کنـد و IC50 تجزیـه شیمیایی عصاره‌ی موسیر نشان داده است کـه از نظـر ترکیبـات شیمیایی دارای دو ترکیب گـوگردی آلیسـین - آلیسـاتین ۱و۲، فلاونوئیدهایی از قبیل کوئرسـتین و سـاپونین‌هـا مـی‌باشـد کـه بخشی از خواص ضـد سـرطانی آن نیـز ناشـی از وجـود همـین ترکیبات می‌باشد (۲۵). هر چنـد کـه مکانیسـم مهـاری موسـیر به‌خوبی روشن نیست، اما نتایج برخی مطالعات نشان داده اسـت که کوئرستین موجود در آن، اثرات ضد تکثیری خود را از طریـق افـزایش القـای p53 و کـاهش پـروتئین هـای آنتـی آپوپتـوزی Survivin و Bcl-2 اعمال مـی‌کنـد (۱۶) و همچنـین آلیسـین موجود در موسیر باعث تحریک تشکیل جسم آپوپتوتیک، توقـف سیکل سـلولی، متـراکم شـدن هسـته، نردبـانی شـدن DNA و همچنین فعال شدن کاسپاز ۳ ، ۸ و ۹ می شود (۲۶). به‌هرحال نیـاز بـه مطالعـات بیشـتر بـرای شناسـایی اثـر موسـیر بـر روی سلول‌های سرطانی ضروری به‌نظر می‌رسد.

Hela,MCF-7 و L-929 صورت گرفته نشان می‌دهـد کـه ایـن عصاره بر روی رده‌های سلولی مختلف بسته به نوع سـلول اثـرات سایتوتوکسیک مختلفی اعمال می‌کند و IC50 بر اسـاس نتـایج به‌دست آمده از دو آزمون رنگ آمیزی تریپان بلو و رنگ سـنجی MTT مشخص شد که استفاده هم‌زمان تاکسول و عصـاره آبـی، باعث کاهش سایتوتوکسیسیتی تاکسول شده است در حـالی‌کـه درمورد تاثیر همزمان تاکسول و عصاره الکلـی ایـن‌چنـین نبـوده است.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله مولفین مقاله از حمایت‌هـای مـالی معاونـت محتـرم پژوهش و فناوری دانشگاه اراک در تحقق ایـن پـژوهش تشـکر و سپاسگزاری می‌نمایند.

منابع

1. Ferlay J, Bray F, Pisane P, Parkin DM. Cancer incidence, mortality and prevalence worldwide,Lyon: Globocan IARC. 2000. In Press.

2. Albano JD, Ward E, Jemal A, Anderson R, et al. Cancer mortality in the United States by education level and race. J Natl Cancer Inst. 2007; 99(18): 1384-94.

3. Li Ci, Uribe DJ, Daling JR. Clinical characteristic of different histologic types of breast cancer.Br J Cancer. 2005; 93(9): 1046-52.

Archive of SID
www.SID.ir

4.Fruebauf JP, Bosanquet AG. In vitro determination of drug response: a discussion of clinical applications. principle and practice of oncology. 1993; 7: 25-32.

5.Gerrero MR, et al. Recent advances in breast cancer biology. Curr Opin Oncol. 2001; 13(6): 415-9.

6. Alvaro MA, Edith AP. Treatment options for breast cancer resistant to anthracycline and taxane. Mayo Clin Proc. Jun. 2009; 84(6): 533–545.

7.Adlercreutz H. Western diet and western diseases: some hormonal and biochemical mechanisms and associations.Scandinavian J Clin Lab Invest. 1990; 50 (S201): 3-23.

8. Fan TP, Yeh JC, Leung KW, Yue PYK, et al. Angiogenesis:from plants to blood vessels. Trends Pharmacol Sci. 2006; 27(6): 297-309.

9. Adeniyi BA, Anyiam FM. In vitro anti-Helicobacter pylori potential of methanol extract of Allium ascalonicum Linn. (Liliaceae) leaf: susceptibility and effect on urease activity. J Phytother Res. 2002; 18(5): 358-361.

10. Leelarungrayub N, Rattanapanone V, Chanarat N, Gebicki J. Quantitative evaluation of the antioxidant properties of garlic and shallot preparations. J Nutrition. 2006; 22(3): 266-274.

11. Owoyele BV, Alabi OT, Adebayo JO, Soladoyea AO, et al. Haematological evaluation of ethanolic extract of Allium ascalonicum in male albino rats. J Fitoterapia. 2004; 75: 322-326.

12. Wang HX, Ng TB. Ascalin, a new anti-fungal peptide with human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase-inhibiting activity from shallot bulbs. J Peptides. 2002; 23(6): 1025-1029.

13. Bianchini F, Vainio H. Allium vegetables and organosulfur compounds: do they help prevent cancer? J Environ Health Persp.2001; 109(9): 893-902.

14. Fattorusso E, Iorizzi M, Lanzotti V, Taglialatela-Scafati O. Chemical composition of shallot (Allium ascalonicum Hort.). J Agr Food Chem. 2002; 50(20): 5686 -5690.

15.Mubarak AM, Kulatilleke CP. Sulfur constituents of need seed volatiles: a revision. J Phytochemistry.1990; 29: 3351-3352.

16. Ghodrati Azadi H, Riazi GH, Ghaffari SM, Ahmadian SH, et al. Effects of Allium hirtifolium (Iranian shallot) and its allicin on microtubule and cancer cell lines. African Journal of Biotechnology. 2002; 8 (19), 5030-5037.

17. Mohammadi Motlagh HR, et al. Anti-Angiogenic Effect of Aqueous Extract of Shallot (Allium ascalonicum) Bulbs in Rat Aorta Ring Model. Yakhteh Medical Journal. 2009; 11(2): 190-195.

18. Trakranrungsie A. Chatchawanchonteera,W. Khunkitti. Ethnoveterinary study for antidermatophytic activity of Piper betle,Alpinia galanga and Allium ascalonicum extracts in vitro. Research in Veterinary Science. 2008; 84(1): 80–84.

19.

20. Lee CS1, Kim YJ, Jang ER, Myung SC, et al. Akt inhibitor enhances apoptotic effect of carboplatin on human epithelial ovarian carcinoma cell lines. Eur J Pharmacol. Apr. 2010; 25; 632(1-3):7-13.

21. Liebmann JE, Cook JA, Lipschultz C, Teague D, et al. " Cytotoxic studies of Paxlitaxel (Taxol) in human tumor cell lines". British Journal of Cancer. 1993; 68(6): 1104-1109 .

22. Chang YF, Li LL, Wu C, Liu T, et al. Paclitaxel induced apoptosis in human gastric carcinoma cell lines. Cancer.1996; 77(1): 8-14.

23. Ofir R, Seidman R, Rabinski T, Kurp M, et al.Taxol-induced apoptosis in human SKOV3 ovarian and MCF7 breast carcinoma cells is caspase-3 and caspase-9 independent. Cell Death and Differentiation. 2002; 9(6): 636-642.

24. Günther B, Henri B, Nick G, Christian L, et al. Carboplatin derivatives with superior antitumor activity compared to the parent compound . Inorganica Chimica Acta. 2004; 357(15): 4452–4466.

25. Fattorusso E, Iorizzi M, Lanzotti V, Taglialatela-Scafati O. Chemical composition of shallot (Allium ascalonicum L.). J. Agric. Food Chem. 2002; 50 (12236699): 5686-5690.

26. Oommen S, John Anto R, Srinivas G, Karunagaran D. Allicin (from garlic) induces caspase-mediated apoptosis in cancer cells. European Journal of Pharmacology. 2004; 485(1-3): 97–103.

27. Samuel T, et al. The Flavonoid Quercetin Transiently Inhibits the Activity of Taxol and Nocodazole Through Interference With the Cell Cycle. Nutrition and Cancer. 2010; 62(8): 1025–1035.

Archive of SID

www.SID.ir

Journal of Cell & Tissue (JCT)
Autumn 2014; 5(3):253-261

Original Article

Cytotoxicity Effect of Aqueous and Alcoholic Total Extract of Shallot (Allium ascalonicum) on Cancer Cells Derived from Mammary Tumors in Rat and Cell Line (4T1) in Mouse, and Comparison with Taxol and Carboplatin Chemotherapy Drugs

Hamta A, Ph.D. *, Shariatzadeh SMA, Ph.D., Soleimani M, Ph.D., Tajali Ardakani M, MSc.

-Department of Biology, Arak University, Arak 38156-8-8349, Iran

* Email corresponding author: a-hamta@araku.ac.ir

Received: 17 Sep. 2013 Accepted: 18 May. 2014

Abstract

Aim: The present study aimed to investigate the effects of aqueous and alcoholic extracts of shallot on breast cancer cells compared to carboplatin and taxol treatments.

Material and methods: Different concentrations of drugs taxol and carboplatin and aqueous and alcoholic extracts of shallots were prepared.

Using Trypan blue and MTT, cytotoxicity on breast cancer cells, in different times and concentrations were evaluated. Utilized Hoechst and propidum iodide staining morphological changes and possible apoptosis of cells were determined. The data statistically analyzed using one-way analysis of variance and the mean level of $P < 0.05$ was considered significant.

Results: The results indicate that shallot alcoholic extract has more inhibitory effects on cancer cells than aqueous extract at concentration range (0.01 to 0.05 g/L). Also, the simultaneous effect of shallot's extract, accompaniment with carboplatin, caused enhancement in cytotoxicity of carboplatin. On the other hand, accompaniment of aqueous extract with taxol led to reduction of taxol cytotoxicity.

Conclusions: This study showed aqueous and alcoholic extracts of shallots has cytotoxicity effects on breast cancer cells on rats affected by breast cancer. This plant is a herb which can be used against breast cancer can be subjects for further research.

Keywords: Cytotoxicity, Extract of shallot, Breast cancer, DMBA, Taxol, Carboplatin

Archive of SID

www.SID.ir