

## بررسی اثر ضدسرطان عصاره الکلی به‌لیمو *Lippia citriodora*: مهار متاستاز سلول‌های سرطان تخمدان A2780 از طریق بازیابی بیان E-کاده‌رین

الهه امینی <sup>۱\*</sup>، محمد نبیونی <sup>۱</sup>، Ph.D.، جواد بهارآرا <sup>۲</sup>، Ph.D.، سید بهرام بهزاد <sup>۱</sup>، M.Sc.، دانیال سیفی <sup>۱</sup>، M.Sc.، فرزانه سالک <sup>۲</sup>، M.Sc.

۱- دانشگاه خوارزمی، دانشکده علوم زیستی، گروه سلولی مولکولی، تهران، ایران

۲- دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی، مشهد، ایران

\* پست الکترونیک نویسنده مسئول: elaheh.amini@khu.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۳/۶

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۱/۱

### چکیده

**هدف:** هدف از این مطالعه، بررسی پتانسیل پروآپتوزی و ضد متاستازی عصاره الکلی برگ به‌لیمو (*Lippia citriodora*) بر سلول‌های سرطان تخمدان A2780 و بررسی بیان E-کاده‌رین به‌عنوان یکی از مارکرهای مهم در متاستاز است.

**مواد و روش‌ها:** در این پژوهش تجربی آزمایشگاهی، رده‌ی سلولی A2780 از بانک سلولی پاستور تهیه و در محیط کشت RPMI1640 دارای FBS، ۱۰ درصد به‌همراه ۱ درصد آنتی بیوتیک در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت شدند. پس از کشت سلول‌ها و تیمار با غلظت‌های مختلف عصاره (۱۰ تا ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) قابلیت حیات سلول‌ها توسط روش MTT، پتانسیل پروآپتوزی توسط آزمون اکریدین اورنج/پروپیدیوم ایوداید و کاسپاز ۳ و اثر ضد تهاجمی توسط تست مهاجرت و ارزیابی بیان E-کاده‌رین اندازه‌گیری شد. سپس از آزمون آماری آنالیز واریانس یک‌طرفه برای تحلیل نتایج کمی استفاده شد.

**نتایج:** داده‌ها نشان داد عصاره الکلی برگ به‌لیمو به‌صورت وابسته به دوز بقای سلول‌های A2780 را کاهش داد. نتایج آزمون اکریدین اورنج و کاسپاز-۳ نشان داد این عصاره در غلظت میانه مهاری (۱۰۰ میکروگرم) باعث القای آپتوز وابسته به کاسپاز در سلول‌های سرطان تخمدان می‌شود. آزمون مهاجرت و RT-PCR نشان داد که این عصاره دارای پتانسیل ضد تهاجمی بوده و با افزایش بیان E-کاده‌رین از سست شدن اتصالات بین سلول‌های سرطانی جلوگیری می‌کند.

**نتیجه‌گیری:** نتایج این پژوهش نشان داد عصاره الکلی برگ به‌لیمو با دارا بودن ظرفیت القای آپتوزیس و بازیابی بیان E-کاده‌رین در سلول‌های سرطانی A2780 قادر به مهار پتانسیل تهاجمی سلول‌های سرطان تخمدان است.

**واژگان کلیدی:** به‌لیمو، متاستاز، تبدیل اپی‌تلیوم به مزانشیم، E-کاده‌رین، سرطان تخمدان

## مقدمه

متصل شده و فعالیت رونویسی و بیان E-کاده‌رین را متوقف کنند، اشاره کرد. مطالعات نشان داده است که از دست دادن و یا کاهش بیان E-کاده‌رین، اولین و مهم‌ترین مرحله EMT در نظر گرفته می‌شود (۸). در اغلب تومورهای اولیه که خاصیت مهاجم دارند چسبندگی بین سلولی کاهش می‌یابد که اغلب به دلیل از دست رفتن E-کاده‌رین است. از آنجایی که بازگشت و وخیم تر شدن بیماری پس از درمان در پی متاستاز یکی از چالش‌های مهم برای بیماران است، بنابراین پیشگیری از روند متاستاز می‌تواند شاخص مهمی در روند درمان بیماران باشد (۹).

گیاهان تولیدکننده تعداد وسیعی متابولیت ثانویه هستند که خواص اغلب این ترکیبات هنوز شناسایی نشده است. به علاوه خواص فیزیکی، شیمیایی و زیستی این ترکیبات به میزان زیادی با هم متفاوت است. مطالعات بسیاری ترکیبات طبیعی را به عنوان گزینه‌های مناسب در درمان سرطان پیشنهاد کرده‌اند (۱۰). تحقیقات نشان داده است در بین ترکیبات طبیعی، گیاهان دارویی و عصاره آن‌ها نقش مهمی در درمان بسیاری از انواع سرطان‌ها از جمله سرطان تخمدان ایفا می‌کند (۱۱).

*Aloysia citrodora* گونه‌ای از گیاهان گلدار از خانواده شاهی‌سند، است. نام رایج آن *lemon verbena* و *lemon beebrush* است. برخی گونه‌های این گیاه (*Candida albicans*) دارای فعالیت ضدقارچی و سیتوتوکسیک هستند (۱۲، ۱۳). تحقیقات نشان داده‌اند که مکمل‌های آنتی‌اکسیدانتی موجود در عصاره به‌لیمو دارای اثر حفاظتی در برابر استرس اکسیداتیو القا شده توسط بیماری‌ها است (۱۴). تا به حال، در مورد خواص ضدسرطان گونه *Lippia citrodora* به‌عنوان یکی از گونه‌های بومی شاه‌سند در ایران مطالعه‌ای صورت نگرفته است. با توجه به این که کاهش بیان E-کاده‌رین به‌عنوان یک بیومارکر برای پیش‌بینی سرطان‌های با منشا اپی‌تلیالی در نظر گرفته می‌شود، هدف از تحقیق حاضر بررسی اثر سمیت سلولی عصاره الکلی برگ‌های به‌لیمو (*Lippia citriodora*) بر سلول‌های سرطان تخمدان A2780 مقاوم به سیس پلاتین و بررسی اثر این عصاره بر مهاجرت سلول‌های A2780 و بیان E-کاده‌رین در این سلول‌ها است.

سرطان تخمدان پنجمین سرطان شایع و در بین زنان دومین بدخیمی دستگاه تولیدمثلی محسوب می‌شود. این نوع سرطان به‌طور رایج به دلیل تجمع فاکتورهای آسیب رسان از جمله عدم تحرک کافی، مصرف الکل، چاقی و افزایش استعمال دخانیات ایجاد می‌شود (۱، ۲). درمان سرطان تخمدان با هدف‌های مختلفی مثل پیشگیری، درمان و کنترل صورت می‌گیرد. به‌طور معمول چند راه برای درمان سرطان از جمله: جراحی، شیمی‌درمانی، پرتو درمانی، هورمون درمانی، ایمونوتراپی و ژن درمانی وجود دارد. در این میان شیمی‌درمانی، جراحی و هورمون درمانی روش‌های رایج‌تر درمان سرطان تخمدان هستند. به‌علاوه استفاده توأم این روش‌ها بر علیه برخی از سرطان‌ها که به‌طور وسیع در بدن انتشار یافته‌اند، به‌کار گرفته می‌شود (۳). متاستاز یکی از چالش‌های عمده در درمان سرطان تخمدان به‌شمار می‌رود. تبدیل حالت اپیتلیالی به‌حالت مزانشیمی (Epithelial Mesenchymal Transition: EMT) یک فرایند بیولوژیکی در متاستاز است که طی این فرایند سلول‌های اپی‌تلیالی قطبی که در شرایط طبیعی از طریق سطح بازال خود با غشای پایه برهم کنش دارند، دستخوش تغییرات بیوشیمیایی شده و فنوتیپ مزانشیمی شبه فیبروبلاستی پیدا می‌کنند (۴). مطالعات نشان داده است که این تغییرات بیوشیمیایی باعث افزایش ظرفیت مهاجرت، مهاجم، مقاومت بالا به آپوپتوزیس و تا حد زیادی افزایش تولید اجزای ماتریکس خارج سلولی (ECM) می‌شود (۵). شواهد نشان می‌دهد که سرطان‌های با منشا اپی‌تلیالی از جمله سرطان تخمدان با دارا بودن مجموعه کوچکی از سلول‌های بنیادی سرطانی توانایی رشد تومور، متاستاز و مقاومت به درمان دارند (۷، ۶). از بین مهم‌ترین نشانه‌های مولکولی EMT می‌توان به کاهش بیان مارکرهای اپی‌تلیال (E-کاده‌رین، پلاک‌گلوبین و دسموپلاکین)، افزایش بیان مارکرهای مزانشیمی (ویمنتین، N-کاده‌رین،  $\alpha$ -SMA) و افزایش بیان فاکتورهای رونویسی مانند Twist, Slug, Snail، ZEB1 (Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 1)، ZEB2 (Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 2) که می‌توانند به پروموتور E-کاده‌رین

(BioTech, USA) اندازه‌گیری شد (۱۷). در نهایت

درصد سلول‌های زنده از فرمول زیر محاسبه شد:

جذب نوری سلول‌های کنترل/جذب نوری سلول‌های

تیمار شده = میزان بقای سلولی  $\times 100$

**رنگ آمیزی اکریدین اورنج/پروپیديوم ايودايد:**

رنگ‌آمیزی ایداید جهت تشخیص و تمایز سلول‌های زنده،

آپوپتوزیس و نکروزیس به کار می‌رود. جهت انجام آزمون،

۲۴ ساعت پس از کشت، سلول‌های A2780 با غلظت‌های

مختلف عصاره الکلی برگ به‌لیمو به مدت ۴۸ ساعت تیمار

شدند. سپس سلول‌ها از کف پلیت جدا شده و با ۱۰

میکرولیتر اکریدین اورنج و ۱۰ میکرولیتر پروپیديوم

ایدايد با غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر (Sigma,

USA) تیمار شدند و پس از پیتاژ در زیر میکروسکوپ

فلورسانس (Olympus, Japan) توسط فیلتر آبی آیزکتیو

۴۰ مورد بررسی قرار گرفتند (۱۸).

**تست کاسپاز ۳:** از این تست به‌منظور تعیین وابستگی

آپوپتوزیس از مسیر کاسپاز استفاده می‌شود. برای انجام

این تست، بعد از گذشت ۴۸ ساعت از تیمار، سلول‌های

A2780 (گروه کنترل و تحت تیمار) تریپسینه شدند و

پس از اتمام سانتیفریوژ، از کیت کاسپاز-۳ (abcam )

(39401, Canada) جهت ارزیابی فعالیت کاسپاز-۳

استفاده گردید. برای این منظور، به هر نمونه ۵۰

میکرولیتر بافر لیزکننده (حاوی NaCl, HEPES,

EDTA, CHAPS, Sucrose, DTT, Triton X-10,

Glycerol, Protease inhibitor cocktail) موجود در

کیت اضافه شد و نمونه‌ها ۱۰ دقیقه روی یخ قرار گرفتند.

پس از افزودن ۵۰  $\mu$ l از DDT (Dithiothreitol) و 2x

buffer و ۵۰  $\mu$ l N-Acetyl-Asp-Glu-DEVD-p-NA

Val-Asp-p-Nitroanilide: سوبسترای کاسپاز ۳) به هر

نمونه و آنکوباسیون ۲ ساعته، بر طبق دستورالعمل کیت

جذب هر نمونه در طول موج ۴۵۰ نانومتر توسط

اسپکتروفتومتر (Bio Tech, USA) اندازه‌گیری شد

(۱۸).

**تست مهاجرت:** این آزمون برای ارزیابی اثر ضد

متاستازی غلظت‌های بازدارنده عصاره الکلی برگ به‌لیمو

به کار گرفته شد. برای بررسی میزان مهاجرت سلول‌های

سرطانی A2780 تحت تیمار با غلظت‌های بازدارنده تکثیر

## مواد و روش‌ها

**تهیه عصاره الکلی گیاه به‌لیمو:** گیاه به‌لیمو پس از

تایید هر بار بوم دانشکده علوم زیستی دانشگاه خوارزمی، به

آزمایشگاه سلولی دانشکده منتقل شد. پس از خشک

کردن گیاه در محل تاریک و بدون رطوبت، برگ‌های

به‌لیمو جدا و خرد گردید. ۲۰ گرم از پودر برگ گیاه با

۱۰۰ میلی‌لیتر اتانول (Merck, Germany) مخلوط شد

و به‌منظور استخراج به مدت ۷۲ ساعت بر روی دستگاه

شیکر (چرخاننده) قرار گرفت. سپس عصاره به دست آمده

توسط کاغذ صافی فیلتر شد و جهت تغلیظ و عصاره

گیری در دستگاه روتاری (Heidolph, Germany) قرار

گرفت (۱۵).

**کشت سلول:** برای انجام این پژوهش تجربی

آزمایشگاهی، سلول‌های A2780 از انستیتو پاستور تهران

خریداری شد. سلول‌ها در محیط کشت RPMI 1640

(شرکت ایده زیست، ایران) حاوی ۱۰ درصد FBS و ۱

درصد آنتی بیوتیک (Gibco, USA) کشت داده شدند

(۱۶).

**بررسی اثر سمیت سلولی:** برای بررسی سمیت سلولی

غلظت‌های مختلف عصاره الکلی برگ به‌لیمو بر سلول‌های

سرطانی A2780 و تعیین دوز میانه مهاری (Inhibitory

Concentration: IC50)، از روش رنگ سنجی MTT

(Sigma, USA) استفاده شد. برای این منظور سلول‌های

A2780، به تعداد ۱۰۰۰۰ سلول در چاهک‌های پلیت ۹۶

خانه کشت داده شدند و ۲۴ ساعت پس از کشت، توسط

غلظت‌های مختلف عصاره الکلی برگ گیاه به‌لیمو (۴۰۰،

۲۰۰، ۱۰۰، ۵۰، ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) تیمار شدند.

بنابراین یک گروه کنترل و پنج گروه تیماری برای این

آزمون در نظر گرفته شد. پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت از تیمار،

MTT با غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به سلول‌ها اضافه

شد و سلول‌ها به مدت ۴ ساعت تحت تیمار با MTT

انکوبه شدند. پس از ۴ ساعت جهت حل کردن

کریستال‌های فورمازان (شاخص سلول‌های زنده) به هر

چاهک ۸۰ میکرولیتر DMSO (دی متیل سولفوکساید)

اضافه شد. سپس جذب نوری در طول موج ۵۷۰ نانومتر

با استفاده از دستگاه میکروپلیت اسپکتروفتومتر

داده‌های آماری در بخش ارزیابی سمیت سلولی و آزمون کاسپاز توسط نرم افزار SPSS شماره ۲۰، آزمون آماری one way ANOVA، تست Tukey در سطح معنی‌داری ( $p \leq 0.05$ ) تجزیه و تحلیل شدند.

**نتایج**

**اثر عصاره الکی برگ به لیمو بر روی میزان بقای سلولی**

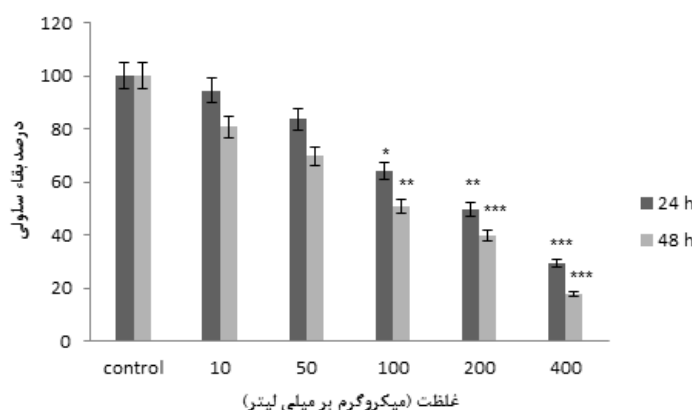
یافته‌های آزمون MTT (شکل ۱) و ارزیابی مورفولوژیک سلول‌ها توسط میکروسکوپ معکوس (شکل ۲) نشان داد که درصد زنده بودن سلول‌های A2780 تحت تیمار با عصاره الکی برگ به لیمو در غلظت‌های ۱۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در مدت زمان ۲۴ ساعت نسبت به گروه کنترل به ترتیب ۴۹/۵، ۶۴/۳، ۸۳/۶، ۹۴/۵ درصد در ۴۸ ساعت ۱۷/۷، ۳۹/۹، ۵۰/۷، ۶۹/۸، ۸۰/۷ درصد مشاهده شد. تحلیل آماری نشان داد که عصاره مورد نظر در غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در ۲۴ ساعت با  $p < 0.01$ ، در ۴۸ ساعت با  $p < 0.001$ ، در غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در ۲۴ ساعت با  $p < 0.01$ ، در ۴۸ ساعت با  $p < 0.001$ ، در غلظت ۴۰۰ میکروگرم در بازه زمانی ۲۴ و ۴۸ ساعت با  $p < 0.001$  موجب کاهش معنی‌دار بقای سلول‌های سرطانی در مقایسه با گروه کنترل شد. این نتایج نشان داد که اثر کشندگی سلولی عصاره الکی برگ‌های به لیمو در ۲۴ ساعت و ۴۸ ساعت وابسته به دوز و زمان است.

عصاره الکی برگ به لیمو (۲۰۰، ۱۰۰، ۵۰، ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر)، سلول‌ها در تراکم ۱۰۵ سلول در هر چاهک پلیت ۶ خانه کوت شده با ژلاتین کشت داده شدند. پس از تراکم ۸۰ درصدی سلول‌های سرطانی در کف پلیت، توسط نوک پیپت خراشی در کف تمام چاهک‌ها ایجاد شد و پس از آن سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت تحت تیمار قرار گرفتند. پس از گذشت این زمان، تحرک و مهاجرت سلول‌ها به صورت کیفی توسط عکس‌برداری و مقایسه میزان پر شدن خراش در گروه‌های کنترل و تیمار، در زیر میکروسکوپ معکوس (Olympus, Japan) مورد بررسی قرار گرفت (۱۹).

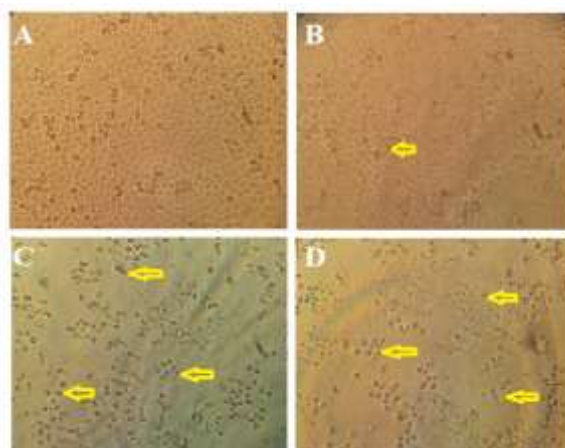
**RT-PCR جهت ارزیابی بیان E-کاده‌رین: RT-PCR**

به منظور ارزیابی بیان mRNA E-کاده‌رین در سلول‌های سرطانی A2780 مورد استفاده قرار گرفت. برای این منظور پس از گذشت ۲۴ ساعت از تیمار، سلول‌ها توسط کیت پارس طوس (A101161, Pars tous biotechnology, Iran) از گروه کنترل و تیمار استخراج شد. در مرحله بعد توسط کیت سنتز cDNA (A101231, Pars tous biotechnology, Iran) از روی RNA، cDNA سنتز شد و پس از افزودن پرایمرهای E-کاده‌رین، dNTP، بافر و Taq پلیمرز PCR انجام شد. B2M (Beta-2 microglobulin) نیز به عنوان ژن کنترل داخلی (housekeeper genes) به منظور نرمالیزاسیون مورد استفاده قرار گرفت (۱۹).

**آنالیز آماری**



شکل ۱: میزان درصد بقای سلول‌ها با استفاده از روش MTT پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت تیمار با عصاره الکی برگ به لیمو. نمودار نشان می‌دهد که درصد بازدارندگی عصاره الکی برگ‌های به لیمو روی سلول‌های سرطانی A2780 وابسته به دوز و زمان می‌باشد. آزمون آماری  $p < 0.001$  SPSS, one way ANOVA  $p < 0.01$ ,  $p < 0.05$ . (n=3, Mean ± SD)

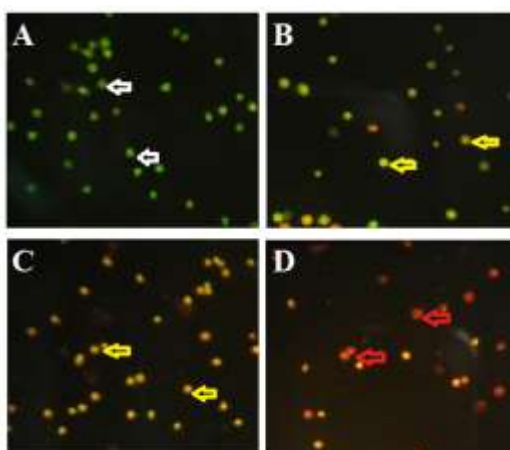


شکل ۲: مقایسه تاثیر غلظت‌های مختلف عصاره الکلی برگ به‌لیمو بر مورفولوژی سلول‌های سرطان تخمدان A2780 بعد از ۲۴ ساعت تیمار (بزرگنمایی: ۲۰۰X). پیکان‌های زرد نشان‌دهنده سلول‌های مرده هستند. A: کنترل، B: تیمار با غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر C: تیمار با غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و D: تیمار با غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر

زرد و زرد مایل به نارنجی (پیکان‌های زرد) مشاهده می‌شوند که نشان‌دهنده اثر القاکننده آپوپتوزیس عصاره برگ به‌لیمو در این غلظت‌ها بر روی سلول‌های سرطان تخمدان است؛ درحالی‌که همان‌طور که در شکل ۳ بخش D نشان داده شده است عصاره الکلی برگ به‌لیمو در غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، قادر به القای آپوپتوزیس در سلول‌های A2780 نیست و از طریق القای نکروزیس موجب از بین رفتن سلول‌های سرطان تخمدان می‌شود.

### آزمون اکریدین اورنج/ پروپیدیم ایوداید

در این آزمون کیفی، سلول‌های زنده به رنگ سبز، سلول‌های آپوپتوزیسی به رنگ زرد و نارنجی و سلول‌های نکروزه به رنگ قرمز قابل شناسایی هستند. همان‌طور که در شکل ۳ مشاهده می‌شود سلول‌های A2780 گروه کنترل غالباً به رنگ سبز مشاهده می‌شوند (پیکان‌های سفید) که نشان‌دهنده زنده بودن سلول‌های سرطانی است. در گروه B, C سلول‌های تیمار شده با غلظت‌های بازدارنده تکثیر عصاره الکلی برگ به‌لیمو (غلظت ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) غالباً به رنگ سبز مایل به

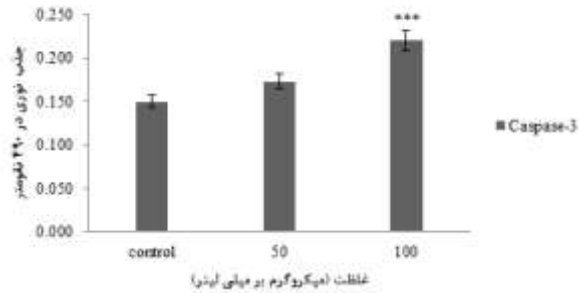


شکل ۳: اثر پیش برنده آپوپتوزیس غلظت‌های مختلف عصاره الکلی برگ به‌لیمو توسط رنگ‌آمیزی اکریدین اورنج/ پروپیدیم ایوداید (بزرگنمایی: ۴۰۰X). پیکان‌های سفید نشان‌دهنده سلول‌های زنده، پیکان‌های زرد نشان‌دهنده سلول‌های آپوپتوزی و پیکان‌های قرمز نشان‌دهنده سلول‌های نکروزه هستند. A: کنترل، B: تیمار با غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر C: تیمار با غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و D: تیمار با غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر

### آزمون کاسپاز ۳

آپوپتوزیس وابسته به کاسپاز در سلول‌های سرطان تخمدان تحت تیمار با غلظت موثره عصاره الکلی برگ به لیمو است (شکل ۴).

نتایج به دست آمده نشان داد تیمار با غلظت میانه مهاری عصاره الکلی برگ به لیمو (غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) موجب افزایش بیان کاسپاز ۳ در سلول‌های سرطان تخمدان A2780 می‌شود که موید القای

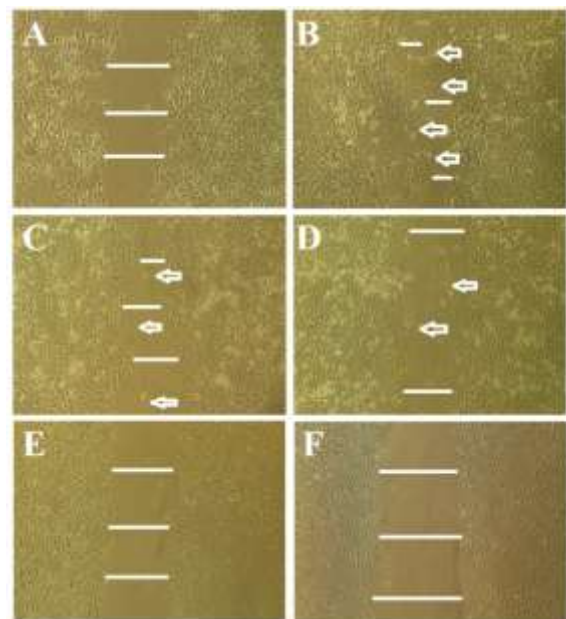


شکل ۴: مقایسه فعالیت کاسپاز ۳ گروه کنترل و گروه تحت تیمار با غلظت‌های بازدارنده تکثیر (الفاکننده آپوپتوزیس) عصاره الکلی برگ به لیمو در سلول‌های سرطان تخمدان A2780. (Mean ± S.E\*\*\* p<0.001)

کردن منطقه خراش در مدت ۲۴ ساعت اثر کمی روی مهاجرت سلول‌های سرطانی نشان داد؛ در حالی که تصاویر به دست آمده نشان داد غلظت‌های ۲۰۰، ۱۰۰، ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره الکلی برگ به لیمو باعث کاهش تحرک سلول‌های سرطان تخمدان شد و با افزایش غلظت ماده تیماری میزان مهاجرت به طور چشم‌گیری کاهش یافت (شکل ۵).

### آزمون مهاجرت

در این تست سلول‌های گروه کنترل (فاقد تیمار) توسط پر کردن ناحیه خراش مهاجرت و تهاجم سریع‌تری در مقایسه با سلول‌های سرطانی تحت تیمار با غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره در مدت زمان ۲۴ ساعت نشان دادند. سلول‌های سرطانی A2780 تحت تیمار با غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر با پر

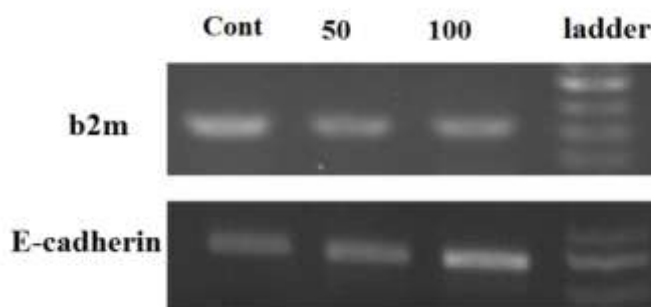


شکل ۵: اثر غلظت‌های مختلف عصاره الکلی برگ به لیمو بر روی مهاجرت سلول‌های سرطان تخمدان A2780. (بزرگنمایی: A. 100x): سلول‌های A2780 در لحظه ایجاد خراش (ساعت صفر): B: سلول‌های کنترل پس از ۲۴ ساعت از ایجاد خراش بخش اعظم فضای خراش را پر کرده‌اند (پیکان‌ها سلول‌های در حال مهاجرت را نشان می‌دهند): C: پس از ۲۴ ساعت، سلول‌ها در گروه تیمار با غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره الکلی برگ به لیمو، در حال پر کردن فضای ایجاد شده توسط خراش هستند. D, E, F: پس از ۲۴ ساعت، تیمار با غلظت‌های ۲۰۰، ۱۰۰، ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره الکلی برگ به لیمو به ترتیب موجب مهار مهاجرت سلول‌های سرطان تخمدان در ناحیه خراش شده‌است.

## ارزیابی بیان E-کادهرین

جهت بررسی اثر ضدتهاجمی غلظت‌های بازدارنده عصاره برگ‌های به‌لیمو، سطح بیان E-کادهرین در سلول‌های A2780 فاقد تیمار (کنترل) و تیمار شده با غلظت‌های بازدارنده تکثیر و القا کننده آپوپتوزیس توسط تکنیک

RT-PCR مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که با افزایش غلظت تیماری عصاره الکلی برگ‌های به‌لیمو سطح بیان E-کادهرین در سلول‌های A2780 تحت تیمار افزایش یافت (شکل ۶).



شکل ۶: ارزیابی اثر غلظت میانه مهاری (غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و غلظت دارای اثر سمیت پایین (۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) عصاره الکلی برگ به‌لیمو بر بیان E-کادهرین در سلول‌های سرطان تخمدان A2780 توسط تکنیک RT-PCR. همان‌طور که مشاهده می‌کنید افزایش بیان E-کادهرین در سلول‌های A2780 تحت تاثیر غلظت میانه مهاری نشان‌دهنده پتانسیل ضدتهاجمی عصاره الکلی برگ به‌لیمو در غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در سلول‌های سرطان تخمدان است.

## بحث

در دهه‌های اخیر افزایش بروز سرطان‌ها، مطالعات و تحقیقات بر روی سرطان و روش‌های نوین درمانی را با دقت مورد ارزیابی قرار داده است (۲۱، ۲۰). با وجود پیشرفت‌های قابل‌توجه در طب مدرن، داروهای به‌دست‌آمده از گیاهان و منابع طبیعی به‌پیشگیری و درمان بسیاری از بیماری‌ها از جمله سرطان کمک شایانی کرده‌اند (۲۲). حدود ۷۵ درصد داروهای ضد سرطان مورد تأیید در جهان از گیاهان، عصاره‌های آن‌ها و سایر منابع طبیعی مشتق شده‌اند، این در حالی است که کمتر از ۱۰ درصد گیاهان به‌منظور شناسایی ترکیبات ضد سرطان مورد بررسی قرار گرفته‌اند (۱۱). هدف از انجام این تحقیق آن بود که اثر سیتوتوکسیک و ضدتهاجمی عصاره الکلی برگ به‌لیمو (*Lippia citriodora*) به‌عنوان یکی از گیاهان بومی ایران روی سلول‌های سرطان تخمدان مقاوم به داروی سیس پلاتین بررسی شود. جنس *Lippia* (شاه پسندیان) شامل حدود ۲۰۰ گونه از گیاهان، بوته‌ها و درختان کوچک است. بیشتر آن‌ها به‌طور

سنتی در درمان بیماری‌های تنفسی و دستگاه گوارش به‌کار گرفته شده‌اند (۲۳). مطالعات نشان داده‌اند که بعضی از گونه‌های *Lippia* دارای خصوصیات ضد مالاریا، ضد ویروسی و فعالیت‌های سایتوتوکسیک هستند (۲۴). پژوهشگران با استفاده از روش GC-MS حضور ۱۶ تا ۲۰ ترکیب فعال زیستی را در عصاره گیاه به‌لیمو نشان دادند که بیشترین ترکیبات آن را Geranial (۳۶/۸ درصد)، Neral (۲۸/۳ درصد) و Limonene (۷/۲۷ درصد) به‌خود اختصاص می‌دهد (۲۵). در سال ۲۰۱۲ نشان داده شد که عصاره *Aloysia citriodora* دارای خواص آنتی‌اکسیدانتی است که می‌تواند نقش مهمی در تنظیم فعالیت GSH ردوکتاز در لنفوسیت‌ها و گلبول‌های قرمز ایفا کند و از پلاسما در برابر آسیب‌های اکسیداتیو محافظت نماید (۲۶).

در این پژوهش نتایج حاصل از سنجش MTT نشان داد که عصاره الکلی برگ به‌لیمو تکثیر سلولی را در یک الگوی وابسته به دوز در سلول‌های A2780 مهار می‌کند. نتایج حاصل از سنجش درصد بقای سلولی نشان داد که غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره الکلی برگ به‌لیمو پس از گذشت ۲۴ ساعت از تیمار، موجب القای

Hep-G2 مورد مطالعه قرار دادند. نتایج پژوهش آن‌ها نشان داد که عصاره‌ی این گیاه دارای اثر توکسیک بر رده سرطانی Hep-G2 است. مطالعه آن‌ها نشان داد که این عصاره باعث تغییر شکل ظاهری درسلول‌های سرطانی می‌شود و آپوپتوزیس را از مسیر کاسپاز ۳ فعال می‌کند که هم راستا با نتایج به دست آمده در این پژوهش نشان‌دهنده اثر عصاره الکلی برگ به لیمو بر القای آپوپتوزیس از طریق مسیر وابسته به کاسپاز بر سلول‌های سرطانی A2780 است.

در پژوهش دیگری توسط Mesa-Arango و همکارانش (۳۰)، جهت بررسی اثرات سمیت سلولی عصاره گونه‌ای دیگر از خانواده شاه‌پسند به نام *Lippia alba* بر رده سلولی سرطانی دهانه رحم HeLa، نتایج نشان داد که عصاره این گیاه به صورت وابسته به دوز توانایی القای سمیت بالایی بر روی سلول‌های سرطانی دهانه رحم دارد. Mirzaei و همکارانش (۱۵) در تحقیقات خود بر روی سلول‌های کولون رده‌ی HT-29 نشان دادند که عصاره‌ی الکلی گیاه *Aloysia citrodora* با افزایش بیان ژن پروآپتوتیک Bax و کاهش بیان ژن ضد آپوپتوزیسی Bcl-2 قادر به القای آپوپتوزیس بر سلول‌های سرطان کولون است که هم راستا با نتایج به دست آمده در این پژوهش مبین اثر پروآپتوزی و ضدسرطانی عصاره برگ به لیمو گونه *Lippia citriodora* بر سلول‌های سرطانی تخمدان A2780 است.

داده‌های حاصل از تست مهاجرت با استفاده از ژلاتین به عنوان ماتریکس و بستری برای مهاجرت سلول‌ها در این پژوهش نشان داد که عصاره الکلی برگ به لیمو در غلظت میانه مهاری باعث مهار مهاجرت سلول‌های سرطانی A2780 روی ماتریکس شده و از این رو دارای اثر آنتی متاستاتیک است. یافته‌های حاصل از ارزیابی بیان E-MCF7 کادهرین نیز نشان داد که عصاره الکلی برگ به لیمو *Lippia citriodora* با افزایش بیان E-MCF7 کادهرین قادر به مهار عود سلول‌های سرطانی A2780 و مهار تهاجم این سلول‌ها است. در مورد نقش ضد تهاجمی E-MCF7 کادهرین و نقش مواد فعال زیستی در این رابطه مطالعات نشان داده‌اند که فرورده‌های طبیعی مثل سیلیبیین به عنوان یک فلاونوئید از طریق افزایش بیان E-MCF7 کادهرین

پنجاه درصد مرگ سلولی در این سلول‌ها شد. تصاویر رنگ‌آمیزی اکریدین اورنج/ پروپیدیوم ایوداید ثابت کرد عصاره برگ به لیمو در غلظت میانه مهاری القا کننده مرگ سلولی آپوپتوزیس در رده‌ی سلولی A2780 سرطان تخمدان است. ارزیابی میزان فعالیت کاسپاز ۳ در سلول‌های گروه کنترل و تیمار شده با غلظت میانه مهاری عصاره برگ گیاه به لیمو نیز مبین این مطلب است که عصاره برگ به لیمو از طریق مسیر وابسته به کاسپاز قادر به القای آپوپتوزیس در سلول‌های سرطانی A2780 است.

سلول‌های سرطانی با تنش‌های محیطی، از جمله فقدان اکسیژن و یا مواد مغذی، pH پایین، گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) و واسطه‌های پاسخ التهابی همراه است. چنین فشارهایی می‌تواند سلول‌های توموری دارای قابلیت رشد بالا را انتخاب کند و سبب کسب یک فنوتیپ تهاجمی شود. به عنوان مثال، هیپوکسی، فاکتور قابل القای هیپوکسی (HIF) را تثبیت می‌کند که منجر به تغییرات در متابولیسم بی‌هوازی، رگ زایی، تهاجم، و بقا می‌شود (۲۷). E-MCF7 کادهرین یک گلیکوپروتئین درگیر در چسبندگی سلول-سلول است. از دست رفتن عملکرد E-MCF7 کادهرین برای تبدیل اپیتلیال به مزانشیم ضروری است اما کافی نیست؛ در این تبدیل، از آنجایی که سلول اپیتلیال قادر به تبدیل به سلول‌های اجدادی فنوتیپی مزانشیمی است تهاجم و متاستاز تومور به خوبی رخ می‌دهد و در این راستا ماتریکس خارج سلولی به عنوان یک داربست عمل می‌کند (۹).

Melo Jo و همکارانش (۲۸) اثرات سمیت سلولی عصاره‌ی گیاه *Aloysia gracilis* را بر روی رده‌های سلولی سرطان دهانه رحم HeLa، ملانوما B-16 و سرطان پستان MCF-7 با تست MTT مورد بررسی قرار دادند. در مطالعه آن‌ها مهم‌ترین ترکیبات فیتوشیمیایی این گیاه تیمول (۴۰ درصد) شناخته شد و مشخص شد که این ترکیب اصلی‌ترین عامل از بین برنده سلول‌های سرطانی است. Ferraz و همکارانش (۲۹)، اثرات سمیت سلولی عصاره گیاه *Lippia gracilis* را بر روی رده سلولی کبدی



3. Chen WL, Ren Y, Ren J, Erxleben C, et al. Streblolide-Induced Cytotoxicity in Ovarian Cancer Cells Is Mediated through Cardiac Glycoside Signaling Networks. *J Nat Prod*. 2017; 80(3): 659-669.
4. Lengyel E. Ovarian cancer development and metastasis. *Am J Pathol*. 2010; 177(3): 1053-1064.
5. Fang D, Chen H, Zhu JY, Wang A, et al. Epithelial-mesenchymal transition of ovarian cancer cells is sustained by Rac1 through simultaneous activation of MEK1/2 and Src signaling pathways. *Oncogene*. 2017; 36(11): 1546-1558.
6. Deng J, Wang L, Chen H, Hao J, et al. Targeting epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cells for chemoresistant ovarian cancer. *Oncotarget*. 2016; 7(34): 55771-55788.
7. Telleria CM. Repopulation of ovarian cancer cells after chemotherapy. *Cancer Growth Metastasis*. 2013; 6(1): 15-21.
8. Bristow RG, Hill RP. Hypoxia and metabolism: hypoxia, DNA repair and genetic instability. *Nat Rev Cancer*. 2008; 8 (3): 180-192.
9. Gheldof A, Berx G. Cadherins and epithelial-to-mesenchymal transition. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2013; 116: 317-336.
10. Rajesh E, Sankari LS, Malathi L, Krupaa JR. Naturally occurring products in cancer therapy. *J Pharm Bioallied Sci*. 2015; 7(Suppl 1): 181-183.
11. Jamalzadeh L, Ghafouri H, Sariri R. Evaluation of anti-proliferative activity of a semi-synthetic derivative of artemisinin-artesunate in MCF-7 human breast cancer cell line. *Journal of Cell & Tissue (JCT)* 2016; 7(1): 45-57.
12. Lasagni Vitar RM, Reides CG, Ferreira SM, Llesuy SF. The protective effect of *Aloysia triphylla* aqueous extracts against brain lipid-peroxidation. *Food Funct*. 2014; 5(3): 557-563.
13. Shafiee F, Moghadamnia A, Shahandeh Z, Sadighian F, et al. Evaluation of the antibacterial effects of aqueous and ethanolic

در سلول‌های سرطانی پروستات (PCA Prostate Cancer Antigen 3) توانسته است پتانسیل تحرک و مهاجم سلول‌های سرطانی پروستات را مهار نماید (۳۱). این پژوهش نیز در راستای پژوهش حاضر از نقش موثر فرآورده‌های طبیعی در پیشگیری از حالت متاستاتیک سرطان حمایت می‌کند.

### نتیجه گیری

در پایان می‌توان با توجه به نتایج حاصل از این پژوهش چنین نتیجه گرفت که عصاره الکلی برگ به‌لیمو دارای خواص ضد سرطانی است و در غلظت‌های مناسب می‌تواند موجب کاهش تکثیر، القای آپوپتوزیس از طریق مسیر وابسته به کاسپاز و مهار متاستاز از طریق افزایش بیان E-cadherin در سلول‌های سرطانی A2780 شود. با توجه به اثرات سیتوتوکسیک و ضدتهاجمی عصاره برگ به‌لیمو پیشنهاد می‌شود که اثر ضد سرطان مواد موثره موجود در این عصاره در مدل‌های حیوانی نیز مورد ارزیابی قرار گیرد تا فواید بالقوه آن در حالت‌های متاستاتیک در شرایط *in vivo* و بالینی نیز تأیید شود.

### تشکر و قدردانی

از همکاران گرمی در دانشکده علوم زیستی دانشگاه خوارزمی و پژوهشکده بیولوژی کاربردی که در اجرای پژوهش همکاری داشتند، سپاسگزاریم.

### منابع

1. Choi Y, Park J, Han JW, Kim E, et al. Differential cytotoxic potential of silver nanoparticles in human ovarian cancer cells and ovarian cancer stem cells. *Int J Mol Sci*. 2016; 17 (2077): 1-17.
  2. Nakayama K, Nakayama N, Katagiri H, Miyazaki K. Mechanisms of ovarian cancer metastasis: biochemical pathways. *Int J Mol Sci*. 2012; 13(9): 11705-11717.
- leaf extracts of *Aloysia Citriodora* (Lemon verbena) on *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*. *Electron Physician*. 2016; 8(12): 3363-3368.

14. Funes L, Carrera-Quintanar L, Cerdán-Calero M, Ferrer MD, et al. Effect of lemon verbena supplementation on muscular damage markers, proinflammatory cytokines release and neutrophils' oxidative stress in chronic exercise. *Eur J Appl Physiol.* 2011; 111(4): 695-705.
15. Mirzaie A, Shandiz S, Ataollah S, Noorbazargan H, et al. Evaluation of chemical composition, antioxidant, antibacterial, cytotoxic and apoptotic effects of *Aloysia citrodora* extract on colon cancer cell line. *Tehran University Medical Journal (TUMJ)* 2016; 74(3): 168-176.
16. Amini E, Baharara J, Nikdel N, Salek Abdollahi F. cytotoxic and pro-apoptotic effects of honey bee venom and chrysin on human ovarian cancer cells. *Asia Pacific Journal of Medical Toxicology (APJMT)* 2015; 4(2): 68-73.
17. Sayyad Delshadpour F, Salehzadeh A, Sadat Shandiz SA. Cytotoxicity effect and changes in the expression of caspase-9 gene in breast cancer cell line (MCF-7) treated with the extract of *Oscillatoria cyanobacteria*. *Qom Univ Med Sci J.* 2018; 12(1): 26-34
18. Najmuddin S, Romli M, Hamid M, Alitheen N, et al. Anti-cancer effect of *Annona muricata* Linn leaves crude Extract (AMCE) on breast cancer cell line. *BMC Complement Altern Med.* 2016; 16(1): 311-317.
19. Lee KS, Shin JS, Nam KS. Cancer chemopreventive effects of starfish polysaccharide in human breast cancer cells. *Biotech Bioprocess Eng.* 2011; 16(5): 987-991.
20. Biemar F, Foti M. Global progress against cancer-challenges and opportunities. *Cancer Biol Med.* 2013; 10(4): 183-186.
21. Zugazagoitia J, Guedes C, Ponce S, Ferrer I, et al. Current challenges in cancer treatment. *Clin Ther.* 2016; 38(7): 1551-1566.
22. Shokri A, Baharara J, Amini E. Evaluation of the antioxidant effect of crocin on neonate Balb/C mouse spermatogonial stem cells. *Journal of Cell & Tissue (JCT)* 2017; 7(3): 219-229.
23. Portmann E, Nigro MM, Reides CG, Llesuy S, et al. Aqueous extracts of *Lippia turbinata* and *Aloysia citriodora* (Verbenaceae): assessment of antioxidant capacity and DNA damage. *Int J Toxicol.* 2012; 31(2): 192-202.
24. Santos N, Pascon R, Vallim M, Figueiredo C, et al. Cytotoxic and antimicrobial constituents from the essential oil of *Lippia alba* (Verbenaceae). *Medicines* 2016; 3(3): 22; 1-9.
25. Shahhoseini H, Ghorbani H, Saleh R. Omidbaigi R. Identification of essential oil content and composition of *Lippia citriodora* seed. *J Plant Prod.* 2012; 18(4): 91-96.
26. Carrera- Quintanar L, Funes L, Viudes E, Tur J, et al. Antioxidant effect of lemon verbena extracts in lymphocytes of university students performing aerobic training program. *Scand J Med Sci Sports.* 2012; 22(4): 454-461.
27. Sullivan LB, Chandel NS. Mitochondrial reactive oxygen species and cancer. *Cancer Metab.* 2014; 2(17): 1-12.
28. Melo JO, Fachin AL, Rizo WF, Jesus HC, et al. Cytotoxic effects of essential oils from three *Lippia gracilis* Schauer genotypes on HeLa, B16, and MCF-7 cells and normal human fibroblasts. *Genet Mol Res* 2014; 13(2): 2691-2697.
29. Ferraz RP, Bomfim DS, Carvalho NC, Soares MB, et al. Cytotoxic effect of leaf essential oil of *Lippia gracilis* Schauer (Verbenaceae). *Phytomedicine.* 2013; 20(7): 615-621.
30. Mesa-Arango AC, Montiel-Ramos J, Zapata B, Durán C, et al. Citral and carvone chemotypes from the essential oils of Colombian *Lippia alba* (Mill.) NE Brown: composition, cytotoxicity and antifungal activity. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009; 104(6): 878-884.
31. Deep G, Gangar S, Agarwal C, Agarwal R. Role of E-cadherin in Anti migratory and anti invasive efficacy of silibinin in prostate cancer cells. *Cancer Prev Res.* 2011; 4(8): 1222-1233.

## Investigating the anticancer effect of *Lippia citriodora* leaf alcoholic extract: in suppression of A2780 ovarian cancer cell metastasis via restoration of E-cadherin expression

Amini E, Ph.D.,<sup>1\*</sup>, Nabiuni M, Ph.D.<sup>2</sup>, Baharara J, Ph.D.<sup>1</sup>, Behzad SB, M.Sc.<sup>2</sup>, Seyfi D, M.Sc.<sup>2</sup>, Salek F, M.Sc.<sup>2</sup>

1. Department of Biology, Faculty of Sciences, Mashhad Islamic Azad University, Mashhad, Iran
2. Department of Cellular & Molecular Biology, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran

\* Email corresponding author: [elaheh.amini@khu.ac.ir](mailto:elaheh.amini@khu.ac.ir)

Received: 1 Jan. 2018

Accepted: 27 May. 2018

### Abstract

**Aim:** The purpose of this study is to investigate the pro-apoptotic and anti-metastatic potentials of *Lippia citriodora* alcoholic leaf extract on A2780 ovarian cancer cells and to evaluate the expression of E-cadherin as one of the most important marker in metastasis.

**Material and Methods:** A2780 ovarian cancer cell line was prepared from Pasteur cell bank and cultured in RPMI1640 medium containing 10% FBS and 1% antibiotic. After cell seeding and treatment with different concentrations of extract (10-400 µg/ml), the cells viability and pro-apoptotic potential were examined by MTT assay and acridine orange/ propodium iodide, respectively. Caspase-3 assay and anti-invasive effect were analyzed by migration assay and assessment of E-cadherin expression, respectively. Then, one way ANOVA test was employed for analysis of quantitative data.

**Results:** Data indicated that *L. citriodora* alcoholic extract attenuated ovarian cancer cell viability. Acridine orange/ propodium iodide and caspase-3 assays showed that this extract in IC50 concentration (100 µg/ml) induced apoptosis mainly through caspase dependent pathway in the ovarian cancer cells. Migration assay and RT-PCR exhibited that this extract has anti-invasive capability and by up- regulation of E-cadherin prevents the loss of attachment between cancer cells.

**Conclusion:** The results revealed that *L. citriodora* alcoholic extract has apoptosis inducing capacity and ability of restoration E-cadherin expression in A2780 cancer cells, which it able to suppress invasive potential of ovarian cancer cells.

**Keywords:** *Lippia citriodora*, metastasis, epithelial mesenchymal transition, E- cadherin, ovarian cancer