Arch

مجله دانشکده علوم پزشکی نیشابور

www.journalnums.ac.ir

Downloaded from journal.nums.ac.ir at 12:07 IRDT on Saturday June 27th 2020

اثر اسانس گیاه *Stachys setifera* برسلول‌های سرطان پستان رده MCF-7

امیر شیرزاد، اکبر صفی‌پور افشار*، فاطمه نعمت‌پور

گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد نیشابور، دانشگاه آزاد اسلامی، نیشابور، ایران

مقاله پژوهشی اصیل

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۵/۲۱

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۰/۱۷

***نویسنده مسئول:** اکبر صفی‌پور افشار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه واحد نیشابور، دانشگاه آزاد اسلامی، نیشابور، ایران

تلفن: ۰۵۱ ۴۲۶۱۳۹۰۵ ۹۸+

پست الکترونیک:

asafshar@iau-neyshabur.ac.ir

چکیده

مقدمه

سرطان پستان شایع‌ترین سرطان در بین زنان است. یکی از راهکارهای پیشگیری و درمان انواع سرطان استفاده از ترکیبات گیاهی است. هدف از این پژوهش مطالعه اثر اسانس گیاه Stachys setifera بر رده سلول سرطانی پستان انسانی MCF-7 و مقایسه آن با داروی دوکسوروبیسین به عنوان یک ترکیب شناخته شده ضدسرطان می‌باشد.

مواد و روش‌ها

سلول‌ها با غلظت‌های ۰/۰۱ تا ۰/۰۲۵ میکرولیتر در میلی‌لیتر اسانس، در فواصل زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت معین تیمار شدند و درصد زنده‌مانی و توانایی تشکیل کلنی سلول‌ها بررسی شد. همچنین اجزای اسانس توسط دستگاه GC-Mass آنالیز شد.

یافته‌ها

اسانس گیاه S. setifera، به طور معنی‌داری سبب کاهش درصد زنده مانی و توانایی تشکیل کلنی سلول‌ها شد و پارامتر IC50 برای زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، به ترتیب،۰/۰۲۰۶، ۰/۰۱۷۸ و ۰/۰۱۷۳ میکرولیتر در میلی‌لیتر بدست آمد. بعلاوه آنالیز اسانس این گیاه نشان داد که بیشترین ترکیبات مربوط به آلکان‌های هیدروکربونی و ترپنوئیدها می‌باشد.

نتیجه‌گیری

اسانس گیاه *S. setifera* در مقایسه با داروی دوکسوروبیسین اثر سمیت سلولی قابل توجهی دارد و به نظر می‌رسد بخشی از این سمیت مربوط به آلکان‌های هیدروکربونی و ترکیبات ترپنوئیدی باشد.

کلیدواژه‌ها

Stachys setifera، سمیت سلولی، سرطان پستان، MCF7، MTT

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from journal.nums.ac.ir at 12:07 IRDT on Saturday June 27th 2020

مقدمه

ابتلا جهانی به بیماری سرطان در سال ۲۰۱۸ به ۱۸/۱ میلیون و مرگ و میر ناشی از آن به ۹/۶ میلیون مورد رسیده است. همچنین در این سال آمار مبتلایان در ایران ۱۱۰ هزار نفر و میزان مرگ میر ۵۶ هزار نفر بوده است (۱). دلایل این افزایش‌ها پیچیده است؛ اما پیری و رشد جمعیت را می‌توان از عوامل مهم دانست. به‌علاوه تغییر در شیوه زندگی روزمره و افزایش عوامل جهش‌زا، نیز از سایر عوامل ابتلا به سرطان می‌باشند (۲). میزان شیوع بدخیمی‌های پستان در کشورهای پیشرفته بیشتر از کشورهای در حال توسعه است (۳). به عقیده کارشناسان، شیوه زندگی متفاوت و عادت‌های غذایی مبتلایان از عوامل مؤثر در بروز این بیماری است (۴). در ایران نیز سرطان پستان به عنوان شایع‌ترین بدخیمی در بین زنان شناخته شده است (۵, ۶).

در سال‌های اخیر با افزایش تحقیقات بر روی گیاهان، اسانس‌ها و ترکیبات گیاهی و خواص آن‌ها همچون فعالیت ضدمیکروبی، آنتی اکسیدانی و به خصوص ضد سرطانی، مورد توجه بسیار قرار گرفته است (۷, ۸). بالغ بر ۳۵۰۰ سال است که از گیاهان در درمان بیماری‌ها استفاده می‌شود و بررسی‌هایی که بر روی گیاهانی که در طب سنتی کاربرد دارند، حاکی از وجود ترکیبات ضد سرطانی در این گیاهان است (۹). کلشی سین[۱] وین کریستین[۲] وین بلاستین[۳] و پاکلیتاکسل[۴] برخی از داروهای مهم ضدسرطان با منشا گیاهی هستند (۱۰). استفاده از ترکیبات گیاهی به عنوان عوامل ضدسرطان برای اولین بار توسط هارتول[۵] و همکاران در اواخر دهه ۱۹۶۰ انجام شد که از پودوفیلوتوکسین[۶] و مشتقات آن به عنوان عامل ضدسرطان استفاده کردند و امروزه بیش از ۶۰ درصد ترکیبات ضدسرطان از منابع گیاهی، دریایی و میکروارگانیسم‌ها تأمین می‌شود (۱۱).

جنس *Stachys* یکی از بزرگترین جنس‌های تیره Lamiaceae محسوب می‌گردد که در سرتاسر جهان حدود ۳۰۰ گونه دارد و تعداد گونه‌های شناسایی شده این جنس در ایران ۳۴ گونه می‌باشد (۱۲). شکل رویشی در برخی از گونه‌های این جنس یک ساله، دوساله، چند ساله، بوته‌ای یا نیمه بوته‌ای هستند که گاهی در نواحی صخره‌ای و استپ‌های کوهستانی رشد می‌کنند (۱۳).

بررسی فیتوشیمیایی برخی از گونه های *Stachys* نشان دهنده حضور ترکیباتی همچون اسید فنولیک، تانن‌ها، فلاونوئیدها و فنیل اتانویید گلیکوزید می‌باشد (۱۴, ۱۵). مطالعات فراوانی به فعالیت‌های دارویی این جنس، از جمله، اثرات ضد سرطانی، ضد باکتریایی، آنتی اکسیدانی، ضد التهابی، ضد نفخ و ضد اضطراب اشاره داشته‌اند (۱۶, ۱۷). بیشتر اسانس‌های گیاهی از ترکیبات هیدروکربنی مانند آلکان‌ها، ترپن‌ها و غیره تشکیل شده‌اند که این اجزا خواص درمانی فراوان دارند. اثر موجود در اسانس‌ها، محرک سیستم عصبی بوده و الکل موجود، مفیدترین جزء دارویی آن‌هاست. آلدهیدها به عنوان ضد میکروب استفاده می‌شوند و استرها بخش معطر، آرام بخش، ضدقارچ، ضد التهاب بیشتر اسانس-ها هستند و همچنین فنول‌ها نیز اجزای آروماتیک و سمی اسانس بوده و مخرب غشاء سلولی و محرک سیستم عصبی می‌باشند (۱۸, ۱۹). به علت وجود ترکیبات ثانویه قابل توجه در جنس *Stachys*، این جنس در صنعت داروسازی و درمان بیماری‌ها کاربرد فراوانی دارد (۲۰, ۲۱).

با افزایش موارد ابتلا به سرطان پستان، هزینه‌های بالای درمانی، عوارض داروهای شیمیایی و مقاومت‌های دارویی متداول، مطالعه بر اثر ترکیبات طبیعی بر این بدخیمی از

[۱] Colchicine
[۲] Vincristine
[۳] Vinblastine
[۴] Paclitaxel
[۵] Hartwell
[۶] Podophyllotoxin

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from journal.nums.ac.ir at 12:07 IRDT on Saturday June 27th 2020

ضرورت فراوانی برخوردار می‌باشد. جمع‌آوری و شناسایی گیاه *S.setifera*، اسانس‌گیری، بررسی میزان زنده ماندن و توان کلنی سازی سلول‌های سرطان پستان رده MCF-7 تحت تأثیر غلظت‌های مختلف اسانس و تشخیص ترکیبات آن از اهداف این پژوهش می‌باشند.

مواد و روش‌ها

تهیه مواد و شرایط انجام تحقیق: در این تحقیق از FBS و Pen-Strep (Gibco, USA)، Trypsin-EDTA و DMEM high Glucose (Viva Cell, Iran) جهت کشت سلول استفاده گردید و همچنین مواد شیمیایی لازم، از شرکت-های Sigma (USA) و Merk (Germany) تهیه شد. در این طرح از رده سلولی سرطان پستان MCF-7 (دانشکده علوم دانشگاه فردوسی مشهد) استفاده شد. سلول‌ها در فلاسک-های درب فیلتردار ۲۵ سانتی متر مکعب در انکوباتور (Memmert, Germany) ۵٪ CO2 و دمای ۳۷°C و رطوبت ۹۵ ٪ کشت داده شدند.

شناسایی، جمع‌آوری و اسانس‌گیری گیاه *S. setifera*: این گیاه از ارتفاع ۱۴۲۸ متری از سطح دریا با آدرس n 36° 20' 030 e 59° 170' "826" در تاریخ ۱۱ خرداد سال ۱۳۹۷ هجری شمسی جمع‌آوری شد. شناسایی توسط متخصصین هرباریوم پژوهشکده علوم گیاهی دانشگاه فردوسی انجام و کد هرباریومی به آن اختصاص یافت. برای تهیه اسانس از سرشاخه‌های خشک برگدار و گلدار گیاه استفاده شد. بدین منظور ۵۰ گرم از بخش‌های مذکور خرد شده و به شف بالن ۱ لیتری منتقل گردید و با دستگاه کلونجر در دمای ۶۰°C به مدت ۴ ساعت عمل اسانس‌گیری انجام شد. سپس اسانس جمع شده با حلال آلی N-Hexane جمع‌آوری شد و برای حذف حلال و تغلیظ آن به مدت ۳۰ ساعت در دمای اتاق قرار گرفت. در این پژوهش از غلظت‌های صفر، ۰/۰۲۵، ۰/۰۲۲۵، ۰/۰۲، ۰/۰۱۷۵، ۰/۰۱۵، ۰/۰۱۲۵ و ۰/۰۱ میکرولیتر در میلی‌لیتر اسانس استفاده شد. جهت تهیه این غلظت‌ها از DMSO ۰/۵٪ استفاده گردید.

سنجش سمیت سلولی اسانس به روش MTT:: ابتدا تعداد ۵۰۰۰ سلول به هر چاهک پلیت ۹۶ خانه منتقل و ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت حاوی ۱۰ درصد FBS به آن‌ها اضافه گردید و پلیت در انکوباتور کشت سلول قرار داده شد. پس از تثبیت سلول‌های کشت شده در پلیت ۹۶ خانه‌ای که این مرحله ۲۴ ساعت به طول انجامید، چاهک‌های کنترل و آزمایش انتخاب شده و غلظت‌های مورد نظر از اسانس و کنترل‌های معادل آن‌ها تهیه و به چاهک‌ها اضافه شدند. اثرات سمیت سلولی اسانس مورد آزمایش ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از تیمار مورد ارزیابی قرار گرفت. به منظور محاسبه درصد زنده‌مانی سلول‌ها از نرم افزار Prism 8.0.2 استفاده شد. در ابتدا میانگین جذب‌های نوری سلول‌های تیمار شده با غلظت‌های مورد نظر از اسانس بر میانگین جذب‌های نوری محلول معادل DMSO ۰/۵ درصد تقسیم و در نهایت عدد حاصل در ۱۰۰ ضرب شد. غلظت مؤثر اسانس دارای سمیت سلولی، با کمیتی به نام IC50 گزارش شد که نشان دهنده غلظتی است که در آن نیمی از سلول‌ها زنده می‌باشند.

بررسی توان کلنی سازی و شمارش کلنی‌ها تحت تأثیر اسانس: تعداد ۵۰۰۰ سلول سرطان پستان MCF-7 در ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت (۵۰۰ سلول در میلی‌لیتر) به مدت ۱۲ ساعت در پتری‌دیش‌های استریل کشت داده شد و سپس با غلظت‌های صفر، ۰/۰۱، ۰/۰۲ و ۰/۰۳ میکرولیتر در میلی‌لیتر اسانس به مدت ۴۸ ساعت تیمار گردید و پس از خارج کردن محیط کشت و فیکس کردن سلول‌ها با متانول به مدت ۱۰ دقیقه در دمای منهای ۲۰°C، عمل رنگ آمیزی با تریپان بلو به مدت ۱۰ دقیقه انجام و سپس با استفاده از استرئومیکروسکوپ شمارش کلنی‌ها در ۵ منطقه تصادفی

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from journal.nums.ac.ir at 12:07 IRDT on Saturday June 27th 2020

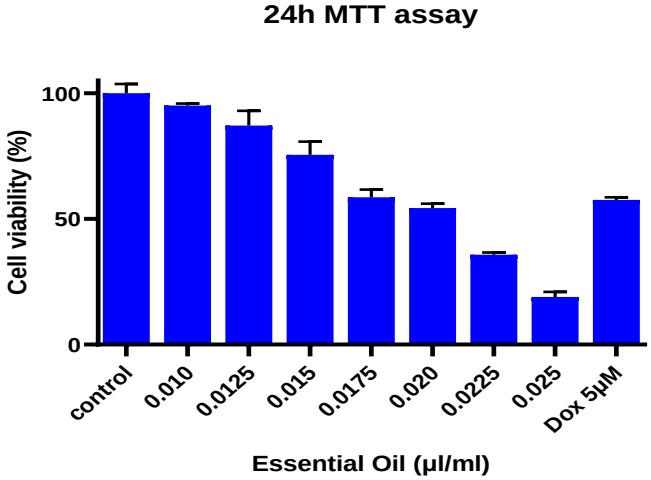
انجام پذیرفت. جهت محاسبه آماری و مقایسه تعداد کلنی-های به‌وجود آمده تحت تیمار هر غلظت، میانگین تعداد کلنی آن‌ها بر میانگین تعداد کلنی نمونه کنترل (حاوی ۰/۵ DMSO) تقسیم و سپس عدد حاصل در عدد ۱۰۰ ضرب گردید.

شناسایی ترکیبات اسانس: اسانس با دستگاه GC-Mass (Agilent Technologies, USA) و ستون DB35MS آنالیز شد. شرایط دمایی شامل ۶۰°C برای ۸ دقیقه و سپس در هر دقیقه ۳°C افزایش تا دمای ۱۸۰°C و در انتها برای ۵ دقیقه دمای ۱۸۰°C و جمعاً به مدت زمان ۵۳ دقیقه بود. پس از اتمام فرایند گازکروماتوگرافی، نموداری شامل پیک-هایی مبنی بر زمان و مقدار ماده شناسایی شده رسم گردید و سپس تمام داده‌ها با کتابخانه بین المللی ترکیبات آلی مقایسه شد و فایلی از ترکیبات احتمالی هر پیک بدست آمد که پس از آنالیز آن‌ها جدول ترکیبات اسانس گیاه *S. setifera* حاصل گردید.

آنالیز آماری: داده ها با نرم افزارهای SAS (9.4) و Statistix (8) آنالیز شدند. تجزیه واریانس با ضریب اطمینان ۹۵٪ و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون LSD صورت گرفت. رسم نمودارها توسط نرم افزار Prism (8.0.2) انجام گرفت.

یافته‌ها

اثر سمیت سلولی اسانس گیاه *S. setifera* بر سلول‌های سرطان پستان انسانی رده MCF-7: نتایج نشان داد که سمیت اسانس گیاه *S. setifera* بر سلول‌های سرطانی رده MCF-7 در مقایسه با گروه کنترل به‌صورت معنی داری بیشتر بوده و با افزایش غلظت اسانس، سمیت سلولی به‌طور قابل توجهی افزایش می‌یابد و در مقایسه با داروی دوکسوروبیسین کشندگی بسیار بالایی دارد. به‌طور مثال میزان درصد زنده‌مانی سلول‌ها در غلظت ۰/۰۲۵میکرولیتر در میلی‌لیتر اسانس ۸۰ درصد نسبت به گروه کنترل در مدت زمان تیمار ۲۴ ساعت، کاهش یافت در حالیکه در این زمان میزان کاهش ایجاد شده توسط دوکسوروبیسین ۵ میکرومولار (محدوده IC50) ۴۲/۵ درصد بود و همچنین پارامتر IC50 در این بازه زمانی، برابر با ۰/۰۲۰۶ میکرولیتر در میلی‌لیتر اسانس بدست آمد (شکل ۱).

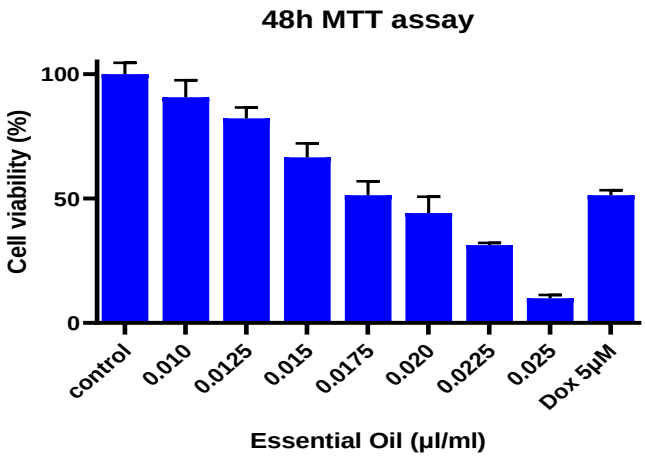


شکل ۱- نمودار اثر سمیت سلولی اسانس گیاه *Stachys Setifera* بر سلول‌های سرطان پستان انسانی رده MCF-7 پس از گذشت ۲۴ ساعت.

www.SID.ir

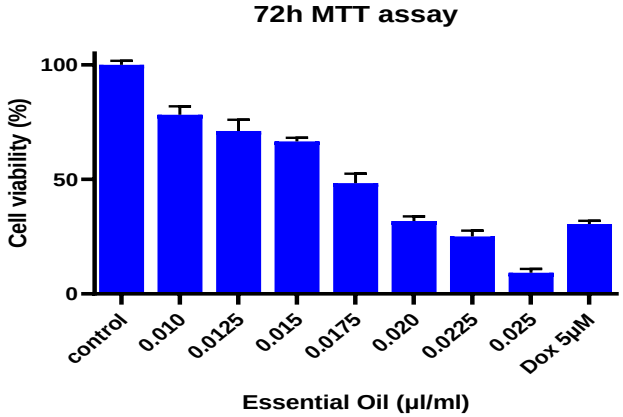
Archive of SID

Downloaded from journal.nums.ac.ir at 12:07 IRDT on Saturday June 27th 2020



شکل ۲- نمودار میانگین اثر سمیت سلولی اسانس گیاه Stachys Setifera بر سلول‌های سرطان پستان انسانی رده MCF-7 پس از گذشت ۴۸ ساعت.

درصد زنده‌مانی سلول‌های سرطان پستان رده MCF-7 در مدت زمان ۴۸ ساعت در شکل ۲ نشان داده شده است. در این زمان نیز سیر نزولی درصد زنده‌مانی با افزایش غلظت اسانس قابل مشاهده است. در این تیمار IC50 به میزان ۰/۰۱۷۸ میکرولیتر در میلی‌لیتر گزارش گردید. داروی دوکسوروبیسین در غلظت ۵ میکرومولار کاهش ۴۹ درصدی در درصد زنده‌مانی سلول‌ها پس از گذشت ۴۸ ساعت را نشان داد (شکل ۲).



شکل ۳- نمودار میانگین اثر سمیت سلولی اسانس گیاه *Stachys Setifera* بر سلول‌های سرطان پستان انسانی رده MCF-7 پس از گذشت ۷۲ ساعت.

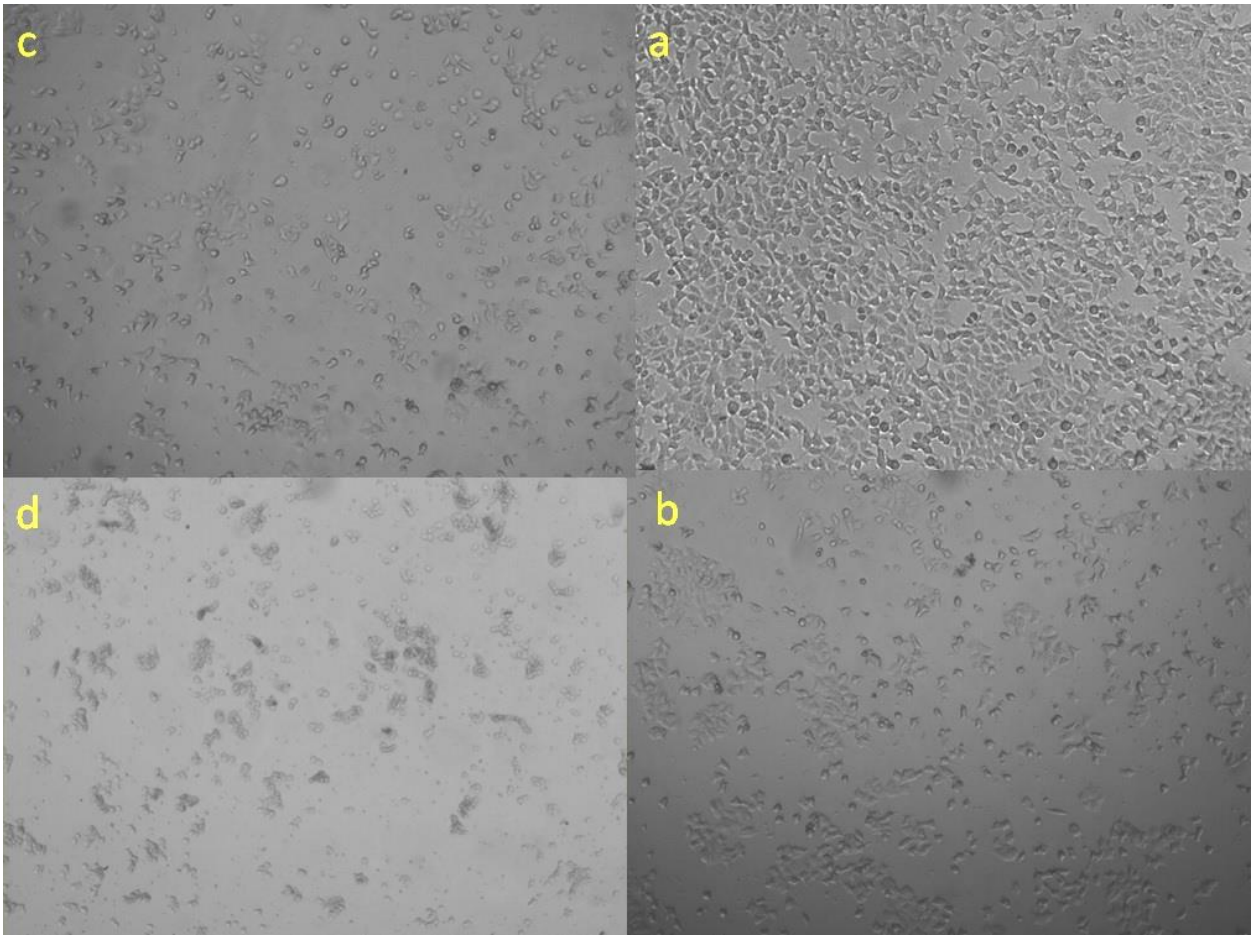
در زمان ۷۲ ساعت نیز روند کاهش درصد زنده‌مانی با افزایش غلظت اسانس دیده شد. IC50 بدست آمده در این زمان معادل ۰/۰۱۷۳ میکرولیتر در میلی‌لیتر می‌باشد که تفاوت چندانی با تیمار ۴۸ساعت ندارد. به‌علاوه داروی دوکسوروبیسین در غلظت ۵ میکرومولار سبب کاهش ۷۰ درصدی در درصد زنده‌مانی سلول‌ها پس از گذشت ۷۲ ساعت شد (شکل ۳).

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from journal.nums.ac.ir at 12:07 IRDT on Saturday June 27th 2020

شکل طبیعی سلول‌های رده MCF-7 به صورت چند ضلعی بوده و از تکثیر نسبتاً بالایی برخوردار می‌باشند. تیمار سلول‌ها با غلظت‌های مختلف اسانس شکل ظاهری سلول‌ها را تحت تأثیر قرار داد. به‌طوری که با افزایش غلظت اسانس، سلول‌ها از حالت طبیعی خارج و پس از بیضی و کروی شدن، توانایی اتصال خود را از دست داده و شناور شدند (شکل ۴).

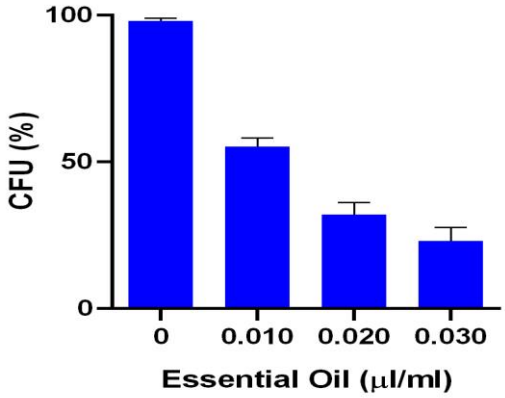


شکل ۴- تصویر اثر سمیت سلولی اسانس گیاه *Stachys Setifera* بر سلول‌های سرطان پستان انسانی رده *MCF-7* پس از گذشت ۴۸ ساعت. (a: نمونه کنترل. b: تیمار با غلظت ۰/۰۱ میکرولیتر در میلی‌لیتر. c: تیمار با غلظت ۰/۰۲ میکرولیتر در میلی‌لیتر. d: تیمار با غلظت ۰/۰۲۵ میکرولیتر در میلی‌لیتر)

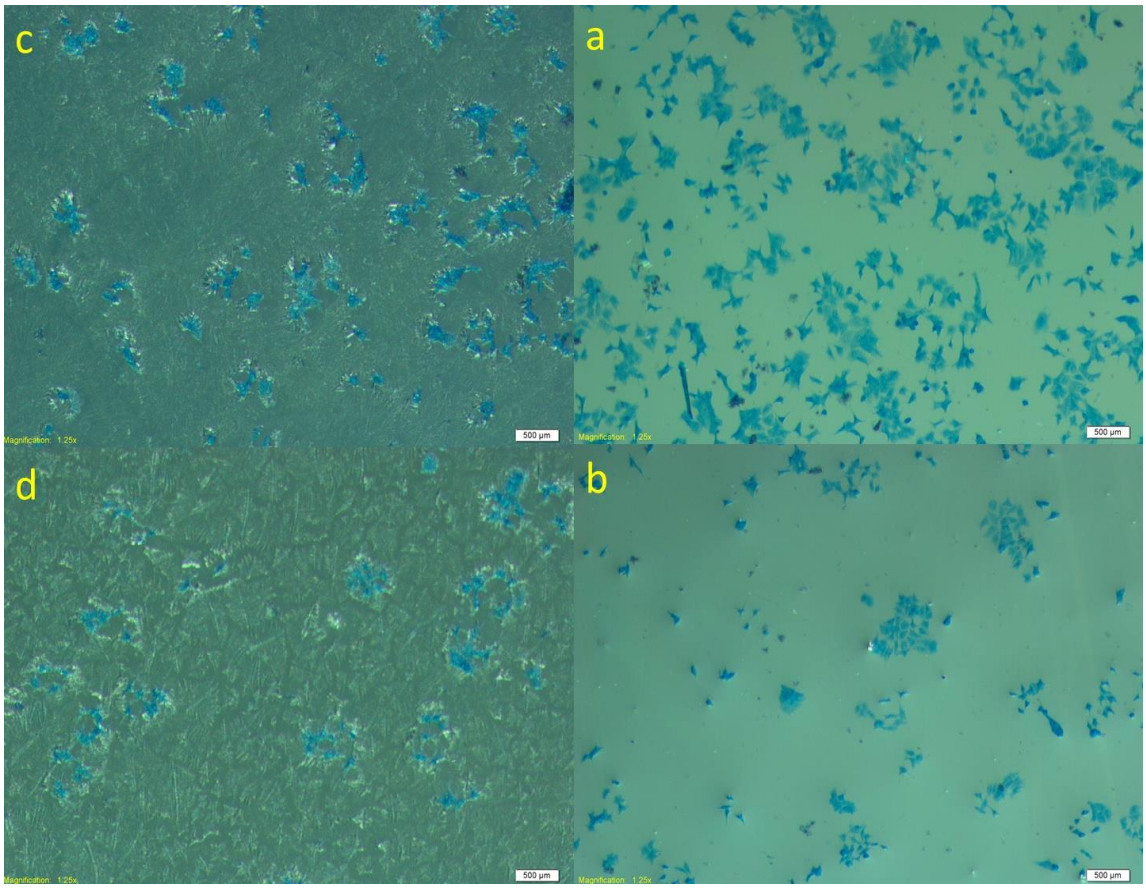
تاثیر اسانس *S. Setifera* بر توانایی تشکیل کلنی سلولی: بررسی تعداد کلنی‌ها در غلظت‌های صفر، ۰/۰۱، ۰/۰۲ و ۰/۰۳ میکرولیتر در میلی‌لیتر اسانس در بازه زمانی ۴۸ ساعت انجام گرفت. درصد توان کلنی شدن سلول‌های سرطانی به طور معنی‌داری پس از تیمار با اسانس در مقایسه با گروه کنترل کاهش یافت. به طوریکه در مقایسه با نمونه کنترل در غلظت ۰/۰۱ میکرولیتر در میلی‌لیتر توان کلنی‌سازی سلول‌های سرطان پستان MCF-7 ۴۵ درصد و در غلظت ۰/۰۲ میکرولیتر در میلی‌لیتر ۶۸ درصد و همچنین در غلظت ۰/۰۳ میکرولیتر در میلی‌لیتر ۷۷ درصد کاهش یافت (شکل ۵ و ۶).

www.SID.ir

Downloaded from journal.nums.ac.ir at 12:07 IRDT on Saturday June 27th 2020



شکل ۵- نمودار اثر سمیت سلولی اسانس گیاه *Stachys Setifera* بر توان کلنی‌سازی سلول‌های سرطان پستان انسانی رده MCF-7 پس از گذشت ۴۸ ساعت.



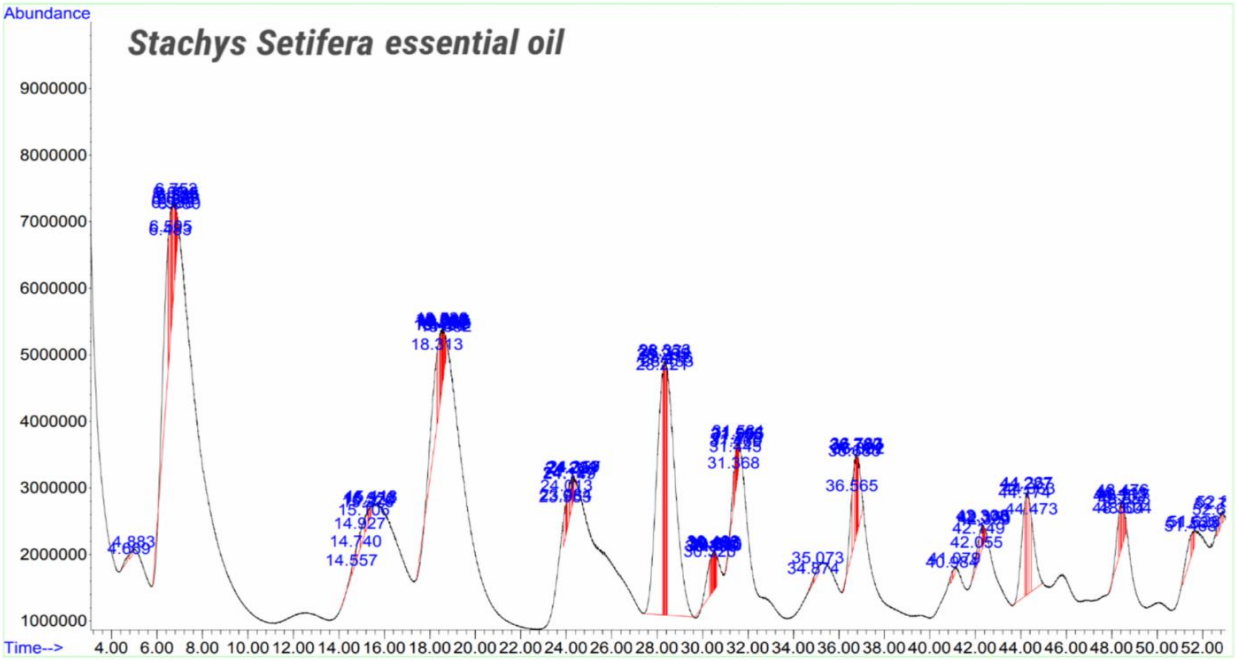
شکل ۶: تصویر اثر سمیت سلولی اسانس گیاه *Stachys Setifera* بر قدرت کلنی‌سازی سلول‌های سرطان پستان انسانی رده MCF-7 پس از گذشت ۴۸ ساعت. (a: نمونه کنترل. b: تیمار با غلظت ۰/۰۱ میکرولیتر در میلی‌لیتر. c: تیمار با غلظت ۰/۰۲ میکرولیتر در میلی‌لیتر. d: تیمار با غلظت ۰/۰۳ میکرولیتر در میلی‌لیتر)

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from journal.nums.ac.ir at 12:07 IRDT on Saturday June 27th 2020

ترکیبات اسانس گیاه *Stachys Setifera* بر اساس آنالیز صورت گرفته (شکل ۷) ۱۴ ترکیب برای اسانس این گیاه گزارش گردید (جدول ۱) که اکثر این ترکیبات دارای صحت تشخیص بالای ۹۰ درصد می‌باشند و ۹۹/۳۴ درصد از کل اسانس را به خود اختصاص می‌دهند و با توجه به ترکیبات شناسائی شده، ۸۲/۱۹ درصد ترکیبات به‌دست آمده از اسانس گیاه *S. Setifera*، ان-دکان بوده و پس از آن هگزاهیدروفارنسیل استون ۳/۲۹ درصد و نیریل استات ۳/۲۲ درصد بیشترین ترکیبات گزارش شده می‌باشند.



شکل ۷. نمودار رسم شده توسط دستگاه GC-Mass.

در جدول یک به ترتیب، شماره پیک، نام ترکیب ، زمان به دست آمدن پیک بر حسب دقیقه، درصد وجود ترکیب در اسانس و احتمال صحت و وجود ترکیب مشخص گردیده است.

جدول۱- ترکیبات اسانس گیاه *Stachys Setifera*

Peak no.	Compound name	RT	% in oil	Qual
۱	Decane	۶,۶۸۳	۱۲,۸۴	۹۶
۲	2-Ethylhexanol	۱۴,۹۸۷	۱,۹۶	۹۰
۳	Dodecane	۱۸,۵۰۳	۸,۱	۹۶
۴	Linalyl Acetate	۲۴,۱۵۵	۲,۷۶	۹۱
۵	Tetradecane	۲۸,۳۳۷	۴۳,۵۶	۹۸
۶	Neryl Acetate	۳۰,۴۵۵	۳,۲۲	۹۱
۷	Geranyl Acetate	۳۱,۴۷۵	۱,۹	۹۱

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from journal.nums.ac.ir at 12:07 IRDT on Saturday June 27th 2020

Peak no.	Compound name	RT	% in oil	Qual
۸	Germacrene-D	۳۴,۹۷۵	۰,۳۷	۹۸
۹	Hexadecane	۳۶,۷۱۰	۶,۷	۹۸
۱۰	Bicyclo[3.1.1]heptane, 6,6-dimethyl-3-methylene	۴۲,۲۲۷	۱,۶	۸۳
۱۱	Octadecane	۴۴,۳۲۴	۱۰,۹۹	۹۷
۱۲	Hexahydrofarnesyl acetone	۴۸,۴۵۳	۳,۲۹	۹۱
۱۳	Eicosane	۵۱,۵۴۸	۱,۶	۹۵
۱۴	Benzyl Benzoate	۵۲,۷۸۱	۰,۴۵	۹۸

بحث

سرطان پستان شایع‌ترین نوع سرطان در بین زنان است و از بزرگترین مشکلات سلامتی بشر در نقاط مختلف جهان به شمار می‌آید که سالانه جان هزاران انسان را می‌گیرد (۲۲). میزان سلامت فردی، محیط زیست، سبک زندگی و فعالیت جسمانی، همگی در روند ابتلا به این بیماری مؤثر می‌باشند. سرطان پستان در ایران رتبه اول را در میان سرطان‌های تشخیص داده شده در زنان دارا است (۲۳).

عوارض ناخواسته جانبی داروهای شیمی‌درمانی مصنوعی فعلی، مقاومت دارویی و همچنین هزینه بالای درمان سرطان پستان، نیازمند جستجوی داروهای طبیعی، معتبر و مقرون به صرفه است و گیاهان دارویی منبع مهمی از مولکول‌های زیست فعال هستند؛ بنابراین استفاده از گیاهان برای توسعه عوامل ضدسرطان جدید برای سال‌های زیادی در حال اجرا است در همین راستا گیاهان مختلف و ترکیبات مربوط به آن‌ها به عنوان عامل ضدسرطان قوی شناسایی می‌شوند (۲۴).

در همین راستا، در پژوهش حاضر اثر سمیت سلولی اسانس گیاه *S. setifera* بررسی شد. در مطالعات گوناگون پیرامون تاثیر اسانس گیاهان دارویی از غلظت‌های مختلفی برای بررسی اثر سمیت سلولی بهره گرفته شده است. در مطالعه‌ای Wu Jia-liang و همکاران از غلظت‌های مختلف ۰/۷۵ تا ۵۰ µg/ml استفاده کردند (۲۵). در عین حال N Sarvmeili و همکاران برای اسانس گیاه *Pinus eldarica* از غلظت‌های ۰/۰۱ تا ۰/۲ µl/ml استفاده نمودند که از غلظت ۰/۱ µl/ml به بالا سمیت بسیار زیاد بوده، به گونه‌ای که سلول زنده‌ای گزارش نکردند (۲۶). بنابراین استفاده از غلظت مناسب در جهت رسیدن به IC50 در سمیت سلولی تابع آزمایش سمیت سلولی اسانس گیاه مربوطه می‌باشد. در این تحقیق در ابتدا از غلظت‌های حدود ۰/۱ استفاده شد اما به دلیل سمیت زیاد غلظت‌های کمتر انتخاب و نهایتاً هفت غلظت در بازه ۰/۰۱ تا ۰/۰۲۵ میکرولیتر در میلی‌لیتر برگزیده شد که IC50 این اسانس در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، به ترتیب ۰/۰۲۰۶، ۰/۰۱۷۸ و ۰/۰۱۷۳ میکرولیتر در میلی‌لیتر بدست آمد.

در مطالعات پیشین گزارشاتی از سمیت سلولی عصاره جنس Stachys وجود دارد که می‌توان به مطالعه Khanavi و همکاران اشاره کرد که عصاره ۴ گونه از Stachys را که از مناطق مختلف کشور ایران جمع‌آوری شده بودند به روش-های متانولی، اتیل استات و کلروفورمی تهیه و اثرات سمیت سلولی آنها را بر رده‌های HT-29، Caco-2 و T47D بررسی کردند (۲۷) و همچنین در سال ۲۰۱۴، Ostad و همکاران با

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from journal.nums.ac.ir at 12:07 IRDT on Saturday June 27th 2020

چهار روش مختلف از چهار گونه از Stachys از جمله *S. setifera* عصاره‌گیری نمودند و اثرات سمیت سلولی قابل توجهی از این گونه‌ها را بر سلول‌های مختلف سرطانی گزارش کرده و مطالعه بر ترکیبات این گونه‌ها را برای تحقیقات آینده پیشنهاد دادند (۲۸).

در سال ۲۰۰۹ مطالعه‌ای بر اسانس ۶ گونه از جنس Stachys، شامل گونه‌های *S. cretica L. ssp. vacillans*، *S. hydrophila Boiss.*، *S. germanica L.*، *S. Rech. fil.*، *S. nivea Labill.*، *S. palustris L.* و *S. spinosa L.* انجام پذیرفت و Conforti و همکاران اثرات سمیت سلولی این اسانس‌ها را بر روی سلول‌های سرطان انسانی رده‌های C32 و ACHN بررسی نمودند و اثر سمیت متفاوتی را با پارامتر IC50 برای هر اسانس در دو رده سلولی C32 و ACHN گزارش کردند(۲۹). در مطالعه دیگری Serbetci و همکاران اسانس دو زیرگونه از *S. cretica* را بر دو رده سرطان انسانی HL-60 و Ishikawa تیمار کرده و به ترتیب IC50 برابر با ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر را برای این دو رده سلولی گزارش نمودند (۳۰).

بر اساس جدول ۱، ان-دکان[۱]، هگزاهیدروفارنسیل استون[۲] و نیریل استات[۳] بیشترین ترکیباتی هستند که در اسانس *Stachys Setifera* وجود دارند. ان-دکان‌ها آلکان‌هایی راست زنجیر از اتم‌های کربن و هیدروژن می‌باشند که بی رنگ، قابل اشتعال، غیر قابل حل در آب و جزء فرار روغن-های گیاهی هستند . هگزاهیدروفارنسیل استون سسکوئی-ترپنوئید[۴] نامحلول در آب و کمی اسیدی است که در اکثر گیاهان یافت می‌شود (۳۱). نیریل استات، مایع فرار معطری است که در ترکیب متابولیت‌های ثانویه اکثر گیاهان وجود دارد و این استراستات[۵] یک مونوترپنوئید[۶] و یک ترکیب الفین[۷] است . Tirillini و همکاران در سال ۲۰۰۴ برروی اسانس گونه‌ای از *Stachys* در کشور ایتالیا مطالعه کردند و مهمترین ترکیبات موجود در این اسانس را مونوترپنوئیدها، سسکوئی‌ترپنوئیدها و آلکان‌های هیدروکربنی گزارش نمودند (۳۲). در سال ۲۰۰۸ مطالعه ای مشابه توسط Bisht و همکاران انجام گردید و در این گزارش نیز ترکیبات مشابه Tirillini و همکاران را تایید کردند (۳۳). Serbetci و همکاران در سال ۲۰۱۰ بر روی اسانس دو زیرگونه از جنس *Stachys cretica* و مهار رشد سلول‌های توموری انسانی HL-60 و Ishikawa مطالعه کردند و مهمترین ترکیب را Germacrene-D که یک ترکیب سسکوئی‌ترپن است را گزارش نمودند (۳۰). در سال ۲۰۰۹، Firouznia و همکاران، تحقیقات در مورد اسانس *Stachys Turcomanica* انجام دادند که ترکیبات اصلی به عنوان Germacrene-D (۱۷,۴٪)، 7-epi-α-selinene (۱۰,۵٪)، β-elemene (۹,۲٪) و β-pinene (۶,۸٪) شناسایی شدند (۳۴). Conforti و همکاران در سال ۲۰۰۹ فعالیت اصلی سیتوتوکسیک ۶ گونه از جنس *Stachys* را مربوط به برخی استرها و ترپنوئیدهایی دانستند که در این جنس وجود دارد (۲۹) در صورتی که K Javidnia و همکاران در سال ۲۰۰۳ اصلی‌ترین ترکیب موجود در گیاه *Stachys setifera* را پالگون[۸]، پیپریتنون اکساید[۹] و آلفا ترپینیل استات[۱۰] گزارش کردند (۳۵).

نتیجه‌گیری

خانواده بزرگ نعناعیان مخصوصا جنس Stachys از دیرباز به عنوان داروی گیاهی مهم در بسیاری از بیماری‌ها کاربرد داشته و چای آن به طور روزمره به عنوان نوشیدنی

۱ n-Decane
۲ Hexahydrofarnesyl acetone
۳ Neryl Acetate
۴ Sesquiterpenoid
۵ Acetate Ester
۶ Monoterpenoid
۷ Olefinic Compound
۸ Pulegone
۹ Piperitenone Oxide
۱۰ α-Terpinyl Acetate

www.SID.ir

Downloaded from journal.nums.ac.ir at 12:07 IRDT on Saturday June 27th 2020

آرام‌بخش مورد استفاده بوده است. این مطالعه به بررسی اثر اسانس گونه *S. setifera* بر سلول‌های سرطان پستان انسانی رده MCF-7 پرداخت و نتایج قابل توجهی از سمیت سلولی و اثر بر توان کلنی‌سازی سلول‌های سرطانی و مورفولوژی این رده بدست آمد و همچنین ترکیبات این اسانس نیز گزارش گردید. در راستای کامل شدن نتایج سمیت سلولی اسانس این گیاه، مطالعه اثر آن بر سلول‌های نرمال پستان پیشنهاد می‌گردد و همچنین می‌توان از ترکیبات این اسانس به‌صورت خالص برای بررسی‌های آینده بهره برد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مراتب تشکر و قدردانی خود را از مدیریت پژوهش و فناوری دانشگاه آزاد اسلامی واحد نیشابور بابت در اختیار قرار دادن امکانات آزمایشگاهی اعلام می دارند.

تعارض منافع

هیچ گونه تعارض منافع توسط نویسندگان بیان نشده است.

References

1. Rawla P, Barsouk A. Epidemiology of gastric cancer: global trends, risk factors and prevention. Przeglad gastroenterologiczny. 2019;14(1):26.
2. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA: a cancer journal for clinicians. 2018;68(6):394-424.
3. Taghiyar S, Poor KS, Razmi Na. A Comparison of the Serum Level of Carcinoembryonic antigen, Prolactin, and Malondialdehyde in Patients Suffering from Breast Cancer and in Healthy individuals in Isfahan. Journal of Fasa University of Medical Sciences/Majallah-i Danishgah-i Ulum-i Pizishki-i Fasa. 2014;4(3).
4. Mehra K, Berkowitz A, Sanft T. Diet, physical activity, and body weight in cancer survivorship. Medical Clinics. 2017;101(6):1151-65.
5. Majidi A, Salimzadeh H, Beiki O, Delavari F, Majidi S, Delavari A, et al. Cancer research priorities and gaps in Iran: the influence of cancer burden on cancer research outputs between 1997 and 2014. Public health. 2017;144:42-7.
6. Zonouzy VT, Niknami S, Ghofranipour F, Montazeri A. An educational intervention based on the extended parallel process model to improve attitude, behavioral intention, and early breast cancer diagnosis: a randomized trial. International journal of women's health. 2019;11:1.
7. Kazemi M. Phytochemical Composition of Thymus vulgaris L. Essential Oil. J of Essential Oil Bearing Plants. 2015;18(3):751-3.
8. Qiao M, Luo J, Yang M, Wu J, Sheng P. Effect of Ferula ferulaeoides on growth and apoptosis of human gastric cancer MGC-803 transplantation tumor in nude mice. Zhongguo Zhong yao za zhi= Zhongguo zhongyao zazhi= China journal of Chinese materia medica. 2019;44(13):2827-34.
9. Butt MS, Naz A, Sultan MT, Qayyum MM. Anti-oncogenic perspectives of spices/herbs: A comprehensive review. EXCLI journal. 2013;12:1043-65.
10. Kaur R, Kapoor K, Kaur H. Plants as a source of anticancer agents. J Nat Prod Plant Resour. 2011;1(1):119-24.
11. Srivastava V, Negi AS, Kumar JK, Gupta MM, Khanuja SP. Plant-based anticancer molecules: a chemical and biological profile of some important leads. Bioorganic & medicinal chemistry. 2005;13(21):5892-908.
12. Dundar E, Akcicek E, Dirmenci T, Akgun S. Phylogenetic analysis of the genus Stachys sect. Eriostomum (Lamiaceae) in Turkey based on nuclear ribosomal ITS sequences. Turkish Journal of Botany. 2013;37:14-23.
13. Lindqvist C, Albert VA. Origin of the Hawaiian endemic mints within North American Stachys (Lamiaceae). American journal of botany. 2002;89(10):1709-24.
14. Vundać VB, Brantner AH, Plazibat M. Content of polyphenolic constituents and antioxidant activity of some Stachys taxa. Food chemistry. 2007;104(3):1277-81.

www.SID.ir

Downloaded from journal.nums.ac.ir at 12:07 IRDT on Saturday June 27th 2020

15. Öztürk M, Duru ME, Aydoğrmuş-Öztürk F, Harmandar M, Mahlıçlı M, Kolak U, et al. GC-MS analysis and antimicrobial activity of essential oil of Stachys cretica subsp. smyrnaea. Natural product communications. 2009;4(1):1934578X0900400124.
16. Amirghofran Z, Bahmani M, Azadmehr A, Javidnia K. Immunomodulatory and apoptotic effects of Stachys obtusicrena on proliferative lymphocytes. Medical science monitor. 2007;13(6):BR145-BR50.
17. Matkowski A, Piotrowska M. Antioxidant and free radical scavenging activities of some medicinal plants from the Lamiaceae. Fitoterapia. 2006;77(5):346-53.
18. Mahmoudi R. Effect of Mentha longifolia L. Essential oil on physicochemical properties of the bio-ayran. Journal of Essential Oil Bearing Plants. 2014;17(1):56-66.
19. Mahmoudi R, Zare P, Nosratpour S, Mardani K, Safari A. Hygienic effects of teucrium polium essential oil against salmonella typhimorium lt2 in probiotic yoghurt. Urmia Med J. 2014;25(8):769-77.
20. Kochieva EZ, Ryzhova NN, Legkobit MP, Khadeeva NV. [RAPD and ISSR analyses of species and populations of the genus Stachys]. Genetika. 2006;42(7):887-92.
21. Lixandru BE, Dracea NO, Dragomirescu CC, Dragulescu EC, Coldea IL, Anton L, et al. Antimicrobial activity of plant essential oils against bacterial and fungal species involved in food poisoning and/or food decay. Roumanian archives of microbiology and immunology. 2010;69(4):224-30.
22. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019. CA: a cancer journal for clinicians. 2019;69(1):7-34.
23. Rezaianzadeh A, Peacock J, Reidpath D, Talei A, Hosseini SV, Mehrabani D. Survival analysis of 1148 women diagnosed with breast cancer in Southern Iran. BMC cancer. 2009;9:168.
24. Usmani S, Ahmad M, Hussain A, Arshad M, Ali M. Cellular oxidative stress and antiproliferative effects of Cordia dichotoma (Linn.) seeds extract and their fractions on human cervix epitheloid (HeLa) and human lung (A549) carcinoma cells. European Journal of Integrative Medicine. 2018.
25. Jia-liang. W, Dan-wei. M, Ya-nan. W, Hong. Z, Bing. H, Qun. L, et al. Cytotoxicity of Essential Oil of Chenopodium ambrosioides L against Human Breast Cancer MCF-7 Cells. Tropical Journal of Pharmaceutical Research. 2013;12(6):929-33.
26. Sarvmeili N, Jafarian-Dehkordi A, Zolfaghari B. Cytotoxic effects of Pinus eldarica essential oil and extracts on HeLa and MCF-7 cell lines. Research in pharmaceutical sciences. 2016;11(6):476-83.
27. Khanavi M, Manayi A, Lotfi M, Abbasi R, Majdzadeh M, Ostad SN. Investigation of cytotoxic activity in four Stachys species from Iran. Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR. 2012;11(2):589.
28. Ostad S, Vazirian M, Manayi A, Hadjiakhoondi A, Khanavi M. Comparison of cytotoxic activity of some Iranian Stachys spp. extracts on different cancer cell lines. Research Journal of Pharmacognosy. 2014;1(2):23-8.
29. Conforti F, Menichini F, Formisano C, Rigano D, Senatore F, Arnold NA, et al. Comparative chemical composition, free radical-scavenging and cytotoxic properties of essential oils of six Stachys species from different regions of the Mediterranean Area. Food Chemistry. 2009;116(4):898-905.
30. Serbetci T, Demirci B, Güzel C, Kültür S, Ergüven M, Başer K. Essential oil composition, antimicrobial and cytotoxic activities of two endemic Stachys cretica subspecies (Lamiaceae) from Turkey. Natural product communications. 2010;5(9):1369-74.
31. Duke J. Dr. Duke's Phytochemical and Ethnobotanical Databases. United States Department of Agriculture. Agricultural Research Service, Accessed April. 2004;27.
32. Tirillini B, Pellegrino R, Bini LM. Essential oil composition of Stachys sylvatica L. from Italy. Flavour and fragrance journal. 2004;19(4):330-2.
33. Bisht D, Padalia R, Joshi S, Singh K, Mathela C. Sesquiterpene hydrocarbons rich essential oil of Stachys sericea Wall. Journal of Essential Oil Bearing Plants. 2008;11(6):586-90.
34. Firouznia A, Rustaiyana A, Masoudi S, Rahimizade M, Bigdeli M, Tabatabaei-Anaraki M. Volatile constituents of Salvia limbata, Stachys turcomanica, Scutellaria litwinowii and Hymenocrater elegans four Lamiaceae herbs from Iran. Journal of Essential Oil Bearing Plants. 2009;12(4):482-9.
35. Javidnia K, Miri R, Azarpira A, Tabaei S. Composition of the essential oil of Stachys setifera CA Mey ssp. iranica growing in Iran. Flavour and fragrance journal. 2003;18(4):299-300.

www.SID.ir

Archiv

Journal of Neyshabur University of Medical Sciences

www.journalnums.ac.ir

Downloaded from journal.nums.ac.ir at 12:07 IRDT on Saturday June 27th 2020

Effect of Stachys setifera essential oil on human breast cancer MCF-7 cells line

Amir Shirzad, Akbar Safipour Afshar*, Fatemeh Saeid Nematpour

Department of Biology, Faculty of Sciences, Neyshabur Branch, Islamic Azad University, Neyshabur, Iran

OriginalArticle

Received: 12 Aug 2019
Accepted: 7 Jan 2020

***Corresponding Author:**
Akbar Safipour Afshar, Department of Biology, Faculty of Sciences, Neyshabur Branch, Islamic Azad University, Neyshabur, Iran
TEL: +98 51 42613905
Email: asafshar@iau-neyshabur.ac.ir

ABSTRACT

Introduction
Breast cancer is the most common cancer among women. One of the approaches to prevent and treat various cancers is to use plant compounds. This study aimed to investigate the effect of *S. setifera* essential oil on the MCF-7 human breast cancer cell line and comparing it with Doxorubicin as a known anti-cancer medicine**.**

Materials and Methods
Cells are treated by 0.01-0.025 µl/ml of essential oil at 24, 48, and 72 hours and cell viability and colony formation ability were quantified. Also, essential oil composition is analyzed by GC-Mass.

Results
The *S. setifera* essential oil decreased the viability and CFU of cells, significantly. EO IC50 was reported as 0.0206, 0.0175 and 0.0173 µl/ml over 24, 48 and 72 hours. In addition, the *S. setifera* essential oil GC-Mass analysis showed that most compounds are related to hydrocarbon alkanes and terpenoids.

Conclusion
Due to the *S. setifera* essential oil cytotoxicity efficacy of and the observation of compounds obtained from the GC-Mass test, Probably the essential oil cytotoxicity effects are related to hydrocarbon alkanes and terpenoids compounds.

Keywords
Stachys setifera, Breast Cancer, Cytotoxicity, MCF7, MTT assay

► *Please cite this article as:* Shirzad A, Safipour Afshar A, Saeid Nematpour F. Effect of Stachys setifera essential oil on human breast cancer MCF-7 cells line. J Neyshabur Univ Med Sci 2020;8(1):25-37.

www.SID.ir