مجله دانش و تندرستی در علوم پایه پزشکی، دوره ۱۵، شماره ۱، بهار ۱۳۹۹
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شاهرود

DOI: 10.22100/jkh.v15i1.2364

مقاله پژوهشی

بررسی اثرات سیتوتوکسیک عصاره هیدروالکلی گیاه همیشک بر روی سلول‌های سرطانی پستان موش (رده 4T1) به روش MTT

مریم زارع[۱]، سهیلا ابراهیمی وسطی‌کلائی*[۱]، هانی اعزی[۲]

۱- استادیار- گروه زیست‌شناسی- دانشکده علوم پایه- دانشگاه پیام نور- تهران- ایران.

۲- دانشجوی کارشناسی ارشد فیزیولوژی جانوری- گروه زیست‌شناسی- دانشکده علوم پایه- دانشگاه پیام نور مرکز بابل- مازندران- ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۶/۱۸، **تاریخ پذیرش:** ۱۳۹۹/۰۲/۰۹

چکیده

مقدمه: *سرطان پستان به‌عنوان یک بیماری هتروژن، دومین سرطان شایع در جهان و نیز شایع‌ترین سرطان در زنان می‌باشد. باوجود توسعه روش‌های درمانی، میزان مرگ و میر در این سرطان بالا بوده و شناسایی درمان‌های جدید ضروری می‌باشد. امروزه، تحقیقات وسیعی در مورد کاربرد گیاهان دارویی برای درمان سرطان در حال انجام است. لذا با توجه به خواص آنتی‌اکسیدانی گیاه همیشک، در این مطالعه اثرات سایتوتوکسیسیتی عصاره هیدروالکلی این گیاه بر روی رده سلولی سرطان پستان مورد ارزیابی قرار گرفت.*

مواد و روش‌ها: *گیاه همیشک پس از جمع‌آوری و شستشو، خشک شده و سپس عصاره هیدروالکلی آن به روش ماسراسیون و در شرایط تاریکی به‌دست آمد. رده سلولی 4T1 مربوط‌به سرطان پستان موشی در محیط کشت RPMI1640 کشت داده شده و سپس با غلظت‌های مختلف (۳۱/۲۵ µg/ml تا ۲۰۰۰µg/ml) از عصاره هیدروالکلی گیاه همیشک، تیمار گردید. سپس میزان زنده‌مانی سلول‌های 4T1 پس از مدت زمان ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت با روش رنگ‌سنجی MTT ارزیابی گردید.*

نتایج: *بر اساس نتایج، درصد زنده‌مانی سلول‌های 4T1، با افزایش غلظت عصاره و زمان تیمار، به‌طور معنی‌داری کاهش می‌یابد (P<۰/۰۵). بیشترین میزان زنده‌مانی سلول‌ها در تیمار ۲۴ ساعته با غلظت ۳۱/۲۵µg/ml معادل ۹۳/۸۷٪ بوده و کمترین میزان زنده‌مانی در تیمار ۷۲ ساعته با غلظت ۲۰۰۰ µg/ml به میزان ۱۳/۲۹٪ مشاهده شد.*

نتیجه‌گیری: *نتایج این مطالعه نشان‌دهنده اثرات سیتوتوکسیسیتی عصاره گیاه همیشک بر روی سلول‌های 4T1 به‌صورت وابسته‌به غلظت و زمان می‌باشد. بنابراین گیاه همیشک می‌تواند به‌عنوان درمان جایگزین و یا مکمل برای سرطان پستان در نظر گرفته شود. البته کاربرد درمانی آن نیازمند بررسی‌های بیشتر است.*

واژه‌های کلیدی: سرطان پستان، عصارهیدروالکلی، گیاه Danae racemoas، میزان زنده‌مانی، آزمون MTT.

***نویسنده مسئول:** استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه پیام نور، صندوق‌پستی ۳۶۹۷-۱۹۳۹۵ تهران، ایران، **تلفن:** ۰۹۱۱۲۲۶۷۹۷۱، **نمابر:** ۰۱۱۴۲۰۸۲۰۱۶،
Email: s_ebrahimi@pnu.ac.ir

ارجاع: زارع مریم، ابراهیمی وسطی کلائی سهیلا، اعزی هانی. بررسی اثرات سیتوتوکسیک عصاره هیدروالکلی گیاه همیشک بر روی سلول‌های سرطانی پستان موش (رده 4T1) به روش MTT. مجله دانش و تندرستی در علوم پایه پزشکی ۱۳۹۹؛۱۵(۱):۵۷-۴۹.

www.SID.ir

مقدمه

سرطان، نوعی اختلال در سرعت تکثیر و تمایز سلولی است که می‌تواند در هر بافتی از بدن و در هر سنی رخ دهد. سلول‌های سرطانی با رشد و تقسیم مداوم و حمله به بافت‌های سالم موجب بیماری شدید و مرگ می‌شوند. سرطان بعد از بیماری‌های قلبی- عروقی، دومین عامل مرگ و میر در انسان است (۱). در این میان سرطان پستان به‌عنوان یک بیماری بسیار هتروژن، دومین سرطان شایع در جهان و البته رایج‌ترین سرطان در بین زنان است؛ به‌طوری‌که براساس آمار آژانس بین‌المللی تحقیقات سرطان، سالانه حدود ۲/۱ میلیون مورد جدید ابتلا به این سرطان شناسایی می‌شوند که این میزان ۲۵٪ کل موارد ابتلا به سرطان را شامل می گردد. همچنین این سرطان به‌عنوان پنجمین عامل مرگ ناشی از سرطان و البته شایع‌ترین عامل در بین زنان تلقی می‌شود (۱ و ۲). در ایران نیز سرطان پستان، شایع‌ترین سرطان در زنان بوده و البته سن بروز آن یک دهه زودتر از زنان در کشورهای غربی است و سالانه بیش از ۷ هزار فرد به سرطان پستان مبتلا می‌گردند (۳ و ۴).

علی‌رغم مطالعات گسترده، علت اصلی بروز سرطان پستان هنوز ناشناخته بوده و در واقع ترکیبی از عوامل ژنتیکی، اپی‌ژنتیکی، هورمونی و محیطی در بروز این سرطان نقش دارند (۵-۷). امروزه روش‌های درمانی متداول برای سرطان پستان شامل جراحی، شیمی درمانی، پرتودرمانی و هورمون درمانی است که با عوارض متعدد همراه بوده و انتخاب آنها به فاکتورهایی از قبیل مرحله بیماری، خصوصیات زیستی تومور، نوع تومور و سن بیمار بستگی دارد. البته موفقیت هر کدام از این روش های درمانی به عواملی همچون اندازه تومور، میزان متاستاز و تهاجم آن، نحوه بیان و یا عدم بیان ژن‌های سرطانی و نیز زیر گروه مولکولی تومور بستگی دارد (۸-۱۰). بنابراین، امروزه مطالعه در زمینه معرفی روش‌های درمانی جدید و با عوارض کمتر به‌ویژه با رویکرد استفاده از گیاهان دارویی بسیار مورد توجه قرا گرفته است.

از جمله گیاهان بومی با خواص دارویی متعدد، گیاه همیشک می‌باشد. گیاه همیشک با نام علمی Danae racemosa متعلق به خانواده Asparagaceae و زیرخانواده Nolinoideae است که البته براساس سیستم رده‌بندی قدیمی‌تر در خانواده لیلیاسه (Liliaceae) یا سوسنی‌ها قرار می‌گیرد (۱۱-۱۳). این گیاه درختچه‌ای که به‌طور طبیعی در مناطق شمالی کشور شامل استان‌های گیلان، مازندران، گلستان و اردبیل رشد می‌کند عمدتاً به‌عنوان یک ادویه در آشپزی و نیز به‌عنوان یک گیاه همیشه سبز در تزیین و گل‌آرایی به‌کار می‌رود (۱۲). مطالعات نشان داده‌اند که اجزای تشکیل‌دهنده آن دارای خواص ضدانعقادی، ضدسمیت کبدی، ضددرد و ضدالتهابی است (۱۲ و ۱۴). با این وجود، خواص آنتی‌اکسیدانی این گیاه نیز قابل توجه بوده و وجود فلاونوئیدهای مهمی چون کامفرول و کوئرستین در عصاره این گیاه نشان داده شده است (۱۲). مطالعات انجام شده در این زمینه نشان داده‌اند که فلاونوئیدها به‌دلیل داشتن فعالیت آنتی‌اکسیدانی قوی برای حفظ سلامتی سلول‌ها و پیشگیری از انواع بیماری‌ها و به‌ویژه سرطان‌ها نقش مهمی دارند (۱۵ و ۱۶).

همان‌گونه که ذکر شد، علاوه بر تغییرات ژنتیکی، پدیده‌های اپی‌ژنتیکی شامل متیلاسیون DNA، اصلاحات پروتئین‌های هیستونی و نیز miRNAها نیز در ایجاد و پیشرفت سرطان پستان نقش دارند که از آن جمله می‌توان به هیپومتیلاسیون DNA، هایپرمتیلاسیون پروموتر ژن‌های سرکوبگر تومور، کاهش استیلاسیون هیستون H4، جهش در آنزیم هیستون استیل ترانسفراز و آنزیم متیلاز، تغییر در متیلاسیون هیستون‌ها و نیز افزایش یا کاهش بیان miRNAها اشاره نمود (۶). از سوی دیگر برگشت‌پذیر بودن تغییرات اپی‌ژنتیکی آنها را به اهداف مناسبی برای درمان سرطان تبدیل نموده است (۱۷). به علاوه، تحقیقات متعدد به‌خوبی نشان داده‌اند که بسیاری از ترکیبات گیاهی به‌ویژه فلاونوئیدها قادر به اصلاح تغییرات اپی‌ژنتیکی می‌باشند. فلاونوئیدها به‌عنوان گروه بزرگی از متابولیت‌های ثانویه گیاهی، دارای شش گروه به نام‌های ایزوفلاونوئید، فلاوانون، فلاوانول، فلاونول، فلاوون و آنتوسیانیدین می‌باشند (۱۵ و ۱۶). مطالعات انجام شده، نقش این ترکیبات را در اصلاح تغییرات اپی‌ژنتیکی از جمله متیلاسیون DNA و استیلاسیون هیستون‌ها نشان داده‌اند (۱۸ و ۱۹). در این رابطه، زیر گروه فلاونول شامل ترکیباتی همچون کامفرول و کوئرستین، مایریستین و فیستین می‌باشد که وجود مقادیر فراوانی از دو ترکیب فلاونوئیدی کامفرول و کوئرستین در گیاه همیشک گزارش شده است و بر این اساس گیاه همیشک می‌تواند کاندید مناسبی برای بررسی خواص ضدسرطانی باشد.

بنابراین، با توجه به شیوع فراوان سرطان پستان در ایـران و نیز به‌دلیل وجود فلاونوئیدهای کامفرول و کوئرستین با قابلیت اصلاح تغییرات اپی‌ژنتیکی و نیز با درنظر گرفتن سایر خواص دارویی این گیاه، در این مطالعه برای اولین بار اثرات سایتوتوکسیسیتی عصاره همیشک بر روی رده سلولی سرطانی پستان (4T1) مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

گیاه همیشک از جنگل‌های روستای پاشاکلا، بخش دودانگه شهرستان ساری جمع‌آوری شده و توسط کارشناس گیاه‌شناسی منابع طبیعی ساری مورد شناسایی و تأیید قرار گرفت (شکل ۱). نمونه های گیاهی با آب فراوان و سپس آب مقطر شسته شده و در شرایط سایه خشک شدند. سپس به‌وسیله آسیاب خانگی پودر شده و به ۲۰ گرم از پودر گیاه، ۴۰۰ میلی‌لیتر حلال اتانول ۸۵٪ (نسبت ۲۰:۱) اضافه گردید. عمل عصاره‌گیری به روش خیساندن (ماسراسیون) و با استفاده از دستگاه شیکر به مدت ۴۸ ساعت و در دمای اتاق و شرایط تاریکی انجام گردید.

www.SID.ir

عصاره حاصل با کاغذ صافی (واتمن) فیلتر شده تا مواد جامد آن جدا شوند. سپس مایع به‌دست آمده با دستگاه تقطیر در خلاء (Rotay Evaporator) تغلیظ شد. پس از آن، با استفاده از حلال دی متیل سولفوکساید (DMSO) غلظت‌های موردنیاز شامل ۳۱/۲۵µg/ml، ۶۲/۵، ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، و ۲۰۰۰ از عصاره تهیه گردید.

شکل ۱- نمونه جمع‌آوری شده گیاه همیشک

رده سلولی 4T1 از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران به‌صورت فلاسک خریداری شد. رده سلولی 4T1 یکی از رده‌های سلولی سرطان پستان موشی با توانایی تهاجم و متاستاز است. سلول‌ها در محیط کشت RPMI1640 حاوی پنی‌سیلین و استرپتومایسین (۱۰۰ IU/ml) همراه با ۱۰٪ سرم جنین گاو غیرفعال شده (FBS) و ۱٪ L- گلوتامین کشت داده شده و در انکوباتور با شرایط دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، ۵ درصد CO_2 و ۹۵ درصد رطوبت نگهداری شدند. سپس سلول‌های رشدیافته، با استفاده از محلول تریپسین- EDTA ۲۵ درصد، ۳-۲ بار پاساژ داده شدند تا تعداد موردنیاز از سلول به‌دست آید.

بررسی اثر سمیت سلولی عصاره هیدروالکلی گیاه همیشک بر روی رده سلولی سرطان پستان 4T1 توسط آزمون رنگ‌سنجی MTT انجام شد. این روش مبتنی بر فعالیت آنزیم‌های دهیدروژناز میتوکندری بوده و تشکیل رنگ نشان‌دهنده وجود سلول‌های زنده می‌باشد. به این منظور، پس از ارزیابی سلول‌ها از نظر رشد و موروفولوژی و سپس جمع‌آوری و شمارش آنها، تعداد ۱۰۰۰۰ سلول در هر یک از چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای کشت داده شد. سپس سلول‌های موجود در چاهک‌ها پس از انکوباسیون ۲۴ ساعته، با غلظت‌های موردنظر (۳۱/۲۵، ۶۲/۵، ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) از عصاره هیدروالکلی گیاه همیشک تیمار شدند. به چاهک‌های نمونه کنترل، عصاره‌ای اضافه نشد. سلول‌های تیمار شده به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در انکوباتور نگهداری شدند. پس از گذشت زمان‌های موردنظر، مقدار ۲۰ میکرولیتر محلول MTT ۵ mg/ml به هر چاهک اضافه شده و پلیت به مدت ۴ ساعت انکوبه شده و سپس به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر DMSO اضافه گردید. پس از انکوباسیون ۱۰ دقیقه‌ای، جذب چاهک‌ها توسط دستگاه الایزا ریدر (ELIZA Reader (Biotek مدل Elx800 آلمان) در طول‌موج ۵۷۰ نانومتر خوانده شد. همه آزمایش‌ها در ۳ تکرار انجام شد. چاهک حاوی سلول و بدون عصاره به‌عنوان نمونه کنترل و چاهک بدون سلول و تنها حاوی محیط کشت و سرم جنین گاو نیز به‌عنوان بلانک در نظر گرفته شد. درصد بقای سلولی (Viability) با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید. براساس این فرمول، ابتدا میزان جذب مربوطبه نمونه بلانک از جذب نمونه‌های تیمار شده و نمونه کنترل کم گردید تا خطای احتمالی حذف شده و عددهای به‌دست آمده اصلاح شود. سپس با تقسیم نمودن جذب نمونه‌های تیمار شده به نمونه کنترل، میزان بقای سلولی هرکدام از چاهک‌ها به‌دست آمد.

درصد بقای سلولی= (جذب نمونه بلانک - جذب نمونه تیمار شده)/ (جذب نمونه بلانک-جذب نمونه کنترل) ×۱۰۰

تجزیه و تحلیل داده‌ها توسط نرم‌افزار اکسل ۲۰۱۳ و SPSS نسخه ۱۶ انجام شد و نتایج به‌صورت میانگین ± انحراف معیار حاصل از سه تکرار به‌دست آمد. داده‌های به‌دست آمده با آزمون واریانس یک طرفه (ANOVA) مورد ارزیابی قرار گرفتند. همچنین برای مشخص نمودن مقادیر IC50 مربوطبه عصاره، از نرم‌افزار ED50V10 که یک برنامه جنبی در نرم‌افزار اکسل است، استفاده شد. این شاخص نشان‌دهنده غلظتی از عصاره است که باعث مرگ نیمی از جمعیت سلولی و بقای نیمی دیگر می‌گردد. سطح معنی‌داری به میزان کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شده است ($P>0/05$).

نتایج

نتایج به‌دست آمده از این بررسی نشان‌دهنده اثرات سیتوتوکسیسیتی و مهار رشدی عصاره هیدروالکلی گیاه همیشک، بر روی رده سلولی 4T1 است. میزان بقای سلول‌ها در گروه‌های تیمار شده نسبت‌به گروه کنترل اختلاف معنی‌داری را نشان داده است ($P<0/05$). همچنین اثرات سمیت سلولی و مهار رشدی عصاره همیشک بر روی سلول‌های سرطانی به‌صورت وابسته‌به غلظت و زمان می‌باشد. در واقع، درصد بقای سلول‌های 4T1 در مقایسه با نمونه کنترل، با افزایش غلظت عصاره و مدت زمان تیمار به‌طور معنی‌داری کاهش می‌یابد (شکل ۲).

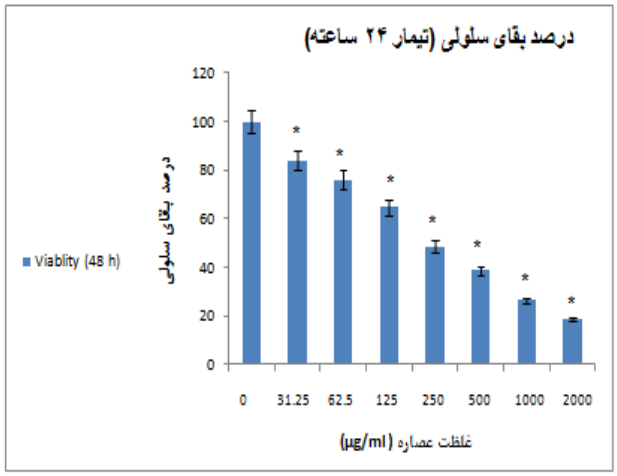
سلول‌های سرطانی در تیمار ۲۴ ساعته با عصاره گیاه همیشک، مهار رشد قابل‌توجهی را به‌صورت وابسته به دوز نشان داده‌اند. به‌طوری‌که درصد بقای سلول‌ها در غلظت µg/ml ۳۱/۲۵ معادل ۹۳/۸۷٪ بوده و به‌تدریج با افزایش غلظت عصاره، درصد بقای سلولی کاهش‌یافته و به میزان ۲۶/۷۸٪ در غلظت µg/ml ۲۰۰۰ می‌رسد. در تیمار ۴۸ ساعته نیز درصد بقای سلول‌های 4T1 در غلظت µg/ml ۳۱/۲۵ عصاره معادل ۸۴/۸۳٪ بوده و با کاهش تدریجی به ۱۸/۶۸٪ در غلظت µg/ml ۲۰۰۰ می‌رسد (شکل ۲). میزان بقای سلول‌های 4T1 در تیمار ۷۲ ساعته نیز

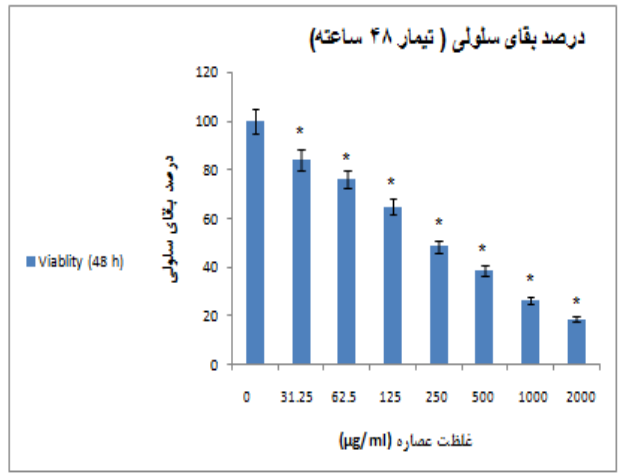
www.SID.ir

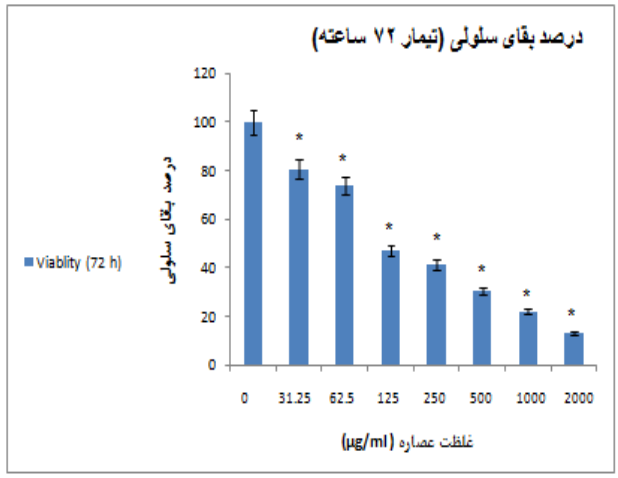
متناسب با افزایش غلظت عصاره، با روند کاهشی همراه بوده است و از میزان ۸۰/۳۷٪ (در غلظت ۳۱/۲۵ µg/ml) به میزان ۱۳/۲۹٪ (در غلظت ۲۰۰۰ µg/ml) کاهش‌یافته است. تجزیه و تحلیل‌های آماری نشان داده است که کاهش درصد بقا در سلول‌های 4T1 در مقایسه با نمونه کنترل معنی‌دار می‌باشد (P<۰/۰۵). نتایج این آزمایش‌ها مشخص می‌کند که با افزایش غلظت و زمان، اثر سیتوتوکسیتی عصاره گیاه همیشک نیز افزایش می‌یابد (شکل ۳). به عبارت دیگر خاصیت ضد سرطانی این عصاره هم به غلظت عصاره و هم به مدت زمان تأثیر عصاره بستگی دارد.

میزان IC50 عصاره نیز در مدت زمان‌های مختلف ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت محاسبه شده است. این شاخص نشان‌دهنده غلظتی از عصاره است که باعث مرگ ۵۰ درصد از سلول‌ها و بقای ۵۰ درصد دیگر می‌گردد. برای محاسبه IC50 از برنامه ED50V10 که نوعی برنامه اضافه شده در نرم‌افزار اکسل است، استفاده گردید. در واقع برای محاسبه شاخص IC50، نمودار درصد بقای سلولی نسبت‌به غلظت عصاره رسم شده و سپس براساس معادله خط به‌دست آمده، و جایگزینی عدد ۵۰ در این معادله، غلظتی از عصاره که منجر به بقای ۵۰ درصدی سلول‌ها (یا مرگ ۵۰ درصد سلول‌ها) می‌شود، به‌دست می‌آید. مقادیر IC50 عصاره همیشک بر حسب میکروگرم بر میلی‌لیتر در جدول ۱ نشان داده شده است.

مشاهده سلول‌ها با میکروسکپ نیز نشان داده است که عصاره اتانولی همیشک سبب متراکم شدن و چروکیدگی سلول‌ها و نیز فروپاشی و تغییر شکل هسته در سلول‌های تیمار شده با عصاره می‌گردد (شکل ۴) که وجود این تغییرات مورفولوژیک نشان‌دهنده فرآیند آپوپتوزیس در سلول‌ها می‌باشد (۲۰ و ۲۱).



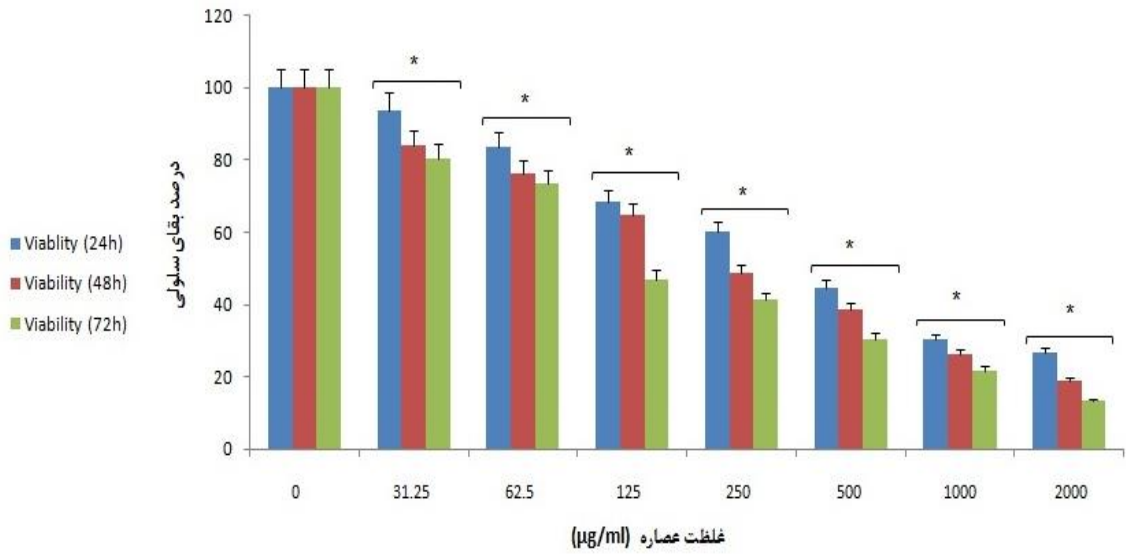




شکل ۲- میزان بقای سلولی در سلول‌های رده 4T1 پس از تیمار با غلظت‌های مختلف عصاره هیدروالکلی گیاه همیشک در مدت زمان ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت

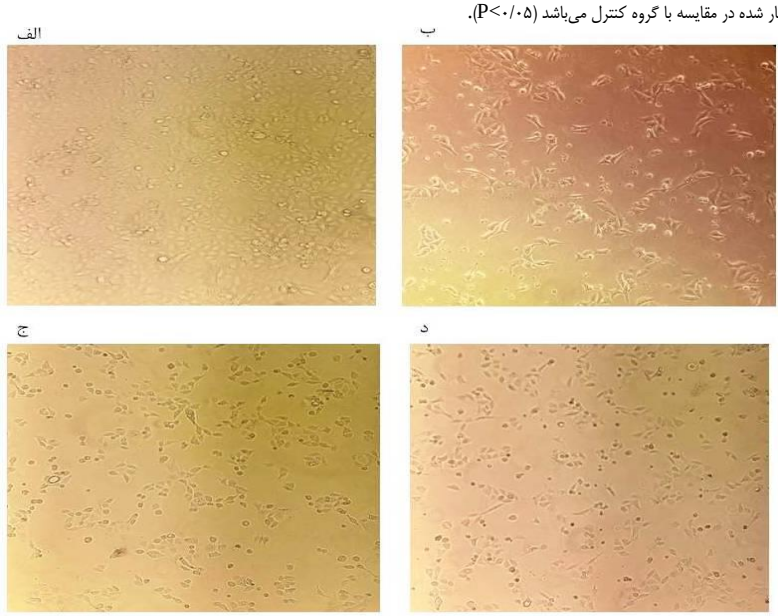
* نشان‌دهنده P<۰/۰۵ است.

www.SID.ir



شکل ۳- تأثیر افزایش مدت زمان تیمار با غلظت‌های مختلف عصاره هیدروالکلی گیاه همیشک، بر میزان بقای سلولی رده 4T1

* نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین گروه‌های تیمار شده در مقایسه با گروه کنترل می‌باشد (P<۰/۰۵).



شکل ٤- مرگ سلول‌های رده 4T1 تیمار شده با عصاره هیدروالکلی گیاه همیشک

الف- سلول‌های تیمار نشده (نمونه کنترل). ب- سلول‌های 4T1 تیمار شده با غلظت ۲۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره همیشک به مدت ۲۴ ساعت. ج- سلول‌های 4T1 تیمار شده با غلظت ۲۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره همیشک به مدت ۴۸ ساعت. د- سلول‌های 4T1 تیمار شده با غلظت ۲۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره همیشک به مدت ۷۲ ساعت

جدول ۱- میزان IC50 مربوطبه عصاره هیدروالکلی گیاه همیشک در مدت زمان ٢٤، ٤٨ و ٧٢ ساعت

مدت زمان تیمار	IC50 (µg/ml)
۲۴ ساعت	۳۹۸/۱۱
۴۸ ساعت	۲۲۴/۲۸۳
۷۲ ساعت	۱۱۶/۹۳۱

بحث

استفاده از خواص گیاهان به‌ویژه برای درمان سرطان همواره مورد توجه محققین بوده است (۲۲ و ۲۳). همچنین، سرطان پستان به‌عنوان شایع‌ترین بدخیمی زنان در دنیا می‌باشد (۱، ۳ و ۵). با توجه به میزان بالای مرگ‌ومیر آن، ارایه درمان‌های جدید برای آن با اهمیت است (۳، ۹ و ۱۰).

www.SID.ir

در این راستا، مطالعه حاضر با هدف بررسی اثرات سیتوتوکسیک عصاره هیدروالکلی گیاه همیشک بر روی رده سلولی سرطان پستان متاستازی (4T1) انجام شد. نتایج این مطالعه به روشنی نشان می‌دهد که عصاره همیشک باعث کاهش چشمگیری در میزان بقای سلول‌های رده 4T1 می‌شود، به‌طوری‌که میزان مرگ سلول‌های سرطانی با افزایش غلظت و مدت زمان تأثیر عصاره، به‌طور معنی‌داری افزایش می‌یابد. در واقع بیشترین میزان بقای سلولی در سلول‌های تیمار شده با غلظت µg/ml ۳۱/۲۵ از عصاره به مدت ۲۴ ساعت و کمترین میزان بقای سلولی در سلول‌های تیمار شده با غلظت µg/ml ۲۰۰۰ از عصاره به مدت ۷۲ ساعت مشاهده شد. همچنین با توجه به ماهیت متاستازی این رده سلولی، نتایج حاصله نشان می‌دهد که این عصاره توانایی متوقف نمودن رشد سلول‌های سرطانی را در مراحل پیشرفته و تهاجمی بیماری دارا می‌باشد.

گیاه همیشک با نام علمی Danae racemosa در کشور ایران، به‌ویژه در استان‌های مازندران و گیلان به وفور یافت می‌شود (۱۲ و ۱۳). با وجود فراوانی این گیاه و کاربرد زینتی و خوراکی آن به‌عنوان ادویه، مطالعات اندکی بر روی خواص این گیاه انجام شده است. یکی از اولین مطالعات انجام شده بر روی گیاه همیشک، وجود ۴ ترکیب پلی‌فنلی را در آن گزارش نموده است (۲۴). سپس، در تحقیق انجام شده توسط فتحی‌زاد و همکاران مشخص شده است که گیاه همیشک سرشار از فلاونوئیدهای کوئرسیتین و کامفرول بوده و این دو ترکیب به‌عنوان اصلی‌ترین ترکیبات فلاونوئیدی موجود در همیشک می‌باشند (۱۲).

فلاونوئیدها یکی از مهمترین متابولیت‌های ثانویه گیاهی و از خانواده پلی‌فنل‌ها می‌باشند. ترکیبات فلاونوئیدی شامل شش گروه به نام‌های ایزوفلاونوئید، فلاوانون، فلاوانول، فلاونول، فلاوون و آنتوسیانیدین بوده و دارای عملکردهای ضدالتهابی، آنتی‌اکسیدانی، ضدحساسیتی و ضدسرطانی هستند (۱۵ و ۱۶). همان‌گونه که اشاره شد، کامفرول و کوئرستین که در گروه فلاونول قرار دارند، به‌عنوان ترکیبات فلاونوئیدی شاخص در گیاه همیشک شناسایی شده‌اند. لذا عملکرد ضدسرطانی و سیتوتوکسیسیتی عصاره همیشک بر روی سلول‌های 4T1 می‌تواند به‌دلیل وجود کامفرول و کوئرستین در این گیاه و البته نقش اثبات شده این ترکیبات در فرآیند آپپتوزیس باشد (۲۵).

کامفرول دارای خصوصیات فارماکولوژیکی متعددی از جمله خواص ضدمیکروبی، ضدالتهابی، آنتی‌اکسیدانی، ضدتوموری و ضددیابتی بوده و در فرآیند شیمی درمانی نیز کاربرد دارد. کامفرول از طریق القای آپپتوزیس، توقف چرخه سلولی در مرحله عبور G2 به M، کاهش بیان مارکرهای مرتبط با فرآیند اپیتلیال- مزانشیمال و توقف مسیرهای سیگنالینگ PI3K ، عملکرد ضدسرطانی خود را انجام می‌دهد. مطالعات اپیدمیولوژیکی نیز نشان داده‌اند که دریافت مقادیر بالای کامفرول در جمعیت‌ها، با کاهش شیوع انواع سرطان‌ها ارتباط مستقیم دارد (۲۶). در مطالعه انجام شده توسط لای و همکاران، نقش کامفرول در مهار بیان ژن Bcl2 و القای آپپتوزیس در رده سلولی سرطان پستان (MCF-7) نشان داده شد (۲۷). به‌علاوه، مطالعات دیگر بر روی سرطان پستان نیز نشان‌دهنده نقش کامفرول در افزایش میزان پروتئین‌ها و آنزیم‌های پیش‌برنده آپپتوزیس همچون کاسپاز ۹ و ۷ و ۳، p21، p53، Bax و PARP و نیز کاهش بیان پروتئین‌های ضدآپپتوزی BCL2، PLK-1، pAKT، CDK1 می‌باشند (۲۸ و ۲۹). کوئرستین نیز با داشتن خواص آنتی‌اکسیدانی و آنتی‌اکسیداتیوی، باعث مهار رشد، القای آپپتوزیس و توقف سیکل سلولی در انواع سرطان‌ها شده و به‌ویژه در سرطان پستان باعث توقف سیکل سلولی در مرحله عبور G2 به M می‌گردد (۳۰) .تاو و همکاران نشان داده‌اند که کوئرستین با فعال کردن کاسپاز ۳ و مسیر میتوکندریایی باعث القای آپپتوزیس در رده‌های سلولی سرطان پستان می‌شود (۳۱). در تحقیق انجام شده توسط رانگاناتان و همکاران نیز نشان داده شد که کوئرستین باعث مهار بیان سایکلین D1، p21 و پروتئین Twist شده و از طریق مسیر سیگنالینگ p38MAPK سبب القای آپپتوزیس در رده سلولی سرطان پستان می‌گردد (۳۲). همچنین، اسرینیواسان و همکاران نشان داده‌اند که کوئرستین با تنظیم نمودن مسیر سیگنالینگ بتا-کاتنین باعث مهار تحرک و تهاجم سلول‌های سرطان پستان می‌شود (۳۳). بنابراین، به‌نظر می‌رسد که عملکرد عصاره گیاه همیشک در القای مرگ سلولی در سلول‌های تیمارشده، می‌تواند به‌دلیل مقادیر زیاد کامفرول و کوئرستین در این گیاه باشد.

از سوی دیگر، کامفرول و کوئرستین و سایر فلاونوئیدها عملکرد قابل توجهی را در اصلاح تغییرات اپی‌ژنتیکی ایجادکننده سرطان‌ها و از جمله سرطان پستان نشان داده‌اند (۱۹). ذکر این نکته ضروری است که تغییرات اپی‌ژنتیکی متعددی در ایجاد سرطان پستان نقش دارند که از آن جمله می‌توان به هیپومتیلاسیون DNA، هایپرمتیلاسیون پروموتر ژن‌های شاخص سرکوبگر تومور مانند BRCA1 و APC و...، تغییر در استیلاسیون و متیلاسیون هیستون‌ها، جهش در آنزیم‌های هیستون استیل ترانسفراز و متیلاز و نیز افزایش یا کاهش بیان miRNAها اشاره نمود (۶ و ۷). قابلیت برگشت‌پذیری تغییرات اپی‌ژنتیکی، آنها را به اهداف مناسبی برای درمان سرطان تبدیل نموده است. به‌طوری‌که مهارکننده‌های آنزیم DNA متیلاز و آنزیم هیستون داستیلاز از جمله داروهای مورد تأیید FDA برای درمان سرطان‌ها می‌باشند (۱۷). براساس مطالعات انجام شده، ترکیبات شش‌گانه فلاوونوئیدی قادر به اصلاح تغییرات اپی‌ژنتیکی از جمله متیلاسیون DNA و استیلاسیون هیستون‌ها می‌باشند (۱۸ و ۱۹). تاو و همکاران با مطالعه بر روی رده‌های سلولی سرطان پستان نشان داده‌اند که کوئرستین از طریق افزایش بیان miRNA-146a باعث مهار تکثیر سلولی و تهاجم

www.SID.ir

سلول‌های سرطانی می‌گردد (۳۱). مطالعه انجام شده توسط کایو و همکاران نیز به خوبی نشان داده است که کامفرول قادر به اصلاح وضعیت متیلاسیون DNA و مهار آنزیم متیلاز DNMT3B در سرطان مثانه می‌باشد (۳۴). به‌علاوه کندر و همکاران نیز نشان داده‌اند که کوئرستین به‌عنوان یک اصلاح‌کننده اپی‌ژنتیکی عمل نموده و از طریق افزایش استیلاسیون هیستون H3K9 در پروموتر ژن BRCA1، باعث افزایش بیان این ژن غیرفعال، در رده سلولی سرطان پستان می‌گردد (۳۵). لذا، براساس نتایج این پژوهش و سایر تحقیقات مرتبط می‌توان نتیجه‌گیری نمود که اثرات سایتوتوکسیسیتی گیاه همیشک بر روی سلول‌های سرطان پستان می‌تواند با عملکرد کامفرول و کوئرستین به‌عنوان اصلاح‌کننده تغییرات اپی‌ژنتیکی نیز مرتبط باشد.

لازم به ذکر است که براساس بررسی در منابع علمی موجود، هیچ گزارشی مبنی‌بر انجام مطالعه در رابطه با اثر ضدسرطانی گیاه همیشک به‌دست نیامده است. با این وجود، اندک مطالعات انجام شده بر روی این گیاه نشان‌دهنده سایر خواص درمانی آن می‌باشند. در تحقیق انجام شده توسط خاکی و همکاران، اثرات مثبت عصاره این گیاه در فرآیند اسپرماتوژنز در موش مشاهده گردید (۱۴). همچنین خواص آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی و ضددردی عصاره گیاه همیشک توسط ملکی و همکاران در مدل حیوانی گزارش شده است (۳۶). به‌علاوه، در مطالعه‌ای که توسط شهریاری و همکاران انجام شد، مشاهده گردیدکه عصاره همیشک قادر است با کاهش میزان اکسیژن واکنشگر باعث بهبود عملکرد اسپرم‌ها، میزان هورومون تستوسترون و فعالیت باروری در موش‌های دیابتی شود (۳۷).

به‌علاوه، از دیدگاه عملکرد سیتوتوکسیسیتی عصاره گیاه همیشک، نتایج مطالعه حاضر با اثرات سیتوتوکسیسیتی سایر ترکیبات گیاهی بررسی شده بر روی سرطان پستان اعم از عصاره متانولی گیاه گزنه (۳۸)، عصاره اتانلی برگ گیاه پسته وحشی (۳۹)، عصاره گیاه گل میمونی (۴۰)، عصاره گیاه آب تره (۴۱)، عصاره هیدروالکلی بذر گیاه خارسنبل (۴۲) و عصاره هیدروالکلی برگ گیاه سدر (۴۳) مطابقت دارد.

در مجموع می‌توان نتیجه‌گیری نمود که گیاه همیشک به‌دلیل داشتن ترکیبات فلاونوئیدی شاخص و اثرات سیتوتوکسیسیتی قابل ملاحظه، باعث از بین رفتن سلول‌های سرطانی و کاهش بقای رده سلولی 4T1 می‌گردد و لذا عصاره این گیاه می‌تواند به‌عنوان یک راهکار درمانی مؤثر با منشأ گیاهی برای درمان سرطان پستان مدنظر قرار گیرد. با این وجود، قطعاً انجام مطالعات بیشتر و دقیق‌تر لازم و ضروری به‌نظر می‌رسد.

References

1. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Mathers C, Parkin DM, Pineros M, et al. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. Int J Cancer 2019;144:1941-53. doi: 10.1002/ijc.31937

2. Noone AM, Howlader N, Krapcho M, Miller D ,Brest A, Yu M, et al. SEER Cancer Statistics Review 1975-2015. National Cancer Institute. Bethesda. MD, https://seer.cancer.gov/csr/1975_2015/, Updated September 10, 2018.

3. Meshkat M, Baghestani AR, Zayeri F, Khayamzadeh M, Akbari ME. Survival rate and prognostic factors among iranian breast cancer patients. Iran J Public Health 2020;49:341-50.

4. Rafiemanesh H, Salehiniya H, Lotfi Z. Breast Cancer in Iranian Woman: Incidence by Age Group, Morphology and Trends. Asian Pac J Cancer Prev 2016;17:1393-7. doi: 0.7314/apjcp.2016.17.3.1393

5. Momenimovahed Z, Salehiniya H. Epidemiological characteristics of and risk factors for breast cancer in the world. Breast Cancer (Dove Med Press) 2019;11:151-64. doi: 10.2147/BCTT.S176070

6. Pasculli B, Barbano R, Parrella P. Epigenetics of breast cancer: Biology and clinical implication in the era of precision medicine. Semin Cancer Biol 2018;51:22-35. doi : 10.1016/j.semcancer.2018.01.007

7. Zare M, Bastami M, Solali S, Alivand MR. Aberrant miRNA promoter methylation and EMT-involving miRNAs in breast cancer metastasis: Diagnosis and therapeutic implications. J Cell Physiol 2018;233:3729-44. doi: 10.1002/jcp.26116

8. Dolatkhah R, Somi MH, Jafarabadi MA, Hosseinalifam M, Sepahi S, Belalzadeh M, et al. Breast Cancer Survival and Incidence: 10 Years Cancer Registry Data in the Northwest, Iran. Int J Breast Cancer 2020;2020:1963814. doi: 10.1155/2020/1963814

9. Nounou MI, ElAmrawy F, Ahmed N, Abdelraouf K, Goda S, Syed-Sha-Qhattal H. Breast Cancer: Conventional Diagnosis and Treatment Modalities and Recent Patents and Technologies. Breast Cancer (Auckl) 2015;9:17-34. doi: 10.4137/BCBCR.S29420

10. Schneeweiss A, Hartkopf AD, Muller V, Wockel A, Lux MP, Janni W, et al. Update Breast Cancer 2020 Part 1 - Early Breast Cancer: Consolidation of Knowledge About Known Therapies. Geburtshilfe Frauenheilkd 2020;80:277-87. doi: 10.1055/a-1111-2431

11. Chase MW, Reveal JL, Fay MF. A subfamilial classification for the expanded asparagalean families Amaryllidaceae, Asparagaceae and Xanthorrhoeaceae. Botanical Journal of the Linnean Society 2009;161:132-6. doi: 10.1111/j.1095-8339.2009.00999.x

12. Fathiazad F, Hamedeyazdan S. Phytochemical Analysis of Danae Racemosa L. Moench Leaves Pharmaceutical Sciences 2015;20:135-40.

13. Mozaffarian V. A dictionary of Iranian Plants Names. 6th ed. Tehran. Farhang Mo'aser 1996:176.

14. Khaki A, Fathiazad F, Ahmadi-Ashtiani H, Rastgar H, Rezazadeh S. Effects of Danae racemosa on Spermatogenesis in Rat. Journal of Medicinal Plants 2009;8:87-92.

15. Ferraz CR, Carvalho TT, Manchope MF, Artero NA, Rasquel-Oliveira FS, Fattori V, et al. Therapeutic potential of flavonoids in pain and inflammation: mechanisms of action, pre-clinical and clinical data, and pharmaceutical development. Molecules 2020;25. doi: 10.3390/molecules25030762

16. Kopustinskiene DM, Jakstas V, Savickas A, Bernatoniene J. Flavonoids as Anticancer Agents. Nutrients 2020;12. doi: 10.3390/nu12020457

17. Lu Y, Chan YT, Tan HY, Li S, Wang N, Feng Y. Epigenetic regulation in human cancer: the potential role of epi-drug in cancer therapy. Mol Cancer 2020;19:79. doi: 10.1186/s12943-020-01197-3

18. Berger A, Venturelli S, Kallnischkies M, Bocker A, Busch C, Weiland T, et al. Kaempferol, a new nutrition-derived pan-inhibitor of human histone deacetylases. J Nutr Biochem 2013;24:977-85. doi: 10.1016/j.jnutbio.2012.07.001

19. Selvakumar P, Badgeley A, Murphy P, Anwar H, Sharma U, Lawrence K, et al. Flavonoids and other polyphenols act as epigenetic modifiers in breast cancer. Nutrients 2020;12. doi: 10.3390/nu12030761

www.SID.ir

20. Kakarla R, Hur J, Kim YJ, Kim J, Chwae YJ. Apoptotic cell-derived exosomes: messages from dying cells. Exp Mol Med 2020;52:1-6. doi: 10.1038/s12276-019-0362-8

21. Xu X, Lai Y, Hua ZC. Apoptosis and apoptotic body: disease message and therapeutic target potentials. Biosci Rep 2019;39. doi: 10.1042/BSR20180992

22. Kooti W, Servatyari K, Behzadifar M, Asadi-Samani M, Sadeghi F, Nouri B, et al. Effective Medicinal Plant in Cancer Treatment, Part 2: Review Study. J Evid Based Complementary Altern Med 2017;22:982-95. doi: 10.1177/2156587217696927

23. Mortazavian A M, Mollakhalili Meybodi N. Medicinal Food Products; a New Approach from Ordinary Foods to Medicine. Iran J Pharm Res 2016;15:1-2.

24. Nasudari AA, Oganesyan ET, Kompantsev VA, Kerimov YB. Polyphenolic compounds of danae racemosa. Chemistry of Natural Compounds 1972;8.

25. Abotaleb M, Samuel SM, Varghese E, Varghese S, Kubatka P, Liskova A, et al. Flavonoids in Cancer and apoptosis. Cancers (Basel) 2018;11. doi: 10.3390/cancers11010028

26. Imran M, Salehi B, Sharifi-Rad J, Aslam Gondal T, Saeed F, Imran A, et al. Kaempferol: A key emphasis to its anticancer potential. Molecules 2019;24. doi: 10.3390/molecules24122277

27. Yi X, Zuo J, Tan C, Xian S, Luo C, Chen S, et al. Kaempferol ,a flavonoid compound from gynura medica induced apoptosis and growth inhibition in mcf-7 breast cancer cell. Afr J Tradit Complement Altern Med 2016;13:210-5. doi: 10.21010/ajtcam.v13i4.27

28. Diantini A, Subarnas A, Lestari K, Halimah E, Susilawati Y, Supriyatna, et al. Kaempferol-3-O-rhamnoside isolated from the leaves of Schima wallichii Korth. inhibits MCF-7 breast cancer cell proliferation through activation of the caspase cascade pathway. Oncology Letters 2012;3:1069-72. doi: 10.3892/ol.2012.596

29. Kim SH, Hwang KA, Choi KC. Treatment with kaempferol suppresses breast cancer cell growth caused by estrogen and triclosan in cellular and xenograft breast cancer models. J Nutr Biochem 2016;28:70-82. doi: 10.1016/j.jnutbio.2015.09.027

30. Rauf A, Imran M, Khan IA, Ur-Rehman M, Gilani SA, Mehmood Z, et al. Anticancer potential of quercetin: A comprehensive review. Phytother Res 2018;32:2109-30. doi: 10.1002/ptr.6155

31. Tao SF, He HF, Chen Q. Quercetin inhibits proliferation and invasion acts by up-regulating miR-146a in human breast cancer cells. Mol Cell Biochem 2015;402:93-100. doi: 10.1007/s11010-014-2317-7

32. Ranganathan S, Halagowder D, Sivasithambaram ND. Quercetin suppresses twist to induce apoptosis in mcf-7 breast cancer cells. PLoS One 2015;10:e0141370. doi: 10.1371/journal.pone.0141370

33. Srinivasan A, Thangavel C, Liu Y, Shoyele S, Den RB, Selvakumar P, et al. Quercetin regulates beta-catenin signaling and reduces the migration of triple negative breast cancer. Mol Carcinog 2016;55:743-56. doi: 10.1002/mc.22318

34. Qiu W, Lin J, Zhu Y, Zhang J, Zeng L, Su M, et al. Kaempferol modulates DNA methylation and downregulates DNMT3B in bladder cancer. Cell Physiol Biochem 2017;41:1325-35. doi: 10.1159/000464435

35. Kundur S, Prayag A, Selvakumar P, Nguyen H, McKee L, Cruz C, et al. Synergistic anticancer action of quercetin and curcumin against triple-negative breast cancer cell lines. J Cell Physiol 2019;234:11103-18. doi: 10.1002/jcp.27761

36. Maleki-Dizaji N, Fathiazad F, Garjani A. Antinociceptive properties of extracts and two flavonoids isolated from leaves of danae racemosa. Arch Pharm Res 2007;30:1536-42.

37. Shahreari S, Khaki A, RAhmadi-Ashtiani H, Rezazadeh S, Hajiaghaei R. Effects of danae racemosa on testosterone hormone in experimental diabetic rats. Journal of Medicinal Plants 2010;9:114-9.

38. Mohammadi A, Baradaran B. Apoptotic effect of the urtica dioica plant extracts on breast cancer cell line (MDA- MB- 468). Journal of Ardabil University of Medical Sciences 2015;15:283-90.

39. Seyedalipour B, Pourakbar E, Taravati A. The cytotoxic effect of ethanolic extract of pistacia khinjuk leaf aganist hela and mcf-7 cancerous cell lines. J Rafsanjan Univ Med Sci 2016;14:939-52.

40. Chokhachi Baradaran P, Baradaran B. Anti-proliferation effects of Scrophularia oxysepala medicinal plant extract on the 4T1 mouse breast cancer cell line. The Journal of Urmia University of Medical Sciences 2017;27:871-81.

41. Fallah N, Ebrahimi S. The anti-cancer effect of watercress (rorripa nasturtium aquaticum) extract on breast cancer cells. Zahedan J Res Med Sci 2016;18:e2725.

42. Aghaabbasi K, Hassani Kumleh H, Askari N, Torkzadeh-Mahani M, Ramzani-ghara A. Anticancer activity of blepharis persica seed hydroalcoholic extract on (MCF-7) human breast cancer and (LNCaP) prostate cancer cell lines and its synergistic effect with doxorubicin. Journal of Cell & Tissue 2018;9:206-21.

43. Ahmadi R, Rahimi S, Ehteshamzad N. The effect of hydroalcoholic Ziziphus spina-christi leaf extract on viability of breast cancer cell line (MCF7) and evaluation of Bax and Bcl2 genes expression level. Feyz 2017;21:407-13.

www.SID.ir

Journal of Knowledge & Health
in Basic Medical Sciences 2020; Vol 15, No 1

DOI: 10.22100/jkh.v15i1.2364

Original Article

Analysis the Cytotoxicity Effects of Hydroalcoholic Extract of *Danae Racemosa* Plant on Mouse Breast Cancer Cells (4T1) by MTT

Maryam Zare (Ph.D.)[1], Soheila Ebrahimi Vosta Kalaee (Ph.D.)[*1], Hani Aezi (M.Sc. Student)[2]

1- Assistant Professor, Dept. of Biology, Payame Noor University, Tehran, Iran.
2- M.Sc. Student of Animal Physiology, Dept. of Biology, Payame Noor University, Babol, Mazandaran, Iran.

Received: 9 September 2019, **Accepted:** 28 April 2020

Abstract:

Introduction: *Breast cancer, as a heterogeneous disease, is the second most common cancer in the world and the most prevalent cancer among the women. Despite improvement in treatment methods, it has still high mortality rate and requires new treatment approaches. Nowadays, many researches have been focused on application of medicinal plants for cancer treatment. Therefore, according to antioxidant properties of Danae racemosa plant, in present study the cytotoxicity effects of the hydroalcoholic extract of Danae racemosa was assessed on breast cancer cell line.*

Methods: *Danae racemosa plant was collected, washed and dried. Then, the hydroalcoholic extract of Danae racemosa was extracted via maceration method in darkness. The 4T1 cell line of mouse breast cancer was cultured in RPMI1640 and then treated with seven concentration of extract (31.25–2000 µg/ml). Subsequently, the viability of the cancer cells was assessed using MTT test after 24, 48 and 72 h.*

Results: *According to the results, the viability of the 4T1 cells was significantly reduced upon the increase in extract concentration and treatment duration ($P<0.05$). The maximum viability of the cells was 93.87%, referred to 24 h treatment with 31.25 µg/ml of extract and the minimum viability was 13.29%, referred to 72 h treatment with 2000 µg/ml of extract.*

Conclusion: *The results of present study indicate the cytotoxicity effects of Danae racemosa extract on 4T1 cells in concentration and time dependent manner. Hence, Danae racemosa plant could be considered as a substitute or complementary treatment for breast cancer. However, its therapeutic application requires more studies.*

Keywords: Breast Cancer, Hydroalcoholic extract, Danae racemosa, Viability, MTT test.

Conflict of Interest: No

***Corresponding author:** S. Ebrahimi Vosta kalaee, **Email**: s_ebrahimi@pnu.ac.ir*

Citation: Zare M, Ebrahimi Vosta kalaee S, Aezi H. Analysis the cytotoxicity effects of hydroalcoholic extract of *danae racemosa* plant on mouse breast cancer cells (4T1) by MTT. Journal of Knowledge & Health in Basic Medical Sciences 2020;15(1):49-57.

www.SID.ir