Downloaded from rjms.iums.ac.ir at 9:42 IRDT on Saturday September 8th 2018

مقایسه اثر ضد تکثیری عصاره هیدروالکلی دارچین (Cinnamonum zeylanicum) با داروی سیکلوفسفامید بر روی سلول‌های سرطانی A459

***طیبه محمدی:** استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران، و مرکز تحقیقات سلول های بنیادی و فناوری ترانسژنیک، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران (*نویسنده مسئول).t.mohammadi@scu.ac.ir

الهام حویزی: استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران، و مرکز تحقیقات سلول های بنیادی و فناوری ترانسژنیک، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۶/۹/۲۰ تاریخ پذیرش: ۹۶/۱۲/۱۶

چکیده

زمینه و هدف: سرطان ریه علت بیشترین مرگ و میر ناشی از سرطان در جهان است. با وجود تلاش‌های فراوان، تاکنون داروی ایده الی برای درمان سرطان یافت نشده است. دارچین حاوی ترکیبات آنتی اکسیدان قوی است. در این مطالعه، اثر کشندگی عصاره هیدروالکلی دارچین روی سلول‌های سرطانی ریه رده A549 با سیکلوفسفامید مقایسه شد.

روش کار: عصاره دارچین با دستگاه سوکسله تهیه گردید. سلول‌های A549 کشت و سپس به مدت ۱، ۳ و ۵ روز، با غلظت‌های۰/۰۱ ، ۰/۱، ۱ و ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر دارچین و سیکلوفسفامید تیمار شدند. در روزهای معین پس از تیمار، بقاء و مورفولوژی سلول‌ها ارزیابی شد. همچنین بیان ژن‌های درگیر در آپوپتوز همچون Bax, Bad و Bcl-2 با روش qRT_PCR مورد ارزیابی قرار گرفت. داده‌ها به روش آماری آنالیز واریانس یکطرفه و پس آزمون توکی آنالیز شدند. سطح معنی دار بودن تفاوت‌ها، $p< ۰/۰۵$ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: مقایسه درصد بقاء سلولی در گروه‌های تیمار شده نشان داد که اثر کشندگی دارچین در غلظت‌های ۱ و ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در روز پنجم تقریبا با سیکلوفسفامید یکسان است ولی در سایر غلظت‌ها و روزها کمتر از سیکلوفسفامید بود ($p<۰/۰۵$). همچنین، نتایج مولکولی نشان داد که عصاره دارچین در غلظت‌های۱ و ۱۰ میلی گرم بر میلی‌لیتر می‌تواند سبب افزایش بیان ژن های Bax, Bad و کاهش بیان ژن Bcl-2 گردد ($p<۰/۰۵$).

نتیجه‌گیری: عصاره هیدروالکلی دارچین قادر است آپوپتوز را به صورت وابسته به دوز و زمان در سلول‌های A459 القاء کند و با افزایش غلظت، با سیکلوفسفامید مشابه است.

کلیدواژه‌ها: دارچین، آپوپتوز، A459، سیکلوفسفامید، آنتی اکسیدان

مقدمه

سرطان ریه یا کارسینومای برونکوژنیک دومین سرطان شناخته شده در جهان است که بیشترین میزان مرگ ومیر ناشی از سرطان در مردان را باعث می‌شود(۱). منشاء این سرطان بافت پوششی مجاری هوایی است با این حال در ریه انواع دیگر سرطان با منشاء سلولی متفاوت و یا انتشار یافته از سایر اعضای بدن نیز وجود دارد ولی آنچه که به عنوان سرطان ریه معروف است کارسینومای برونکوژنیک است(۲). دلیل اصلی سرطان ریه جهش در بیان ژن‌هاست. پروتئین سرکوبگر تومور یکی از پروتئین‌هایی است که در سرطان ریه نقش دارد و با اتصالبه DNA باعث مهار رشد سلول و مسدود کردن ورود به سیکل سلولی می‌شود و از آسیب به DNA جلوگیری می‌کند. جهش در ژن این پروتئین باعث افزایش بیان آن شده که به رشد بی رویه سلول، آسیب DNA و سرطانی شدن سلول منجر می‌شود به طوری که حدود ۷۰ درصد سرطان ریه به علت جهش در بیان این پروتئین است(۳).

در حال حاضر جراحی، شیمی درمانی،ایمنی درمانی و اشعه درمانی درمان‌های رایج برای سرطان ریه هستند. یکی از مشکلات درمان شیمیایی سرطان، مسأله مقاومت دارویی سلول-های سرطانی است که روند درمان را مشکل می-سازد و جستجو برای داروهای ضد سرطان جدید را ضروری می‌سازد. همچنین، عوارض جانبی داروهای شیمیایی ضد سرطان عامل محدود کننده

www.SID.ir

Downloaded from rjms.iums.ac.ir at 9:42 IRDT on Saturday September 8th 2018

دیگری برای استفاده آنها در درمان سرطان است. سیکلوفسفامید دارویی است که در درمان انواع سرطان استفاده می‌شود(۴) .سیکلوفسفامید با ایجاد اتصال بین دو رشته DNA و شکست DNA و RNA و مهار ساخت پروتئین باعث مرگ سلولی می‌شود(۵). این دارو به موازات اثرات مفیدی که روی سلول‌های سرطانی دارد با القاء استرس اکسیداتیو روی سلول‌های طبیعی درحال تقسیم بدن بویژه آنهایی که سرعت تقسیم بالایی دارند از جمله سلول‌های مغز استخوان، روده و بیضه اثرات جانبی توکسیک نیز دارد(۶). در موش نشان داده شده است که سیکلوفسفامید با افزایش مالون دی آلدئید و کاهش دفاع آنتی اکسیدانی، با عث القاء استرس اکسیداتیو در کبد موش می‌شود(۴). یکی از متابولیت‌های فعال سیکلوفسفامید آکرولئین است که با تداخل در سیستم دفاعی آنتی اکسیدانی بافت‌ها و تولید مقادیر زیاد رادیکال‌های آزاد اکسیژن خواص جهش زا دارد. بر همین اساس قرار گرفتن در معرض سیکلوفسفامید تولید رادیکال‌های آزاد را افزایش داده و آسیب ناشی از این دارو به مکانیسم ایجاد استرس اکسیداتیو توسط آن برمی‌گردد(۷).

با توجه به مشکلات موجود در رابطه با استفاده از داروهای شیمیایی برای درمان سرطان، توجه محققین به سمت ایجاد داروهای جدید برای درمان انواع سرطان معطوف شده است. یک گروه از این داروها، داروهای گیاهی هستند که به واسطه اثرات جانبی کمتر مورد توجه محققین فعال در زمینه درمان سرطان هستند. سینامومم زیلانیکوم (Cinnamomum zeilanicum) یا دارچین، گیاه بومی سریلانکا و هندوستان است که از قدیمی‌ترین و پرمصرف‌ترین گیاهان ادویه‌ای و دارویی در جهان از جمله ایران محسوب می‌شود. دارچین در طب سنتی برای تقویت قلب، معده و روده، کلیه، حافظه، نیروی جنسی، درمان کم خونی و دردهای عضلانی به طور وسیعی استفاده شده است. امروزه اثرات آرام بخشی، کاهندگی قند، چربی و فشار خون، کاهندگی تب، اثر ضد میکروبی، تقویت کنندگی سیستم ایمنی و ترمیم کنندگی زخم آن نیز گزارش شده است. این گیاه دارای خاصیت آنتی اکسیدانی قوی است که به سبب وجود ترکیباتی چون سینامالدئید، اپی کاتشین، پلی فنولAو ویتامین ث است. گزارش شده است که ترکیبات آنتی اکسیدان موجود در عصاره‌های الکلی دارچین می‌توانند اکسیژن‌های واکنش‌پذیر مانند آنیون‌های سوپراکسید و رادیکال‌های هیدروکسیل و سایر رادیکال‌های آزاد را در آزمایشگاه از بین ببرند و در برابر آسیب‌های شیمیایی از سلول محافظت کنند. از سوی دیگر، مصرف دارچین به عنوان ادویه به دلیل خاصیت آنتی اکسیدانی قوی که دارد از اکسیداسیون مواد آلی در بدن جلوگیری می‌کند و میزان رادیکال‌های آزد را کاهش می‌دهد(۸). دارچین دارای اثر ضدسرطانی نیز هست و از جمله مکانیسم‌های ضد سرطانی آن، القاء آپوپتوز در سلول‌های سرطانی می‌باشد(۹). از آنجایی که سلول‌های سرطانی به آپوپتوز مقاوم هستند، یک روش مؤثر برای تولید داروهای ضد سرطان جدید از بین بردن انتخابی آنها با تحریک مسیر آپوپتوز است. از این رو، هدف این مطالعه بررسی اثر عصاره هیدروالکلی دارچین روی مرگ سلول‌های سرطانی A459 و مقایسه آن با سیکلوفسفامید است.

روش کار

این مطالعه از نوع تجربی بوده که در آزمایشگاه تحقیقاتی کشت سلول گروه زیست شناسی دانشکده علوم دانشگاه شهید چمران اهواز روی سلول‌های سرطانی ریه انسان رده A459 انجام شد. دوز سیکلوفسفامید و عصاره هیدروالکلی دارچین و مدت زمان تیمار سلول‌ها متغیرهای مورد مطالعه بودند و بر اساس الگوی استاندارد، باید حداقل سه چاهک برای هر کدام از غلظت-های دو دارو در گروه‌های کنترل و آزمایش در هر روز تهیه شود و مورد ارزیابی قرار گیرد. در مطالعه حاضر برای هر دوز در هر روز شش چاهک در نظر گرفته شد.

تهیه عصاره هیدروالکلی دارچین: پوست ساقه درخت دارچین از عطاری معتبرخریداری و پس از تایید توسط کارشناس مربوط، با دستگاه آسیاب برقی پودر شد. عصاره‌گیری به کمک دستگاه

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from rjms.iums.ac.ir at 9:42 IRDT on Saturday September 8th 2018

سوکسله و حلال اتانول ۷۰ درصد انجام شد. به این منظور، ۵۰ گرم از پودر تهیه شده دارچین داخل کاغذ صافی و درون فلاسک دستگاه قرار گرفت. سپس ۳۰۰ میلی‌لیتر اتانول ۷۰ درصد در فلاسک دستگاه ریخته و درجه حرارت دستگاه بر اساس نقطه جوش حلال تنظیم و عصاره‌گیری به مدت ۱۲ ساعت انجام شد. برای این که عصاره به دست آمده غلیظ شود وحلال حذف شود به مدت ۲ ساعت در روتاری قرار گرفت. پس از خشک شدن عصاره، ۱ گرم از آن وزن و در فسفات بافرسالین حل شد. سپس غلظت‌های لازم از آن تهیه گردید.

آماده سازی محلول‌های دارویی: ابتدا برای تهیه غلظت‌های ۰/۰۱، ۰/۱ ، ۱و ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر از سیکلوفسفامید و دارچین مقدار لازم از آنها برای هر غلظت، در فسفات بافرسالین حل و سپس با محیط کشت به حجم مورد نظر رسانده شد و پس از فیلتر نمودن با کمک فیلتر سرسرنگی، در دمای $4^{\circ}C$ تا زمان استفاده نگهداری شدند.

کشت و پاساژ سلولی: رده سلولی A459 از موسسه پاستور تهران خریداری و در محیط کشت DMEM-F12 (Gibco, USA) حاوی FBS ٪۱۰ (Gibco, USA) کشت و در انکوباتور(شرکت سینا،ایران) با ٪۵ CO2 ، ٪۹۵ رطوبت و دمای $37^{\circ}C$ نگهداری شد. زمانی که تراکم سلول ها در فلاسک به ۸۰ درصد رسید، پاساژ سلولی انجام شد و سلول‌ها با تعداد تقریبی 1×10^{4} cells/cm^2 در پلیت۹۶ چاهکی محتوی محیط معمول کشت شدند. ۲۴ ساعت بعد، سلول‌ها با غلظت‌های مختلف سیکلوفسفامید و دارچین تیمار و در زمان-های ۱، ۳ و ۵ روز بقای سلول‌ها ارزیابی شد. لازم به ذکر است که تعویض محیط یک روز در میان انجام شد و در مورد زمان‌های ۳ و ۵ روز بعد از تعویض محیط، مجددا دارو اضافه گردید.

ارزیابی بقاء سلولی: میزان بقای سلول‌های تیمار شده با غلظت‌های مختلف دو دارو در این مطالعه، با استفاده از روش MTT ارزیابی شد. برای انجام این آزمون از غلظت ۵ mg/ml MTT (Sigma, USA) به صورت زیر استفاده شد.

سلول‌های سرطانی A459تحت تاثیر غلظت‌های مختلف سیکلوفسفامید و دارچین به عنوان گروه آزمایش و سلول‌های بدون تیمار به عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شد. ۱، ۳ و ۵ روز بعد از کشت سلول‌ها در پلیت ۹۶ چاهکی تست MTT انجام شد، به این‌صورت که در زمان‌های مورد نظر، پس از کشت سلول‌ها در پلیت‌های ۹۶ چاهکی، محیط کشت خارج و به هر خانه حدود ۱۰۰ µl محیط DMEM حاوی ۱۰ µl از محلول MTT اضافه شد و به مدت ۴-۳ ساعت در دمای $37^{\circ}C$ انکوبه و سپس محلول MTTخارج و به هر چاهک ۱۰۰ µl DMSO (Merck, USA, 100%)اضافه شد و در نهایت با استفاده از دستگاه میکروپلیت ریدر(Biotek، آلمان) جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۵۷۰ نانومتر خوانده شد.

استخراج RNA و انجام qRT-PCR: در مطالعه حاضر، الگوی بیان mRNA ژن‌های مورد نظربرای غلظت های ۱ و ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره دارچین و سیکلوفسفامید با استفاده از qRT-PCR انجام شد. برای استخراج RNA سلول‌ها با استفاده از QIAzol لیز شدند سپس عصاره لیز شده سلولی در کلروفورم بمدت ۱۵ دقیقه با دور ۱۲ هزار rpm در ۴ درجه سانتیگراد سانتریوفوژ گردید و با ایزوپروپانول شستشو و با شرایط ذکر شده مجددا سانتریفیوژ شدند. ماحصل را در اتانول حل کرده و بمدت ۸ دقیقه با دور ۷۵۰۰ rpm سانتریوفیوژ و سپس خشک و RNA حاصل در اب حل گردید. برای سنتز cDNA از TaqMan Reverse Transcription Kit (کیاژن، ژاپن) استفاده شد. برای این منظور ۱µg از RNA تخلیص شده با پرایمر راندوم هگزامر، dNTP mixture و مخلوط به مدت ۵ دقیقه در دمای $65^{\circ}C$ انکوبه شد و پس از اتمام زمان به سرعت روی یخ منتقل شد. و سپس بافر، پروتئین مهار کننده ریبونوکلئاز و آنزیم اضافه شد و دستگاه ترموسایکلر قرار داده شد. برای هر نمونه ۴۰ نانوگرم از cDNA سنتز شده با ۱۰ میکرولیتر از Power SYBER Green master mix (کیاژن، ژاپن) و ۰/۵ میکرولیتر از هر پرایمر (جدول ۱) مخلوط گشت. Ct هر نمونه با استفاده از نرم افزار StepOne محاسبه و

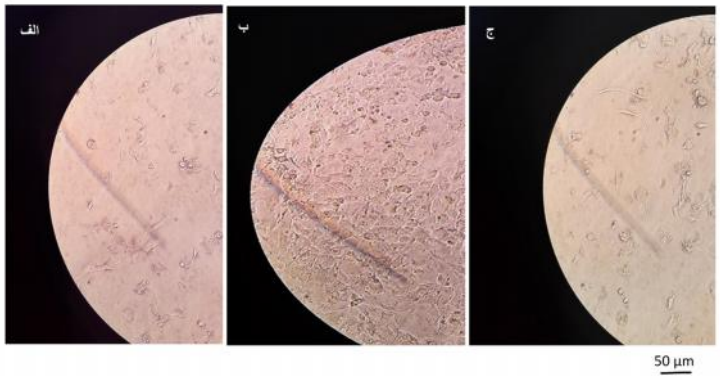
Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from rjms.iums.ac.ir at 9:42 IRDT on Saturday September 8th 2018

جدول ۱- توالی پرایمرهای اختصاصی طراحی شده برای ژن‌های مورد مطالعه.

Gene	Sequence
Bcl-2	F 5' -AAAATACAACATCACAGAGGAAGTAGACTG- 3'
	F 5' - TCAATCACGCGGAACACTTG- 3'
Bax	F 5' - TGAAGACAGGGGCCTTTTTG- 3'
	R 5' -AATTCGCCGGAGACACTCG - 3'
Bad	F 5' - AAGTCCGATCCCGGAATCC- 3'
	R 5' -CTCCAGTTGTGCCACTTGT - 3'
GAPDH	F 5' -GGTATGCACCCAGAGTGATGC- 3'
	R 5' -GACTGTGCCGTTGAATTTG - 3'



تصویر۱- مورفولوژی سلول های A459با عصاره هیدروالکلی دارچین با غلظت۱۰ میکروگرم بر میلی لیتر و سیکلوفسفامید با غلظت۱۰ میکروگرم بر میلی لیتر با استفاده از میکروسکوپ معکوس پنج روز بعد از تیمار الف) سلول های در حال آپوپتوز در نمونه تیمار شده با دارچین ب) گروه کنترل و ج) سلول های در حال آپوپتوز در نمونه تیمار شده با سیکلوفسفامید

نرمالیزاسیون با استفاده از ژن کنترل GAPDH انجام گرفت و هر آزمایش سه بار تکرار گردید. توالی ژن‌ها از سایت Http: // www. ncbi.nlm. nih.gov استخراج شد و پرایمرهای مستقیم و معکوس با استفاده از نرم افزارهای Gene runner (version3) و express primer (version3.05) طراحی شدند.

جهت آنالیز آماری داده‌های به دست آمده، از نسخه ۱۸نرم افزار SPSS(IBM SPSS, Armonk, NY, USA) و آزمون آماری (ANOVA)استفاده شد. نمودارها با کمک نرم افزار Microsoft Excel 2013 (Microsoft Corp., Redmond, WA, USA) رسم و تفاوت‌ها در سطح P<۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

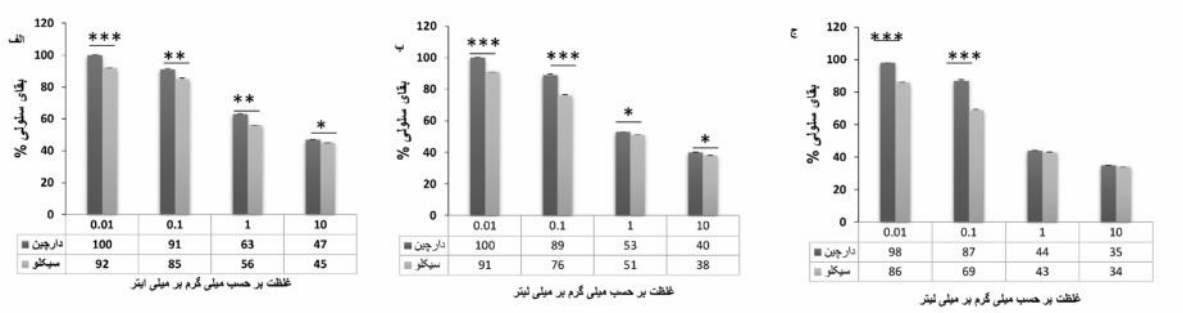
مورفولوژی سلولی: سلول‌های سرطانی رده A459 با کمک میکروسکوپ اینورت مشاهده و بررسی شدند و مشخص شد که در غلظت‌های مختلف دارچین در مقایسه با گروه کنترل، مورفولوژی سلول‌ها دستخوش تغییرات مشخصی شد که کاهش قابل توجه حجم سلول‌ها، کروی شدن و گرانوله شدن آنها از جمله تغییرات مشاهده شده بود که با افزایش دوز و زمان تیمار این تغییرات برجسته تر هم شدند (تصویر ۱).

بقاء سلولی: مقایسه درصد زنده ماندن سلول ها با روشMTT نشان داد که درصد بقاء سلول های سرطانی A459 تیمار شده با غلظت های مختلف سیکلوفسفامید در روزهای مورد آزمایش به طور معنی داری نسبت به نمونه کنترل کاهش یافت (p<۰/۰۵). همچنین مشاهدات در مورد غلظت های مورد آزمایش دارچین در مقایسه با گروه کنترل نشان داد که غلظت ۰/۰۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر دارچین در روزهای اول و سوم روی سلول های A459 اثر کشندگی نداشت، اما در غلظت‌های ۰/۱، ۱ و ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در هر سه روز، روی سلول های A459 در مقایسه با نمونه کنترل اثر کشندگی معنی داری داشت (p<۰/۰۵).

بعلاوه نتایج نشان داد که اثر کشندگی دارچین

Archive
www.SID.ir

Downloaded from rjms.iums.ac.ir at 9:42 IRDT on Saturday September 8th 2018

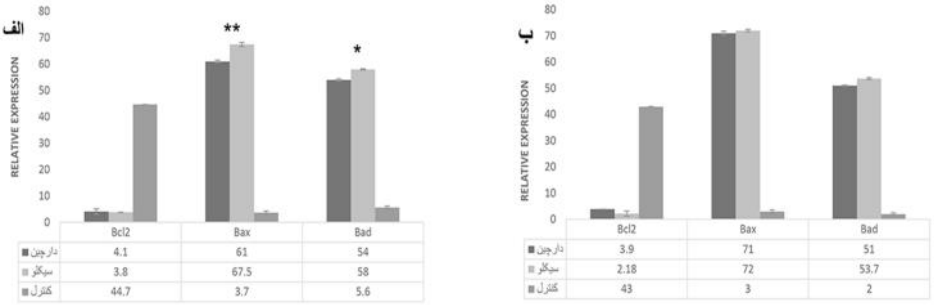


تصویر۲- اثرات غلظت های مختلف عصاره دارچین و سیکلوفسفامید بر بقای سلول‌های A459. بررسی بقا با روش MTT در روزهای ۱، ۳ و ۵ بعد از تیمار انجام گرفت.الف) روز یک بعد از تیمار ب) روز سوم بعد از تیمار ج) روز پنجم بعد از تیمار.

علامت * نشان دهنده $P<0.05$ است.

علامت ** نشان دهنده $P<0.01$ است.

علامت *** نشان دهنده $P<0.001$ است.



تصویر ۳- میانگین بیان ژن‌های Bcl-2، Bax و Badاندازه گیری شده با qRT-PCRدر سلول‌های تیمار شده با الف) غلظت ۱ میلی گرم بر میلی لیتر دارچین و سیکلوفسفامید ب) غلظت ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر دارچین و سیکلوفسفامید.

علامت * نشان دهنده $P<0.05$ است.

علامت ** نشان دهنده $P<0.01$ است.

روی سلول‌های سرطانی A459 در روزهای اول و سوم در همه غلظت‌ها کمتراز سیکلوفسفامید بود ($p<۰/۰۵$)، در حالی که در روز پنجم اثر کشندگی دارچین در غلظت‌های ۱ و ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر با گروه سیکلوفسفامید تفاوت نداشت ($P>۰/۰۵$). با این حال، درصد زنده بودن سلول ها در گروه های تیمار شده با غلظت‌های ۰/۰۱ و ۰/۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر دارچین در روز پنجم همچنان بیشتر از گروه سیکلوفسفامید بود ($p>۰/۰۵$) (تصویر۲).

بیان mRNA مارکرهای آپوپتوز در سلول‌های تیمار شده با استفاده از qRT-PCR: نتایج حاصل از qRT-PCR برای سلول‌های A549تیمار شده با غلظت‌های ۱ و ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره دارچین و سیکلوفسفامید نشان دهنده افزایش معنی دار بیان ژن‌های Bax, Bad و کاهش معنی‌دار ژن Bcl-2 در مقایسه با نمونه کنترل بودند ($p<۰/۰۵$). همچنین نتایج بیان این ژن‌ها در سطح mRNAنشان داد که تفاوت معنی‌داری بین غلظت های ۱ و ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره دارچین در مقایسه با غلظت های ۱ و ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر سیکلوفسفامید در روز پنجم وجود نداشت (تصویر ۳).

بحث و نتیجه‌گیری

بسیاری از گیاهان دارای خاصیت آنتی اکسیدانی هستند که در فعالیت های ضد بدخیمی و ضد جهش زایی سلولی نقش دارند. از آنجایی که پیشرفت سرطان ارتباط بسیار نزدیکی با استرس اکسیداتیو دارد، ترکیباتی که خاصیت آنتی اکسیدانی داشته باشند، می توانند اثر ضد بدخیمی داشته باشند(۱۰). دارچین ادویه‌ای گیاهی است که دارای مصارف متعدد غذایی و دارویی است و به عنوان یک آنتی اکسیدان قوی مورد توجه است.

www.SID.ir

Downloaded from rjms.iums.ac.ir at 9:42 IRDT on Saturday September 8th 2018

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که عصاره هیدروالکلی دارچین توانست در دوزهای بالا میزان مرگ سلولی را در سلول‌های سرطانی ریه افزایش دهد به طوری که اثر آن در دوزهای ۱ و ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر با اثر سیکلوفسفامید قابل مقایسه بود. نکته مورد توجه دیگر در این مطالعه وابستگی اثر کشندگی عصاره هیدروالکلی دارچین به دوز و زمان تیمار بود. به طوری که با افزایش دوز و همچنین زمان تیمار میزان کشندگی آنافزایش یافت.

القاء فعال آپوپتوز به صورت اختصاصی در سرطان راهکاری جالب توجه برای درمان بسیاری از سرطان‌هاست. آپوپتوز مسیری است که طی آن سلول‌های یک موجود چند سلولی در پاسخ به انواعی از محرک‌ها دستخوش خود تخریبی می‌شوند که این فرایند به طور ژنتیکی کنترل و از قبل برنامه‌ریزی می‌شود و زمانی که تعداد سلول‌ها از حد طبیعی زیادتر شود آنها را حذف می‌کند، یا فرایندی است که به عنوان پاسخ فوری به دنبال آسیب ناشی از تشعشع، عفونت ویروسی یا رشد نابجای سلول‌ها در اثر فعال شدن انکوژن‌ها عمل می‌کند(۱۱). پروتئین‌های خانواده Bcl-2 مولکول‌های ضد آپوپتوزی فاکتور بقا هستند که در مسیر مرگ سلولی عامل داخل سلولی مهمی هستند. از اعضاء این خانواده، ژنBcl-2 مهارکننده آپوپتوز است در حالی که ژن‌های Bad و Bax القاء کننده آپوپتوز هستند(۱۲). مطالعه حاضر نشان داد که عصاره دارچین با غلظت بالا همانند سیکلوفسفامید میزان بیان ژن Bcl-2 را کاهش داد در حالی که بیان ژن‌های Bad و Bax را در سلول‌های سرطانی ریه افزایش داد و با این مکانیسم روی سلول‌های سرطانی اثر کشندگی داشت.

در مطالعه‌ای مشابه، کوون و همکاران ۲۰۱۰ با بررسی اثر عصاره آبی دارچین روی سلول‌های توموری در آزمایشگاه اعلام کردند که دارچین با افزایش بیان مولکول‌های پیش آپوپتوزی، مرگ فعال سلولی را در سلول‌های توموری القاء کرد و ژن‌های مهارکننده مسیر آپوپتوزی را مهار کرد(۹). بر اساس مطالعه انجام شده توسط کوپیکار و همکارانش، عصاره آبی دارچین قادر است با افزایش سیگنالینگ کلسیم داخل سلولی و کاهش پتانسیل غشاء میتوکندری باعث القاء آپوپتوز در سلول‌های سرطان گردن شود و به صورت وابسته به دوز کینتیک رشد سلول‌ها را تغییر دهد و بیان انکوپروتئین Her 2 را کاهش داد(۱۳). وارالاکشیمی و همکاران(۲۰۱۴) نیز عصاره متانولی دارچین را روی سلول‌های سرطانی کبد انسان رده HepG2 اثر دادند و اعلام نمودند که عصاره، آپوپتوز را در این سلول‌ها بعد از ۲۴ ساعت القاء کرد(۱۴)

ترکیبات آنتی اکسیدان زیادی در دارچین وجود دارد که بیشترین درصد در بین آنها مربوط به سینامالدئید است. در مطالعات مختلف اثرات ضدتکثیری و پیش آپوپتوزی آن روی رده‌های مختلف سلولی گزارش شده است. به عنوان مثال، لی و همکاران(۲۰۱۶) در مطالعه‌ای بیان کردند که سینامالدئید میزان تکثیر سلول‌های سرطانی کولورکتال انسان را به صورت وابسته به دوز و زمان کاهش داد که علت آن را تنظیم بیان ژن‌های مسئول آپوپتوز، تهاجم و چسبندگی سلولی از طریق مهار مسیر سیگنالینگ PI3K/AKT دانستند. AKT و p-AKT در بافت‌های سرطانی در مقادیر زیادی نسبت به بافت‌های سالم بیان می‌شوند که نه تنها باعث تغییر بدخیم سلولی می‌شود بلکه باعث مهاجرت، جسبندگی و تخریب ماتریکس خارج سلولی نیز می‌شود. از این رو مسیر PI3K/AKT هدفی بالقوه برای درمان سرطان است. ترکیباتی که ژن‌های مربوط به این مسیر را مهار می‌کنند و مانع از فعال شدن مولکول‌های آنتی آپوپتوزی می‌شوند و آپوپتوز سلولی را تحریک می‌کنند برای درمان سرطان امیدوار کننده هستند (۱۵) ، در مطالعه دیگری نشان داده شده استCB403که ترکیبی مشتق شده از سینامالدئید است از طریق توقف چرخه سلولی در فاز G2/M ، وی تومورهای کولون و پستان اثر ضد توموری دارد(۱۶). با این حال، سینگ و همکاران(۲۰۰۹) اثر سمیت سلولی عصاره آبی دارچین (سینامومم زیلانیکوم) را با سینامالدئید تجاری روی لاین‌های سلولی مختلف مقایسه

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from rjms.iums.ac.ir at 9:42 IRDT on Saturday September 8th 2018

کردند و نشان دادند که عصاره در مقایسه با سینامالدئید اثر مهارکنندگی قابل توجهی روی اکثر سلول‌های سرطانی دارد و آن را به عنوان یک داروی شیمی درمانی پیشنهاد نمودند(۱۷)

بعلاوه، کوون و همکارانش در مطالعه خود اعلام کردند که عصاره دارچین در مقایسه با داروی ضد سرطان داکسوروبیسین اثرات مفیدتری دارد چون در عین حال که روی سلول های سرطانی اثر ضد توموری دارد روی سلول‌های سالم اثر سمی ندارد در حالی که داکسوروبیسین روی سلول‌های سالم هم اثر سمی دارد و این یک مزیت مهم برای دارچین است که به عنوان داروی ضد سرطان استفاده شود(۹)

در مطالعات مشابه دیگر، اثرات کشندگی سلولی و آنتی اکسیدانی عصاره های گیاهان مختلف روی سلول‌های سرطانی مختلف بررسی شده است. از جمله، افسار و همکاران اثر عصاره Acacia hydaspica را روی رشد و سیگنالینگ سلول‌های سرطانی پروستات و پستان بررسی کردند. عصاره این گیاه حاوی چهار ترکیب پلی فنولی فعال بود و توانست به صورت وابسته به دوز رشد سلول‌های سرطانی پروستات را مهار کند. همچنین بقا و رشد کلونی سلول‌ها را نیز مهار کرد و باعث القا آپوپتوز در آنها شد. این عصاره از یک طرف بیان مولکول-های ضد آپوپتوزی را مهار کرد و از سوی دیگر باعث افزایش بیان مولکول‌های آپوپتوزی شد(۱۸).

رامان و همکارن عصاره گیاه گرمسیری Lippia origanoids را روی سلول‌های سرطانی پستان و سلول‌های سالم پستان بررسی کردند و نشان دادند که عصاره قادر بود بقا سلول‌ها را به صورت وابسته به دوز کاهش دهد که به صورت معنی داری بیشتر از اثر آن روی سلول‌های سالم پستان بود. عصاره چرخه سلولی را در مرحله G0/G1 متوقف کرد و آپوپتوز را القا نمود(۱۹).

رابینسون و همکارن فعالیت سیتوتوکسیک و آنتی اکسیدان عصاره Tecoma stans علیه رده سلول سرطانی ریه A459 بررسی کردند و اعلام نمودند که عصاره در غلظت‌های بالا فعالیت آنتی اکسیدان بیشتری در مقایسه با ال آسکوربیک اسید داشت و مرگ سلولی را به صورت وابسته به دوز افزایش داد(۲۰).

با توجه به نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر، می‌توان چنین نتیجه گیری کرد که تیمار سلول‌های سرطانی با عصاره هیدروالکلی دارچین به صورت وابسته به دوز و زمان،درصد بقاء آنها را کاهش داد و باعث القاء مرگ سلولی در آنها شد. از این رو، در مقایسه با سیکلوفسفامید که یک داروی ضد سرطان رایج است، دارچین به عنوان یک داروی گیاهی با عوارض جانبی اندک، می‌تواند به عنوان دارویی مناسب و ایمن برای درمان سرطان مطرح باشد.با این حال لازم است مطالعات بیشتری برای روشن ساختن مکانیسم عمل و ترکیبات فعال اصلی دارچین برای القاء مرگ سلولی در سلول‌های سرطانی صورت گیرد.

تقدیر و تشکر

هزینه انجام این تحقیق از محل گرنت پژوهشی نویسندگان تامین شده است و نویسندگان این مقاله کمال تشکر و قدردانی خود را از معاونت پژوهشی و فن آوری دانشگاه شهید چمران اهواز اعلام می‌دارند.

منابع

1. Torre AL, Bray F, Siegel RL, Ferlay J ,Lortet-Tieulent J ,Jemal A. Global cancer statistics, CA, 2015. 65(2):87-108.

2. Travis WD, Brambilla E, Nicholson AG, Yatabe Y, and B.M. Austin JH, The 2015 world healthorganization classification of lung tumors. J Thorac Oncol; 2015. 10:1243- 1261.

3. Baldi A, De Luca A., Esposito V, Campioni M, Spugnini EP, Citro G. Tumor Suppressors and Cell-Cycle Proteins in Lung Cancer. Patholog Res Int; 2011. 605042.

4. Tripathy DN and Jena GBIntervention ofastaxanthin against cyclophosphamide induced oxidative stress and DNA damage: a study in mice. Chem Biol Interact, 2009. 180(3):398-406.

5. Hales BF, Barton TS, Robaire B. Impart of paternal exposure to chemotherapy on offspring in the rat. J Natl Cncer Inst Monogr; 2005. 34:28-31.

6. Korkmaz A, Opal T, Oter T. Pathophysiological aspects of cyclophosphamide and ifosfamide induced hemorrhagic cystitis: implication of reactive oxygen and nitrogen species as well as PARP activation. Cell Biol Toxicol; 2007 .23(5): 303-312.

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from rjms.iums.ac.ir at 9:42 IRDT on Saturday September 8th 2018

7. Jeelani R, Khan S, Shaeib F, Kohan-Ghadr HR, Aldhaheri SR, Najafi T, et al. Cyclophosphamide and acrolein induced oxidative stress leading to deterioration of metaphase II mouse oocyte quality. Free Radic Biol Med; 2017. 9(110) 11-18.

8. Ranasinghe P, PigeraS, Premakumara S, Galappaththy P, Constantine GR, Katulanda P, Medicinal properties of 'true' cinnamon (Cinnamomum zeylanicum): a systematic review. BMC Complement Altern Med; 2013. 13(275).

9.Kwon HK, Hovang J,So JS, Lee CG, Sahoo A, Ryu JH et al. , Cinnamon extract induces tumor cell death through inhibition of NFB and AP1BMC Cancer; 2010. 10(392).

10.Greenwell M and Rahman PKSM. Medicinal Plants: Their Use in Anticancer Treatment. Int J Pharm Sci Res; 2015. 6(10):4103-4112.

11.Hong JR and Wu JL..Induction of apoptotic death in cells via Bad gene expression by infectious pancreatic necrosis virus infection. Cell Death Differ; 2002. 9(2):113-124.

12.Newton K and Strasser A. The Bcl-2 family and cell death regulation. Curr Opin Genet Dev; 1998. 18(1):68-75

13. Koppikar SJ, Choudhari AS, Suryavanshi SA, Kumari S, Chattopadhyay S, Kaul-Ghanekar R, Cinnamon Extract (ACE-c) from the bark of Cinnamomum cassia causes apoptosis in humancervical cancer cell line (SiHa)loss ofmitochondrial membrane potential. BMC Cancer; 2010. 10(210).

14. Varalakshimi B, Vijayaanand A, Karpagam T, Sugunabai J, Manikandan R, In vitro antimicrobial and anticancer activity of Cinnamomum zeylanicum linn bark extracts. Int Pharm Pharm Sci; 2014. 6:12-18.

15. Li J, Teng Y, Liu S, Wang Z, Chen Y, Zhang Y et al, Cinnamaldehyde affects the biological behavior of human colorectal cancer cells and induces apoptosis via inhibition of the PI3K/Akt signaling pathway. Oncol Rep; 2016. 35(3):1501-1510.

16. Fang SH, Raob YK, Tzengb YM, Cytotoxic Effect of trans-Cinnamaldehyde from Cinnamomum osmophloeum Leaves on Human Cancer Cell Lines. JAES; 2004. 2(2):136-147.

17. Singh R, Koppikar SJ, Paul P, Gilda S, Paradkar AR, Kaul-Ghanekar R, Comparative analysis of cytotoxic effect of aqueous cinnamon extract from Cinnamomum zeylanicum bark with commercial cinnamaldehyde on various cell lines. Pharm Biol; 2009. 47(12):1174–1179.

18. Afsar T, Trembley JH, Salomon CE, Razak S, Khan MR & Ahmed K .Growth inhibition and apoptosis in cancer cells induced by polyphenolic compounds of Acacia hydaspica: Involvement of multiple signal transduction pathways. Sci Rep; 2016. 6:23077.

19. Raman V, Lorenzo JF, Stashenko EE, Levy M, Levy MM & Camarillo IG. Lippia origanoides extract induces cell cycle arrest and apoptosis and suppresses NF-κB signaling in triple-negative breast cancer cells. Int J Oncol; 2017. 51:1801-1808.

20. Robinson JP, Suriya K, Subbaiya R, Ponmurugan P. Antioxidant and cytotoxic activity of Tecoma stans against lung cancer cell line (A549). Braz J Pharm Sci; 2017. 53(3):e00204.

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from rjms.iums.ac.ir at 9:42 IRDT on Saturday September 8th 2018

Comparison of anti proliferative effect of cinnamon (Cinnamomum zeylanicum) hydroalcoholic extract with cyclophosphamide medicine on A459 Cancer Cells

***Tayebeh Mohamadi**, Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran, & Stem cells and Transgenic technology research center (STTRC), Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran (*Corresponding author). t.mohammadi@scu.ac.ir

Elham Hoveizi, Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran, & Stem cells and Transgenic technology research center (STTRC), Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.

Abstract

Background: Lung cancer is the most common cause of cancer death worldwide. Despite extensive efforts, an ideal medicine has not been yet found for cancer treatment. Cinnamon contains strong anti-oxidative compounds. This study evaluated and compared the lethal effect of cinnamon extract on the A459 line lung cancer cells with cyclophosphamide.
Methods: Cinnamon extract was prepared by soxhlet set. Then A459 cells were seeded and treated with 0.01, 0.1, 1 and 10 mg/ml concentrations of cinnamon and cyclophosphamide for 1, 3 and 5 days. Cell viability and morphology were evaluated on certain days after treatment. The expression of apoptotic genes including Bad, Bax and Bcl-2 was evaluated by qRT-PCR.
Results: Comparison of the cell viability percent in treated groups showed that lethal effect of cinnamon is equal to cyclophosphamide in 1 and 10 mg/ml concentrations on the 5th day but it was less than cyclophosphamide in other concentrations and days ($p<0.05$). Moreover, molecular findings showed that 1 and 10 mg/ml concentrations of cinnamon extract could up-regulate Bad and Bax genes expression and down regulate Bcl-2 gene expression ($p<0.05$).
Conclusion: Cinnamon hydroalcoholic extract can induce apoptosis in A459 cells in a dose and time-dependent manner and be similar to cyclophosphamide with increasing concentration.

Keywords: Cinnamon, Apoptosis, A459, Cyclophosphamide, Antioxidant

Archive of SID

www.SID.ir