

## بررسی اثر سمیت سلولی گیاه اسپرس درختی نقره‌ای بر رده‌های سلولی سرطان انسانی

فرحناز خلیقی‌سیگارودی<sup>۱</sup>، محمود جدی‌تهرانی<sup>۲\*</sup>، مریم اهوازی<sup>۳</sup>، سحر شهنازی<sup>۴</sup>، علی احمد بیات<sup>۵</sup>، ندا مهاجر<sup>۵</sup>، سعید زارعی<sup>۲</sup>

- ۱- دانشیار پژوهش، گروه فارماکونوزی و داروسازی مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، پژوهشکده گیاهان دارویی جهاددانشگاهی، کرج، ایران
  - ۲- استاد پژوهش، مرکز تحقیقات آنتی‌بادی منوکلونال، پژوهشگاه فناوری‌های نوین علوم زیستی جهاددانشگاهی - ابن‌سینا، تهران، ایران
  - ۳- مربی پژوهش، گروه کشت و توسعه مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، پژوهشکده گیاهان دارویی جهاددانشگاهی، کرج، ایران
  - ۴- دکترای تخصصی، مؤسسه کشاورزی مناطق گرمسیری، دانشگاه پوترا مالزی، سردانگ، سلانگور، مالزی
  - ۵- کارشناسی ارشد، گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
- \*آدرس مکاتبه: تهران، ولنجک، پژوهشگاه فناوری‌های نوین علوم زیستی جهاددانشگاهی - ابن‌سینا، مرکز تحقیقات آنتی‌بادی منوکلونال، صندوق پستی: ۱۱۷۷-۱۹۶۱۵، تلفن: ۲۲۴۳۲۰۲۰ (۰۲۱)، نمابر: ۲۲۴۳۲۰۲۱ (۰۲۱)  
پست الکترونیک: mahjed@avicenna.ac.ir

تاریخ تصویب: ۹۲/۱۱/۲۰

تاریخ دریافت: ۹۲/۵/۲۶

### چکیده

مقدمه: برای قرن‌ها، گیاهان منبع اصلی کشف داروهای مختلف بوده‌اند. برخی داروهای ضدسرطان حاصل از گیاهان، وین‌بلاستین، وین‌کریستین، تاکزول و کامپوتوسین می‌باشند. سرطان پستان یکی از رایج‌ترین سرطان‌های تشخیص داده‌شده در بین زنان و سرطان پروستات یکی از مشکلات بهداشتی مردان در سراسر دنیا به شمار می‌روند.

هدف: هدف از این مطالعه بررسی اثر سمیت سلولی گیاه اسپرس درختی نقره‌ای بر رده‌های سلولی سرطان انسانی می‌باشد. روش بررسی: در مطالعه حاضر، به بررسی اثرات سمیت سلولی عصاره‌های تام متانولی و فراکسیون‌های اسپرس درختی نقره‌ای بر روی دو رده سلولی سرطان پستان انسانی MCF-7 و BT-474 و نیز دو رده سلولی سرطان پروستات انسانی PC-3 و Du-145 پرداخته شده است. سمیت سلولی بوسیله روش MTT و فلوسیتومتری ارزیابی شد. نتایج: از بین فراکسیون‌های مورد آزمایش، فراکسیون کلروفومی گیاه، در تست MTT بیشترین اثر سمیت را داشت. کمترین IC<sub>50</sub> مربوط به رده سلولی سرطان پستان انسانی MCF-7 برابر با ۷۰/۶۹ میکروگرم در میلی‌لیتر در زمان ۴۸ ساعت بود. در تست فلوسیتومتری این فراکسیون در سه رده سلولی MCF-7، BT-474 و PC-3 اثر القای نکروز و در رده Du-145 اثر القای آپوپتوز از خود نشان داد. نتیجه‌گیری: این گیاه دارای اثرات سمیت سلولی می‌باشد. بررسی‌های بیشتری برای تعیین ساختار شیمیایی ترکیبات فعال و مکانیسم‌های ملکولی دخیل در اثرات ضدسرطانی گیاه اسپرس درختی نقره‌ای مورد نیاز می‌باشد. گل‌واژگان: اسپرس درختی نقره‌ای، رده‌های سلولی سرطان انسانی، سمیت سلولی

## مقدمه

دارای اثر ضدالتهاب، ضدتومور، ضد میکروب و محافظت کننده در برابر سمیت موتازنی و سلولی [۱۵] می باشد.

اسپرس درختی نقره‌ای (*Taverniera spartea* DC.) [۱۶] گیاه چوبی، درختچه‌ای به ارتفاع ۵۰ - ۱۱۰ سانتی‌متر، متمایل به سفید، پوشیده از کرک‌های روی هم خوابیده، با ساقه بسیار متعدد، با شاخه‌های کوتاه، تقریباً دوشاخه‌ای، دارای خطوط طولی، در مقطع کمی زاویه‌دار می باشد. برگ‌ها تقریباً بدون دم‌برگ، مرکب از ۳ - ۱ برگچه کوچک، کنج‌دار، واژ تخم‌مرغی، غالباً تاشده، در انتها دارای نوک کوچک برگشته، گوشوارک‌ها کوچک و بی‌دوام می باشد. گل‌های آن صورتی - متمایل به بنفش، دمگل بسیار کوچک، محوری با ۱ - ۲ گل، کاسه پوشیده از کرک‌های سفید، با تقسیمات مثلثی، کمی طولی‌تر از لوله، درفش برابر با ناو، بال‌ها دوبار بلندتر از کاسه ولی دوبار کوتاه‌تر از ناو و میوه به صورت نیام دارای بندهایی حاوی ۳ - ۲ تخمک و پوشیده از کرک‌ها یا تارهای طویل روی هم خوابیده می باشد. موسم گل آن بهمن تا اسفند و انتشار جغرافیایی آن در سواحل جنوبی ایران شامل بندرعباس، میناب، بلوچستان، نیک‌شهر و سیرجان می باشد [۱۷].

در یک بررسی سمیت سلولی به کمک مدل لارو آرتیمیا سالینا بر روی اسپرس درختی نقره‌ای نشان داده شد که این گیاه دارای اثر سمیت سلولی بالایی ( $LC_{50}$  برابر با ۰/۳۴ میکروگرم در میلی‌لیتر) می باشد [۱۸]. آزمون سمیت سلولی به کمک لارو آرتیمیا سالینا (*Artemia salina*) یکی از آزمون‌های غربالی برای جداسازی ترکیبات فعال گیاهی می باشد. به کمک این تست، گیاهانی که دارای خاصیت سمیت سلولی بالایی بوده طی یک آزمون سریع، ساده و ارزان شناسایی شده و برای اثبات اثر سمیت سلولی، برای انجام آزمون‌های پیشرفته‌تر بررسی اثر سمیت سلولی انتخاب می شوند [۲۰، ۱۹].

هدف از مطالعه حاضر بررسی اثر سیتوتوکسیک عصاره‌ها و فراکسیون‌های اسپرس درختی نقره‌ای بر رده‌های سلولی سرطان پستان انسانی MCF-7 و BT-474 و رده‌های سلولی سرطان پروستات انسانی PC-3 و Du-145 به روش

برای قرن‌ها، گیاهان منبع اصلی کشف داروهای مختلف بوده‌اند. اولین داروی سرطان گیاهی، آلکالوئیدهای ضدلوسمی وین کریستین و وین‌بلاستین از گیاه پروانش می باشند. از اوایل دهه‌ی ۱۹۵۰ تاکنون شناسایی ترکیبات جدید رهبر برای شیمی درمانی سرطان و مشتق‌سازی از آنها، از برنامه‌های غربالگری وسیع گیاهان شده است. در این راه عوامل ضدنئوپلاسم جدید نظیر مشتق تاکسان paclitaxel که بعدها taxol نامیده شد (از گیاه سرخدار برگ‌ریز *Taxus brevifolia*) و آلکالوئید camptothecin (از درخت چینی *Camptotheca acuminata*) شناسایی شدند [۱].

تحقیقات بسیاری در سراسر دنیا در جهت کشف ترکیبات طبیعی که می‌توانند باعث مهار یا پیشگیری روند سرطان گردند در حال انجام می‌باشند [۷ - ۲].

سرطان بزرگ‌ترین مشکل سلامت عمومی در ایران می‌باشد. طبق آخرین گزارش کشوری ثبت موارد سرطانی مربوط به سال ۱۳۸۸ وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی، بعد از بیماری عروق کرونر قلب و تصادفات، سرطان سومین عامل مرگ و میر در ایران می‌باشد. سرطان پستان در بین زنان ایرانی، رتبه اول را در میان سرطان‌های تشخیص داده شده به خود اختصاص می‌دهد و شامل ۲۳ درصد کل بدخیمی‌ها با میزان بروز سنی (ASR) ۲۸/۲۵ نفر در هر ۱۰۰۰۰ نفر می‌باشد [۸، ۹].

سرطان پروستات نیز یکی از مشکلات بهداشتی مردان در سراسر دنیا به شمار می‌رود. در ایران طبق آخرین گزارش کشوری ثبت موارد سرطانی مربوط به سال ۱۳۸۸ وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی، بعد از سرطان پوست و سرطان معده با شیوع ۹/۴ درصد کل بدخیمی‌ها در مردان و با میزان بروز سنی (ASR) ۱۲/۵۹ در هر ۱۰۰۰۰ نفر، در رتبه سوم ابتلا به سرطان مردان قرار دارد [۹].

گیاهان جنس اسپرس درختی عمدتاً حاوی ترکیبات ایزوفلاونوئیدی و ساپونینی می‌باشند [۱۲ - ۱۰]. همچنین در درمان درد معده [۱۴، ۱۳] و بهبود سریع تب مؤثر بوده [۱۱] و



MTT assay و تعیین مکانیسم مرگ سلولی با روش فلوسیتومتری می‌باشد.

## مواد و روش‌ها

### تهیه نمونه گیاه

قسمت‌های هوایی گیاه اسپرس درختی نقره‌ای (*Taverniera spartea* DC.) از استان هرمزگان در اردیبهشت‌ماه ۱۳۹۰ جمع‌آوری شد و نمونه هرباریومی آن جهت شناسایی به هرباریوم پژوهشکده گیاهان دارویی جهاددانشگاهی منتقل و پس از تأیید نام علمی، با کد (IMPH 600) در هرباریوم نگهداری شد. به منظور استخراج عصاره، نمونه خشک شده گیاه شامل ساقه (بخش اعظم گیاه)، برگ، گل و میوه به وسیله دستگاه آسیاب خرد شد.

### عصاره‌گیری و تغلیظ

مقدار ۱۰۰ گرم قسمت‌های هوایی پودر شده گیاه توسط دستگاه پرکولاتور و با کمک ۶۵۰ میلی‌لیتر حلال متانول عصاره‌گیری شد. به این ترتیب عصاره تام متانولی گیاه تهیه شد. عصاره صاف شده با کاغذ صافی، توسط روتاری (دستگاه تقطیر در خلاء) در دمای زیر ۵۰ درجه سانتی‌گراد تغلیظ شد. عصاره به دست آمده توزین شد و وزن عصاره تغلیظ شده و بازده عصاره‌گیری به دست آمد. عصاره تغلیظ شده تا زمان مصرف در فریزر ۱۸- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد [۲۱].

### فراکسیون‌کردن نمونه‌ها

از ۲۹ گرم عصاره متانولی خشک به دست آمده، مقدار ۵ گرم در آب به کمک سونیکاتور حل شد و با استفاده از دکانتور و توسط حلال‌های پترولیوم‌اتر، کلروفرم، اتیل استات و n- بوتانول فراکسیون‌ها شد. فراکسیون‌ها پس از تهیه توسط دستگاه روتاری خشک شده و وزن آنها محاسبه شد [۲۲].

### کشت سلولی

رده‌های سلولی PC-3، BT-474، Du-145 و MCF-7 پس از دفریز، داخل فلاسک‌های ۲۵ سانتی‌متر مربع کشت داده

شدند و پس از آنکه رشد آنها به حد نصاب رسید به داخل فلاسک‌های ۷۵ سانتی‌متر منتقل شدند. جهت کشت سلول‌های PC-3، MCF-7 و Du-145 از محیط RPMI حاوی ۱۰ درصد FBS و جهت کشت سلول BT-474 به دلیل کند رشد بودن از محیط RPMI با ۱۵٪ FBS و NEAA 1X (اسید آمینه غیرضروری) و سدیم پیرووات با غلظت ۱ میلی‌مولار و نیز انسولین رگولار انسانی استفاده شد.

به دلیل اینکه سلول‌های مذکور به کف فلاسک و نیز به یکدیگر می‌چسبند، جهت جداسازی از Trypsin-EDTA1x استفاده شد. به این ترتیب که محیط کشت داخل فلاسک‌ها خارج و سلول‌ها توسط RPMI بدون سرم شستشو داده شدند. سپس Trypsin-EDTA1x به مقداری که کف فلاسک‌ها را بپوشاند به هر فلاسک اضافه و به مدت ۳ دقیقه در دمای ۳۷ سانتی‌گراد انکوبه شد، سپس فلاسک‌ها از انکوباتور خارج و زیر میکروسکوپ بررسی شدند، در این مرحله کاملاً مشخص بود که سلول‌ها از کف پلیت جدا و به صورت سلول تکی درآمدند، سپس جهت غیرفعال کردن Trypsin، به هر فلاسک ۱۰ میلی‌لیتر محیط RPMI حاوی ۱۰٪ FBS اضافه و دیواره فلاسک‌ها با پر و خالی کردن ملایم پیپت پاستور شستشو داده شد و سلول‌ها داخل لوله فالكون ۱۵ میلی‌لیتر منتقل و در دور RPM ۱۵۰۰ به مدت ۵ دقیقه و در دمای اتاق ساتریفوز شدند، پس از آن محلول رویی سلول‌ها خالی و به رسوب سلولی محیط حاوی ۱۰٪ FBS اضافه و تعداد سلول‌ها شمارش شد.

پس از شمارش، رده‌های سلولی مورد نظر داخل پلیت ۹۶ حفره کشت داده شدند به طوری‌که در داخل هر حفره ۱۰<sup>۴</sup> سلول به همراه ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت، قرار داده شد. همزمان نیز عصاره‌ها و فراکسیون‌های گیاه مذکور در DMSO حل شدند و در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در DMSO تهیه شدند. از عصاره‌ها و فراکسیون‌ها به میزان ۱۰۰ μl/well و در زمان‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت و در ۸ سری، درون پلیت‌های کشت سلولی ۹۶ حفره حاوی سلول اضافه شدند. غلظت نهایی عصاره‌ها در پلیت‌ها برابر ۸۰۰ تا ۰/۸ میکروگرم در میلی‌لیتر شد [۲۲].



## آماده‌سازی MTT

MTT در غلظت ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در محیط RPMI بدون سرم تهیه شد. پس از انکوباسیون سلول‌ها به همراه عصاره در زمان موردنظر، محیط رویی سلول‌ها خارج و هر حفره با ۱۰۰ میکرولیتر RPMI بدون سرم شستشو داده شد. سپس MTT به نسبت ۱:۱۰ با محیط RPMI بدون سرم رقیق و به هر حفره ۱۰۰ میکرولیتر اضافه و به مدت ۳ ساعت در دمای ۳۷ سانتی‌گراد انکوبه شد، در این مدت به طور متناوب پلیت‌ها در زیر میکروسکوپ بررسی شدند، با افزایش زمان انکوباسیون، ظهور کریستال‌های سوزنی داخل حفره‌ها کاملاً مشهود بود. پس از سپری شدن زمان انکوباسیون، محتویات حفره‌ها به آرامی خارج و به آنها ایزوپروپانل اسیدی اضافه شد [۲۲].

## اضافه کردن ایزوپروپانل اسیدی

به هر حفره ۱۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانل حاوی اسید کلریدریک ۰/۰۴ مولار اضافه و سپس محتویات حفره‌ها با استفاده از سمپلر مخلوط شد. با ظهور رنگ بنفش پلیت‌ها در طول موج ۵۷۰ نانومتر خوانده شد.

## کنترل‌ها

کنترل‌هایی که در این تست استفاده شدند عبارتند از:

- ۱- ۰.۵٪ DMSO به صورت سه تکرار
- ۲- رقت‌های سریال DMSO عیناً مشابه غلظت‌های عصاره‌های موجود در تست و به صورت ۸ تکرار
- ۳- رده‌های سلولی که بدون حضور عصاره به صورت سه تکرار کشت داده شده بودند.

برای محاسبه مهار رشد و رسم منحنی از فرمول زیر استفاده شد:

$$\text{Growth inhibition (\%)} = \left[ \frac{\text{control O.D.} - \text{sample O.D.}}{\text{control O.D.}} \right] \times 100$$

در نهایت از روی منحنی رسم شده مقدار  $IC_{50}$  نمونه‌ها که بیانگر غلظتی از نمونه است که موجب ۵۰ درصد مهار رشد سلول‌های سرطانی می‌شود، محاسبه شد.

## فلوسیتومتری

تست فلوسیتومتری بر اساس کیت BD (با اندکی تغییرات) و بر اساس دستورالعمل زیر، انجام شد: سلول Jurcat به میزان  $10^6$  cell/well در پلیت ۲۴ حفره کشت داده شد و به هر چاهک ۱ میلی‌لیتر محیط RPMI حاوی ۱۰ درصد FBS و یک میکرولیتر Stuarosporin اضافه و به مدت ۱۵ ساعت در انکوباتور کشت سلول انکوبه شد. سلول مذکور در ۴ حفره کشت داده شد. پس از سپری شدن مدت انکوباسیون، محلول رویی هر چاهک خارج و سلول‌های آن داخل ۴ عدد میکروتیوپ ۱/۵ میلی‌لیتر منتقل شد و به تمامی میکروتیوپ‌ها ۱۰۰ میکرولیتر بافر Binding اضافه شد. به ۲ عدد از میکروتیوپ‌ها ۲/۵ میکرولیتر Annexin V اضافه و به مدت ۱۵ دقیقه در انکوباتور کشت سلول انکوبه شد. پس از سپری شدن مدت انکوباسیون فوق به یکی از ۲ لوله فوق ۰/۵ میکرولیتر PI (پروپیدیوم یدید) اضافه و به لوله دیگر چیزی اضافه نشد. و به یکی از دو میکروتیوپ که فاقد Annexin V بوده ۰/۵ میکرولیتر PI و به لوله دیگر چیزی اضافه نشد. سپس کلیه لوله‌ها به مدت ۲ دقیقه در انکوباتور کشت سلول انکوبه و پس از آن دو نوبت با PBS1x شستشو داده شدند و پس از خالی کردن محلول رویی، ۴۰۰ میکرولیتر بافر Binding اضافه و با فلوسیتومتری خوانده شد.

نتایج به دست آمده نمایانگر این موضوع بود که لوله تست حاوی Annexin V و PI و نیز لوله‌ای که فقط حاوی Annexin V بود سلول را وارد فاز اولیه آپتوز کرد و لوله‌های دیگر که حاوی PI و فاقد Annexin V و PI بودند هیچ واکنشی صورت نگرفت.

از نتایج به دست آمده، استنباط شد که کیت مورد نظر از نظر کارایی مورد تأیید بوده و بر اساس آن تست اصلی و به شرح زیر انجام شد:

ابتدا رده‌های سلولی PC-3، BT-474، MCF-7 و DU-145 در فلاسک ۲۵ سانتی‌متر مربع کشت داده و سپس به فلاسک ۷۵ سانتی‌متر مربع منتقل شدند به دلیل اینکه رده‌های سلولی فوق چسبنده می‌باشند جهت جداسازی سلول از



### آنالیز آماری

تمامی آنالیزهای MTT در ۸ تکرار انجام شد. با استفاده از نرم افزار Microsoft Excel<sup>®</sup> میانگین ۸ بار تکرار و انحراف معیار آن‌ها محاسبه شد و سپس معادله خط رگرسیون غلظت در برابر مهار رشد به دست آمد. برای محاسبه مهار رشد و رسم منحنی از فرمول زیر استفاده شد:

$$\text{Growth inhibition (\%)} = \frac{[(\text{control O.D.} - \text{sample O.D.}) / \text{control O.D.}] \times 100}{}$$

در نهایت از روی منحنی رسم شده مقدار  $IC_{50}$  نمونه‌ها که بیانگر غلظتی از نمونه است که موجب ۵۰ درصد مهار رشد سلول‌های سرطانی می‌شود، محاسبه شد. برای بررسی اثر غلظت‌های مختلف عصاره‌ها بر رده‌های سلولی سرطانی مختلف از نرم‌افزار SPSS<sup>®</sup> و تست آماری ANOVA استفاده شد.

### نتایج

#### بازده عصاره‌گیری و اسانس‌گیری

بازده عصاره خشک به دست آمده از ۱۰۰ گرم پودر گیاه برابر با ۲۹ درصد شد. در جدول شماره ۱ میزان فراکسیون‌های مختلف حاصل از ۵ گرم عصاره متانولی اسپرس درختی نقره‌ای ملاحظه می‌شود.

#### نتایج تست MTT بر رده‌های سلولی سرطان انسانی

نتایج تست MTT بر روی عصاره متانولی و فراکسیون‌های گیاه اسپرس درختی نقره‌ای نشان داد که رده‌های سلولی حساسیت‌های مختلفی به این فراکسیون‌ها نشان می‌دهند. در جدول شماره ۲ نتایج عصاره و فراکسیون‌هایی که بیشترین اثر را از خود نشان داده بودند به صورت  $IC_{50}$  برحسب میکروگرم در میلی‌لیتر بیان شده است. نتایج حاصل میانگین ۸ بار تکرار  $\pm$  انحراف معیار بوده و زمان خواندن نمونه داخل پراتنز برحسب ساعت آورده شده است.

Trypsin-EDTA 1x استفاده شد. سپس  $10^6$  سلول به همراه ۱ میلی‌لیتر محیط RPMI سرم‌دار به هر حفره پلیت ۲۴ حفره اضافه شد. سپس ۱ میلی‌لیتر از فراکسیون AC در غلظت‌های ۱۰۰۰، ۲۰۰، ۴۰، ۸ و  $1/6$  میکروگرم در میلی‌لیتر به حفره‌های پلیت ۲۴ حفره اضافه شدند که غلظت نهایی فراکسیون ۵۰۰، ۱۰۰، ۲۰، ۴ و  $0/8$  میکروگرم در میلی‌لیتر به دست آمد. پلیت‌های فوق به مدت ۱۶ ساعت در انکوباتور کشت سلول قرار داده شدند.

پس از انکوباسیون مدت مذکور، به دلیل اینکه سلول‌های مورد استفاده به کف پلیت ۲۴ حفره چسبیده بودند از مخلوط BSA 1% و PBS 1X، EDTA 0.05% جهت جداسازی سلول‌ها از یکدیگر استفاده شد، سلول‌های درون هر پلیت ۲۴ حفره به داخل یک لوله فالکون ۱۵ میلی‌لیتر منتقل شد و سپس در ۱۵۰۰ RPM و دمای ۲۲ سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ و محلول رویی لوله‌ها خارج شد، سپس ۱۰۰ میکرولیتر محلول بافر Binding به هر لوله و سپس ۲/۵ میکرولیتر Annexin V به هر لوله اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه در انکوباتور کشت سلول انکوبه شد. پس از آن ۰/۵ میکرولیتر PI به هر لوله اضافه شد و به مدت ۲ دقیقه در انکوباتور کشت سلول انکوبه شد. سپس با PBS 1X شستشو داده شدند و محلول رویی خارج و به رسوب سلول‌ها ۴۰۰ میکرولیتر بافر Binding اضافه شد و به وسیله فلوسیتومتری خوانده شد [۲۲].

#### کنترل‌ها

کنترل‌هایی که در تست فلوسیتومتری استفاده شد، عبارتند از:

- ۱- DMSO 0.5%
- ۲- رقت‌های سریال DMSO که عیناً مشابه غلظت‌های عصاره‌های موجود در تست استفاده شد.
- ۳- کشت سلول به صورت عدم استفاده از عصاره.



جدول شماره ۱- فراکسیون‌های مختلف عصاره متانولی اسپرس درختی نقره‌ای

ردیف	نام عصاره یا فراکسیون	نام حلال	وزن فراکسیون (گرم)
۱	A	متانول	۵
۲	AP	پترولیوم اتر	۰/۲۴
۳	AC	کلروفرم	۰/۳۱
۴	AE	اتیل استات	۱/۷۱
۵	AB	-n بوتانول	۰/۱۸
۶	AW	باقیمانده آبی	۲/۲۶

جدول شماره ۲- نتایج تست MTT بر رده‌های سلولی سرطان انسانی

ردیف	رده سلولی	نام عصاره یا فراکسیون	نام حلال	IC <sub>50</sub> (µg/ml) ± SD
۱	رده سلولی سرطان پستان انسانی	MCF-7	کلروفرم	70.69 ± 0.79 (48 h)
۲		BT-474	متانول	2595.06 ± 7.18 (24 h)
۳		AC	کلروفرم	271.41 ± 0.60 (24 h)
۴	رده سلولی سرطان پروستات انسانی	PC-3	کلروفرم	291.83 ± 0.63 (24 h)
۵		AC	کلروفرم	112.21 ± 0.34 (24 h)
۶		Du-145	کلروفرم	176.71 ± 3.73 (72 h)
۷		AC	کلروفرم	449.28 ± 2.36 (96 h)

همچنین در رده سلولی Du-145 نیز بین غلظت‌های مختلف به‌کار گرفته شده از فراکسیون AC اسپرس درختی نقره‌ای و اثر مهار رشد سلول‌های سرطانی اختلاف معنی‌دار ( $p < 0.001$ ) وجود دارد. تنها بین دو غلظت ۸۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر و نیز دو غلظت ۲۰۰ و ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر اختلاف معنی‌دار ( $p > 0.001$ ) وجود ندارد (نمودار شماره ۲).

همچنین در رده سلولی PC-3 نیز بین غلظت‌های مختلف به‌کار گرفته شده از فراکسیون AC اسپرس درختی نقره‌ای و اثر مهار رشد سلول‌های سرطانی اختلاف معنی‌دار ( $p < 0.001$ ) وجود دارد. به عنوان نمونه بین غلظت ۸۰۰ و غلظت‌های ۲۰۰، ۱۰۰ و ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر اختلاف معنی‌دار ( $p < 0.001$ ) وجود دارد. همچنین بین غلظت ۸۰۰ و غلظت ۴۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر اختلاف معنی‌دار در سطح ( $p < 0.05$ ) وجود دارد (نمودار شماره ۳).

### نتایج آنالیز فلوسیتومتری بر رده‌های سلولی سرطان انسانی

نتایج آنالیز فلوسیتومتری فراکسیون AC (کلروفرمی) اسپرس درختی نقره‌ای که نسبت به سایر فراکسیون‌ها در تست MTT اثر سمیت سلولی بیشتری بر رده‌های مختلف سرطانی داشت در جدول شماره ۳ آورده شده است.

### نتایج آنالیز آماری

آنالیز آماری با استفاده از تست ANOVA نشان داد که در رده سلولی BT-474 در اکثر موارد بین غلظت‌های مختلف به‌کار گرفته شده از فراکسیون AC اسپرس درختی نقره‌ای و اثر مهار رشد سلول‌های سرطانی اختلاف معنی‌دار ( $p < 0.001$ ) وجود دارد. برای مثال بین غلظت ۸۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر با غلظت‌های ۲۰۰، ۱۰۰ و ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر در اثر مهار رشد اختلاف معنی‌دار ( $p < 0.001$ ) وجود دارد (نمودار شماره ۱).



مهار رشد اختلاف معنی دار ( $p < 0/001$ ) وجود دارد. درحالی که بین غلظت‌های ۱۰۰، ۲۰ و ۰/۸ میکروگرم در میلی لیتر در اثر مهار رشد اختلاف معنی دار ( $p > 0/001$ ) وجود ندارد (نمودار شماره ۴).

در رده سلولی MCF-7 نیز بین برخی غلظت‌های مختلف به کار گرفته شده از فراکسیون AC اسپرس درختی نقره‌ای و اثر مهار رشد سلول‌های سرطانی اختلاف معنی دار ( $p < 0/001$ ) وجود دارد. برای مثال بین غلظت ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر با غلظت‌های ۱۰۰، ۲۰ و ۰/۸ میکروگرم در میلی لیتر در اثر

جدول شماره ۳- نتایج آنالیز فلوسیتومتری فراکسیون کلروفومی اسپرس درختی نقره‌ای بر رده‌های سلولی سرطان انسانی

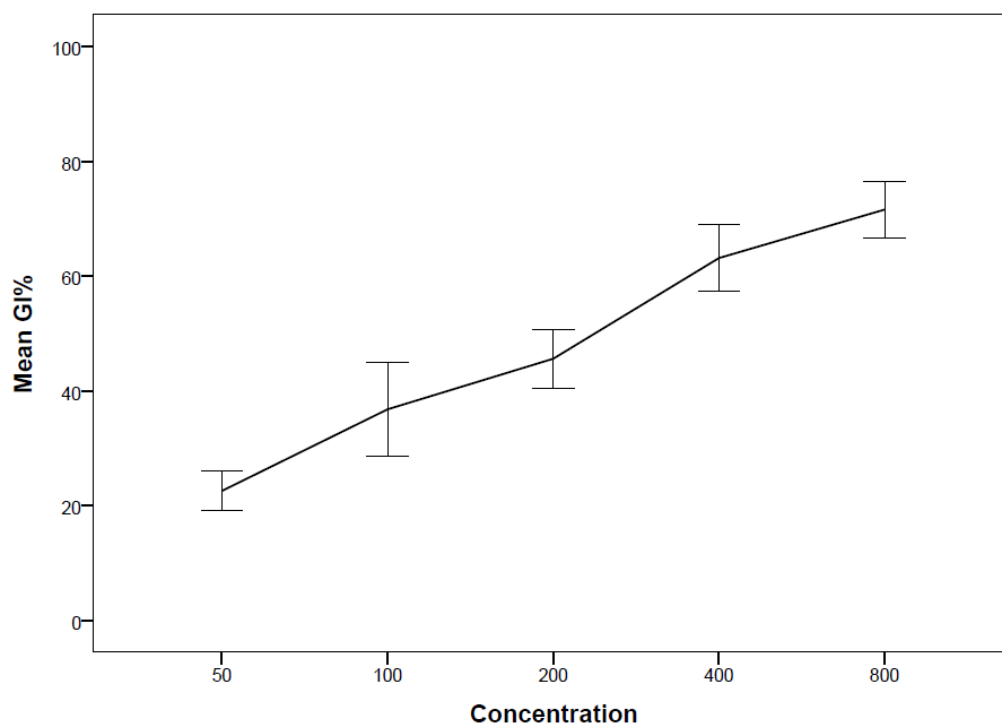
ردیف	رده سلولی	غلظت (میکروگرم در میلی لیتر)	فاز آپتوز زودرس (درصد) <sup>۱</sup>	فاز آپتوز تأخیری (درصد) <sup>۲</sup>	فاز نکروزی (درصد) <sup>۳</sup>
۱	MCF-7	۵۰۰	۱/۰۵	۳/۵۱	۷/۴۰
		۱۰۰	۲/۰۱	۴/۷۳	۱/۷۵
		۲۰	۰/۱۷	۰/۵۳	۱۷/۱۴
		۴	۰/۳۷	۰/۸۲	۱۸/۱۶
		۰/۸	۰/۳۰	۰/۴۶	۱۹/۷۶
رده سلولی سرطان پستان انسانی					
۲	BT-474	۵۰۰	۰/۱۷	۰/۱۴	۲۰/۳۴
		۱۰۰	۰/۳۰	۰/۲۵	۸/۳۹
		۲۰	۰/۲۰	۰/۱۵	۶/۴۸
		۴	۰/۲۳	۰/۲۶	۵/۷۹
		۰/۸	۰/۱۶	۰/۲۱	۵/۲۵
۳	PC-3	۵۰۰	۲/۶۸	۶/۷۸	۵۷/۷۳
		۱۰۰	۰/۰۶	۰/۰۹	۴/۸۲
		۲۰	۰/۰۳	۰/۰۸	۳/۳۴
		۴	۰/۰۱	۰/۱۳	۳/۳۵
		۰/۸	۰/۰۱	۰/۰۳	۰/۰۳
رده سلولی سرطان پروستات انسانی					
۴	Du-145	۵۰۰	۱/۷۷	۰/۰۵	۰/۰۷
		۱۰۰	۶/۱۶	۰/۲۰	۰/۰۰
		۲۰	۲۱/۴۳	۰/۰۰	۰/۰۰
		۴	۱۹/۱۱	۰/۰۰	۰/۰۰
		۰/۸	۱۶/۱۲	۰/۰۰	۰/۰۰

<sup>۱</sup> فاز آپتوز زودرس: مقادیر بالای Annexin V و مقادیر پایین PI

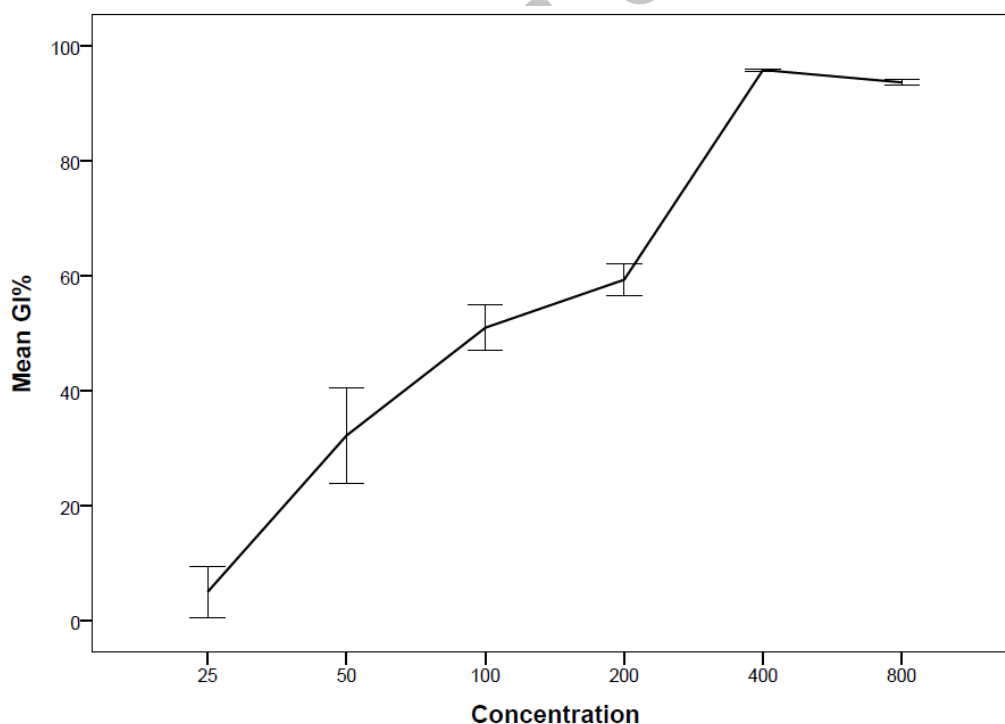
<sup>۲</sup> فاز آپتوز تأخیری: مقادیر بالای Annexin V و PI

<sup>۳</sup> فاز نکروزی: مقادیر پایین Annexin V و مقادیر بالای PI





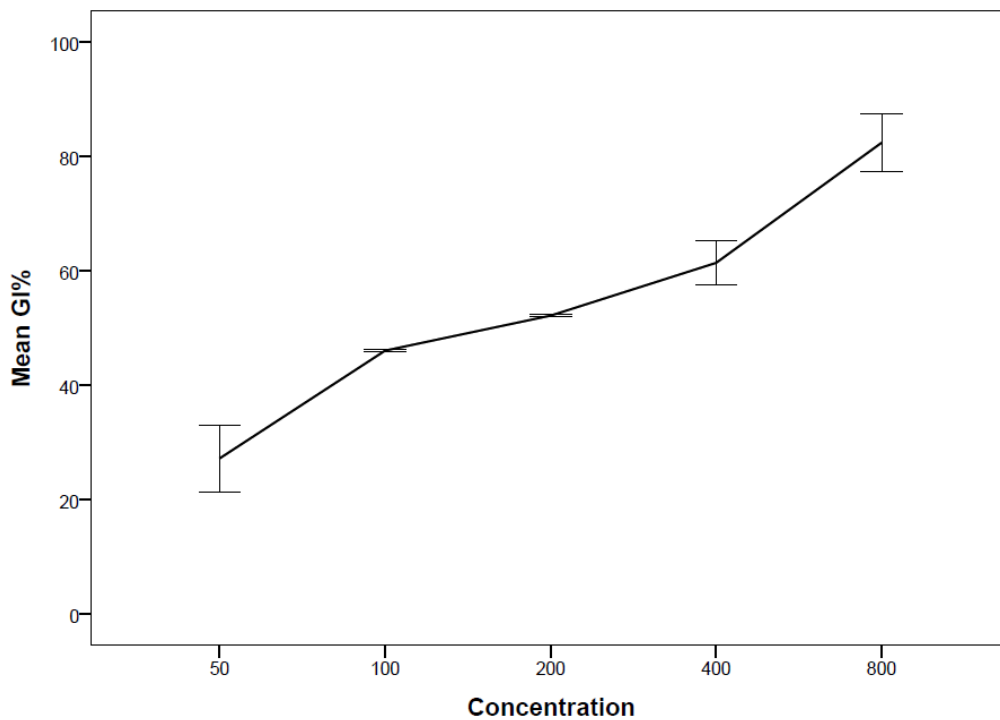
نمودار شماره ۱- نمودار درصد مهار رشد رده سلولی BT-474 در برابر غلظت‌های مختلف فراکسیون AC اسپرس درختی نقره‌ای برحسب میکروگرم در میلی‌لیتر



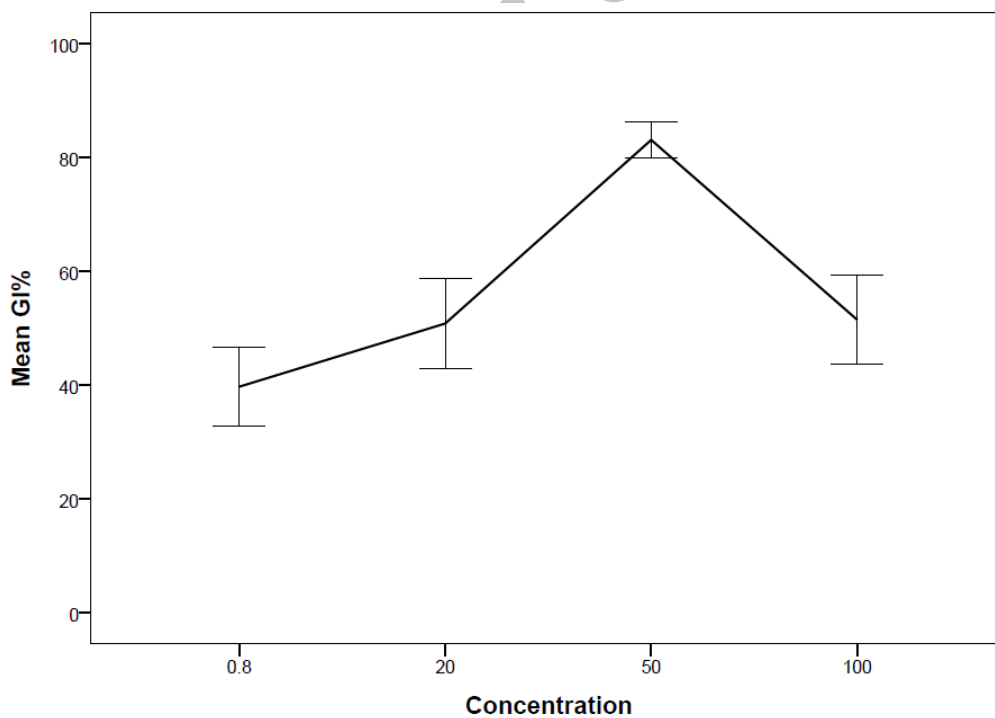
نمودار شماره ۲- نمودار درصد مهار رشد رده سلولی Du-145 در برابر غلظت‌های مختلف فراکسیون AC اسپرس درختی نقره‌ای برحسب میکروگرم در میلی‌لیتر







نمودار شماره ۳- نمودار درصد مهار رشد رده سلولی PC-3 در برابر غلظت‌های مختلف فراکسیون AC اسپرس درختی نقره‌ای بر حسب میکروگرم در میلی لیتر



نمودار شماره ۴- نمودار درصد مهار رشد رده سلولی MCF-7 در برابر غلظت‌های مختلف فراکسیون AC اسپرس درختی نقره‌ای بر حسب میکروگرم در میلی لیتر



## بحث

فراکسیون‌های این گیاه از خود نشان داد (جدول شماره ۲). کمترین  $IC_{50}$  در بین این چهار رده سلولی مربوط به رده سلولی سرطان پستان انسانی MCF-7 برابر با ۷۰/۶۹ میکروگرم در میلی‌لیتر در زمان خواندن نمونه ۴۸ ساعت بود. در زیر به مقایسه برخی از نتایجی که در تحقیقات سایر محققین بر روی گیاهان مختلف و رده‌های مختلف سرطانی حاصل شده است، می‌پردازیم.

در یک مطالعه اثرات سمیت سلولی عصاره‌های متانولی هفت گونه از جنس *Hedyotis* مورد بررسی قرار گرفت. این بررسی نشان داد که تمامی عصاره‌ها اثر سمیت سلولی متوسطی بر علیه رده سلولی CEM-SS با  $CD_{50}$  برابر ۲۱ تا ۴۱ میکروگرم در میلی‌لیتر داشتند [۲۴].

در یک تحقیق عصاره اتیل استاتی گیاه *Patrinia scabiosaefolia* بر روی رده‌های مختلف سلول‌های سرطانی به صورت برون‌تنی مورد آزمایش قرار گرفت. این رده‌ها عبارت بودند از کارسینومای پستان (MCF-7)، کارسینومای کبدی (HepG2)، ملانومای پوست (A375)، کارسینومای ریه (A549) و آدنوکارسینومای پروستات (PC-3). نتایج تست MTT نشان داد که  $IC_{50}$  MCF-7 برابر ۱۱۲/۳ میکروگرم در میلی‌لیتر (بیشترین پاسخ را به مهار رشد سلول و  $IC_{50}$  بیشترین مقاومت) برابر ۳۴۸/۷ میکروگرم در میلی‌لیتر) را از خود نشان دادند.  $IC_{50}$  های به دست آمده در این مطالعه به مراتب بالاتر از نتایج به دست آمده در تحقیق ما بود، که نشان‌دهنده کمتر بودن اثر سمیت سلولی این گیاه نسبت به اسپرس درختی نقره‌ای می‌باشد [۲۲].

اثرات ضدتوپلاسمی عصاره‌های گوناگون گیاه *Ximenia Americana L.* که در طب سنتی آفریقا برای درمان سرطان به کار می‌رود در محیط برون‌تنی در یک بررسی ارزیابی گردید. عصاره آبی که مؤثرترین عصاره بود بر روی رده سلولی سرطانی بررسی مجدد گردید و میانگین  $IC_{50}$  آن برابر ۴۹ میکروگرم پودر خام در یک میلی‌لیتر محیط کشت شد. حساسیت رده‌های سلولی در دامنه ۱/۷ میکرو در میلی‌لیتر در سلول سرطانی پستان MCF-7 تا ۱۷۰ میکروگرم در میلی‌لیتر در سلول‌های لوسمی میلوئیدی مزمن متغیر بود [۱].

بر اساس تخمین سازمان جهانی بهداشت، نزدیک به ۸۰ درصد جمعیت کشورهای در حال توسعه از درمان‌های سنتی که بیشتر آنها داروهای گیاهی هستند برای برطرف نمودن نیازهای اولیه مراقبت‌های بهداشتی خود استفاده می‌نمایند. طب سنتی به عنوان یکی از منابع طب مکمل در داروسازی جدید و فرآورده‌های بهداشتی به کار گرفته می‌شود. گیاهان دارویی برای تحقیقات فارماکولوژیکی و توسعه داروها هم به صورت استفاده مستقیم از ترکیبات گیاهی و هم به عنوان ترکیبات رهبر جهت سنتز داروها از اهمیت خاصی برخوردارند. چندین دهه است که فرآورده‌های طبیعی به عنوان منابع تهیه داروها و ترکیبات رهبر در نظر گرفته می‌شوند. ۷۸ درصد ترکیبات ضدباکتری و ۷۴ درصد ترکیبات ضدسرطان، فرآورده‌های طبیعی هستند و یا از آنها مشتق شده و یا الهام گرفته شده‌اند [۲۳].

گیاهان جنس اسپرس درختی عمدتاً حاوی ترکیبات ایزوفلاونوئیدی و ساپونینی می‌باشند [۱۲ - ۱۰]. همچنین در درمان درد معده [۱۴، ۱۳]، رهایی سریع از تب، ناراحتی و درد مؤثر بوده [۱۱]، ضدالتهاب، ضدتومور، ضد میکروب و محافظت‌کننده در برابر سمیت موتاژنی و سلولی [۱۵] می‌باشند.

## تست MTT

در مورد اسپرس درختی نقره‌ای اثر عصاره تام متانولی و ۵ فراکسیون پترولیوم‌اتری، کلروفرمی، اتیل‌استاتی، n- بوتانولی و باقیمانده آبی بر روی چهار رده سلولی، در چهار زمان مختلف (۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت) و در غلظت‌های گوناگون از ۸۰۰ تا ۰/۸ میکروگرم در میلی‌لیتر در ۸ تکرار مورد مطالعه قرار گرفت.

$IC_{50}$  عصاره تام متانولی در مورد رده‌های مختلف، بالا بوده به نحوی که کمترین  $IC_{50}$  در رده BT-474 مشاهده شده که برابر با ۲۵۹۵/۰۶ میکروگرم در میلی‌لیتر در زمان قرائت نمونه ۴۸ ساعت بوده است. در این بین فراکسیون کلروفرمی بیشترین اثر سمیت سلولی را با کمترین  $IC_{50}$  نسبت به سایر



سلول و متراکم شدن کروماتین بررسی شد. اثر سیتوتوکسیسته عصاره کلروفومی گیاه بیشتر از سایر عصاره‌ها بود [۲۸]. از مقایسه تحقیقات مختلف بر روی گیاهان و رده‌های سلولی مختلف سرطانی چنین برمی‌آید که حساسیت سلول‌های سرطانی نسبت به عصاره‌ها و ترکیبات گوناگون استخراج شده از گیاهان متفاوت می‌باشد و امکان دارد که یک گیاه بر روی یک رده سلولی سرطانی اثر سمیت سلولی داشته باشد و در عین حال بر روی یک رده دیگر بی‌اثر باشد که این مورد در مورد تحقیق ما نیز صدق دارد.

#### فلوسیتومتری

برای ارزیابی فلوسیتومتری فراکسیون‌هایی که در تست MTT بیشترین اثر سمیت سلولی را در رده‌های مختلف سرطانی داشتند، از دو معرف Annexin V که نشان‌دهنده آپوپتوز بوده و پروپیدیوم دیدید (PI) که نمایانگر نکروز می‌باشد، استفاده شد. فراکسیون AC (کلروفومی) گیاه اسپرس درختی نقره‌ای در این تست مورد ارزیابی قرار گرفت. با توجه به نمودارهای ترکیبی حاصله از فلوسیتومتری پس از افزودن این دو معرف، سلول‌ها به چهار جمعیت تقسیم‌بندی شدند. در بخش‌هایی از نمودار که سلول‌ها مقادیر کمی از دو معرف را جذب کرده بودند سلول‌ها زنده (Viable) بودند. در جمعیت‌های سلولی که مقدار Annexin V جذب شده بالا، اما مقادیر PI کم بود سلول‌ها در فاز آپوپتوز زودرس (Early Apoptotic Stage) قرار داشتند. در سلول‌هایی که مقادیر جذب شده دو معرف بالا بود، سلول‌ها در فاز آپوپتوز تاخیری (Late Apoptotic Stage) قرار داشتند و مقادیر پایین Annexin V و بالای PI در سلول‌ها، نمایانگر از دست رفتن غشای سلولی و فاز نکروزی (Necrotic Stage) بود.

مرگ سلولی به دو دسته مجزای آپوپتوز و نکروز تقسیم‌بندی می‌شود. آپوپتوز مترادف عبارت «مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده» می‌باشد و مکانیسمی داخل سلولی برای خودکشی می‌باشد که به وسیله مسیرهای سیگنال‌دهنده سلولی گوناگونی تنظیم می‌شود. سلول‌هایی که دچار آپوپتوز می‌شوند توسط فاگوسیت‌ها شناسایی شده و بلعیده می‌شوند و بنابراین

در یک مطالعه اثر عصاره متانولی و فراکسیون‌های گیاه سلولی سرطان پستان انسانی SKBR3 و MDA-MB435 از خانواده پیچک بر روی رده‌های مورد بررسی قرار گرفت. مقدار ED<sub>50</sub> (۵۰ درصد مهار رشد سلول‌های سرطانی) فراکسیون شماره ۳ عصاره متانولی بر روی این رده‌ها به ترتیب برابر ۵۶/۰۷ و ۳۰/۶۱ میکروگرم در میلی‌لیتر بود. این فراکسیون بعد از ۴۸ ساعت در غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر باعث کاهش معنی‌دار تکثیر سلولی این دو رده سلولی شد [۲۵].

در یک تحقیق اثرات ضدتوموری xanthohumol (XN) در برنیل ایزوفلانونوئید اصلی گیاه رازک (*Humulus lupulus L.*) بر روی سرطان پروستات و هیپریلازی خوش‌خیم پروستات بررسی شد. رده‌های سلولی BPH-1 و PC3 به ترتیب برای هیپریلازی غیرسرطانی و سرطان بدخیم پروستات استفاده شدند. XN و محصول اکسیداسیون آن (XAL)، زیست‌پذیری هر دو رده سلولی را به صورت وابسته به دوز (۲/۵ تا ۲۰ میکرومول) کاهش دادند که با روش MTT تعیین شد و باعث افزایش تشکیل سلول‌های آپوپتوتیک زودرس و دیررس شدند که به روش رنگ‌آمیزی Annexin V و روش multicaspase بررسی شد. همچنین تغییراتی در چرخه سلولی هر دو رده القاء نمودند [۲۶].

در مطالعه‌ای اثر سمیت سلولی عصاره متانولی ۲۰ گیاه دارویی استفاده شده توسط درمانگران سنتی ایران برای درمان عفونت‌های باکتریایی و قارچی، زگیل و سایر بیماری‌ها به صورت برون‌تنی بر رده سلولی اپی‌تلیوم پستان انسان MCF-7 بررسی شد. اثرات انکوباسیون ۷۲ ساعته با غلظت‌های متفاوت عصاره‌ها بررسی شد. نتایج حاصل از تست MTT نشان داد که دو گیاه از گیاهان مورد بررسی دارای اثرات سمیت سلولی (IC<sub>50</sub> کمتر از ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) می‌باشند [۲۷].

در یک تحقیق اثر ضدسرطانی غلظت‌های مختلف عصاره‌های گیاه *Gmelina asiatica* بر روی رده سلولی سرطان پستان انسانی MCF-7 مورد بررسی قرار گرفت. القای آپوپتوز توسط عصاره‌های این گیاه در این رده سلولی با استفاده از روش تکثیر سلولی MTT، تغییرات ریخت‌شناسی



می تواند ناشی از نکروز باشد بلکه می تواند ناشی از آپوپتوز و یا مرگ سلولی اتوفازیک نیز باشد [۳۰].

ظرفیت فلوسیتومتری برای آنالیز سریع و منحصر به فرد تعداد زیادی سلول، آن را برای مطالعات مرگ سلولی ایده آل می نماید. چندین روش فلوسیتومتری در دسترس می باشد که با استفاده از تغییر در DNA، خواص تفرق نوری یا غشای سطحی، مرگ سلولی را تشخیص می دهند. یکی از این روش ها که ترکیبی از رنگ آمیزی با Annexin V و PI (پروپیدیوم دیدید) می باشد برای افتراق سلول ها در فازهای آپوپتوز زودرس از فاز آپوپتوز تاخیری و فاز نکروزی استفاده می شوند که بر پایه تعیین جابه جایی فسفاتیدیل سرین از لایه داخلی غشای پلاسمایی به لایه خارجی آن در فاز آپوپتوز زودرس بوسیله رنگ آمیزی با Annexin V می باشد [۳۱].

در رده سلولی سرطان پستان انسانی MCF-7 فراکسیون کلروفومی اسپرس درختی نقره ای با غلظت ۰/۸ میکروگرم در میلی لیتر باعث ایجاد ۱۹/۷۶ درصد نکروز شد. در رده سلولی سرطان پستان انسانی BT-474، فراکسیون کلروفومی اسپرس درختی نقره ای با غلظت ۵۰۰ میکروگرم در میلی لیتر باعث ایجاد ۲۰/۳۴ درصد نکروز شد.

رده سلولی سرطان پروستات انسانی PC-3 بیشترین حساسیت را در بین چهار رده سلولی مورد آزمایش نسبت به فراکسیون های افزوده شده در تست فلوسیتومتری از خود نشان داد. فراکسیون AC با غلظت ۵۰۰ میکروگرم در میلی لیتر باعث ایجاد ۵۷/۷۳ درصد نکروز شد.

در رده سلولی سرطان پروستات انسانی Du-145 مکانیسم سمیت سلولی اندکی با سایر رده ها متفاوت بوده و فراکسیون AC با القای آپوپتوز باعث ایجاد سمیت سلولی شد. فراکسیون AC با غلظت ۲۰ میکروگرم در میلی لیتر باعث القای ۲۱/۴۳ درصد آپوپتوز گردیدند.

در ادامه به مقایسه برخی از تحقیقاتی که برای پی بردن به مکانیسم مرگ سلولی از روش فلوسیتومتری استفاده نموده اند، می پردازیم.

در یک مطالعه اثر مهار جوشانده دانه های سیاه دانه (*Nigella sativa* L.)، ریشه گیاه *Hemidesmus indicus* و

نکته قابل توجه در آپوپتوز، غیاب التهاب در اطراف سلول های در حال مرگ می باشد. خصوصیات مورفولوژیکی آپوپتوز از فعال سازی caspase (پروتنازهای سیستئین) یا بوسیله لیگاندپوشی گیرنده مرگ و یا آزادسازی واسطه های آپوپتوز از میتوکندری منتج می شود. مرگ ناشی از آپوپتوز نیاز به انرژی در شکل ATP دارد [۲۹].

بررسی ها نشان داده اند که داروهای شیمی درمانی شامل ایتوپوزید، کامپوتوسین، وین کریستین، سیس-پلاتین، سیکلوفسفامید، تاکسول، ۵-فلوئورو اوراسیل و دوکسوروبین باعث القای آپوپتوز در سلول های سرطانی می شوند. آپوپتوز توانایی یک سلول در القای خودتخریبی بوسیله فعال سازی برنامه داخلی خودکشی سلولی هنگامی که دیگر نیازی به سلول ها نیست یا سلول ها به طور جدی آسیب دیده اند، می باشد. شواهدی که طی چند سال اخیر به دست آمده اند حاکی از این هستند که تعداد زیادی از داروهای شیمی درمانی سرطان، سلول های سرطانی را در محیط درون تنی و برون تنی به وسیله راه انداختن مکانیسم های آپوپتوز از بین می برند. از نظر مورفولوژیکی، آپوپتوز بوسیله حباب دار شدن ظاهر غشاء، چروکیدگی سلول، متراکم شدن کروماتین، شکافتگی DNA و قطعه قطعه شدن سلول به اجساد مرده غشاء دار مشخص می شود [۲۸].

در برابر آپوپتوز، نکروز شکل غیرفعال مرگ سلولی است که شبیه متلاشی شدن است تا خودکشی. نکروز نتیجه نهایی فاجعه بیوانرژییک تخلیه ATP به سطحی از ناسازگاری با بقای سلولی است که معمولاً با حوادث سلولی مثل آسیب های سمی یا فیزیکی آغاز می شود. نکروز از نظر مورفولوژیکی با ایجاد واکونل در سیتوپلاسم و شکسته شدن غشای پلاسمایی و ایجاد التهاب در اطراف سلول در حال مرگ ناشی از آزادسازی محتوای سلول و مولکول های پیش التهابی، شناسایی می شود [۲۹].

رایج ترین روش برون تنی برای اندازه گیری نکروز، نفوذپذیری غشای پلاسمایی سلول به رنگ های حیاتی (مثل تربیان بلو یا پروپیدیوم دیدید) و انتشار آنزیم های سیتوزولی (لاکتات دهیدروژناز و کراتین کیناز) می باشد. احیای نمک های تترازولیم (مانند روش MTT) نیز اغلب به کار می رود. اما اندازه گیری فعالیت میتوکندری سلول ترجیح دارد زیرا نه تنها



پلی ساکارید پیش از درمان با کامپوتوسین می‌تواند باعث افزایش پاسخ درمانی و القای آپوپتوز در سلول‌های HL-60 لوسمی انسانی شود. در این مطالعه از آنالیز فلوسیتومتری Annexin V/PI برای تعیین مقدار کیفی سلول‌های زنده، نکروزی و آپوپتوزی استفاده شد [۳۳].

به این ترتیب مشاهده می‌شود که یکی از روش‌های تعیین مکانیسم مرگ سلولی استفاده از فلوسیتومتری و رنگ‌آمیزی با ترکیبات مختلفی نظیر Annexin V و PI (پروپیدیوم دید) می‌باشد، که باعث افتراق فازهای زودرس و تاخیری آپوپتوز از نکروز جهت از بین بردن سلول‌های سرطانی می‌باشد.

### نتیجه‌گیری

به عنوان یک نتیجه‌گیری کلی، از بین فراکسیون‌های مورد آزمایش گیاه اسپرس درختی نقره‌ای، فراکسیون کلروفومی آن، در تست MTT بیشترین اثر سمیت را داشت و کمترین IC<sub>50</sub> آن در بین این چهار رده سلولی مربوط به رده سلولی سرطان پستان انسانی MCF-7 برابر با ۷۰/۶۹ میکروگرم در میلی‌لیتر در زمان خواندن نمونه ۴۸ ساعت بود. در تست فلوسیتومتری این فراکسیون در سه رده سلولی MCF-7، BT-474 و PC-3 اثر القای نکروز بیشتری نسبت به آپوپتوز از خود نشان داد که بیشترین درصد نکروز (۵۷/۷۳ درصد) مربوط به غلظت ۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر آن در رده سلولی سرطان پروستات انسانی PC-3 بود و در رده Du-145 با غلظت ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر باعث القای ۲۱/۴۳ درصد آپوپتوز شد.

در مجموع با توجه به اثرات سمیت سلولی این گیاه بر روی رده‌های سلولی سرطان انسانی می‌توان این گیاه را در مطالعات گیاهان ضدسرطان ارزشمند دانست و لذا بررسی‌های جامع‌تری جهت شناخت ترکیبات مؤثره این گیاه و شناخت مکانیسم‌های دخیل در اثر سمیت سلولی آن مورد نیاز می‌باشد.

ریزوم *Smilax glabra* در سرطان‌زایی شیمیایی در موش‌های صحرایی بر روی رده سلولی HepG2 هپاتوما انسانی آزمایش شد. اثر انکوباسیون ۲۴ ساعته غلظت‌های مختلف (صفر تا ۵۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) عصاره‌ها بر روی این رده تعیین شد. نتایج تست MTT و SRB، جذب [14C]-leucine و [3H]-thymidine اثبات نمود که این جوشانده اثر سمیت سلولی وابسته به دوز قوی دارد. اثرات مهار قوی‌تر در سنتز DNA توسط جوشانده و عصاره سیاه‌دانه به تنهایی حتی در غلظت‌های پایین (۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) مشاهده شد. آنالیز فلوسیتومتری با رنگ‌آمیزی Annexin V و پروپیدیوم دید بعد از ۲۴ ساعت نشان داد که سلول‌ها تحت تأثیر جوشانده در فاز آپوپتوز تاخیری و یا نکروز بودند [۶].

در یک تحقیق عصاره اتیل استاتی گیاه *Patrinia scabiosaefolia* بر روی رده‌های مختلف سلول‌های سرطانی به صورت برون‌تنی مورد آزمایش قرار گرفت. این رده‌ها عبارت بودند از کارسینوما پستان (MCF-7)، کارسینوما کبدی (HepG2)، ملانوما پوست (A375)، کارسینوما ریه (A549) و آدنوکارسینوما پروستات (PC-3). فلوسیتومتری DNA، القای آپوپتوز را در سلول‌های MCF-7 مقاوم به وسیله ۱۴/۵ برابر سطح کنترل توسط عصاره گیاه بعد از ۳۶ ساعت تماس اثبات نمود [۲۲].

در یک بررسی نشان داده شد که آندروگرافولید (AGP) ترکیب فیتوشیمیایی اصلی جداشده از گیاه *Andrographis paniculata* اثر مهار رشد و سمیت سلولی بر رده‌های سلولی سرطان پروستات غیروابسته به هورمون (DU-145 و PC-3) و وابسته به هورمون (LNCaP) با روش بررسی MTT دارند. این گیاه اثر سمیت سلولی قوی‌تر و انتخابی‌تر بر روی رده PC-3 داشت و آنالیز فلوسیتومتری برای بررسی چرخه سلولی این رده تحت درمان با گیاه مورد استفاده قرار گرفت. فلوسیتومتری القای آپوپتوز را جهت از بین بردن سلول‌های سرطانی PC-3 نشان داد [۳۲].

مطالعه‌ای بر روی پلی‌ساکاروپپتید (PSP) حاصل از *Coriolus versicolor* نشان داد که استفاده از این



حمایت مالی این طرح پژوهشی (کد: ۳۳ - ۱۴۰۹) تقبل نمودند، قدردانی می‌شود.

## تشکر و قدردانی

بدینوسیله از معاونت پژوهش و فناوری جهاددانشگاهی که

## منابع

1. Voss C, Eyol E and Berger MR. Identification of potent anticancer activity in *Ximenia americana* aqueous extracts used by African traditional medicine. *Toxicol. Appl. Pharm.* 2006; 211: 177 - 87.
2. Roberge M, Cinel B, Anderson HJ, Lim L, Jiang X, Xu L, Bigg CM, Kelly MT and Andersen RJ. Cell-based screen for antimetabolic agents and identification of analogues of rhizoxin, eleutherobin, and paclitaxel in natural extracts. *Cancer Res.* 2000; 60: 5052 - 8.
3. Huerta S, Arteaga JR, Irwin RW, Ikezoe T, Heber D and Koeffler HP. PC-SPES inhibits colon cancer growth *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Res.* 2002; 62: 5204 - 9.
4. Zhang DY, Wu J, Ye F, Xue L, Jiang S, Yi J, Zhang W, Wei H, Sung M, Wang W and Li X. Inhibition of cancer cell proliferation and prostaglandin E2 synthesis by *Scutellaria baicalensis*. *Cancer Res.* 2003; 63: 4037 - 43.
5. Kang JX, Liu J, Wang J, He C and Li FP. The extract of huanglian, a medicinal herb, induces cell growth arrest and apoptosis by upregulation of interferon- $\beta$  and TNF- $\alpha$  in human breast cancer cells. *Carcinogenesis* 2005; 26 (11): 1934 - 9.
6. Thabrew MI, Mitry RR, Morsy MA and Hughes RD. Cytotoxic effects of a decoction of *Nigella sativa*, *Hemidesmus indicus* and *Smilax glabra* on human hepatoma HepG2 cells. *Life Sci.* 2005; 77: 1319 - 30.
7. Won HJ, Han CH, Kim YH, Kwon HJ, Kim BW, Choi JS and Kim KH. Induction of apoptosis in human acute leukemia Jurkat T cells by *Albizia julibrissin* extract is mediated via mitochondria-dependent caspase-3 activation. *J. Ethnopharmacol.* 2006; 106: 383 - 9.
8. Taghavi A, Fazeli Z, Vahedi M, Baghestani AR, Pourhoseingholi A, Barzegar F and Pourhoseingholi MA. Increased trend of breast cancer mortality in Iran. *APJCP* 2012; 13: 367 - 70.
9. Islamic Republic of Iran, Ministry of Health and Medical Education, Office of Deputy, Center for Diseases Control, Cancer office. Iranian Annual National Cancer Registration Report. 2009.
10. Hassanean HA. Saikosaponins from *Taverniera aegyptiaca*. *Phytochem.* 1998; 48 (4): 693 - 7.
11. Abegaz BM, Ngadjui BT, Bezabih M and Mdee LK. Novel natural products from marketed plants of eastern and southern Africa. *Pure Appl. Chem.* 1999; 71 (6): 919 - 26.
12. Ibraheim ZZ, Hassanean HA and Bishay DW. Further saponins from *Taverniera aegyptiaca*. *Phytochem.* 2003; 62: 1201 - 5.
13. Noamesi BK, Bogale M and Dagne E. Intestinal smooth muscle spasmolytic actions of the aqueous extract of the roots of *Taverniera abyssinica*. *J. Ethnopharmacol.* 1990; 30 (1): 107 - 13.
14. Gedif T and Hahn HJ. The use of medicinal plants in self-care in rural central Ethiopia. *J. Ethnopharmacol.* 2003; 87: 155 - 61.
15. Zore GB, Winston UB, Surwase BS, Meshram NS, Sangle VD, Kulkarni SS and Karuppayil SM. Chemoprofile and bioactivities of *Taverniera cuneifolia* (Roth) Arn.: A wild relative and possible substitute of *Glycyrrhiza glabra* L. *Phytomedicine* 2008; 15 (4): 292 - 300.



16. Mozaffarian V. A dictionary of Iranian plant names: Latin - English - Persian. 4<sup>th</sup> Ed. Farhang Moaser. Tehran. 2006, p: 539.
17. Ghahreman A. Flora of Iran. Research Institute of Forests and Rangelands. Tehran. 1984, vol: 4, p: 491.
18. Khalighi-Sigaroodi F, Hadjiakhoondi A, Ahvazi M, Taghizadeh M, Yazdani D, Khalighi-Sigaroodi Sh and Bidel S. Cytotoxicity and antioxidant activity of 23 plant species of Leguminosae family. *IJPR* 2012; 11 (1): 295 - 302.
19. Khalighi-Sigaroodi F, Hadjiakhoondi A, Ahvazi M, Taghizadeh M, Yazdani D and Khalighi-Sigaroodi Sh. Cytotoxicity evaluation of two species from *Caesalpinia* genus. *J. Medicinal Plants* 2008; 7 (25): 60 - 70.
20. Khalighi-Sigaroodi F, Ahvazi M, Yazdani D, Kashefi M. Cytotoxicity and antioxidant activity of five plant species of Solanaceae family from Iran. *J. Medicinal Plants* 2012; 11 (43): 41 - 53.
21. Ozkan G, Sagdic O, Ekici L, Ozturk I and Ozcan MM. Phenolic compounds of *Origanum sipyleum* L. extract, and its antioxidant and antibacterial activities. *J. Food Lipids* 2007; 14: 157 - 69.
22. Chiu LCM, Ho TS, Wong EYL and Ooi VEC. Ethyl acetate extract of *Patrinia scabiosaefolia* downregulates anti-apoptotic Bcl-2/Bcl-XL expression, and induces apoptosis in human breast carcinoma MCF-7 cells independent of caspase-9 activation. *J. Ethnopharmacol.* 2006; 105: 263 - 8.
23. Yang H, Zheng S, Meijer L, Li SM, Leclerc S, Yu LL, Cheng JQ and Zhang SZ. Screening the active constituents of Chinese medicinal herbs as potent inhibitors of Cdc25 tyrosine phosphatase, an activator of the mitosis-inducing p34cdc2 kinase. *J. Zhejiang Univ-Sc. B.* 2005; 6 (7): 656 - 63.
24. Ahmad R, Ali AM, Israf DA, Ismail NH, Shaari K and Lajis NH. Antioxidant, radical-scavenging, anti-inflammatory, cytotoxic and antibacterial activities of methanolic extracts of some *Hedyotis species* *Life Sci.* 2005; 76: 1953 - 64.
25. Kummalue T, O-charoenrat P, Jiratchariyakul W, Chanchai M, Pattanapanyasat K, Sukapirom K and Iemsri S. Antiproliferative effect of *Erycibe elliptilimba* on human breast cancer cell lines. *J. Ethnopharmacol.* 2007; 110 (3): 439 - 43.
26. Colgate EC, Miranda CL, Stevens JF, Bray TM and Ho E. Xanthohumol, a prenylflavonoid derived from hops induces apoptosis and inhibits NF-kappaB activation in prostate epithelial cells. *Cancer Lett.* 2007; 246: 201 - 9.
27. Sahranavard S, Naghibi F, Mosaddegh M, Davari E, Cheah YH and Noor RA. Cytotoxic activity of some medicinal plants from Iran. *Ethno-Med.* 2009; 3 (1): 81 - 2.
28. Merlin NJ, Parthasarathy V and Santhoshkumar T.R. Induction of apoptosis in human breast cancer cell line MCF-7 by phytochemicals from *Gmelina asiatica*. *AJB* 2010; 9 (28): 4451 - 6.
29. Edinger AL and Thompson CB. Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2004; 16: 663 - 9.
30. Proskuryakov SY and Gabai VL. Mechanisms of Tumor Cell Necrosis. *Curr. Pharm. Design* 2010; 16: 56 - 68.
31. Bertho AL, Santiago MA and Coutinho SG. Flow cytometry in the study of cell death. *Mem. I. Oswaldo Cruz* 2000; 95 (3): 429 - 33.
32. Wong HC, Sagineedu SR, Lajis NH, Loke SC and Stanslas J. Andrographolide induces cell cycle arrest and apoptosis in PC-3 prostate cancer cells. *Afr. J. Pharm. Pharmacol.* 2011; 5 (2): 225 - 33.
33. Wan JMF, Sit WH, Yang W, Jiang P and Wong LLY. Polysaccharopeptides derived from *Coriolus versicolor* potentiate the S-phase specific cytotoxicity of Camptothecin (CPT) on human leukemia HL-60 cells. *CM* 2010; 5: 16.

