Archive of SID

بررسی اثر سیتوتاکسیسیتی عصاره گیاهی هندوانه ابوجهل بر رده‌های سلولی Hep2 و L929

دکتر جلیل توکل افشاری[۱*]، دکتر حسن رخشنده[۲]، دکتر علیرضا زمانی[۳]، دکتر ناصر مهدوی شهری[۴]، لیلا قاضی‌زاده[۱]، معصومه نوروزی[۱]، فاطمه واحدی[۵]

۱- بخش ایمونوژنتیک و کشت سلولی، مرکز تحقیقات ایمونولوژی، پژوهشکده بوعلی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد ۲- گروه فیزیولوژی و فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد ۳- گروه میکروبیولوژی و ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان ۴- گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی ۵- موسسه سرم‌سازی رازی، مشهد

Title: *Cytotoxicity effects of Citrullus colocynthis on Hep2 and L929 cell lines.*

Authors: *Tavakkol Afshari J,(PhD); Rakhshandeh H,(Pharm D); Zamani AR,(PhD); Mahdavi Shahri N, (PhD); Ghazezadeh L,(BSc); Norozi M,(BSc); Vahedi F,(MSc).*

Introduction: *In this study, we investigated in vitro anti-tumoral effects of whole extract from bitter melon on human caucasian larynx carcinoma cell line (Hep2) and normal mouse fibroblast cell line (L929) by MTT assay.*

Methods: *Hep2 and L929 cell lines were maintained in RPMI-1640 culture medium. Bitter melon extract was prepared by 75% ethanol. The number of $5x10^4$ cell/ml were incubated in the presence or absence of the different concentrations (100, 50, 25, 2.5, 0.25, 0.025µg/ml) of bitter melon extract into 6 well tissue culture plates. The plant extract cytotoxicity screening was performed by using 3-(4,5-dimethyl thiazol-2y1)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) colorimetric assay. Inhibitory concentration at 50% (IC50) was determined by plotting of the extract concentration against the optical density (OD) at 570nm from MTT assay.*

Results: *There was a dose dependent cytotoxicity effect on Hep2 cells. At the highest concentration (100µg/ml), the plant extract completely inhibited the growth of cells and these effects gradually decreased as the dose reduced. After 48 hours incubation of the Hep2 cells at concentration of 100 µg/ml with the extract, viability of the cells were only 26% in compare to the L929 control cells. IC50 for Hep2 cell line was 27µg/ml. The plant extract showed no effect on L929 cell viability and characteristics.*

Conclusion: *From this study it can be suggested that whole extract from bitter melon has a dose dependent cytotoxicity effect on Hep2 cell line. Therefore, this compound may be used for inhibition of the growth of cancer cells such as human larynx carcinoma.*

Keywords: *Citrullus colocynthis, MTT, cytotoxicity, Hep2, L929.*

Hakim 2005; 8(2); 47-54.

*- نویسنده مسؤول: مشهد، بخش ایمونوژنتیک و کشت سلولی مرکز تحقیقات ایمونولوژی، پژوهشکده بوعلی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد. تلفن: ۰۵۱۱-۷۱۱۲۴۷۱
فاکس: ۰۵۱۱-۷۱۱۲۵۹۶ E-mail: Jtavakkol@yahoo.com

www.SID.ir

Archive of SID

چکیده:

مقدمه: *در این تحقیق اثر سیتوتاکسیسیتی عصارهٔ الکلی گیاه هنداونه ابوجهل[1] بصورت in vitro با استفاده از تست* MTT[2] *مورد ارزیابی قرار گرفت و اثر مهار کنندگی[3] آن برروی دو ردهٔ سلولی سرطان حنجره[4] و فیبروبلاست نرمال موشی* L929 *مورد ارزیابی قرار گرفت. همچنین تغییرات مرفولوژی رده‌های سلولی در مجاورت عصاره نیز ارزیابی و ثبت گردید.*

روش‌کار: *تعداد* ۵×۱۰^{۴} cell/ml *از سلول‌های* Hep2 *و* L929 *را در پلیت‌های ۶ خانه کشت سلولی به همراه و یا بدون عصارهٔ گیاهی هندوانه ابوجهل کشت شد. عصاره‌گیری به روش سوکسله و با استفاده از حلال اتانل ۷۰٪ انجام شد و با غلظت‌های (۰/۰۲۵، ۰/۲۵، ۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ µg/ml) به سلول‌های* Hep2 *و* L929 *اضافه شد. تغییرات مرفولوژی سلول‌ها پس از ۱۲ الی ۷۲ ساعت مورد ارزیابی قرار گرفتند. اثر سیتوتاکسیسیتی عصاره هنداونه ابوجهل با استفاده از تست* MTT *در in vitro مورد سنجش قرار گرفته و درصد* IC50 *تعیین گردید.*

نتایج: *نتایج بدست آمده برای رده سلولی* Hep2 *نشان می‌دهد که در بالاترین غلظت* (۱۰۰µg/ml) *عصاره گیاهی، رشد سلول‌ها کاملاً مهار شده اند. این اثر با کاهش غلظت‌های عصاره* (۰/۰۲۵ µg/ml، ۰/۲۵، ۲/۵، ۲۵، ۵۰) *کمتر می شود.* IC50 *برای ردهٔ سلولی* Hep2 ۲۷ µg/ml *بدست آمد. نتایج مرفولوژی و پرولیفراسیون سلولی عصارهٔ هندوانه ابوجهل بر ردهٔ سلولی نرمال موشی* L929 *هیچگونه تأثیر سیتوتاکسیک را نشان نداد.*

نتیجه‌گیری: *این نتایج نشان می‌دهد که اثر سیتوتاکسیسیتی عصارهٔ گیاهی هنداونه ابوجهل بر ردهٔ سلولی* Hep2 *وابسته به غلظت[5] می‌باشد. عصارهٔ تام این گیاه ممکن است برای مهار رشد و از بین بردن برخی از سلول‌های سرطانی نظیر سرطان حنجره بکار رود.*

گل‌واژگان: *سیتوتوکسیسیتی، هندوانه ابوجهل،* Hep2، L929.

مقدمه:

معالجه و درمان بیماری‌ها با گیاهان دارویی از دیرباز معمول بوده است. گیاهان همیشه بعنوان یکی از منابع مهم دارویی بوده‌اند، زیرا که منابع طبیعی آنها معمولاً فراوان، سالم و مهم می‌باشند. با پیشرفت علم، صنعت و فناوری داروسازی، کاربرد وسیع آنها در درمان بیماری‌ها، موجب بروز مشکلاتی مانند اثرات جانبی که در بعضی موارد خطرناکتر از نوع بیماری بوده می‌شوند (۱). گیاهان دارویی خواص گوناگونی منجمله خواص ضد سرطانی دارند. «هندوانه ابوجهل» و یا «خربزه روباه» که در کتب طب سنتی با نام‌های «حنظل» و «مراره الصحاری» و «علقم» نام برده شده است، یکی از گیاهان دارویی متعلق به خانواده (خیارها و کدوها)[6] می‌باشد. این گیاه بومی ایران بوده و در نواحی جنوبی کشور و مناطقی همچون جنوب استان خراسان یافت می‌شود. میوه این گیاه دارای گلوکوزید قابل تبلوری با طعم بسیار تلخ به نام کولوسنتین[1] است. این گلیکوزید به حالت متبلور و خالص به رنگ زرد می‌باشد. در آب به نسبت ۱/۲۰ حل می شود و اگر هیدرولیز گردد، گلوکز و ماده‌ای به نام کولوسنتتین[2] می‌دهد. میوه این گیاه علاوه بر موارد مذکور دارای کولوسنتی لین[3]، سیترولین[4]، ماده روغنی (۱۷-۱۰ درصد در دانه)، مواد صمغی و املاح مختلف است. ریشهٔ آن دارای مواد آلفا-آلاترین[5]، هنتریاکونتان[6] و چند ساپونین می‌باشد. میوه این گیاه دارای خاصیت مسهلی قوی با اثر قاطع است. در موارد ضعف اعمال روده، فلج امعاء و احشاء، آب آوردن انساج، انسداد و بیماری‌های کبدی و گاهی به عنوان قاعده آور بکار می‌رود. از

[1]- Citrullus colocynthis
[2]- Inhibitory concentration at 50%-IC_{50}
[3]- Human caucasian larynx carcinoma cell line-(Hep2)
[4]- 3-(4,5-dimethyl thiazol-2y1)-2,5-diphenyl tetrazolium btomide
[5]- dose dependent
[6]- *Cucurbitaceous*

[1]- Colocynthine C5IH54O23
[2]- Colocynthine C5HI4Oi3
[3]- Colocynthine
[4]- Citrulline
[5]- α-elatrin
[6]- Hentriacotane

www.SID.ir

Archive of SID

خواص مهم دیگر این دارو، اثر ضد ویروسی، میکروبی و سرطانی آن است (۲ و ۳). هدف از این تحقیق بررسی اثر مهاری عصارهٔ این گیاه بر روی ردهٔ سلول سرطان حنجره[1] می‌باشد. همچنین به منظور بررسی اثر سیتوتاکسیسیتی عصارهٔ این گیاه بر سلول‌های نرمال، از ردهٔ سلولی فیبروبلاست موشی (L929) استفاده شد.

روش کار:

تهیه و آماده‌سازی عصارهٔ گیاه

عصاره‌گیری مواد مؤثره موجود در میوه گیاه هندوانه ابوجهل توسط حلال‌های مختلف انجام شد و به دلیل حل شدن بهتر این عصاره در الکل، اتانل ۷۰٪ مورد استفاده قرار گرفت. روش بکار گرفته شده، عصاره‌گیری به روش سوکسله بود. به طور خلاصه در این روش ۵۰ گرم پودر بدست آمده از آسیاب میوه هندوانه ابوجهل و ۴۰۰ سی سی اتانل ۷۰٪ مخلوط شده و سپس به وسیله دستگاه دوار تقطیر در خلأ به دست آمد. این عمل در حدود ۲۴ ساعت به طول انجامید. بعد از عصاره‌گیری عمل حذف حلال با استفاده از دستگاه Rota Vapor انجام گرفت که با پمپ خلاء در فشار کم عمل تبخیر را انجام می‌دهد تا عصاره نسوزد. طی این عمل، حلال تبخیر شده و عصاره غلیظ باقی می‌ماند. عصاره تهیه شده با استفاده از کیسه دیالیز و PEG 20000[2] تغلیظ و سپس از فیلتر µM ۰/۲ عبور داده شده و غلظت پروتئینی عصاره توسط اسپکتروفتومتر در طول موج ۲۸۰nm اندازه‌گیری شد و برای مطالعات بعدی مورد استفاده قرار گرفت.

کشت سلول‌های Hep2 و L929 و ارزیابی مرفولوژی سلولی

ابتدا سلول‌های Hep2 و L929 (تهیه شده از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران، تهران) را در فلاسک‌های کشت سلولی ۲۵ سی‌سی (Nunc, Denmark) در محیط RPMI-1640 همراه با 10% FCS، 2mM L-glutamine، 100IU/ml penicillin، 100µg/ml streptomycin، 12.5mM HEPES (Gibco BRL, Scotland) و در دمای ۳۷ºC و 5% CO2 کشت و پاساژ[3] داده تا اینکه سلول‌ها از لحاظ تعداد و مرفولوژی به حد مطلوب[4] برسند (پس از ۴-۳ پاساژ). پس از جدا کردن سلول‌ها از سطح فلاسک توسط تریپسین – EDTA (Gibco BRL, Scotland)، شمارش و ارزیابی حیاتی سلول‌ها با استفاده از تست trypan blue exclusion test، انجام شد و تعداد 5×10^4 cell/ml را در چاهک‌های پلیت ۶ خانه مخصوص کشت سلولی (6 well plate, Nunc, Denmark) به همراه و یا بدون عصاره گیاهی هندوانه ابوجهل کشت دادیم. غلظت‌های مورد استفاده از عصارهٔ گیاهی شامل (µg/ml ۰/۰۲۵، ۰/۲۵، ۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰) بود که به سلول‌های Hep2 و L929 اضافه شد. تغییرات مرفولوژی و خصوصیات عمومی سلول‌ها پس از ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت از نظر قابلیت اتصال به سطح پلیت [5] و میزان گرانولیتی[6] با استفاده از میکروسکوپ نوری معکوس مورد ارزیابی قرار گرفته و با استفاده از دوربین دیجیتال ثبت گردید.

تست MTT

اثر سیتوتاکسیسیتی عصاره هندوانه ابوجهل با استفاده از تست رنگ سنجی MTT[7] و ارزیابی کمی پرولیفراسیون سلولی در *In vitro* مورد سنجش قرار گرفته و درصد IC50 محاسبه گردید (۴ و ۵). MTT (Sigma-Aldrich, USA) یک نمک تترازولیوم محلول در آب است و هنگامیکه این ترکیب در محیط کشت فاقد فنل رد[8] و یا بافرPBS[9] آماده‌سازی می‌شود، ترکیب زرد رنگی ایجاد می کند. هنگامیکه رنگ آماده شده MTT به سلول‌های کشت داده شده افزوده می‌شود، حلقه MTT، فقط در میتوکندری سلول‌های زنده توسط آنزیم هیدروژناز شکسته و به ترکیب نامحلول فورمازان[10] تبدیل می‌شود. بلورهای فورمازان توسط حلال‌هایی نظیر DMSO و یا ایزوپروپانول اسیدی حل شده و سپس جذب نوری رنگ ارغوانی ظاهر شده که در طول موج ۵۷۰nm با استفاده از ریدر الیزا[11] اندازه‌گیری می‌شود (۶). در تست MTT تعداد ۲۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی با غلظت 2×10^6 cell/ml همراه با عصاره و یا بدون آن به هر چاهک از پلیت ۹۶ خانه مسطح کشت (Nunc, Denmark) افزوده شد بطوریکه در هر چاهک تعداد ۵۰۰۰ cell/well موجود باشد. سپس سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ºC و 5% CO2 و رطوبت ۱۰۰٪ انکوبه شدند. پس از اتمام انوکوباسیون، محیط کشت چاهک‌ها جمع‌آوری و دور ریخته شد. سپس غلظت‌های عصارهٔ گیاهی هندوانه ابوجهل به هر چاهک

[1]- Hep2- human caucasian larynx carcinoma cell line
[2]- Polyethelyen glycol 20000
[3]- Passage
[4]- Confluent

[5]- Anchorage dependent
[6]- Granulation
[7]- 3-(4,5-dimethyl thiazol-2y1)-2,5-diphenyl tetrazolium btomide
[8]- Phenol red
[9] - Phosphate Buffer Saline
[10]- Formazan
[11]- ELISA reader

www.SID.ir

Archive of SID

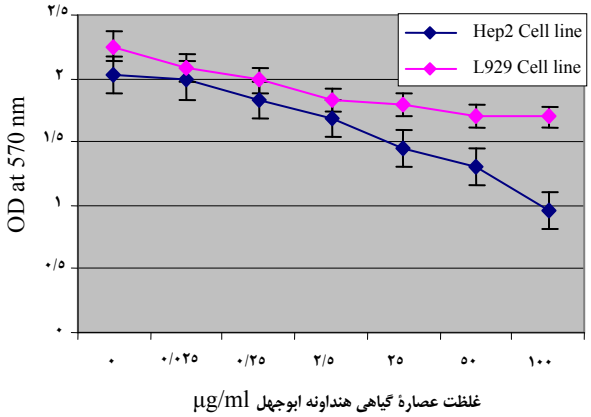
افزوده و به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت انکوبه شد. مقدار ۲۰µl رنگ MTT آماده شده (غلظت ۵mg/ml) پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت انکوباسیون، به هر چاهک افزوده و به مدت ۴-۳ ساعت دیگر انکوبه شد (در این مدت برای جلوگیری از نور، پلیت‌ها با فویل پوشانده شدند). سپس محلول رویی از هر چاهک حذف و مقدار ۲۰۰µl DMSO (دی متیل سولفواکسید، فلوکا-آلمان) و ۲۵µl بافر گلایسین-NaCl به هر چاهک افزوده شد و بلورهای فورمازان توسط سوسپانسیون بطور کامل حل شده و سرانجام جذب نوری چاهک‌ها در طول موج ۵۷۰nm توسط دستگاه ELISA Plate reader (STAT FAX, USA) اندازه‌گیری شد. درصد سلول‌های زنده با استفاده از کنترل از روش فرمول زیر محاسبه گردید (۷).

$$\frac{\text{جذب نوری سلولهای درمان شده}}{\text{میانگین جذب نوری سلولهای کنترل}} \times ۱۰۰$$

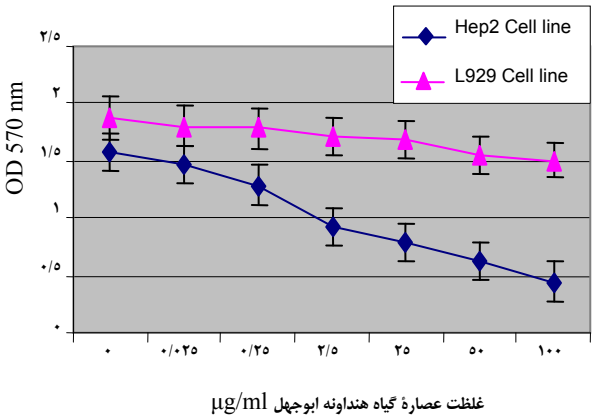
IC_{50}[1] پس از رسم منحنی با بکارگیری غلظت‌های عصاره و درصد سلولهای زنده محاسبه گردید.

یافته‌ها:

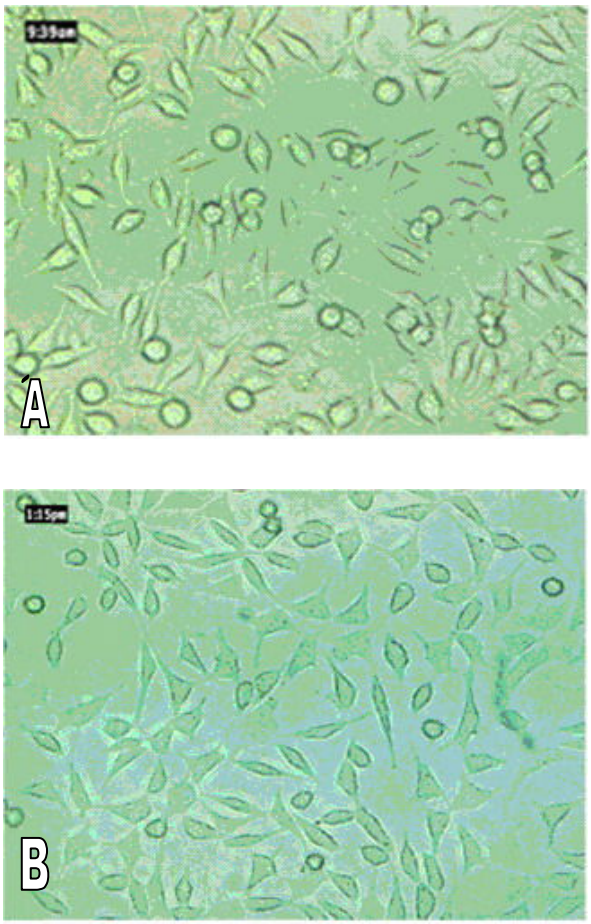
نتایج مرفولوژی ردهٔ سلولی Hep2 نشان می‌دهد که عصارهٔ گیاهی هندوانه ابوجهل، تغییرات قابل توجهی در مقایسه با سلول‌های کنترل (فاقد عصارهٔ گیاهی) در خصوصیات مرفولوژی سلول‌ها ایجاد نموده است. سلول‌ها در مجاورت عصارهٔ گیاهی قابلیت وابستگی به سطح[2] خود را از دست داده و بصورت گرد[3] و سوسپانسیون ظاهر شدند. همچنین میزان گرانولیتی[4] سلول‌ها در مقایسه با کنترل افزایش داشته و از رشد سلول‌ها نیز کاسته شد.



شکل ۱- اثر سیتوتاکسیسیتی عصاره گیاهی هندوانه ابوجهل بر رده سلولی Hep2 و L929 در تست MTT پس از ۲۴ ساعت



شکل ۲- اثر سیتوتاکسیسیتی عصاره گیاهی هندوانه ابوجهل بر رده سلولی Hep2 و L929 در تست MTT پس از ۴۸ ساعت



شکل ۳- ارزیابی مرفولوژی سلول رده‌های Hep2 (A) و L929 (B). سلول‌ها در شرایط ارایه شده در بخش مواد و روش‌ها رشد داده شده و فاقد عصارهٔ گیاهی هندوانه

[1]- Inhibitory concentration at 50%
[2]- anchorage dependency
[3]- Round
[4]- Granulation

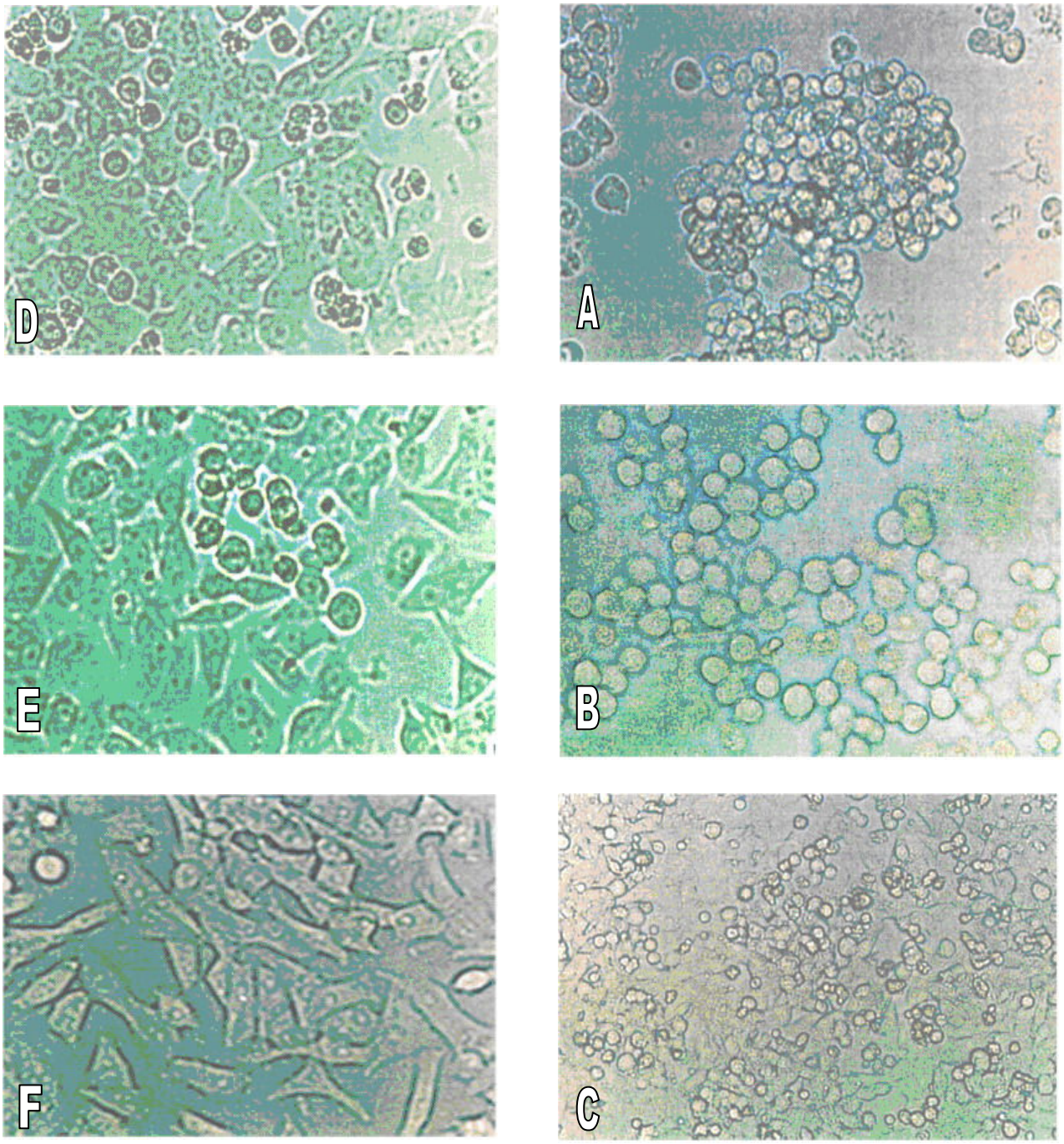
www.SID.ir

Archive of SID

ابوجهل می‌باشند (کنترل). ثبت مرفولوژی با دوربین دیجیتال میکروسکوپ معکوس نوری و با بزرگ نمایی 25x پس از ۴۸ ساعت انجام شد.

این تغییرات مرفولوژی وابسته به غلظت[1] بوده و با کاهش غلظت عصاره، از تغییرات مرفولوژیک کاسته می‌شود، تا جایی که در پایین‌ترین غلظت عصارهٔ گیاهی (۰/۰۲۵µg/ml)، سلول‌ها از نظر مرفولوژی همانند سلول‌های کنترل ظاهر شده و هیچگونه تغییری در خصوصیات سلول‌ها دیده نمی‌شود. این تغییرات مرفولوژی سلولی پس از ۴۸ ساعت مشاهده شد (شکل ۳ و ۴).

اثر عصارهٔ گیاهی هنداونه ابوجهل بر ردهٔ سلولی L929 در



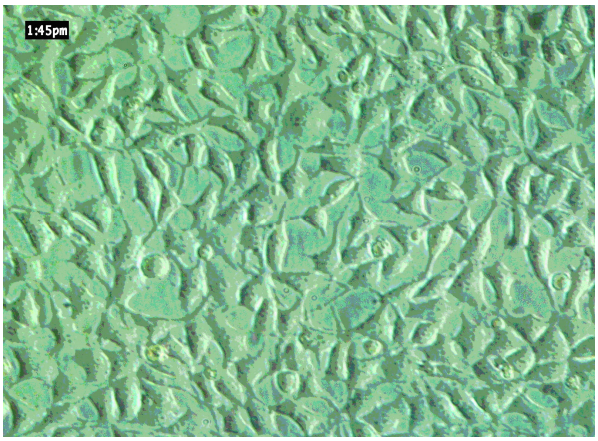
شکل ۴- ارزیابی مرفولوژی سلول ردههای Hep2 سلول‌ها در شرایط ارائه شده در بخش مواد و روش‌ها رشد داده شده و بهمراه عصارهٔ گیاهی هندوانه ابوجهل (A) 100µg، (B) 50µg و (C) 25µg (D) 2.5µg، (E) 0.25µg و (F) 0.025µg می‌باشند. ثبت مرفولوژی با دوربین دیجیتال میکروسکوپ معکوس نوری و با بزرگ نمایی 25x پس از ۴۸ ساعت انجام شد

[1]- Dose dependent

www.SID.ir

Archive of SID

هیچکدام از غلظت‌ها تغییر مرفولوژی در این سلول‌ها ایجاد ننموده است، که این یافته بیانگر عدم تأثیر عصاره بر خصوصیات سلول‌های فیبروبلاست طبیعی موشی است (شکل ۵).



شکل ۵- ارزیابی مرفولوژی سلول رده L929: سلول‌ها در شرایط ارائه شده در بخش مواد و روش‌ها رشد داده شده و بهمراه عصارهٔ گیاهی هندوانه ابوجهل 100µg می‌باشد. ثبت مرفولوژی با دوربین دیجیتال میکروسکوپ معکوس نوری و با بزرگ نمایی 25x پس از ۴۸ ساعت انجام شد.

نتایج ارزیابی سیتوتاکسیسیتی در *in vitro* با استفاده از تست MTT پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت در شکل ۱ و ۲ نشان داده شده است. با افزایش غلظت عصاره، جذب نوری (OD) حاصل از تست MTT کاهش می‌یابد (جدول ۱ و ۲).

جدول ۱- میانگین جذب نوری (OD) در طول موج ۵۷۰ نانومتر حاصل از تست MTT بصورت triplicate و برای دوبار طبق پروتکل ارایه شده در بخش مواد و روش‌ها پس از ۲۴ ساعت

غلظت (µg/ml) / سلول	صفر	۱۰۰
Hep2 cell line	۲/۰۲۵±۰/۶۳۷	۰/۹۶۵±۰/۳۷۱
L929 cell line	۲/۲۵۵±۰/۵۹۵	۱/۶۹۸±۰/۴۲۸

جدول ۲- میانگین جذب نوری (OD) در طول موج ۵۷۰ نانومتر حاصل از تست MTT که بصورت triplicate و برای دوبار طبق پروتکل ارایه شده در بخش مواد و روش‌ها پس از ۴۸ ساعت

غلظت (µg/ml) / سلول	صفر	۱۰۰
Hep2 cell line	۱/۵۸۵ ±۰/۴۰۷	۰/۴۴۸ ±۰/۲۲۹
L929 cell line	۱/۸۷۲ ±۰/۵۳۹	۱/۴۹۵ ±۰/۳۶۴

این یافته‌ها بیانگر آن است که درصد سلول‌های Hep2 زنده، در مجاورت عصارهٔ گیاهی هندوانه ابوجهل کاهش داشته و همچنین از قابلیت پرولیفراسیون سلول‌ها جلوگیری شده است. بطوریکه در غلظت ۱۰۰µg/ml تنها نزدیک به ۲۶٪ سلولها پس از ۴۸ ساعت در مقایسه با سلول‌های L929 زنده بودند. با کاهش غلظت عصاره، درصد سلول‌های زنده افزایش داشته است. در غلظت ۰/۰۲۵µg/ml در صد سلول‌های زنده در مقایسه با کنترل پس از ۴۸ ساعت تقریباً ۸۶٪ بوده است. این نتایج دال بر وابسته به غلظت بودن اثر عصاره می‌کند. IC_{50} عصارهٔ هندوانه ابوجهل برای ردهٔ سلولی Hep2 ۲۷µg محاسبه گردید. در صد سلول‌های زندهٔ ردهٔ سلولی L929 در مجاورت عصارهٔ گیاهی هنداونه ابوجهل کاهش قابل توجهی را در مقایسه با کنترل نشان نمی‌دهد. در بالاترین غلظت عصارهٔ گیاهی (۱۰۰µg/ml) کاهش حیات سلول‌های L929 کمتر از ۲۵٪ پس از ۴۸ ساعت بوده است.

بحث:

در طب سنتی چین، یونان و عرب از عصاره یا آب هندوانه ابوجهل بعنوان یک داروی گیاهی مؤثر در بسیاری از بیماری‌ها استفاده می‌شود (۸ و ۹). هندوانه ابوجهل که عضو خانواده کوکوربیتاسه می‌باشد بسیار تلخ و لعابدار بوده و به عنوان داروی مسهل قوی مصرف می‌شود. توصیهٔ اطبا سنتی این است که چون در عین حال که مسهل قوی است، خراش دهندهٔ شدید نیز می‌باشد، بنابراین حتی الامکان جز در موارد استثنایی که ناچار باشند معده و روده‌ها را بشدت تخلیه کنند از استعمال آن به عنوان مسهل خودداری شود (۲). عصارهٔ حنظل یا آب هنداونهٔ ابوجهل آنتی بیوتیک مقتدری بر ضد برخی میکروب‌ها می‌باشد، از جمله بر ضد سالمونلا تایفوزا[1]، کوراینه باکتریوم دیفتریا[2]، اشریشیا کولی[3] و استافیلوکوکوس اورئوس[4] به ترتیب ضعیف‌تر وکمی مؤثر است و برای مبارزه با سالمونلا پاراتایفی[5] بسیار مؤثر می‌باشد (۱۱). کولوسنتین و کولوسنتتین موجود در گیاه جهت بیماری‌های متعددی منجمله آسیت‌ها، سرطان، هپاتیت، لوسمی و تومورها استفاده شده است. مادهٔ مؤثره حنظل که بعنوان ضد سرطان از آن نامبرده می‌شود، کوکوربتاسین[6] است. همچنین ماده د-گلوکزید

[1]- *Salmonella typhosa*
[2]- *Diphtheriae corynebacterium*
[3]- *Escherichia coli*
[4]- *Staphylococcus aureus*
[5]- *Salmonella paratyphi*
[6]- cucurbitacin

www.SID.ir

Archive of SID

بتا سیتوسترول[1] نیز به عنوان آنتی تومور در عصارهٔ حنظل موجود می‌باشد (۱۵-۱۲). یکی از مکانیسم‌های پیشنهادی آنتی تومور در عصارهٔ حنظل و بسیاری از عصاره‌های گیاهی، مکانیسم آپوپتوزیس و یا مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی[2] است. در فعال شدن مکانیسم آپوپتوزیس چند عامل مؤثر می‌باشد، که مهمترین آنها، فعال شدن آنزیم اندونئوکلئاز، القای P53 و فعال شدن آنزیم پروتئاز کسپس ۳[3] می‌باشد (۱۸-۱۶). دو نوع کوکوربتاسین B و E وجود دارد که در بین انواع کوکوربیتاسین‌ها نوع E آن اثر آنتی توموری مؤثرتری دارد (۱۸). در طب سنتی چین از عصارهٔ حنظل برای درمان لوسمی‌ها و تومور کبد و طحال استفاده می‌شود (۱۹ و ۲۰). در این تحقیق از عصاره تام حنظل جهت بررسی اثر مهاری بر ردهٔ سلول‌های سرطانی حنجره Hep2 استفاده شد. با توجه به اثر مهاری عصاره بر رشد سلول‌ها و اثر سیتوتاکسیسیتی در *in vitro*، نتایج این تحقیق می‌تواند تأییدی بر این مدعی باشد که عصارهٔ تام حنظل با توجه به وجود کوکوربیتاسین[4] می‌تواند بر سلول‌های سرطان حنجره نیز مؤثر باشد. عصارهٔ حنظل بر ردهٔ سلولی L929 بصورت کیفی و مرفولوژیک و همچنین در تست کمی MTT بصورت *in vitro* اثر سیتوتاکسیسیتی نشان نمی‌دهد، که این یافته می تواند برای کاربرد بالینی و تحقیقات بصورت *in vivo* مهم باشد. بطور کلی در مهار سلول‌های سرطانی ماده مورد استفاده نباید بر سلول‌های طبیعی اثر مخرب داشته باشد. با توجه به اینکه ما در این تحقیق از ردهٔ سلولی L929 بعنوان سلول طبیعی استفاده نمودیم، عدم تأثیر عصارهٔ هندوانه ابوجهل بر این سلول‌ها دال بر این موضوع است. باید تأکید نماییم که این یافته‌ها جهت بکارگیری بصورت بالینی نیز باید بصورت *in vivo* به اثبات برسد، هر چند که طب سنتی و تجربی اثرات آن، نشان داده شده است.

همچنین در نتایج بدست آمده مشاهده شد که سلول‌ها نسبت به عصاره مورد نظر خاصیت وابسته به غلظت[5] دارند. یعنی با افزایش غلظت، اثر سایتوتوکسیسیتی عصاره بیشتر قابل مشاهده است. بطوریکه در بالاترین غلظت‌ها (۵۰µg و ۱۰۰) اثر سیتوتاکسیستی کامل و در مقادیر پایین‌تر (۰/۲۵µg، ۲/۵ و ۲۵) اثر ممانعت کنندگی بر رشد سلول‌ها دارد. در کاربرد بالینی عصارهٔ حنظل، دوز پیشنهادی به مقدار ۲ تا ۵ حبه[6] از عصاره در روز می‌باشد (۲۱ و۲۲). همچنین قرص‌های آماده شده از پودر این عصاره به مقدار ۴ تا ۸ گرم نیز وجود دارد که برای مصرف بالینی، ۲ قرص در روز پیشنهاد شده است. گزارشاتی مبنی بر مسمومیت با استفاده از عصارهٔ حنظل گزارش شده است که، کولیت[7]، اسهال و درد شکم از علایم مسومیت می‌باشد (۲۳ و۲۴).

از آنجا که مطالعه بر روی اثر ضد توموری هندوانه ابوجهل مراحل اولیه را سپری می‌نماید، لذا این تحقیق مقدمه‌ای برای رسیدن به جنبه‌های کاربردی این گیاه دارویی در مهار رشد سلول‌های سرطانی می‌باشد. آزمایشات *in vivo* در مدل‌های حیوانات آزمایشگاهی می‌تواند قدم مؤثری در نزدیک شدن و تأیید این یافته‌ها جهت بکارگیری در موارد بالینی باشد.

[1]- D-glucoside β-sitosterol
[2]- apaptosis
[3]- caspase 3
[4]- cucurbitacin E
[5]- Dose dependent
[6]- 2-5 grains/day
[7]- colitis

منابع:

۱- زرگری، علی. گیاهان دارویی. چاپ ششم، جلد دوم، انتشارات دانشگاه تهران، ۱۳۷۲، ۱۵۵-۱۵۳.

۲- میرحیدر، حسین. معارف گیاهی: کاربرد گیاهان در پیشگیری و درمان بیماری‌ها. چاپ دوم، جلد سوم، تهران: دفتر نشر فرهنگ اسلامی، ۱۳۷۵، ۱۸۲-۱۷۶.

3- Konoshima TA, Takaski MB, Kozuka MO, et al. Inhibitory effects of Cucurbitane triterpenoids on epstein-barr virus activation and two-stage carcinogenesis of skin tumor. Biol Pharm Bull 1995; 18: 284-7.

4- Mossman T. Rapid colorimetric assay of cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assay. J Immunol Meth 1983; 65: 55-63.

5- Alley MC, Pacula-Cox CM, Hursey ML. Morphometric and colorimetric analyses of human tumor cell line growth and drug sensitivity in soft agar culture. Cancer Res 1988; 51: 1247-56.

6- Iselt MA, Holtei.WJ, Hilgad PT. The tetrazolium dye assay for rapid in vitro assessment of cytotoxicity. Drug Res 1998; 39: 125-9.

7- Romijn JC, Verkoelen CF, Schroeder FH. Application of the MTT assay to human prostate cancer cell lines in vitro: establishment of test conditions and assessment of hormone-stimulated growth and drug-induced cytostatic and cytotoxic effects. Prostate 1988; 12: 99-110.

8- Bauer RG, Wagner HT. Cucurbitacin containing crude drugs. Analysis and standardization of medicinal drugs and phytopreparations by HPLC and other chromatographic methods. J Biol Sci Res 1985;16: 105-24

9- Huang YA, De-Bruyne TB, Apers S, et al. Complement-inhibiting cucurbitacin glycosides from *Picria fel-terrae*. J Nat Prod 1998; 61: 757-61.

10- Duncan MD, Duncan LK. Cucurbitacin E targets

www.SID.ir

Archive of SID

proliferating endothelia. J Surg Res 1997; 69: 55-60.
11- Habs M, Jahn SA. Carcinogenic activity of condensate from coloquint seeds (*Citrullus colocynthis*) after chronic epicutaneous administration to mice. J Cancer Res Clin Onco 1984; 108: 154-6.
12- Zaki MM, Mahmoud SA. Biochemical activities of bacterial population in the rhizosphere and soil of *Hyoscyamus muticus* and *Citrullus colocynthis*. Ann Agri Sci 1984; 29: 167-74.
13- Hatam NA, Whiting RD. Cucurbitacin glycosides from *Citrullus colocynthis*. Phytochem 1876; 28: 1268-71.
14- Thatte U, Bagadey S, Dahanukar S. Modulation of programmed cell death by medicinal plants. Cell Mol Biol 2000; 46: 199-214.
15- Wasfi IA. Some pharmacological studies on *Citrullus colocynthis*. J Herbs Spices Med Plants 1994; 2: 65-79.
16- Goldfain D, Lavergne A, Galian A, et al. Peculiar acute toxic colitis after ingestion of colocynth: a clinicopathological study of three cases. Gut 1989; 30: 1412-8.
17- Nadkarni KM. Indian Plants and Drugs with their Medical Properties and Uses. Delhi: Asiatic Publishing House; 1998.
18- Zaki MM, Mahmoud SA. Biochemical activities of bacterial population in the rhizosphere and soil of *Hyoscyamus muticus* and *Citrullus colocynthis*. Ann Agri Sci 1984; 29:167-74.
19- Habs M, Jahn SA. Carcinogenic activity of condensate from coloquint seeds (*Citrullus colocynthis*), after chronic epicutaneous administration to mice. J Cancer Res Clin Onco 1984; 108: 154-6.
20- Basalah MO, Al WM. Comparative study of some metabolites of *Citrullus colocynthis* and *Cucumis prohetarum*. J Biol Sci Res 1985; 16: 105-24.
21- Sawaya WN, Daghir NJ. *Citrullus colocynthis* seeds as a potential source of protein for food and feed. J Agri Food Chem 1986; 34: 285-8.
22- Hatam NA, Whiting DA. Lipids and sterols of *Citrullus colocynthis*. Int J Crude Drug Res 1990; 28: 183-4.
23- Bhattacharya AN. *Citrullus colocynthis* seed meal as a protein supplement for Najdi sheep in Northern Saudi Arabia. Anim. Feed SciTech 1990; 29: 57-62.
24- Al-Faraj S. Haemorrhagic colitis induced by *Citrullus colocynthis*. Ann Trop Med Paras 1995; 89: 695-6.

www.SID.ir