پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و چهارم شماره ۱۱۳ خرداد سال ۱۳۹۳ (۱۳۸-۱۳۰)

بررسی اثرات سمیت سلولی عصاره هیدروالکلی میوه گیاه زغال اخته بر سلول های سرطانی و CHO

فاطره رضایی[۱]
محمد شکرزاده[۲]
احمد مجد[۳]
طاهر نژاد ستاری[۱]

چکیده

سابقه و هدف: سرطان یکی از علل عمده مرگ و میر در سراسر جهان می‌باشد.امروزه تعداد زیادی از داروهای مدرن مورد استفاده در درمان سرطان، بر اساس استفاده آن‌ها در طب سنتی از منابع طبیعی جداسازی یا مشتق شده‌اند.گیاه زغال اخته (Cornus mas L) از خانواده Cornaceae کاربردهای دارویی متعددی جهت درمان طیف وسیعی از بیماری ها از جمله سرطان دارد. در این مطالعه اثرات سایتوتوکسیک عصاره میوه نارس و رسیده گیاه زغال اخته بر رده سلول‌های سرطانی و نرمال مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: عصاره هیدروالکلی میوه نارس و رسیده به روش سوکسله تهیه شد. فعالیت ضد سرطانی در غلظت‌های متفاوت عصاره (۲۵۰، ۲۰۰، ۱۵۰، ۱۰۰، ۵۰، ۱۰ و ۰ میکروگرم در میلی لیتر) روی سه رده سلولی MCF7 (سرطان سینه)، HepG2(سرطان کبد) و CHO (نرمال تخمدان هم‌ستر) با روش MTT مورد بررسی قرار گرفت. تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم افزار SPSS16 انجام شد. مقایسه های متعدد بین بیش از دو گروه توسط آنالیز واریانسیک طرفه ANOVA و به دنبال آن تست توکی انجام شد. مقدار P کم تر از $P<0/5$ برای تعیین سطح معنی‌دار بودن بین گروه‌ها در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: یافته‌های پژوهش بیانگر مهار وابسته به دوز و زمان وهم‌چنین تفاوت‌های معنی‌دار بین میزان half maximal inhibitory concentration) میوه نارس و رسیده در همه خطوط سلولی بود ($p<0/05$). هم‌چنین میزان IC50 میوه نارس و رسیده سلول‌های نرمال نیز نسبت به سلول‌های سرطانی تفاوت معنی‌داری را نشان داد ($p<0/05$). اگرچه سیتوتوکسیسیته میوه نارس نسبت به رسیده بیش‌تر است.

استنتاج: این مطالعه نشان می‌دهد که عصاره هیدروالکلی میوه Cornus mas L (نارس و رسیده)، تأثیر سیتوتوکسیک قابل توجهی، روی سلول‌های سرطانی و نرمال دارد و باید بررسی‌های بیش‌تری جهت یافتن ترکیبات مؤثر موجود در عصاره میوه گیاه صورت گیرد تا گامی در جهت یافتن و طراحی داروهای جدید و مؤثر در درمان سرطان باشد.

واژه های کلیدی: روش MTT، زغال اخته، خطوط سلولی سرطانی، IC50، سمیت سلولی

مقدمه

سرطان‌ها عامل مهم و مسئول ۲۳ درصد موارد مرگ و میر در افراد جامعه می‌باشند. آمار مرگ ناشی از سرطان(بیش از ۷ میلیون در سال) در سراسر جهان هشدار دهنده است و این آمار بیش ازاچ آی وی/ ایدز،

مولف مسئول: فاطره رضایی- تهران: دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات E-mail: faterehrezaei62@gmail.com
۱. گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران
۲. مرکز تحقیقات علوم و دارویی، گروه سم شناسی/ فارماکولوژی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۳. گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد سلامی، واحد تهران شمال، تهران، ایران
تاریخ دریافت : ۱۳۹۲/۳/۱۹ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۳۹۲/۵/۱۵ تاریخ تصویب : ۱۳۹۳/۲/۸

Archive of SID
www.SID.ir

مالاریا و سل است. تخمین زده می‌شود که تعداد موارد جدید سرطان به ۱۵ میلیون در هر سال تا سال ۲۰۲۰ برسد، که ۷۰ درصد از آن در کشورهای در حال توسعه خواهد بود(۱).

سرطان پستان شیوع بالایی در بین زنان دارد به طوری که حدود ۱۰ درصد زنان در طول عمر خود به این بیماری مبتلا می شوند. مطالعات اخیر پیشنهاد می‌دهند که سرطان پستان با رشد رو به افزایش خود، به یکی از شایع‌ترین بدخیمی ها در میان زنان ایرانی تبدیل شده و ازهر ۱۰۰۰۰۰ زن ۱۲۰ نفر به این سرطان مبتلا می‌شوند(۳،۲).

روش‌های درمان متفاوتی برای سرطان‌ها وجود دارد که می‌توان به جراحی، شیمی درمانی، رادیوتراپی، هورمون درمانی، ایمونوتراپی و ... اشاره داشت غیر از درمان های رایج ذکر شده، استفاده از گیاهان دارویی در درمان سرطان از اهمیت فوق العاده‌ای برخوردار است(۵،۴). زیرا داروهای گیاهی طبیعی بوده و از این رو نسبت به درمان های دیگر بدون عوارض جانبی قابل توجهی می‌باشند. با این حال، بسیاری از گیاهان به ویژه در مقادیر بالا و با استفاده مکرر می‌توانند اثرات سمی داشته باشند(۶، ۷). بین سال‌های ۱۹۸۱ و۲۰۰۲، ۵ درصد از مجموع ۱۰۳۱ داروی تأیید شده توسط اداره دارو و غذای ایالات متحده آمریکا محصولات طبیعی و ۲۳ درصد دیگر مولکول‌های مشتق شده از محصولات طبیعی بودند(۹،۸).

در کشورهای مختلف مطالعات متعددی جهت بررسی اثرات ضد سرطانی گیاهان دارویی بومی انجام شده و اثر داروهای گیاهی بر انواع رده‌های سلول‌های سرطانی(۶) از جمله رده سرطانی پستان(۱۱،۱۰) مورد ارزیابی قرار گرفته است. اما هنوز تأثیر مثبت بسیاری از این گیاهان به صورت علمی مورد بررسی و تحقیق قرار نگرفته است.

مطالعات نشان داده است که افزایش مصرف غلات و حبوبات، میوه‌ها و سبزیجات با کاهش خطر ابتلا به بیماری در ارتباط است. این امر به وجود آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی از قبیل ویتامینC، توکوفرول، کاروتنوئیدها، پلی‌فنول ها و فلاونوئیدها که در جلوگیری از صدمه ناشی از رادیکال‌های آزاد نقش دارند، نسبت داده شده است. فنل های گیاه معمولاً در میوه، سبزیجات، برگ، دانه، پوست ساقه، ریشه حضور دارند. خاصیت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات فنولیک عمدتاً به دلیل خواص ردوکس آن‌ها می‌باشد. آن‌ها به عنوان عوامل کاهش، اهدا کنندگان هیدروژن و کلاته‌کننده‌های فلز عمل می‌کنند(۱۲) و می‌توانند نقش مهمی در تعدیل یا پیشگیری از بیماری‌های دژنراتیو ناشی از رادیکال‌های آزاد از جمله سرطان و دیابت ایفاء کنند. تحقیقات نشان می‌دهد که کمیت و کیفیت ترکیبات فیتو شیمیایی فنولیک موجود در میوه و سبزیجات به شکل چشم‌گیری تحت تأثیر کالتیوار، محیط، نوع خاک، شرایط رشد قرار می‌گیرد. هم‌چنین کیفیت میوه و سبزیجات بسته به مرحله بلوغ و رسیدگی ممکن است تحت تأثیر قرار گیرد. رسیدگی میوه یک فرآیند تکوینی پیچیده است که به دنبال اعمال تغییرات بیوشیمیایی خاص در متابولیسم سلولی و چندین فاکتور فیزیکوشیمیایی، می‌تواند منابع تغذیه‌ای میوه‌ها را تحت تأثیر قرار دهد(۱۳).

گیاه دارویی زغال اخته با نام علمی Cornus mas L متعلق به خانواده Cornaceae می‌باشد. زغال اخته در طب سنتی برای درمان اسهال، ورم روده ها، رفع تب، درمان بیماری مالاریا، دفع سنگ کلیه، هم‌چنین برای درمان عفونت‌های کلیه و مثانه به کار می‌رود(۱۶-۱۴). میوه زغال اخته حاوی گلوکز، فروکتوز، لاکتوز، اسید آلی و تانن، بیوفلاوونوئیدها، مقدار زیادی ویتامین از جمله ویتامین C و ursolic acid است(۱۷). وجود انواع مختلف ترکیبات آنتی‌اکسیدانی شامل آنتوسیانین‌ها، فلاوونوئیدها و مقدار زیادی ویتامین سبب شده است تا تحقیقات گوناگونی روی این گونه و گونه‌های دیگر این جنس صورت گیرد، به‌طوری که خواص ضد

Archive of SID
www.SID.ir

مالاریایی(۱۵)، ضد باکتریایی(۱۵)، ضد میکروبی(۱۸،۱۵، ۱۹)، آنتی‌هیستامینی(۱۹،۱۵)، آنتی‌آلرژیک(۱۹،۱۵)، ضد دیابتی(۲۰،۱۸)، ضد التهابی، تأثیرات آن در آترواسکلروزیس(۲۱،۲۰) و غیره این گیاه گزارش شده است. نکته مهم آن است که مهار رشد در سلول‌های سرطانی (Inhibition concentration of IC50) به عنوان یک معیار برای جلوگیری یا خاموش نمودن و در نهایت مرگ این سلول‌ها به کار می رود. لذا با توجه به این‌که تاکنون تحقیق مشابهی روی این گونه انجام نشده است، بر آن شدیم تا عصاره هیدروالکلی میوه نارس و رسیده گیاه .Cornus mas L را به منظور مهار رشد سلول‌های نرمال و سرطانی انسانی مورد ارزیابی قرار دهیم.

مواد و روش‌ها

الف) جمع آوری گیاه و عصاره گیری

میوه گیاه زغال اخته، پس از تأیید گونه و نوع بر اساس خصوصیات گیاه شناسی توسط متخصص هرباریوم مرکز تحقیقات کشاورزی قزوین با شماره هرباریوم ۱۹۷۲، از منطقه سوگا قزوین در سال ۱۳۹۱ جمع‌آوری گردید. میوه‌ها (نارس و رسیده) در سایه به مدت پنج روز و پس از حرارت مصنوعی ۴۰ درجه سانتی‌گراد به مدت یک هفته کامل خشک شده و پس از جدا کردن هسته به کمک آسیاب معمولی خرد و ریز شدند. ۱۰۰ گرم نمونه خشک شده پودر شده به روش سوکسله و باحلال آب- اتانول به نسبت ۲۰ به ۸۰ عصاره‌گیری گردید. سپس عصاره توسط دستگاه روتاری اواپوراتور دردمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد تغلیظ شده و عصاره حاصل توسط فریز درایر خشک و به صورت پودر تهیه شد و بر اساس وزن خشک استاندارد شد (بازده حدود ۴۴ گرم برای میوه نارس (سبز رنگ) و ۳۷/۴ گرم برای میوه رسیده (قرمز رنگ)(۲۳،۲۲).

عصاره در DMSO حل شد و سپس غلظت‌های مختلف از عصاره (۲۵۰، ۲۰۰، ۱۵۰، ۱۰۰، ۵۰، ۱۰ و صفر) میکروگرم در میلی لیترتهیه شده که غلظت صفر به عنوان شاهد در نظر گرفته شد (غلظت DMSO در محیط کشت جهت جلوگیری از سمیت حلال ۰/۱ درصد در نظر گرفته شده و نمونه کنترل سلول‌های انکوبه شده با DMSO ۰/۱ درصد می‌باشد)(۲۳).

ب)کشت سلولی

رده سلولی سرطانی سینه (MCF7)، کبد (HepG2) و نرمال تخمدان هم‌ستر (CHO) از بانک سلولی انستیتو پاستور تهران خریداری شده و در محیط کشت ۱۶۴۰ RPMI (PAA) حاوی FBS ۱۰ درصد، پنی‌سیلین- استرپتومایسین یک درصد، آمفوتریپسین یک درصد کشت داده شدند. برای انجام تست‌های مختلف زمانی که سلول‌ها حداقل به ۷۰ درصد رشد سلولی رسیدند توسط تریپسین-EDTA (اتیلن در آمین ترا استیک اسید) از ته فلاسک جدا شده و در دورrpm ۱۵۰۰ به مدت پنج دقیقه سانتریفوژ شدند. رسوب سلولی در یک میلی‌لیتر محیط کشت به حالت سوسپانسیون تهیه شد و درصد زنده بودن سلول‌های موجود در سوسپانسیون سلولی با مخلوط شدن نسبت مساوی از تریپان بلو با استفاده از لام هموسیتومتر و بررسی با میکروسکوپ نوری تعیین شد. پس از حصول اطمینان از عدم آلودگی سلول‌ها، از سلول‌های با درصد زنده بودن بالای ۹۰ درصد برای انجام تست استفاده شد(۲۶-۲۴).

ج) سنجش میزان سمیت سلولی

به منظور بررسی اثر عصاره میوه زغال اخته (نارس و رسیده) بر رشد و تکثیر سلول های سرطانی از روش رنگ سنجی MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide,a yellow tetrazole) استفاده شد(۲۶). این روش یک تست متابولیک رقابتی میتوکندریایی است و بر پایه شکستن نمک تترازولیوم توسط آنزیم سوکسینات دهیدروژناز میتوکندریایی استوار است. در این روش میزان ۲۰۰µl محیط کشت

Archive of SID

www.SID.ir

حاوی 10^5 سلول در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه کاشته شد. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون غلظت‌های ۲۵۰، ۲۰۰، ۱۵۰، ۱۰۰، ۵۰، ۱۰ و صفر) میکروگرم در میلی‌لیتر از هر دو عصاره به سلول‌ها اضافه شد و طی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت انکوبه شد. پس از طی زمان مذکور به هر چاهک پلیت ۲۰ µl MTT (از شرکت سیگما با غلظت ۵ میلی گرم در میلی لیتر) اضافه شد و به مدت چهار ساعت دیگر در تاریکی انکوبه شد. پس از طی زمان لازم محیط کشت حاوی MTT به دقت خارج شده و به هر خانه پلیت میزان ۲۰۰µl محلول DMSO رقیق شده جهت حل کردن فورامازان ارغوانی رنگ اضافه شد. پس از ۱۵ دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق جذب نوری هر چاهک با استفاده از دستگاه الایزا در طول موج ۴۹۰ نانومتر قرائت شد. نتایج حاصل به صورت درصد بقای سلولی در برابر غلظت عصاره گزارش می‌شود.

درصد بقای سلولی = (جذب نمونه / جذب کنترل) *۱۰۰

درصد سمیت سلولی = ۱- (جذب نمونه / جذب کنترل) *۱۰۰

مقدار IC50 (غلظت موثری که ۵۰ درصد مهار ایجاد می‌کند) برای هر عصاره با استفاده از درصد سمیت سلولی غلظت‌های به کار رفته از آن عصاره، محاسبه شد و اعداد IC50 مبنای مطالعات آماری قرار گرفت. تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS16 انجام شد. مقایسه‌های متعدد بین بیش از دو گروه توسط آنالیز واریانسیک طرفه و به دنبال آن تست توکی انجام شد. مقدار p کم‌تر از ۰/۰۵ برای تعیین سطح معنی‌دار بودن بین گروه‌ها در نظر گرفته شد(۲۷-۲۴).

یافته ها

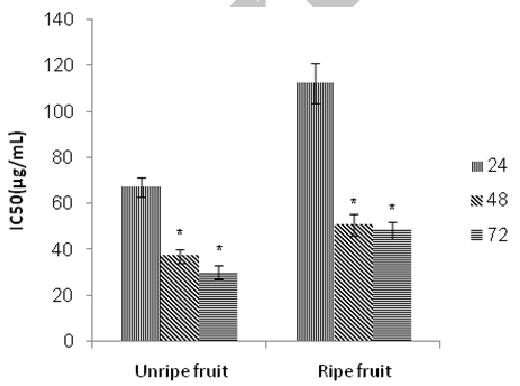
فعالیت ضد سرطانی میوه نارس و رسیده زغال اخته در غلظت‌های ۱۰، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ ، ۲۰۰، ۲۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر در برابر خط سلولی MCF-7 (سرطان پستان) و HepG2 (سرطان کبد) و CHO (نرمال تخمدان همستر) مورد آزمایش قرار گرفت. مقادیر IC50 مربوط به هر یک از عصاره‌ها روی رده‌های سلولی MCF-7، HepG2 و CHO در سه زمان مورد مطالعه (۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت)، در جدول شماره ۱ آورده شده است.

جدول شماره ۱: مقادیر IC50 مربوط به هر یک از عصاره‌ها روی رده‌های سلولی MCF-7، HepG2 و CHO در زمان‌های مورد مطالعه (۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت)

Ripe fruit total extract (IC50[a]± SD)*	Unripe fruit total extract (IC50[a]± SD)*	Time(h)	Cell line
۱۱۲/۲ ± ۴/۸	۶۷/۰۹ ± ۲/۱	۲۴	MCF-7
۵۰/۷ ± ۲/۵	۳۷/۲ ± ۲/۷	۴۸	
۴۸ ± ۲/۱	۳۰/۱ ± ۱/۸	۷۲	
۱۸۱/۱ ± ۴/۲	۱۳۰/۱ ± ۶/۸	۲۴	HepG2
۶۷/۹ ± ۱/۲	۵۶/۲ ± ۳/۶	۴۸	
۵۶/۴ ± ۳/۹	۴۷/۴ ± ۱/۲	۷۲	
>۲۵۰	>۲۵۰	۲۴	CHO
۲۰۱/۷ ± ۴/۱	۱۵۹/۹ ± ۷/۱	۴۸	
۱۷۷/۱ ± ۳/۲	۱۴۰ ± ۳/۲	۷۲	

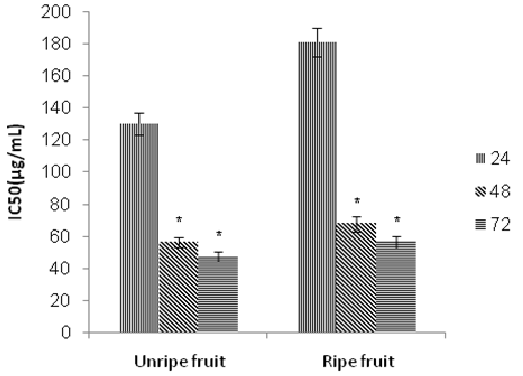
[a] µg/ml,
*p<0.05,
MCF-7: breast adenocarcinoma;
HepG2: liver hepatocellular carcinoma;
CHO:chinese hamster ovary

مقایسه داده‌های IC50 عصاره میوه نارس و رسیده روی رده‌های سلولی سرطانی سینه، کبد در زمان‌های ۲۴،۴۸ و ۷۲ نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین تمامی داده ها وجود دارد ($p < ۰/۰۵$) (نمودار شماره ۱ و ۲).

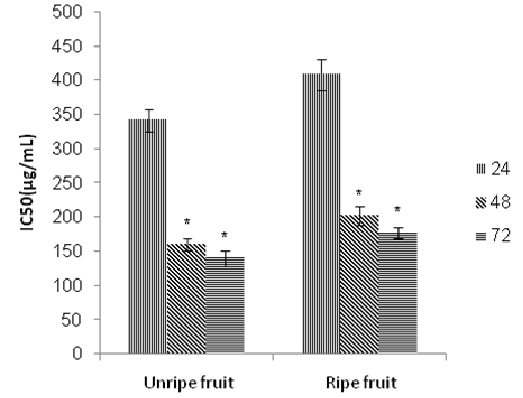


نمودار شماره ۱: مقایسه آماری IC50 عصاره تام میوه نارس و رسیده در زمان های ۲۴،۴۸،۷۲ در رده سلول سرطانی MCF7.تفاوت های معنی دار در هر گروه در مقایسه با نمونه‌های 24h با $p<0.05$* نشان داده شده است. هر داده نشانگر IC50±SE حاصل از حداقل ۳ تکرار می‌باشد.

Archive of SID
www.SID.ir



نمودار شماره ۲: مقایسه آماری IC50 عصاره تام میوه نارس و رسیده در زمان های ۷۲،۴۸،۲۴ در رده سلول سرطانیHepG2.تفاوت‌های معنی‌دار در هر گروه در مقایسه با نمونه های ۲۴h با ۰/۰۵ > p نشان داده شده است.هر داده نشانگر IC50±SE حاصل از حداقل ۳ تکرار می‌باشد



نمودار شماره ۳: مقایسه آماری IC50 عصاره تام میوه نارس و رسیده در زمان‌های ۷۲،۴۸،۲۴ در رده سلولنرمال CHO.تفاوت‌های معنی‌دار در هر گروه در مقایسه با نمونه های ۲۴h با ۰/۰۵ > pنشان داده شده است. هر داده نشانگر IC50±SE حاصل از حداقل ۳ تکرار می‌باشد.

مقایسه داده‌های IC50 عصاره میوه نارس و رسیده روی رده‌های سلولی نرمال تخمدان همستر در زمان‌های ۲۴،۴۸ و ۷۲ نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین تمامی داده ها وجود دارد (p <۰/۰۵) (نمودار شماره ۳). میزان IC50 عصاره میوه نارس و رسیده روی رده سلولی نرمال (رده نرمال در یک گروه)، با میزان آن بر روی رده سلولی سرطانی (۲ رده سرطانی در گروه دیگر) تفاوت معنی‌داری داشت (p <۰/۰۵). میزان IC50 عصاره میوه نارس و رسیده روی رده سلول‌های سرطانی و نرمال نشان داد که تفاوت معنی داری بین اثر میوه نارس و رسیده در سرکوب رشد سلول‌های سرطانی وجود دارد و اثر بازدارند گی میوه نارس بیش‌تربوده است (p <۰/۰۵) (نمودارهای شماره ۱، ۲، و۳).

بحث

باتوجه به این‌که تاکنون اثر مقایسه ای ضد سرطانی میوه زغال اخته نارس و رسیده گزارش نشده است، در این مطالعه فعالیت ضد سرطانی عصاره اتانولی میوه نارس و رسیده زغال اخته که از منطقه سوگای قزوین جمع آوری شده بود،در خطوط سلولی سرطانی MCF7 و HepG2 و نرمال CHO با روش MTT مورد بررسی قرار گرفت. در تحقیق حاضر در بررسی داخل سلولی عصاره میوه نارس و رسیده زغال اخته اثرات مهاری رشد را روی خطوط سرطانی (MCF7 و HepG2) و نرمال (CHO) نشان دادند، اگرچه اثر مهاری عصاره میوه نارس بیش‌تر از میوه رسیده بوده است. سرطان یک بیماری چند مکانیستیک است که نیازمند طیف گسترده‌ای از رویکردها جهت درمان، کنترل و پیشگیری است. سرطان دومین بیماری است که سهم قابل توجهی در تعداد کل مرگ و میر دارد(۲۸). گزارش جهانی سرطان نشان می‌دهدکه نرخ ابتلا به سرطان در سطح جهانی هشدار دهنده می‌باشد. گیاهان برای پیشگیری و درمان بیماری‌های انسان هم‌چنین بیماری سرطان از گذشته‌های دور استفاده می‌شدند. زغال اخته به عنوان گیاهی ضد سرطان مورداستفاده در طب سنتی گزارش شده است(۱۶-۱۴). تحقیقات نشان داده است که گونه‌هایی از جنس Cornus دارای فعالیت ضد سرطان می‌باشد. در سال۲۰۱۱ بررسی تأثیر حفاظتی‌کبدی عصاره اتانولی میوه Cornus officinalis در یک مدل موش با آسیب کبدی القا شده با استامینوفن نشان داد که عصاره میوه این گیاه می‌تواند از آسیب‌های کبدی مرتبط با هپاتوتوکسیسیتی القا شده با استامینوفن به وسیله

Archive of SID

www.SID.ir

جلوگیری یا کم کردن استرس اکسیداتیو جلوگیری کند(۲۹).

شناسایی و جداسازی آنتوسیانین‌ها از میوه Cornus alternifolia، C.controversa ، C.kousa و C.florida و بررسی تأثیر مهاری آن‌ها روی پراکسیداسیون لیپید، آنزیم های سیکلو اکسیژناز و تکثیر سلول‌های توموری رده های سلولی سرطانی انسانی انجام شده است(۱۵). هم چنین جداسازی یک lignan glycoside جدید از میوه Cornus kousa و بررسی سیتوتوکسیتی آن در مقابل خطوط سرطانی انجام شد(۹).

Pawlowska و همکارانش با آنالیز کمی و کیفی فلاوونوئیدهای میوه زغال اخته حضور هشت ترکیب فلاوونوئیدی مانند quercetin ، kaempferol و مشتقات گلیکوزیله aromadendrin و سه آنتوسیانین را گزارش کردند(۳۰).

یافته‌های ما با یافته های Fategbe و همکارانش (۲۰۱۳)، Chukwuka و همکارانش (۲۰۱۳)، Rekha و همکارانش (۲۰۱۲) و Oboh و همکارانش (۲۰۰۷) که نشان دادند به ترتیب عصاره هیدروالکلی میوه نارس و رسیده Solanum melongena، Carica paya، Citrus، Pepeer دارای فعالیت آنتی اکسیدانی بوده اما فعالیت آنتی‌اکسیدانی میوه نارس بیش‌تر از میوه رسیده می‌باشد، هم‌خوانی دارد(۱۲،۱۳، ۳۱، ۳۲). در سال ۱۹۹۹ Sudheese و همکارانش گزارش کردند که فلاوونوئیدهای استخراج شده از S.melongena فعالیت آنتی اکسیدانی از خود نشان می‌دهند(۳۳). مطالعه Ghafar و همکارانش (۲۰۱۰)، Rekha و همکارانش (۲۰۱۲) نیز نشان داد که ارتباط مستقیمی بین فعالیت آنتی‌اکسیدانی گونه‌های سیتروس و محتوای فنولی آن وجود دارد. آن‌ها هم‌چنین بیان داشتند که میزان pH میوه‌های نارس بیشتر از میوه‌های رسیده می‌باشد(۱۲،۳۴).

در سال ۲۰۰۷ پیشنهاد شد تغییرات فلاونوئیدها و pH در سلول‌های سرطانی می‌تواند خاصیت ضد سرطانی داشته باشد(۳۵). هم‌سو با گزارش های مذکور تصور می‌کنیم که علت تاثیر بیش‌تر میوه نارس نسبت به رسیده مربوط به تفاوت مقدار ترکیبات فنولیک و فلاونوئیدهای عصاره آن‌ها باشد. میوه‌های نارس دارای مقدار بیش‌تری از اسیدآسکوربیک، فنولیک‌ها، نشاسته، کلروفیل، پکتین، اسیدها و ترکیبات آلی می‌باشد. طی بلوغ و رسیدگی فیتوهورمون اتیلن آزاد می‌شود که در فرایند رسیدگی میوه نقش دارد. در طی این فرایند متابولیسم سرعت یافته و همچنین تعدادی رادیکال آزاد تولید می‌شود. آنتی اکسیدان‌هایی چون اسیدآسکوربیک، فنولیک و .... برای نجات آمده و مسمومیت حاصل از تولید رادیکال‌های آزاد را از طریق ایجاد ترکیبات با ضرر کم‌تر کاهش می دهند و سبب کاهش در میزان اسید آسکوربیک، ترکیبات فنولیک و دیگر ترکیبات آنتی‌اکسیدانی در میوه‌های در حال رسیدن می‌شود. در نتیجه فعالیت آنتی‌اکسیدانی میوه رسیده از میوه نارس کم‌تر می‌شود(۱۲). بررسی‌ها نشان داده که تفاوت معنی‌داری در سه زمان تیمار(۲۴،۴۸،۷۲) وجود دارد. به طوری‌که با افزایش زمان تیمار، اثرات سمیت سلولی بیش‌تر می‌شود. این نتایج با گزارش‌های Abdolmohammadi و همکاران (۲۰۰۸) که اثرات سمیت سلولی عصاره Astradacus persicus را بر رده سلول سرطانی T47D در سه زمان ۲، ۴ و ۶ روز بررسی کرده و تفاوت معنی‌داری را در هر سه زمان تیمار مشاهده کردند، مطابقت دارد(۳۵). با مشاهده نتایج به دست آمده می‌توان گفت که در بین تمامی رده‌های سلولی (در هر سه زمان مورد مطالعه) بیش‌ترین IC50 مربوط به رده سلولی نرمال تخمدان هم‌ستر (CHO) و کم‌ترین میزان آن مربوط به رده سلولی سرطانی سینه (MCF7) بوده است که نشان‌دهنده اثر نسبی مهارکنندگی رشد و سمیت سلولی عصاره هیدروالکلی میوه زغال اخته روی رده MCF7 در مقایسه با رده سلولی نرمال بوده است. این امر می‌تواند نشأت گرفته از به هم‌خوردن توازن مکانیسم های سلولی و بروز اختلال در مکانیسم‌های دفاعی و حذفی (متابولیسم و دفع)

Archive of SID
www.SID.ir

سلول‌ها به دنبال سرطانی شدن و تکثیر بی رویه سلولی نسبت به سلول‌های سالم باشد(۳۶). از سوی دیگر، می‌توان IC50 بالای رده‌های سلولی نرمال را در مقایسه با رده‌های سلولی سرطانی ناشی از توانایی این سلول‌ها در خارج نمودن داروها و عصاره مورد نظر از سلول دانست. هم‌چنین روش‌ها یا سرعت مقابله سلول‌های نرمال نسبت به سلول‌های سرطانی در مواجه با ترکیبات مختلف بدین ترتیب است که سلول‌های نرمال مسیرهای مقابله با خصوصیات سمی ترکیبات را که منجر به مهار رشد می‌شود، با سرعت بیش‌تری راه‌اندازی می‌نمایند به عنوان مثال، ترکیبات آنتی اکسیدانی داخل سلولی از قبیل گلوتاتیون در مواجه با ترکیبات سمی سبب حذف ترکیبات اکسیداتیو قوی می گردد(۳۷). در میان خطوط سرطانی میزان IC50 سینه از کبد کم‌تر بوده است که می‌تواند بیانگر اثر نسبی بیش‌تر این عصاره بر خط سلولی سرطانی سینه باشد.

پژوهش ها نشان می‌دهد که میوه زغال اخته حاوی انواع مختلف ترکیبات آنتی‌اکسیدانی شامل آنتوسیانین‌ها، فلاوونوئیدها و مقدار زیادی ویتامین می‌باشد که از این ویژگی می‌توان جهت اهداف پزشکی، درمانی و داروسازی استفاده کرد . به دلیل اهمیت دارویی گیاه زغال اخته وبومی بودن آن و با توجه به این که امروزه با ایجاد تحول در امر پزشکی، از ترکیبات شیمیایی موجود در گیاهان جهت تولید داروهایی با عوارض کم‌تر استفاده می‌شود. به این ترتیب تحقیقات بیش‌تر روی اثرات درمانی گیاهان جهت تولید داروهایی با عوارض جانبی کم‌تر و کارایی بالاتر بسیار ضروری است.

سپاسگزاری

این پژوهش حاصل رساله خانم فاطره رضایی دانشجوی دکتری زیست شناسی (سلولی تکوینی گیاهی) می‌باشد. از آقای زاوش زال زر، خانم عاطفه عاصمی و کارشناسان محترم آزمایشگاه سرکار خانم مریم علیزاده و جناب آقای مجتبی علیخانی،کارشناس محترم مرکز تحقیقات و علوم دارویی آقای حامد فتحی و همه عزیزانی که در انجام این رساله مشارکت داشته‌اند، صمیمانه سپاسگزاری می‌نماییم.

References

1. Kuete V, Efferth T. Pharmacogenomics of Cameroonian traditional herbal medicine for cancer therapy. Journal of Ethnopharmacology 2011; 137(1): 752-766.
2. Mousavi SM, Montazeri A, Mohagheghi MA, Jarrahi AM, Harirchi I, Najafi M, et al. Breast cancer in Iran: an epidemiological review. Breast J 2007; 13(4): 383-391.
3. Yavari P, Mosavizade M, Sadrol-Hefazi B, Mehrabi Y. Reproductive characteristics and the risk of breast cancer-a case-cotrol study in Iran. Asian Pac J Cancer Prev 2005; 6(3): 370-375.
4. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. CACancer J Clin 2005; 55(2): 74-108.
5. Shoeb M. Anticancer agents from medicinal plants. Bangladesh Pharmacological Society 2006; 1(2): 35-41.
6. Tavakoli J, Miar S, Zadehzare MM, Akbari H. Evaluation of Effectiveness of Herbal Medication in Cancer Care: A Review Study, Iran J Cancer Prev 2012; 5(3): 144-156.
7. Mahady G. global harmonisation of herbal health claims. Journal of Nutrition 2001; 131(3): 1120-1123.
8. Lee D, Lee MH, Jung TS, Kwon BM, Baek NI, Rho YD. Triterpenoid and lignan from the fruits of *Cornus kousa* inhibit the activities of PRL-3 and LDL-Oxidation. Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry 2010; 53(1): 97-100.

Archive of SID

www.SID.ir

9. Lee DY, Yoo Kh, Chung IS, Kim JY, Chung DK, Kim DK, et al. A new lignan glycoside from the fruits of Cornus kousa burg. Arch Pharm Res 2008; 31(7): 830-833.
10. El Babili F, Bouajila J, Fouraste I, Valentin A, Mauret S, Moulis C. Chemical study, antimalarial and antioxidant activities, and cytotoxicity to human breast cancer cells (MCF7) of Argania spinosa. Phytomedicine 2010; 17(27): 157-160.
11. Wattanapiromsakul C, Wangsintaweekul B, Sangprapan P, Itharat A, Keawpradub N. Goniothalamin, a cytotoxic compound, isolated from Goniothalamus macrophyllus (Blume) Hook. f. & Thomson var. macrophyllus. Songklanakarin J Sci Technol 2005; (27): 479-487
12. Rekha C, Poornima G, Manasa M, Abhipsa V, Pavithra Devi J, Vijay Kumar HT, et al. Ascorbic Acid, Total Phenol Content and Antioxidant Activity of Fresh Juices of Four Ripe and Unripe Citrus Fruits. Chem Sci Trans 2012; 1(2): 303-311.
13. Fategbe MA, Ibukun EO, Kade IJ, Rocha JBT. A comparative study on ripe and unripe eggplant (*Solanum melongena*) as dietary antioxidant sources. Journal of Medicinal Plants Research 2013; 7(6): 209-218.
14. Šavikin K, Zdunić G, Jankovic T, Stanojkovic T, Juranic Z, Menkovic N. In vitro cytotoxic and antioxidative activity of Cornus mas and Cotinus coggygria. Natural Product Research 2009; 23(18): 1731-1739.
15. Vareed SK, Reddy MK, Nair MG. Anthocyanins in Cornus alternifolia, Cornus controversa, Cornus kousa and Cornus florida fruits with health benefits. Sciencedirect 2006; (78): 777-784.
16. Tural S, Koca L. Physico-chemical and antioxidant properties of cornelian cherry fruits (Cornus mas L) grown in Turkey. Sciencedirect 2008; 116(4): 362-366.
17. Jayaprakasam B, Olson L, Schutzki RE, Tai MH, Nair MG. Amelioration of obesity and glucose intolerance in high by anthocyanins and ursolic acid in Cornelian cherry. Journal of Agriculture and Food Chemistry 2006; 54(1): 243-248.
18. Funatogawa K, Hayashi S, Shimomura H, Yoshida T, Hatano T, Ito H, Hirai Y. Antibacterial activity of hydrolyzable tannins derived from medicinal plants against helicobacter pylori. Microbiol. Immunol 2004; 48(4): 251-261
19. Ercisli S, Yilmaz S, Gadze J, Dzubur A, Hadziabulic S, Aliman Y. Some Fruit Characteristics of Cornelian Cherries (Cornus mas L.). Not Bot Hort Agrobot Cluj 2011; 39(1): 255-259.
20. Rafieian-Kopaei M, Asgary S, Adelnia A, Setorki M, Khazaei M, Shamsi F. The effects of cornelian cherry on atherosclerosis and atherogenic factors in hypercholesterolemic rabbits. Journal of Medicinal Plants Research 2011; 5(13): 2670-2676.
21. Asghary S, Rafieian-Kopaei M, Adelnia A, Khazaei M, Shamsi F. Comparing the effects of lovastatin and Cornus mas fruit on fibrinogen level in hypercholesterolemic rabbits. ARYA Atherosclerosis Journal 2010; 6(1): 1-5.
22. Lim SH, Choi SH, Oh YL, Kim SJ. Anti-oxidative effects of flavonoids enriched Corni fructus extract and the mechanism. Afr J Pharm Pharmacol 2011; 5(4): 506-511.
23. Salimi M, Majd A, Sepahdar Z, Azadmanesh K, Irian S, Ardestaniyan MH, et al. Cytotoxicity effects of various *Juglans regi*a (walnut) leaf extracts in human cancer cell lines, Pharmaceutical Biology 2012; 50(11):

Archive of SID
www.SID.ir

1416-1422.

24. Ismail M, Bagalkotkar G, Iqbal S, Adamu HA. Anticancer Properties and Phenolic Contents of Sequentially Prepared Extracts from Different Parts of Selected Medicinal Plants Indigenous to Malaysia. *Molecules* 2012; (17): 5745-5756.
25. Motaal AA, Shaker S. Anticancer and Antioxidant Activities of Standardized Whole Fruit, Pulp, and Peel Extracts of Egyptian Pomegranate, The Open Conference Proceedings Journal 2011; 2(1): 41-45.
26. Shokrzadeh M, Parvaresh A, Shahani S, Habibi O, Zalzar Z. Cytotoxic Effects of *Lagenaria siceraria* Standl. Extract on Cancer Cell Line. J Mazandaran Univ Med Sci 2013; 23(97): 225-230.
27. Sukhramani PS, Sukhramani PS, Tirthani SR, Desai SA, Suthar MP. Biological cytotoxicity evaluation of spiro [azetidine-2, 3'-indole]-2', 4(1'H)-dione derivatives for anti-lung and anti-breast cancer activity. Der Pharmacia Lettre 2011; 3(5): 236-243.
28. Marimuthu P. Projection of cancer incidence in "ve cities and cancer mortality in India. Indian J Cancer 2008; 45(1): 4-7.
29. Lee NH, Seo C. Hepatoprotective and Antioxidative Activities of Cornus officinalis against Acetaminophen-Induced Hepatotoxicity in Mice. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine 2012; 32(1): 1-8.
30. Pawlowska AM, Camangi F, Braca A. Quali-quantitative analysis of flavonoids of Cornus mas L. (Cornaceae) fruits. (2010).
31. Chukwuka KS, Iwuagwu M, Uka UN. Evaluation of Nutritional Components of Carica papaya L. At Different Stages of Ripening, IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences 2013; 6(4): 13-16.
32. Oboh G, Puntel RL, Rocha JBT. *Hot pepper (Capsicum annuum, Tepin & Capsicum Chinese, Habanero) Prevents Fe2+-induced Lipid Peroxidation in Brain: In vitro*, Food Chem 2005; 102(3): 178-185.
33. Sudheesh S, Sandhya C, Koshy AS, Vijayalakshmi NR. Antioxidant Activity of Flavonoids from *Solanum melongena.* Phytother Res 1999; 13(5): 393-396.
34. Ghafar MFA, Prasad KN, Weng KK, Ismail A. Flavonoid, hesperidine, total phenolic contents and antioxidant activities from Citrus species. Afr J Biotechnol 2010; 9(3): 326-330.
35. Abdolmohammadi M.H., Fouladdel Sh., Shafiee A., Amin Gh., Ghaffari S.M, Azizi E. Anticancer effects and cell cycle analysis on human breast cancer T47D cells treated with extracts of *Astrodaucus persicus* (Boiss.) Drude in comparison to doxorubicin. Daru 2008; 16(2): 112-118.
36. Dosik GM, Barlogie B, Johnston D, Mellard D, Freireich EJ. Dose-dependent suppressionof DNA synthesis in vitro as a predictor ofclinical response in adult acute myeloblasticleukemia. Eur J Cancer 1981; 17(5): 549-555
37. Van Haaften RI, Evelo CT, Haenen GR, Bast A. No reduction of alpha-tocopherolquinone by glutathione in rat liver microsomes. Biochem Pharmacol 2001; 61(6): 715-719.

Archive of SID

www.SID.ir

ORIGINAL ARTICLE

Cytotoxic Effect of Hydroalcoholic Extract of Cornus mas L.fruit on MCF7, HepG2 and CHO cell line by MTTAssay

Fatereh Rezaei[1],
Mohammad Shokrzadeh[2],
Ahmad Majd[3],
Taher Nezhadsattari[1]

[1]Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
[2] Pharmaceutical Research Center, Department of Toxicology and Pharmacology, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[3] Department of Biology, Faculty of Biological Sciences, North-tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

(Received June 9, 2013 ; Accepted April 28 , 2014)

Abstract

Background and purpose: Today cancer is considered as one of the leading causes of death worldwide. An impressive number of modern drugs used in cancer treatment are isolated or derived from natural sources based on their use in traditional medicine. Cornus mas L. (Cornaceae) has medicinal applications in treating a wide range of diseases such as cancer. This study was designed to evaluate the Cytotoxic effect of *Cornus mas* L.fruit hydroalcoholic extract on normal and cancer cell lines**.**

Material and Methods: Rip fruit and unripe fruit extract was prepared by soxhlet extraction method. The anticancer activity of different concentrations of the extract (0, 10, 50, 100, 150, 200, 250µg/ml) in three cell lines MCF7 (breast cancer), HepG2 (liver cancer), and CHO (normal hamster ovary) were examined using MTT. Statistical analysis was performed using SPSS V.16.

Results: The findings revealed time and dose-dependent inhibition and also significant differences between the levels of IC50 of unripe and ripe fruit in all cell lines ($P<0.05$). Also, the level of IC50 of unripe and ripe fruit on normal cell lines was significantly different from that of the cancer cell lines ($P<0.05$). However, cytotoxicity of unripe fruit was found more than ripe fruit.

Conclusion: This study showed that hydroalcoholic extract of *Cornus mas* L.(unripe and ripe), have a considerable cytotoxic effect on cancer and normal cell lines and should be further investigated to find effective compounds present in the fruit extract. Hence, effective steps could be taken towards finding new drugs in treating cancer.

Keywords: MTT assay, *Cornus mas L*, cancer cell line, IC50, cytotoxicity

J Mazandaran Univ Med Sci 2014; 24(113): 130-138 (Persian).

Archive of SID

www.SID.ir