بررسی اثرات مهاری عصاره اتانولی گیاه کوشنه (قسط شیرین) (Alpinia galanga L) بر رده سلول سرطانی روده بزرگ انسان (HT-29) و رده سلول غیرسرطانی فیبروبلاست موش (L929)

موسی الرضا حاج زاده[1]، جلیل توکل افشاری[2]، مینا براتی[3].

تاریخ دریافت 85/07/17، تاریخ پذیرش 85/10/27

چکیده

هدف: در مطالعات فراوانی ترکیبات ضد سرطانی متعددی در گیاه کوشنه (قسط شیرین) (Alpinia galangal L) شناسایی شده است که اثرات ضد سرطانی این ترکیبات در نتیجه شکار رادیکال های آزاد، تعدیل و مهار فعالیت های آنزیمی و سمیت سلولی است. هدف از این پژوهش بررسی اثر عصاره اتانولی ریزوم های گیاه کوشنه بر رشد و تکثیر رده سلول های سرطان روده بزرگ انسان (HT-29) به عنوان تجربی و رده سلول های سالم فیبروبلاست موش (L929) به عنوان کنترل در محیط کشت می باشد.

مواد و روش کار: عصاره اتانولی تهیه شده از ریزوم های گیاه کوشنه به روش سوکسله با غلظت های معادل ۲۵۰، ۵۰۰، ۷۵۰، ۱۰۰۰ و ۱۵۰۰ میکرو گرم از پودر خشک ریزوم ها بر میلی لیتر در مجاورت سلول های کشت داده شده در پلیت ها اثر داده شد. با مشاهده مستقیم توسط میکروسکوپ معکوس و عکس برداری، اطلاعات مورفولوژیک (شکل سلولی، میزان گرانولوسیتی سلول و میزان چسبیدگی به سطح) برای هر دو رده سلول های HT-29 و L929 در محیط کشت جمع آوری گردید. در بخش دیگر از پژوهش سلول های کشت شده از هر دو رده مذکور با روش MTT در سه روز متوالی مورد بررسی قرار گرفت و درصد سلول های زنده در هر یک از دو رده سلولی و برای هر یک از غلظت های مورد استفاده از عصاره به صورت Mean±SD محاسبه و ثبت شد. یافته ها با استفاده از نرم افزارهای Instat و SPSS و با روش One-way ANOVA و متعاقبا" تستTukey-Kramer و یا student-test مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و هر جا که $p<0.05$ بود تفاوت ها معنی دار تلقی گردید.

یافته ها: یافته های این مطالعه نشان می دهد که عصاره اتانولی گیاه کوشنه بر رشد و تکثیر رده سلول های سرطانی روده بزرگ انسان HT-29 اثر مهاری دارد درحالی که بر رشد و تکثیر رده سلول های سالم فیبروبلاست موش L929 چنین اثری را نشان نمی دهد. IC_{50} سلول های HT-29 در فواصل۲۴ و ۴۸ برابر ۵۰۰ و در ۷۲ ساعت حدود ۲۵۰ میکروگرم از پودر خشک بر میلی لیتر می باشد.

نتیجه گیری: با توجه به اثرات مهاری عصاره اتانولی ریزوم های گیاه کوشنه (قسط شیرین) بر رشد و تکثیر رده سلول های سرطانی روده بزرگ انسان و عدم وجود چنین اثری بر سلول های سالم فیبروبلاست به نظر می رسد که این عصاره ممکن است در پیشگیری و یا درمان سرطان روده بزرگ موثر باشد و شاید بتوان از عصاره اتانولی گیاه کوشنه (قسط شیرین) یا ترکیبات آن در درمان سرطان روده بزرگ در بیماران نیز استفاده نمود.

کلمات کلیدی: کوشنه (قسط شیرین)، عصاره اتانولی، سرطان روده بزرگ، سلول هایHT-29، سلول های L929

مجله پزشکی ارومیه، سال هجدهم، شماره سوم، ص ۵۸۱-۵۷۲، پاییز ۱۳۸۶

آدرس مکاتبه: مشهد، بیمارستان قائم، دانشکده پزشکی، ساختمان فیزیولوژی–فارماکولوژی، بخش فیزیولوژی، کدپستی: ۹۱۷۶۶-۹۹۱۹۹، نمابر و تلفن: ۰۵۱۱-۸۴۴۰۳۵۰

E-mail: MS-Hajzadeh@MUMS.ac.ir

[1] دانشیار گروه فیزیولوژی مشهد، بیمارستان قائم، دانشکده پزشکی (نویسنده مسئول)

[2] دانشیار گروه ایمنولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد

[3] کارشناس ارشد فیزیولوژی، دانشگاه پیام نور مرکز اصفهان

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

گیاه کوشنه یا قسط شیرین با نام علمی .Alpinia galanga L گیاهی است چند ساله و پایا، کوتاه و اغلب خزنده، ساقه هوایی آن از ریزوم ضخیم، گوشت دار و منشعب که مواد معطر دربر دارد منشا گرفته است و طعمی تند و سوزاننده دارد. برگ ها متناوب، دراز، نوک تیز، بی کرک با پهنک های نسبتا" بزرگ و منتهی به غلاف می باشند. این گیاه متعلق به خانواده زنجبیل[1] و بومی هندوستان، تایلند، مالزی و نواحی جنوب آسیا می باشد، اما در نواحی گرم سیری و استوایی نیز به خوبی رشد می کند (۱،۲).

از ترکیبات شیمیایی شناسایی شده در کوشنه متیل سینامات، گالانگول، آلپی نین و کمپرفید می باشند (۲،۳). همچنین ترکیبات آنتی اکسیدان فراوانی از جمله فنیل پروپانوئید ۵-فلورویوراسیل، دی آریل هپتانوئید، گالانژین، ۱و۱ دی فنیل ۲ پیکریل هیدروزیل و.... در گیاه کوشنه شناسایی شده است (۸-۴).

در کتاب گیاهان دارویی و معارف گیاهی اثرات درمانی متعددی برای قسط شیرین ذکر شده است که عبارتند از؛ دافع سموم و پادزهر سم مار و سایر حشرات موذی، ضد التهاب و تاول، ضد درد دندان و سردرد، معالجه کننده وبا، سوء هاضمه و اسهال خونی، مسمومیت غذایی، تشنج و مفید و موثر در سرطان معده (۱،۲).

قسط شیرین یا کوشنه علاوه بر اثرات مذکور دارای اثرات کاهش دهنده قند خون، محافظت نورونی، جلوگیری کننده از بیوسنتز پروستاگلاندین ها و لوکوترین ها است. این گیاه دارای اثرات ضد درد و حشره کشی است و فعالیت آنزیم ۵ آلفا ردوکتاز را نیز مهار می کند (۱۲-۹).

برخی از گیاهان خانواده Zingiberaceae شامل Alpinia galang, Alpinia officinarum و چند گونه دیگر دارای اثرات ضد سرطانی با فعالیت مهار رشد سلولی بر رده های مختلف سلول های سرطانی در حیوانات تجربی و بر چندین رده سلولی شامل سلول های سرطانی ریه و پستان در انسان اند. با توجه به شیوع نسبتاً فراوان سرطان های دستگاه گوارش، مطالعه ای که نشان دهنده اثرات قسط شیرین بر سرطان های دستگاه گوارش باشد وجود نداشت و لذا در این مطالعه تصمیم گرفتیم تا اثرات احتمالی گیاه کوشنه را بر رده سلول های سرطانی روده بزرگ انسان (HT-29) در محیط کشت بررسی نمائیم. در این پژوهش اثرات مهاری عصاره اتانولی گیاه کوشنه بر رشد و تکثیر رده سلول های سرطانی روده بزرگ انسان (HT-29) و سلول های سالم فیبروبلاست موش (L929) مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها

عصاره گیری: ریزوم های گیاه مورد استفاده در این پژوهش از نوع قسط شیرین هندی می باشد که پس از تهیه و تایید در دانشکده داروسازی دانشگاه تهران مورد استفاده قرار گرفت. پس از نرم و آسیاب نمودن ریزوم ها، از g ۲۰ پودر تهیه شده با استفاده از ml ۴۰۰ اتانول۹۶% در دستگاه سوکسله به مدت ۱۸ ساعت عصاره گیری انجام شد. سپس حجم عصاره حاصل را با دستگاه حذف حلال به حدود ml ۱۰۰ رسانده و این حجم عصاره از فیلتر سرنگی ۰/۲ میکرون عبور داده شد تا استریل گردد. برای تعیین وزن خشک عصاره استریل، ml ۱۰ از آن در پلیت با وزن معلوم ریخته و روی بن ماری ۷۰ درجه خشک گردید. وزن خشک عصاره اتانولی ۲۶۶ میلی گرم بود که غلظتی معادل mg/ml ۲۶/۶ داشت (۳).

بررسی مورفولوژیک: رده های سلولی HT-29 و L929 از بانک سلولی انیستیتو پاستور ایران تهیه شده و در پژوهشکده بوعلی مشهد نگه داری می شود. ابتدا هر دو رده سلولی از تانک ازت خارج و مرحله یخ زدایی سلول ها انجام شد. پس از انجام یک دوره پاساژ سلولی و تعیین قدرت زنده مانی سلول ها با استفاده از تست تریپان بلو، یک پلیت ۶ خانه برای سلول های HT-29 و یک پلیت مشابه نیز برای سلول های L929 در نظر گرفته و در هر خانه تعداد ۵×۱۰^{۵} سلول سرطانی و ۲×۱۰^{۵} سلول سالم ریخته شد. محیط کشت پلیت ها از نوعRPMI-1640[2]، ۱ درصد پنی سیلین–استرپتومایسین و حاوی ۱۰ درصد FCS[3] بود. پلیت ها در انکوباتور ۳۷ درجه با ۵ درصد CO_2 قرار داده شد و پس از ۲۴ ساعت که سلول ها به کف پلیت چسبیدند مرحله اثر دادن عصاره بر سلول ها به این ترتیب انجام شد؛ ابتدا محیط کشت قبلی همه چاهک ها خالی و به جای آن ml ۲ محیط کشت تازه با ویژگی قبلی اضافه شد. سپس با استفاده از محیط کشت، غلظت های معادل ۲۵۰، ۵۰۰، ۷۵۰، ۱۰۰۰ و ۱۵۰۰ میکروگرم از پودر خشک ریزوم ها بر میلی لیتر از عصاره مورد نظر تهیه شد و به چاهک های مورد نظر برای سلول های L929 و HT-29 اضافه گردید. به چاهک اول از هر رده سلولی که چاهک کنترل محسوب می شد، عصاره اضافه نگردید. به این ترتیب برای هر رده سلولی ۶ چاهک حاوی غلظت های مورد نظر یعنی ۰، ۲۵۰، ۵۰۰، ۷۵۰، ۱۰۰۰ و ۱۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر تهیه گردید. سپس پلیت ها در انکوباتور قرار داده شد و پس از گذشت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، مورفولوژی سلول ها با میکروسکوپ معکوس بررسی و مشاهدات ثبت گردید. این گونه ارزیابی مورفولوژیک سلولی، برای

[1] Zingiberaceae

[2] Roswell Park Memorial Institute

[3] Fatel Calf Serum

Archive of SID

www.SID.ir

هر غلظت از عصاره ۳ بار تکرار شد تا اطمینان کافی از نتایج به دست آمده حاصل گردد (۱۴،۱۵).

بررسی کمی با استفاده از آزمون MTT: از هر دو رده سلولی پس از انجام پاساژ و تعیین قدرت زنده مانی سلول ها، ۲۰۰۰ سلول سالم و ۵۰۰۰ سلول سرطانی در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه کشت داده شد (در این آزمون ۳ پلیت ۹۶ خانه در نظر گرفته شد) در هر پلیت، گروه های سه تایی از چاهک ها برای هر غلظت از عصاره مشخص شد و شماره خانه های هر گروه یادداشت گردید. یک گروه سه تایی نیز برای هر رده سلولی به عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شد. پلیت ها ۲۴ ساعت در انکوباتور قرار داده شدند تا سلول ها به بستر خود بچسبند پس از طی این مدت، مرحله مجاور کردن سلول ها با عصاره به این ترتیب انجام شد؛ نخست محیط کشت های هر سه پلیت خالی و ۲۰۰ میکرولیتر محیط تازه در خانه ها ریخته شد. سپس از ۵ غلظت مختلف از عصاره که در بخش بررسی مورفولوژیک با محیط کشت تهیه شده بود به گروه های سه تایی از خانه های حاوی سلول ها L929 و گروه های سه تایی از خانه های حاوی سلول های HT-29 اضافه گردید. به گروه سه تایی ششم از هر رده سلولی نیز که خانه های کنترل محسوب می شد، عصاره اضافه نگردید. پلیت ها در انکوباتور قرار گرفت و پس از ۲۴ ساعت یکی از پلیت ها به صورت راندم برداشته و محیط کشت خانه های آن خالی شد و در عوض به هر چاهک ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت تازه و ۲۵ میکرولیتر رنگ MTT اضافه شد. پلیت سریعا" در ورقه آلومینیومی پیچیده شد و به مدت ۳ الی ۴ ساعت در انکوباتور قرار گرفت. پس از آن محیط کشت حاوی رنگ MTT خالی و ۲۰۰ میکرولیتر DMSO و ۲۵ میکرولیتر بافر گلیسین جایگزین آن شد و جذب نوری هر خانه توسط دستگاه Eliza reader، در طول موج ۵۷۰ نانومتر اندازه گیری گردید.

مراحل اخیر برای پلیت دوم پس از ۴۸ ساعت و برای پلیت سوم پس از ۷۲ ساعت از هنگام مجاورت دادن سلول ها با عصاره انجام شد (۱۴،۱۵).

آزمون های آماری و رسم شکل:

تجزیه و تحلیل نتایج با استفاده از نرم افزارهای Instat و SPSS، آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون تعقیبی Tukey و آنالیز همبستگی انجام شد. برای اطمینان از نرمال بودن توزیع داده ها آزمون Kolomogorov-Smirnov انجام شد و تفاوت ها با $P<0.05$ معنی دار تلقی گردید.

نتایج

نتایج بررسی مورفولوژیک:

الف)رده سلولی L929: پس از ۲۴ ساعت اول، وضعیت سلولی در خانه های ۱، ۳،۲ و ۴ مشابه بود و سلول ها دارای وضعیت طبیعی یعنی همه چسبیده به سطح و غیر گرانوله بودند. در مورد خانه های شماره ۵ و ۶ تقسیم سلولی اندکی کند شده و تعداد بسیار کمی از سلول ها گرانوله شده بودند. بعد از ۴۸ و ۷۲ ساعت وضعیت سلول ها از نظر مورفولوژی در هر ۶ خانه تغییری نداشت و در همه خانه ها اکثر سلول ها زنده و با وضعیت طبیعی بودند (شکل ۱).

ب)رده سلولی HT-29: پس از ۲۴ ساعت، در خانه شماره ۱ (کنترل) شکل سلول ها طبیعی بود و تعداد بسیار ناچیزی از سلول ها از بستر پلیت جدا شده بودند و پر شدگی خانه یکنواخت بود. در خانه های ۲ و ۳ تقسیم سلولی کند شده بود، برخی از سلول ها گرانوله و تعدادی چسبندگی خود به سطح را از دست داده بودند. در خانه های ۴ و ۵ وضعیت سلول ها بسیار تغییر کرده بود و تعداد زیادی از سلول ها از سطح جدا شده و سیتوپلاسم آنها اندکی گرانوله شده بود. در خانه شماره ۶ هم فاصله بین توده های سلولی زیاد شده و سلول های شناور در محیط کشت زیادتر شده بودند.

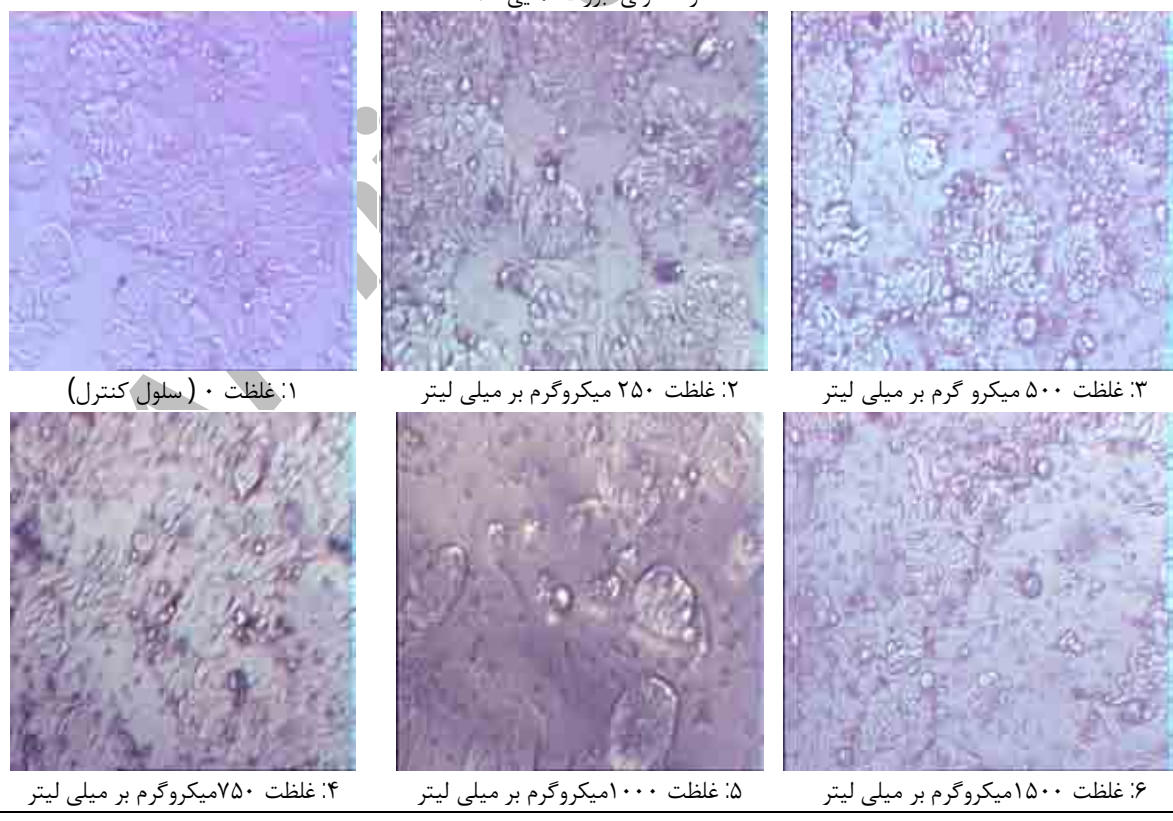
پس از ۴۸ ساعت در خانه کنترل تعداد سلول ها افزایش یافته، سلول ها وضعیت طبیعی داشتند اما در خانه های ۲ و ۳ تعداد سلول های شناور در محیط کشت زیاد شده بود. با افزایش غلظت عصاره در خانه های ۴، ۵ و ۶ فاصله بین توده های سلولی افزایش یافته بود، تعداد سلول های شناور در محیط کشت زیاد شده و تعداد فراوانی از سلول ها گرانوله شده بودند. بعد از ۷۲ ساعت نیز خانه کنترل دارای تعداد بسیار زیادی سلول (در حد پر شدن خانه) بود ولی در خانه های دیگر با زیاد شدن غلظت عصاره تعداد سلول های گرانوله شده و شناور در محیط کشت افزایش یافته بود (شکل ۲).

Archive of SID

www.SID.ir

۱: غلظت ۰ (سلول کنترل)
۲: غلظت ۲۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر
۳: غلظت ۵۰۰ میکرو گرم بر میلی لیتر
۴: غلظت ۷۵۰میکروگرم بر میلی لیتر
۵: غلظت ۱۰۰۰میکروگرم بر میلی لیتر
۶: غلظت ۱۵۰۰میکروگرم بر میلی لیتر

شکل ۱: تصویر اثرات عصاره اتانولی کوشنه بر سلول های سالم (L929) در زیر میکروسکوپ ۷۲ ساعت پس از مجاورت با غلظت های مختلف عصاره اتانولی، بزرگ نمایی ۱۰ ×



۱: غلظت ۰ (سلول کنترل)
۲: غلظت ۲۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر
۳: غلظت ۵۰۰ میکرو گرم بر میلی لیتر
۴: غلظت ۷۵۰میکروگرم بر میلی لیتر
۵: غلظت ۱۰۰۰میکروگرم بر میلی لیتر
۶: غلظت ۱۵۰۰میکروگرم بر میلی لیتر

شکل ۲: تصویر اثرات عصاره اتانولی کوشنه بر سلول های سرطانی روده بزرگ انسان (HT-29) در زیر میکروسکوپ ۷۲ ساعت پس از مجاورت با غلظت های مختلف عصاره اتانولی، بزرگ نمایی ۱۰×

www.SID.ir

نتایج بررسی آزمون MTT

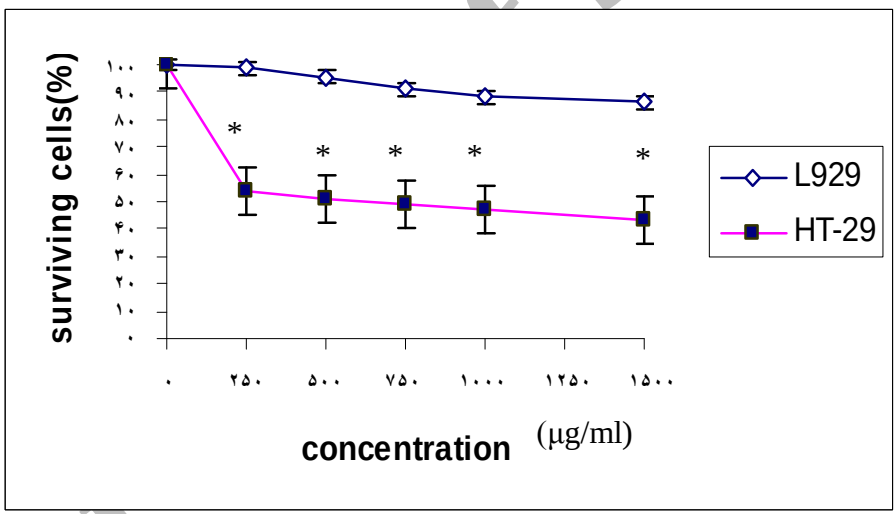
میانگین جذب نوری به دست آمده از سلول هایی که تحت تاثیر غلظت های مختلف عصاره کوشنه قرارگرفتند با میانگین جذب نوری سلول هایی که تحت تاثیر عصاره نبودند (خانه کنترل) مقایسه شد و درصد سلول های زنده پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، با استفاده از فرمول:

۱۰۰× (جذب نوری سلول های کنترل / جذب نوری سلول های تحت تاثیر عصاره در هر خانه) = درصد سلول های زنده محاسبه گردید.

پس از ۲۴ ساعت: درصد سلول های زنده رده L929 بالا بود و با افزایش غلظت عصاره، کاهش ناچیزی یافته بود. در مورد سلول های HT-29, درصد سلول های زنده از همان غلظت های پایین، کم شده بود و این کاهش تعداد سلول ها با افزایش غلظت عصاره متناسب بود. IC_{50} برای این رده سلولی ۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر به دست آمد. در تمامی غلظت های مورد استفاده از عصاره، کاهش درصد سلول های زنده HT-29 به طور معنی داری بیشتر از کاهش درصد سلول های زنده L929 بود ($P<0.014$). برای سلول های HT-29 بین افزایش غلظت و کاهش درصد سلول های زنده همبستگی معنی داری از وجود نداشت ($r= -0.366$) (شکل ۳).

پس از ۴۸ ساعت: نتایج مشابه مرحله قبل و درصد سلول های زنده L929 به طور معنی داری سلول های HT-29 بیشتر بود ($p<0.05$). IC_{50} برای رده سلولی HT-29 همچنان ۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر بود (شکل ۴).

پس از ۷۲ ساعت: تعداد سلول های زنده در هر دو رده کمتر شده و این کاهش در رده HT-29 به طور معنی داری از رده L929 بیشتر بود ($P<0.05$)، به طوری که IC_{50} در این زمان ۲۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر مشخص گردید. نتایج آماری در این زمان همبستگی معنی داری بین افزایش غلظت عصاره و کاهش درصد سلول ها نشان نمی دهد ($r = -0.49$) (شکل ۵).

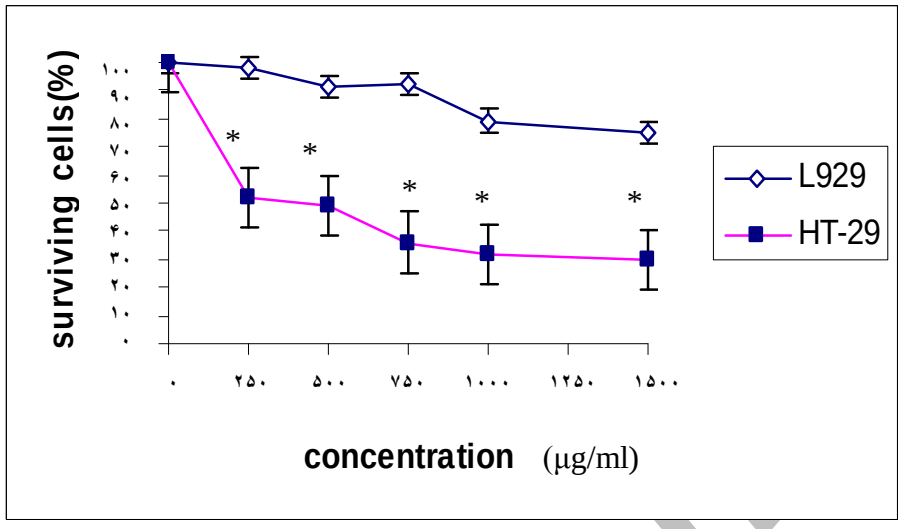


شکل ۳: بررسی اثرات عصاره اتانولی کوشنه بر سلول های L929 و HT-29 بعد از ۲۴ ساعت با روش MTT

نتایج آزمون MTT که اثرات غلظت های مختلف عصارهٔ الکلی کوشنه بر درصد سلول های زندهٔ HT-29 و L929 پس از ۲۴ ساعت را نشان می دهد. هر نقطه بیان گر Mean ± SD است. درصد سلول های زنده رده L929 زیاد بوده و با افزایش غلظت کاهش ناچیزی داشته است. IC50 برای رده سلولی HT-29 برابر ۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر است. با توجه به آزمون آماری در هر یک از غلظت های ۲۵۰، ۵۰۰، ۷۵۰، ۱۰۰۰ و ۱۵۰۰کاهش درصد سلول های زنده HT-29 به طور معنی داری بیشتر از گروه L929 می باشد ($P<0.05$ *)، در مورد سلول های HT-29، درصد سلول های زنده از همان غلظت های پایین، کم شده، اما بین افزایش غلظت عصاره و کاهش درصد سلول های زنده همبستگی معنی داری وجود ندارد ($r= -0.366$).

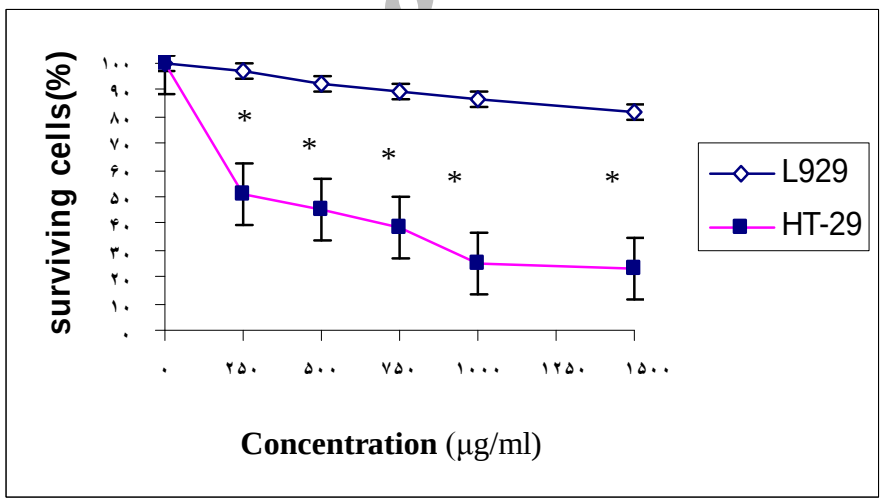
Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۴: بررسی اثرات عصاره اتانولی کوشنه بر سلول های L929 و HT-29، بعد از ۴۸ ساعت با روش MTT

نتایج آزمون MTT که اثرات غلظت های مختلف عصارهٔ الکلی کوشنه بر درصد سلول های زندهٔ HT-29 و L929 پس از ۴۸ ساعت را نشان می دهد. هر نقطه بیان گر Mean ± SD است. درصد سلول های زنده رده L929 زیاد بوده و با افزایش غلظت کاهش ناچیزی داشته است. IC50 برای رده سلولی HT-29 برابر ۲۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر است. با توجه به آزمون آماری در هر یک از غلظت های ۲۵۰، ۵۰۰، ۷۵۰، ۱۰۰۰ و ۱۵۰۰ کاهش درصد سلول های زنده HT-29 به طور معنی داری بیشتر از گروه L929 می باشد ($P<0.05$ *). در مورد سلول های HT-29 درصد سلول های زنده از همان غلظت های پایین کاهش یافته است.



شکل ۵: بررسی اثرات عصاره اتانولی کوشنه بر سلول های L929 و HT-29، بعد از ۷۲ ساعت با روش MTT

نتایج آزمون MTT که اثرات غلظت های مختلف عصارهٔ الکلی کوشنه بر درصد سلول های زندهٔ HT-29 و L929 پس از ۷۲ ساعت را نشان می دهد. هر نقطه بیانگر Mean ± SD است. تعداد سلول های زنده در هر دو رده کمتر شده و این تغییر در رده HT-29 معنی دار است، IC50 برای این رده سلولی در این زمان ۲۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر می باشد. با توجه به آزمون آماری در هر یک از غلظت های ۲۵۰، ۵۰۰، ۷۵۰، ۱۰۰۰ و ۱۵۰۰ کاهش درصد سلول های زنده HT-29 به طور معنی داری بیشتر از گروه L929 می باشد ($P<0.05$ *).

www.SID.ir

بحث

تاکنون راه اصلی درمان سرطان های دستگاه گوارش تشخیص زودرس توده سرطانی و حذف جراحی آنها بوده است و درمان های طبی شامل شیمی درمانی معمولا در مراحل انتهایی صورت می گیرد که اثر چندانی بر زنده مانی بیماران ندارد. لذا پژوهش هایی که احیاناً امکان دسترسی به داروها و مواد موثر در درمان سرطان ها را فراهم سازند، دارای اهمیت فوق العاده خواهند بود.

مهمترین و اصلی ترین نتایج حاصل از این پژوهش، اثرات مهاری عصاره اتانولی ریزوم های گیاه کوشنه (قسط شیرین) بر رده سلول های سرطانی کولون است که برای اولین بار گزارش می شود. همان طور که نتایج بررسی مورفولوژیک و نتایج حاصل از آزمونMTT نشان می دهند، اثرات مهاری عصاره اتانولی ریزوم های گیاه کوشنه از غلظت های کم ۲۵۰µg/ml تا غلظت ۱۵۰۰ µg/ml از همان ۲۴ ساعت اول شروع شده و با گذشت زمان یعنی در فواصل ۴۸ و ۷۲ ساعت نیز بیشترین اثر مهاری بر روی سلول های HT-29 دیده می شود. در بررسی مورفولوژیک بیشترین اثر مهاری عصاره در ۲۴ ساعت، در غلظت ۵۰۰µg/ml دیده می شود ولی با گذشت زمان حتی کاهش سلول های زنده از غلظت کمتر یعنی ۲۵۰µg/ml نیز مشهود است. عصاره اتانولی در این غلظت ها اثر چندانی بر کاهش سلول های سالم L929 (کنترل) ندارد و سلول های مرده این رده بسیار اندک می باشند (شکل ۱).

در آزمون MTT مشخص شد که IC_{50} سلول های HT-29 در ۲۴ ساعت و ۴۸ ساعت برابر ۵۰۰µg/ml و در ۷۲ ساعت ۲۵۰µg/ml است و نشان می دهد که این عصاره در حالی که در غلظت های نسبتا کم اثرات مهاری بسیار خوبی بر رشد سلول های سرطانی کولون (HT-29) دارد، چنین اثری بر سلول های سالم L929 را به وجود نمی آورد و بنابراین می توان این عصاره را برای مطالعات بیشتر و حتی مطالعات in vivo در بیماران دچار کارسینوم کولون پیشنهاد نمود.

اگر چه بر حسب اطلاع ما تاکنون مطالعه ای که اثرات عصاره اتانولی گیاه کوشنه را بر روی سلول های سرطانی HT-29 بررسی کرده باشد وجود ندارد، اما برای توجیه اثرات ضد سرطانی قسط شیرین و ترکیبات آن مکانیسم های مختلفی پیشنهاد شده است که برخی از آنها عبارتند از؛ شکار رادیکال های آزاد، تعدیل و مهار فعالیت های آنزیمی، مهار ژنوتوکسیسیتی، اثرات مهاری بر پرولیفراسیون سلولی، اثرات ضد اکسیدان و اثرات سیتوتوکسیک (۵-۷).

در بخش های مختلف گیاهان خانواده زنجبیل(Zingiberaceae) مواد شیمیایی متعددی وجود دارد که به طور طبیعی اثرات مهاری و اثرات به تاخیر انداختن و یا معکوس کردن مراحل چندگانه کانسرزایی دارند (۱۶).

در مطالعه ای که توسط Yoshikawa و همکاران انجام شد، آنها از عصاره آبی-استونی ریزوم های گیاه قسط شیرین (Alpinia galanga) علاوه بر ده ماده شناخته شده قبلی که از خانواده فلاونوئیدها هستند و دارای اثرات ضد سرطانی می باشند، ۴ ماده جدید شامل galanganal, galanganol A, galanganol B و galanganol C را جدا کردند و نشان دادند که این مواد جدید دارای اثرات مهای بر تولید NO در اثر لیپوپلی ساکارید در سلول های ماکروفاژ صفاق موش سوری بودند (۱۷). در روغن فرار از بخش های مختلف گیاه کوشنه شامل ریزوم ها نیز چندین ماده از جمله ترکیبات مونوترپن، سزکویی ترپن و (E)-Methylcinemate وجود دارند (۱۸). Capsacio که در نوعی فلفل تند (hot chili pepper) وجود دارد، اثرات حفاظتی بر موتاژنیسیته ایجاد شده تجربی دارد و از تومورزایی تجربی نیز جلوگیری می کند (۱۹).

از عصاره اتانولی دانه های نوعی قسط (Alpinia belpharocalyx) نیز ۴۵ ترکیب Diarylheptanoid جدا شده است که اثرات معنی داری در مهار رشد سلول های HT-1080 (فیبرو سارکوم انسانی) و سلول های L5-26 (کارسینوم کولون Marine) نشان داده اند. در این مطالعه برخی از ترکیبات موجود در عصاره در مقایسه با داروی ضد سرطانی 5-Fluorouracil اثرات مهاری موثرتری بر سلول های HT-1080 نشان دادند (۲۰).

بخش عمده ای از مواد فنولی موجود در گیاهان خانواده زنجبیل اثرات ضد التهاب و ضد اکسیدان دارند. Capsaicin موجود در فلفل اثر محافظتی بر علیه تومور زایی و موتاژن زایی ایجاد شده تجربی دارد و در مطالعه ای بر روی چندین رده از سلول های سرطانی ایجاد آپوپتوز می کند. Yakachinon A و B که در گیاه Alpinia oxyphylla Miquel وجود دارند اثرات مهاری بر التهاب ایجاد شده در اثر فوربل استر و مواد کانسرزای پوست در موش سوری دارند. این مواد که diarylheptanoid می باشند تولید TNFα و IL-1α و بیان mRNA آنها را متوقف می کنند و هر دو در سلول های HL-60 (رده سلول های سرطانی لوسمی پرومیلوستیک انسانی) با ایجاد آپوپتوز موجب مرگ سلولی می شوند (۱۹،۲۱).

Galangin که از خانواده فلاونوئید ها است و در گیاهان خانواده زنجبیل مثل Alpinia officinarum در غلظت های بالا یافت می شود، فعالیت های ضد اکسیدانی و شکارکنندگی رادیکال های

Archive of SID

www.SID.ir

آزاد و تعدیل فعالیت های آنزیمی و اثرات مهار ژنوتوکسیتی مواد شیمیایی دارد و پیشنهاد شده که ممکن است در درمان سرطان ها مفید باشد (۲۲).

در ریزوم های زنجبیل (Zingiber officinale) مواد مهار کننده سنتز آنزیم پروستاگلاندین سنتتاز مشخص شده است. در بین این مواد Gingrol ها و diarylheptanoid ها فعال ترین مواد شناخته شده در مهار آنزیم پروستاگلاندین سنتتاز و نیز در مهار فعالیت آنزیم Arachidonate 5 -lipoxygenase که یک آنزیم دخیل در بیوسنتز لکوترین هاست، می باشند (۲۳).

در مطالعه ای که توسط Lee و همکاران انجام شد، عصاره متانولی میوه Alpinia oxyphylla به طور معنی داری موجب بهبود تومور پوستی ایجاد شده در موش سوری بر اثر ماده شیمیایی 12-O-tetradecanol/1phorbol-13-acetate گردید و در مطالعه دیگری از همین گروه، تیمار سلول های سرطانی HL-60 با عصاره متانولی مذکور موجب کاهش زنده مانی سلول های سرطانی و مهار سنتز DNA شد (۲۴). با توجه به یافته های ما در پژوهش حاضر و اثر مهاری عصاره الکلی کوشنه بر رشد رده سلول های سرطانیHT-29 ممکن است عصاره الکلی مورد استفاده در این پژوهش نیز به نحو مشابه موجب مهار رشد سلول های سرطانی HT-29 شده باشد.

در مطالعه دیگری که توسط Lee و Houghton (2005) انجام شد، آنها نشان دادند که Alpinia galanga وAlpinia officinarum بر روی رده سلول های سرطان ریه (CORL23) و کانسر پستان(MCF7) انسان اثرات سیتوتوکسیک داشتند و در ضمن ماده شیمیایی 1-acetoxychavicol acetate به عنوان ماده اصلی سیتوتوکسیک گونه قسط مشخص گردید (۲۵). با توجه به این که اثرات مهاری معنی داری در پژوهش حاضر بر روی سلول های HT-29 توسط عصاره قسط شیرین دیده می شود، شاید بخشی از مکانیسم اثرات مهاری مشابه مطالعه یاد شده مربوط به وجود ترکیب شیمیایی مذکور در عصاره های کوشنه باشد.

تجویز موضعی 2-6 µg از diarylheptanoidها (yakuchinone A و B) که از ترکیبات موجود در Alpinia oxyphylla هستند قبل از تجویز موضعی ماده سرطان زا در موش کوچک، به طور معنی داری تشکیل تومور پوست را تخفیف داد و از ایجاد تومور جلوگیری نمود. تجویز موضعی یاکوکینون A و B به طور بارزی موجب مهار فعالیت آنزیم اورنتین دکربوکسیلاز ODC در اثر ماده کانسروژن و نیز مهار ODC mRNA گردید. در این پژوهش نشان داده شد که دی آریل هپاتونیدهای موجود در Alpinia oxyphylla دارای فعالیت ضد توموری بودند که ممکن است با ویژگی های ضد التهابی آنها مرتبط باشد (۲۶). برای عصاره Alpinia galanga نیز اثرات بهبود و کاهش دردهای اوستئو آرتریتی زانو در بیماران گزارش شده (۹) و لذا ممکن است اثرات سیتوتوکسیسیتی مشاهده شده عصاره الکلی کوشنه در پژوهش حاضر بخشی به علت اثرات ضد التهابی این عصاره باشد.

در مطالعه ای که توسط ویلن و همکارش (۲۰۰۳) صورت گرفت، مقادیر نسبتاً بالا از ماده شیمیایی ۱و۱- دی فنیل– ۲- پیکریل هیدروزیل در کوشنه وجود داشت و این ماده دارای فعالیت شکار رادیکال های آزاد در سلول های سرطانی است و همچنین سبب افزایش فعالیت آنزیم های سوپر اکسید دسموتاز، کاتالاز و گلوتاتیون پر اکسیداز در سلول های سرطانی می شود (۸). اگرچه در پژوهش حاضر اثرات مواد شیمیایی موجود در قسط شیرین را به طور مجزا بر روی سلول های سرطانی کولون بررسی نکرده ایم، اما این احتمال وجود دارد که اثرات مشاهده شده بر مهار رشد سلول های سرطانی را به یک یا چند ماده شیمیایی از ترکیبات شیمیایی موجود در ریزوم های گیاه بتوان نسبت داد.

نتیجه گیری:

با توجه به این که در این پژوهش عصاره اتانولی ریزوم های گیاه قسط شیرین (Alpinia galanga) به طور معنی داری موجب مهار رشد و تکثیر رده سلول های سرطانی کولون انسان (HT-29) در محیط کشت می شود و از طرفی این عصاره بر سلول های سالم L929 اثرات مهاری چندانی ندارد، و با توجه به این که از غلظت های نسبتا کم حدود۲۵۰ µg/ml از پودر خشک ریزوم ها این اثرات مهاری دیده می شود، شاید بتوان عصاره الکلی کوشنه را برای مطالعات in vivo در مدل های سرطان های حیوانی و احیاناً برای استفاده در درمان یا جلوگیری از پیشرفت سرطان روده بزرگ انسان پیشنهاد نمود.

تقدیر و تشکر:

بخشی از هزینه این پژوهش توسط معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مشهد تامین شد که بدینوسیله تشکر و قدردانی می نمائیم.

Archive of SID

www.SID.ir

References:

۰۱. زرگری ع. گیاهان داروئی. چاپ چهارم. انتشارات دانشگاه تهران. جلد چهارم، ۱۳۶۹. صفحات ۶۰-۵۵۹.

۰۲. میرحیدر ح. معارف گیاهی. چاپ اول. انتشارات دفتر نشر فرهنگ اسلامی تهران. جلد سوم، ۱۳۷۳. صفحات ۵۰-۴۹.

03. Jirovetz L, Buchbauer G, Shafi MP, Leela NK. Analysis of the essential oils of the leaves, stems, rhizomes and roots of the medicinal plant Alpinia galangal from southern India. Acta Pharm 2003; 53: 73-81.

04. Heo MY, Sohn SJ, AuWW. Anti- genotoxicity of galangal as a cancer chemoprevaentive agent candidate. College Pharm 2001; 488: 135-50.

05. Lee SE, Hwang HJ, Ha JS, Jeong HS, KimJH. Screening of medicinal plant exteacts for antioxidant activity. Life Sci 2003; 73: 167-79.

06. Ly TN, Shimoyamada M, Kato K, Yamauchi R. Isolation and characterization of some antioxidative compounds from the rhizomes of smaller galangal (Alpinia officinarum Hance). J Agric 2003; 51: 924-9.

07. Ruffa MJ, Ferraro G, Wagner ML, Calcagno ML, Campos RH, Cavallaro L. Cytotoxic effect of Argentine medicinal plant extracts on human hepatocellular carcinoma cell line. J Ethnopharmacol 2002; 79: 335.

08. Whelan LC, Ryan MF. Ethanolic extracts of euphorbia and other ethnobo tanical species as inhibitors of human tumour cell growth. Phytomed 2003; 10: 53-8.

09. Altman RD, Marcussen KC. Effects of a ginger extrat on knee pain in patients with osteoarthritis. Arthritis Rheum 2001; 44: 2531-8.

10. Akhtar MS, Khan MA, Malik MT. Hypoglycaemic activity of Alpinia galangal rhizome and its extracts in rabbits. Fitoterapa 2002; 73: 623-8.

11. Kiuchi F, Iwakami S, Shibuya M, Hanaoka F, Sankawa U. Inhibition of prostaglandin and Leukotriene biosynthesis by gingerols and diarylheptanoids. Faculty Pharmaceut Sci 1992; 40: 387-91.

12. Miyazawa M, Nakamura Y, Ishikawa Y. Insecticidal diarylheptanoid from Alpinia oxyphlla against Larvae of Drosophila melanogaster. Nat Prod Lett 2001; 15: 75-9.

۱۳. صمصام شریعت س ه. عصاره گیری و استخراج مواد موثره گیاهان داروئی و روش های شناسایی و ارزشیابی آنها. چاپ اول. انتشارات مانی اصفهان. ۱۳۷۱. صفحات ۲۰–۵.

۱۴. قربانی ا. بررسی اثر مهاری عصاره آبی و الکلی سیر (Allium sativum) بر رشد سلول های سرطان حنجره (H.EP.2). پایان نامه کارشناسی ارشد فیزیولوژی پزشکی. دانشکده پزشکی مشهد، ۱۳۸۲.

۱۵. نژاد شاهرخ آبادی خ. بررسی اثرات سیتوتوکسیسیتی عصاره تام زعفران (Crocus sativus L) بر سلول های هپاتوکارسینومای کبد انسان (H.EP.2). پایان نامه کارشناسی ارشد ژنتیک. دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، ۱۳۸۲.

16. Shawka M, ArjunH A, Tezuka Y, Saiki I. Antiproliferative activity of diarylheptanoids from the seeds of Alpinia blepharocalyx. Biol Pharm 2001; 24: 528.

17. Morikawa T, Ando S, Matsuda H, Kataoka S, Muraoka O, Yoshikawa M. Inhibitors of nitric oxide production from the rhizomes of Alpinia galanga: structures of new 8-9' linked neolignans and sesquineolignan. Chem Pharm 2005; 53: 625-30.

18. Jirovetz L, Buchbauer G, Shafi MP, Leela NK. Analysis of the essential oils of the leaves, stems, rhizomes and roots of the medicinal plant Alpinia galangal from southern India. Acta Pharm 2003; 53: 73-81.

19. Chun KS, Sohn Y, Kim HS, Kim OH, Park KK, Lee JM, et al. Anti-tumor promoting potential of naturally occurring diarylheptanoids structurally related to curcumin. Mutat Res 1999; 428: 49-57.

20. Kiuchi F, Iwakami S, Shibuya M, Hanaoka F, Sankawa. Inhibition of prostaglandin and

Archive of SID

www.SID.ir

Leukotriene biosynthesis by gingerols and diarylheptanoids. Faculty Pharmaceut Sci 1992; 40: 387- 91.

21. Surch Y. Molecular mechanisms of chemopreventive effects of selected dietary and medicinal phenolic substsnces. Mutat Res 1999; 428: 305-27.
22. Heo MY, Sohn SJ, AuWW. Anti- genotoxicity of galangal as a cancer chemoprevaentive agent candidate. College Pharm 2001; 488: 135-50.
23. Kiuchi F, Iwakami S, Shibuya M, Hanaoka F, Sankawa U. Inhibition of prostaglandin and leukotriene biosynthesis by gingerols and diarylheptanoids. Chem Pharm Bull 1992; 40: 387-91.
24. Lee E, Park KK, Lee JM, Chun KS, Kang HY, Lee SS, et al. Suppression of mouse skin tumor promotion and induction of apoptosis in HL-60 cells by Alpinia oxyphylla Miquel (Zingiberaceae). Carcinogenesis 1998; 19: 1377-81.
25. Lee CC, Houghton P. Cytotoxicity of plants form Malaysia and Thailand used traditionally to treat cancer. J Ethnopharmacol 2005; 100: 234-43.
26. Chun KS, Park KK, Lee J, Kang M, Surh YJ. Inhibition of monse skin tumor promotion by anti-inflammatory diarylheptanoids derived form Alpinia oxyphylla Miquel (Zingiberaceae). Oncol Res 2002; 13: 37-45.

Archive of SID

www.SID.ir