بررسی اثر سمیت سلولی عصارهٔ اتانولی جوانه برگ و گل گیاه سیاه ولیک *Crataegus melanocarpa* روی ردهٔ سلول‌های سرطانی پستان (MCF-7) و دهانهٔ رحم (HeLa)

محمود علی‌پور[1]، فرخنده نعمتی[2]*

۱. گروه زیست‌شناسی، دبیر زیست‌شناسی ادارهٔ آموزش‌وپرورش قائم‌شهر، قائم‌شهر، ایران.
۲. استادیار و متخصص فیزیولوژی جانوری، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قائم‌شهر، قائم‌شهر، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۶/۱۷
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۴/۱۷

چکیده

زمینه و هدف در چند دههٔ اخیر دانشمندان بر استفاده از ترکیبات طبیعی برای درمان سرطان، از جمله عصارهٔ خام گیاهی یا برخی از متابولیت‌های ثانویه گیاهی متمرکز شده‌اند. هدف از این پژوهش بررسی فعالیت سمیت سلولی عصارهٔ اتانولی خام تهیه شده از جوانهٔ برگ و گل گیاه سیاه ولیک *Crataegus melanocarpa* بر لاین‌های سلولی سرطانی MCF-7 و HeLa.

مواد و روش‌ها در این پژوهش اثر غلظت‌های مختلف عصاره بر لاین‌های سلولیMCF-7 و HeLa، با استفاده از روش رنگ‌آمیزی و آزمون MTT تعیین شد. چگالی نوری محلول رنگی در طول موج ۵۷۰ نانومتر با دستگاه الایزا ریدر، پس از ۲۴ و ۴۸ و ۷۲ ساعت انکوباسیون، تعیین شد.

یافته‌ها نتایج نشان دادند که پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون، عصارهٔ اتانولی در غلظت‌های ۵ و ۱۰ mg/ml تکثیر سلول‌های سرطانی MCF-7 را با تفاوت معنادار با سلول‌های کنترل، کاهش داد (p< ۰/۰۵). همچنین، پس از ۷۲ ساعت انکوباسیون، غلظت ۰/۱۵۶ و غلظت‌های بالاتر در اثر مهارکنندگی، دارای تفاوت معنادار با گروه کنترل بودند؛ و بیشترین اثر ممانعت‌کنندگی در غلظت ۱۰ mg/ml مشاهده شد (۸۶/۱۴ درصد). همچنین آثار سمیت سلولی عصارهٔ اتانولی *C. melanocarpa* علیه لاین سلولی HeLa بسیار پایین بوده و تنها در غلظت ۱۰ mg/ml، پس از ۷۲ ساعت دارای اختلاف معنادار با گروه کنترل بوده است (p<۰/۰۵). بیشترین اثر ممانعت‌کنندگی علیه لاین سلولی HeLa در غلظت ۱۰ mg/ml مشاهده شد (۲۳/۱۴ درصد)..

نتیجه‌گیری در نهایت این پژوهش تأیید می‌کند که گونه *C. melanocarpa* دارای اثر سمیت سلولی علیه سلول‌های سرطانی پستان است و می‌تواند زمینه‌ای را برای تحقیقات آینده درباره سایر گونه‌های این جنس فراهم کند.

کلیدواژه‌ها:
سمیت سلولی، عصاره اتانولی، *C. melanocarpa*، MCF-7، HeLa

مقدمه

سرطان‌ها با یک سری جهش‌های متوالی در ژن‌های انسان، به علت برخی شرایط محیطی اتفاق می‌افتد و هر جهش هم تا حدی تغییرات جدیدی را در سلول به وجود می‌آورد و آن را به سمت سرطانی شدن سوق می‌دهد [۱]. سرطان پستان و دهانهٔ رحم به‌عنوان شایع‌ترین سرطان‌های زنان در سراسر دنیا و عمده‌ترین علل مرگ ناشی از سرطان در زنان شناخته می‌شود [۲]. این بیماری‌ها به‌عنوان یکی از مشکلات عمدهٔ بهداشت عمومی در دنیا مطرح هستند [۳]. در کشور ایران نیز، افزایش نگران‌کننده‌ای در بروز این سرطان‌ها مشاهده می‌شود

* نویسندهٔ مسئول: فرخنده نعمتی
نشانی:

تلفن: ۰۹۱۱۳۱۴۰۵۵۹ دورنگار:
رایانه: Farkhondehnemati@gmail.com
شناسه ORCID: 0000-0002-3674-2087
شناسه ORCID نویسنده اول: 0000-0003-2677-1033

مجلهٔ علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی سبزوار، دورهٔ ۲۶، شمارهٔ ۱، فروردین و اردیبهشت ۱۳۹۸، ص ۱۴۵-۱۵۲
آدرس سایت: http://jsums.medsab.ac.ir رایانامه: journal@medsab.ac.ir
شاپای چاپی: ۷۴۸۷-۱۶۰۶

www.SID.ir

و آمار بیماران با مرحلهٔ پیشرفتهٔ بیماری و نسبتاً جوان در حال افزایش است. برای مثال میزان بروز سرطان پستان در ایران حدود ۲۰ مورد جدید در صد هزار زن در سال است[۴] و دومین سرطان شایع و پنجمین علت مرگ ناشی از سرطان‌ها در کشور شناخته می‌شود[۵]. سرطان دهانهٔ رحم نیز یکی از علت‌های اصلی مرگ‌ومیر زنان در جهان و دومین سرطان شایع پس از سرطان پستان است[۶، ۷].

با توجه به اپیدمیولوژی و اهمیت بیماری، سرطان به‌عنوان یکی از علت‌های مرگ‌ومیر انسان‌ها، امروزه جستجوی شدیدی در منابع بیولوژیکی مختلف به‌منظور توسعهٔ داروی ضد سرطانی جدید برای مبارزه با این بیماری وجود دارد. سالیان بسیاری است که نقش گیاهان به‌عنوان منبع طبیعی مهم در درمان سرطان اثبات شده است[۸]. ترکیبات مشتق شدهٔ گیاهی که تاکنون جدا شده است در حال حاضر تحت آزمایش‌های بالینی قرار گرفته‌اند. این ترکیبات ضد سرطان به‌طور فعالی در برابر انواع مختلفی از سلول‌های سرطانی مؤثر بوده و تحقیقات بیشتر در این زمینه یقیناً به درمان بهتر سرطان منجر می‌شود. با توجه به مطالب مذکور و با توجه به عوارض بسیار زیاد استفاده از داروهای شیمیایی و عدم موفقیت آن‌ها در بسیاری از موارد، نیاز به بررسی و تحقیق در زمینهٔ استفاده از داروهای گیاهی در پیشگیری و درمان بسیاری از بیماری‌ها به‌ویژه سرطان‌ها، بیشتر از گذشته احساس می‌شود [۲]. هدف از مطالعهٔ حاضر بررسی اثر سمیت سلولی عصارهٔ اتانولی استخراج شده از جوانهٔ برگ و گل گونه *Crataegus melanocarpa* با نام محلی سیاه ولیک بر ردهٔ سلول‌های سرطانی پستان (MCF-7) و دهانهٔ رحم (HeLa) است.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری گیاه و عصاره‌گیری

گیاه *C. melanocarpa* در اردیبهشت ۱۳۹۳ از استان مازندران، از جنگل‌های شهرستان سوادکوه جمع‌آوری شد. بخش‌های جوانه برگ و گل این گیاه در سایه و در مجاورت هوا خشک، سپس پودر شده و برای تهیهٔ عصاره استفاده شد. برای عصاره‌گیری، ۴۰ گرم از پودر حاصل در دوره‌ای سه روزه در اتانول ۹۶ درصد خیسانده و سپس با استفاده از کاغذ صافی فیلتر شد و در نهایت با استفاده از دستگاه روتاری حلال اضافی تبخیر شد. این عصاره به‌عنوان عصارهٔ خالص در نظر گرفته شد و سپس غلظت‌های مختلف از آن تهیه شد.

کشت سلولی

سلول‌های Hela (NCBIC115) و MCF-7 (NCBI C135) از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران به‌صورت فلاسک خریداری شدند و در محیط کشت مایع RPMI1640، حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاو غیرفعال شده (FBS) و ۱ درصد آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین- استرپتومایسین کشت داده شدند. سلول‌ها در انکوباتور با دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد و در اتمسفر حاوی ۵ درصد CO_2 و ۹۵ درصد رطوبت در فلاسک‌های استریل قرار گرفتند. محیط کشت‌های آماده در پلیت‌های ۹۶ تایی با تعداد ۱۰۰۰۰ سلول ریخته شد و پس از ۲۴ ساعت که سلول‌ها مورفولوژی طبیعی یافتند در معرض عصارهٔ اتانولی در رقت‌های ۰/۰۳۹، ۰/۰۷۸، ۰/۱۵۶، ۰/۳۱۲، ۰/۶۲۵، ۱/۲۵، ۲/۵، ۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت قرار گرفتند. هم‌زمان نمونهٔ کنترل فاقد عصاره نیز به‌صورت سه‌تایی مانند نمونه‌های حاوی عصاره در نظر گرفته شد.

جداسازی سلول‌های خونی

برای جداسازی سلول‌های خونی ۲ سی‌سی فایکول را به یک لوله فالکون ۱۵ سی‌سی منتقل می‌کنیم. سپس ۲ سی‌سی از خون محیطی را قطره‌قطره و به‌آرامی به روی فایکول درون لوله فالکون اضافه، و با دور ۱۵۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ می‌کنیم. لایهٔ ابری متشکل از سلول‌های تک‌هسته‌ای را از بین لایهٔ پلاسما در بالا و لایهٔ سلول‌های خونی در پایین جدا و به لولهٔ فالکون جدیدی منتقل کرده، با محیط کشت RPMI با دور ۱۵۰۰ به مدت ۷ دقیقه شستشو می‌دهیم. بعد از شستن سلول‌ها، تعداد ۱۰۰۰۰ سلول از این سلول‌ها را در۴ ردیف از چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای کشت داده، یک ردیف به‌عنوان گروه کنترل و ردیف‌های دیگر با غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از عصاره به مدت۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تیمار شدند.

بررسی اثر سمیت سلولی با روش MTT

پس از گذشت زمان‌های انکوباسیون موردنظر به هر چاهک ۲۰ میکرولیتر از محلول MTT (۵ mg/ml) اضافه شد. پلیت‌ها به مدت ۳ تا ۴ ساعت انکوبه شدند و سپس باقیمانده خارج و به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر DMSO اضافه شد تا فورمازان حاصل حل شود. پس از ۱۰ دقیقه و تکان دادن پلیت‌ها با استفاده از تکان‌دهندهٔ پلیت، جذب نوری فورمازان در ۵۷۰ نانومتر با استفاده از خوانشگر پلیت خوانده شد. چاهک‌های حاوی سلول و بدون عصاره به‌عنوان چگالی نوری (OD) شاهد (کنترل) و چگالی نوری چاهک‌های بدون سلول و تنها حاوی محیط RPMI 1640 به همراه سرم جنین گاوی به‌عنوان بلانک در نظر گرفته شد. درصد حیات سلولی با استفاده از

Archive of SID
www.SID.ir

رابطهٔ ۱ محاسبه شد:

$$\%OD = \frac{OD\ \text{بلانک} - OD\ \text{چاهک های تحت تاثیر عصاره}}{OD\ \text{بلانک} - OD\ \text{کنترل}} \times 100 \quad (۱)$$

درصد مهار رشد نیز با استفاده از رابطهٔ ۲ به دست آمد:

(۲) درصد حیات سلولی − ۱۰۰ = درصد مهار رشد

تجزیه‌وتحلیل آماری

در نهایت داده‌ها پس از گردآوری با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۱۹ و با استفاده از آزمون واریانس یک‌طرفه تجزیه‌وتحلیل شد. برای مقایسهٔ میانگین داده‌ها از آزمون توکی استفاده شد. اختلاف در سطح احتمال معنادار کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

نتایج

اثر سمیت سلولی عصارهٔ گیاه *C. melanocarpa* بر ردهٔ سلول‌های سرطانی MCF-7

نتایج حاصل از بررسی اثر مهارکنندگی عصارهٔ گیاه *C. melanocarpa* پس از گذشت زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بر رده سلول‌های سرطانی MCF-7 در جدول ۱ آمده است. میزان مهارکنندگی چشمگیری پس از گذشت ۲۴ ساعت مشاهده نشد و هیچ‌یک از غلظت‌های به‌کاررفته تفاوت معناداری با گروه کنترل نداشته‌اند.

جدول ۱. اثر مهارکنندگی عصاره *C. melanocarpa* بر ردهٔ سلولی MCF-7 پس از گذشت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت انکوباسیون

غلظت عصاره C.melanocarpa (mg/ml)	درصد مهار رشد سلولی پس از ۲۴ ساعت (P-Value)	درصد مهار رشد سلولی پس از ۴۸ ساعت (P-Value)	درصد مهار رشد سلولی پس از ۷۲ ساعت (P-Value)
سلول‌های خونی	۰/۷۱۰ ± ۰/۴۷۴ P= ۰/۰۵۷	۰/۷۰۵ ± ۰/۱۱۳ P= ۰/۰۶۸	۲/۵۸۸ ± ۰/۰۰۸ P= ۲/۹۹۳
۰/۰۳۹	۰/۷۴۲ ± ۰/۰۹۲ P= ۰/۸۸۸	۰/۹۵۷ ± ۰/۰۲۰ P= ۰/۸۱۴	۲۴/۸۱۲ ± ۰/۰۳۷ P= ۰/۱۹۵
۰/۰۷۸	۱/۴۸۶ ± ۰/۰۶۲ P= ۰/۷۵۴	۳/۱۳۶ ± ۰/۰۸۳ P= ۰/۲۱۰	۲۹/۰۴۴ ± ۰/۱۰۸ P= ۰/۰۹۳
۰/۱۵۶	۲/۶۷۸ ± ۰/۱۰۰ P= ۰/۷۳۱	۴/۶۱۶ ± ۰/۱۵۹ P= ۰/۷۶۰	۲۸/۳۲۷ ± ۰/۰۲۲ P= ۰/۰۷۷
۰/۳۱۲	۰/۶۱۹ ± ۰/۱۴۴ P= ۰/۵۵۶	۷/۲۸۶ ± ۰/۰۸۵ P= ۰/۴۲۶	۳۷/۰۰۲ ± ۰/۰۷۴* P= ۰/۰۲۶
۰/۶۲۵	۱۵/۹۵۵ ± ۰/۱۱۳ P= ۰/۱۸۰	۸/۹۸۸ ± ۰/۰۴۸ P= ۰/۲۶۵	۴۴/۰۴۹ ± ۰/۰۱۹** P= ۰/۰۰۳
۱/۲۵	۱۶/۱۰۶ ± ۰/۰۹۸ P= ۰/۱۵۲	۱۶/۶۹۰ ± ۰/۰۳۲ P= ۰/۱۴۳	۷۰/۸۳۹ ± ۰/۰۵۷** P= ۰/۰۰۵
۲/۵	۱۸/۹۹۷ ± ۰/۰۶۶ P= ۰/۱۱۲	۱۸/۲۶۱ ± ۰/۰۷۷ P= ۰/۱۱۰	۷۴/۷۷۰ ± ۰/۰۵۶** P= ۰/۰۰۲
۵	۲۲/۰۱۸ ± ۰/۱۱۶ P= ۰/۱۸۳	۲۷/۴۲۸ ± ۰/۱۳۷* P= ۰/۰۴۵	۷۸/۵۷۳ ± ۰/۰۷۱** P= ۰/۰۰۵
۱۰	۲۳/۲۵۹ ± ۰/۱۳۸ P= ۰/۳۵۴	۴۰/۹۱۱ ± ۰/۱۷۰* P= ۰/۰۱۳	۸۶/۱۴۴ ± ۰/۰۳۱** P= ۰/۰۰۱
IC50) mg/ml(	----	---	۵/۹۴

اثر غلظت‌های مختلف عصاره *C.melanocarpa* (ستون نخست از راست) بر سلول‌های MCF-7؛ میزان درصد مهار رشد(ستون ۴،۳،۲ از راست) در مقایسه با گروه کنترل بر اساس روش MTT. هر عدد بیانگر میانگین به دست آمده مربوط به سه آزمایش مستقل ± خطای معیار است.$p \leq ۰/۰۵$ * و$p \leq ۰/۰۲$** در مقابل گروه کنترل. اثر عصاره بر لنفوسیت‌های خون محیطی (ردیف دوم از بالا) بعد از ۲۴، ۴۸و ۷۲ ساعت انکوباسیون. میزان IC50 (ردیف آخر)، IC50 غلظتی از عصاره است که موجب جلوگیری از رشد سلول‌ها به میزان ۵۰ درصد می‌شود.

Archive of SID
www.SID.ir

پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون، درصد مهار رشد سلول‌ها در غلظت‌های ۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، به ترتیب با ۲۷/۴۲ و ۴۰/۹۱ درصد، دارای اختلاف معنادار در مقایسه با گروه کنترل بودند ($p < ۰/۰۵$).

پس از ۷۲ ساعت انکوباسیون سلول‌های خونی و ردهٔ سلول‌های سرطانی با غلظت‌های مختلف عصارهٔ اتانولی گیاه *C. melanocarpa*، درصد مهار رشد سلول‌های سرطانی در غلظت‌های ۰/۳۱۲ تا ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر دارای اختلاف معنادار با گروه کنترل بوده‌اند ($p < ۰/۰۵$) و بیشترین درصد مهار رشد سلولی در غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به میزان ۸۶/۱۴ درصد مشاهده شد. همچنین میزان IC_{50} پس ۷۲ ساعت انکوباسیون به‌ترتیب به میزان ۵/۹۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به دست آمد.

اثر سمیت سلولی عصارهٔ اتانولی گیاه *C. melanocarpa* بر ردهٔ سلول‌های سرطانی HeLa

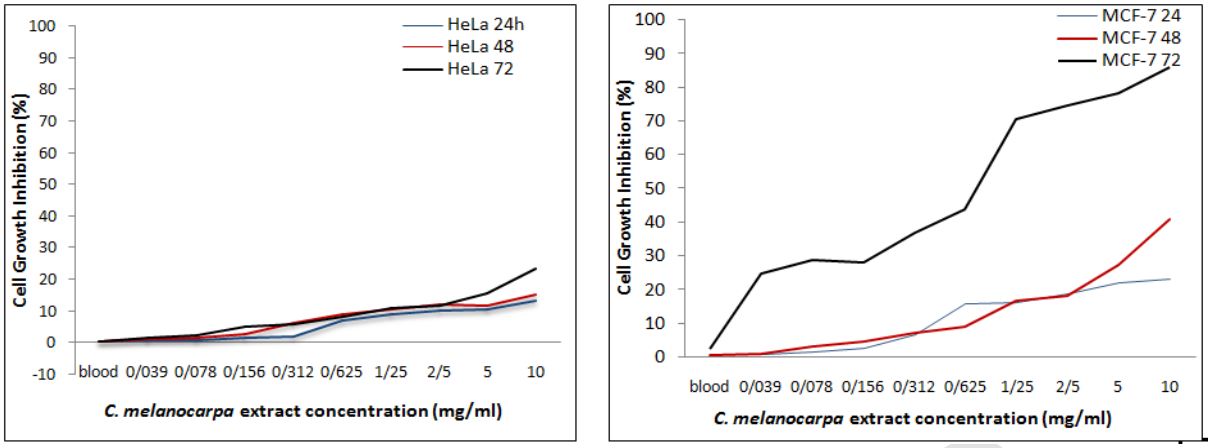
نتایج حاصل از اثر مهارکنندگی عصارهٔ گیاه *C. melanocarpa* پس از گذشت زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بر ردهٔ سلول‌های سرطانی HeLa در جدول ۲ آمده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود درصد مهار رشد سلولی تنها در غلظت‌های ۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و پس از ۷۲ ساعت انکوباسیون دارای اختلاف معنادار با گروه کنترل بوده است ($p< ۰/۰۵$) و بیشترین درصد مهار رشد سلول‌های سرطانی HeLa برابر با ۲۳/۱۴ و متعلق به غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بوده است.

جدول ۲. اثر مهارکنندگی عصاره *C. melanocarpa* بر ردهٔ سلول‌های سرطانی HeLa پس از گذشت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت انکوباسیون

غلظت عصاره C.melanocarpa (mg/ml)	درصد مهار رشد سلولی پس از ۲۴ ساعت (P-Value)	درصد مهار رشد سلولی پس از ۴۸ ساعت (P-Value)	درصد مهار رشد سلولی پس از ۷۲ ساعت (P-Value)
سلول‌های خونی	۰/۳۷۹ ± ۰/۰۶۴ P= ۰/۰۷۷	۰/۱۶۶ ± ۰/۱۱۲ P= ۰/۰۸۸	۰/۱۵۳ ± ۰/۰۰۸ P= ۰/۰۹۳
۰/۰۳۹	۰/۶۷۰ ± ۰/۰۳۵ P= ۰/۸۹۶	۰/۹۵۷ ± ۰/۰۲۱ P= ۰/۸۱۴	۱/۴۳۱ ± ۰/۰۱۰ P= ۰/۱۲۹
۰/۰۷۸	۰/۷۷۱ ± ۰/۰۲۳ P= ۰/۸۳۷	۱/۵۳۵ ± ۰/۰۸۴ P= ۰/۴۳۰	۲/۰۳۸ ± ۰/۰۵۰ P= ۰/۶۹۰
۰/۱۵۶	۱/۶۲۸ ± ۰/۰۵۰ P= ۰/۸۲۶	۲/۶۷۸ ± ۰/۱۶۲ P= ۰/۸۴۳	۴/۹۴۶ ± ۰/۰۴۱ P= ۰/۱۶۷
۰/۳۱۲	۱/۶۹۴ ± ۰/۰۵۰ P= ۰/۸۲۹	۶/۰۲۱ ± ۰/۰۸۲ P= ۰/۵۱۴	۵/۶۶۵ ± ۰/۰۷۸ P= ۰/۴۵۳
۰/۶۲۵	۶/۸۷۳ ± ۰/۰۳۷ P= ۰/۲۸۹	۸/۴۸۸ ± ۰/۰۴۸ P= ۰/۲۶۵	۸/۰۵۶ ± ۰/۰۵۷ P= ۰/۲۷۰
۱/۲۵	۸/۹۶۸ ± ۰/۰۱۴ P= ۰/۰۸۶	۱۰/۳۶۵ ± ۰/۰۴۷ P= ۰/۴۳۱	۱۰/۷۶۰ ± ۰/۱۴۶ P= ۰/۴۲۳
۲/۵	۹/۸۵۸ ± ۰/۰۲۹ P= ۰/۳۸۱	۱۱/۹۳۶ ± ۰/۰۴۴ P= ۰/۳۲۸	۱۱/۶۳۸ ± ۰/۰۹۰ P= ۰/۲۸۱
۵	۱۰/۵۹۰ ± ۰/۰۳۴ P= ۰/۰۵۴	۱۱/۵۶۶ ± ۰/۰۳۷ P= ۰/۰۶۳	۱۵/۴۵۳ ± ۰/۰۸۴ P= ۰/۱۹۳
۱۰	۱۳/۳۰۰ ± ۰/۰۷۹ P= ۰/۵۲۴	۱۲/۲۶۵ ± ۰/۰۳۷ P= ۰/۲۴۲	۲۳/۱۴۵ ± ۰/۰۲۹* P= ۰/۰۴۸
(mg/ml) IC50	----	----	----

اثر غلظت‌های مختلف عصاره *C.melanocarpa* (ستون نخست از راست) بر سلول‌های HeLa؛ میزان درصد مهار رشد (ستون ۴،۳،۲ از راست) در مقایسه با گروه کنترل بر اساس روش MTT. هر عدد بیانگر میانگین به دست آمده مربوط به سه آزمایش مستقل ± خطای معیار است. $p \leq ۰/۰۵$ * و $p \leq ۰/۰۲$** در مقابل گروه کنترل. اثر عصاره روی لنفوسیت‌های خون محیطی (ردیف دوم از بالا) بعد از ۲۴، ۴۸و ۷۲ ساعت انکوباسیون. میزان IC50 (ردیف آخر)، IC50 غلظتی از عصاره است که موجب جلوگیری از رشد سلول‌ها به میزان ۵۰ درصد می‌شود.

Archive of SID
www.SID.ir



شکل ۱. مقایسهٔ اثر مهارکنندگی غلظت‌های مختلف عصاره *C. melanocarpa* پس از گذشت زمان‌های انکوباسیون ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بر سلول‌های MCF-7 (سمت راست) و HeLa (سمت چپ).

درصد مهارکنندگی رشد سلول‌های سرطانی MCF-7 و HeLa در زمان‌های مختلف انکوباسیون و تحت تأثیر غلظت‌های مختلف در شکل ۱ نشان داده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود با گذشت زمان اثر مهارکنندگی عصاره در هر دو لاین سلولی افزایش می‌یابد؛ همچنین با افزایش غلظت عصاره نیز اثر مهارکنندگی افزایش پیدا می‌کند بنابراین می‌توان نتیجه‌گیری کرد که این عصاره دارای اثری وابسته به زمان و دوز بر سلول‌های سرطانی است.

بحث

با وجود تحقیقات فراوانی که روی گونه‌های گیاهی معطر و دارویی کشور انجام گرفته است، امّا هنوز زمینه‌های فراوانی برای شناسایی گونه‌ها یا متابولیت‌های ثانویه در آن‌ها وجود دارد. گیاه *C. melanocarpa* از جمله گونه‌هایی است که در نواحی مختلف کشور، به‌صورت خودرو می‌روید که تاکنون تحقیقاتی در زمینهٔ تعیین برخی ترکیبات فیتوشیمیایی در آن انجام شده است، امّا تا به حال اثر سمیت سلولی آن بر سلول‌های سرطانی پستان و دهانهٔ رحم در داخل کشور بررسی نشده است. از این‌رو در تحقیق حاضر نسبت به بررسی اثر مهاری گونه *C. melanocarpa* روی ردهٔ سلولی سرطان پستان (MCF-7) و دهانهٔ رحم (HeLa)، که از جمله سرطان‌های شایع زنان در کشور است، بر اساس سنجش MTT، اقدام شده است.

نتایج این پژوهش نشان داد که عصارهٔ جوانه برگ و گل *C. melanocarpa* دارای اثر سمیت سلولی خوبی علیه لاین سلولی سرطان پستان است که این نتیجه به دست آمده با یافته‌های رودریگز و همکاران[۹]، کائو و همکاران[۱۱]، زانگ و همکاران [۱۲]، مین و همکاران [۱۳] و نوماتا و همکاران[۱۴] همسو است. همچنین نتایج نشان داده است که اثر مهارکنندگی غلظت‌های مختلف عصاره بر سلول‌های HeLa کمتر از اثر مهارکنندگی آن بر سلول‌های MCF-7 است. علاوه بر این عصارهٔ گیاه *C. melanocarpa* بر سلول‌های خونی نرمال نیز اثر داده شد که نتایج نشان می‌دهد عصاره دارای اثر معناداری بر این سلول‌ها نبوده است و این ویژگی مثبتی برای ترکیباتی که دارای اثر ضد سرطانی هستند، محسوب می‌شود.

اثر ضد سرطانی گونه *C. melanocarpa* را می‌توان به ترکیبات مؤثرهٔ موجود در آن نسبت داد؛ چراکه گزارش‌های مختلفی وجود دارد مبنی بر اینکه گونه‌های مختلف جنس *Crataegus* دارای ترکیبات بیولوژیکی فراوانی هستند که برخی از آن‌ها از جمله ترکیبات ضدسرطانی محسوب می‌شوند. برای مثال اثبات شده است که گونه‌های مختلف این جنس، ترکیبات پلی‌فنولی چشمگیری دارند. بنابراین برای توصیف مکانیسم‌های اثر ضد سرطانی این‌گونه می‌توان به مکانیسم عمل ترکیبات در آن یا در دیگر گونه‌های این جنس اشاره کرد. برای مثال گزارش‌هایی وجود دارد که فنیل پروپانوئیدها در این گونه از فعالیت متابولیکی کارسینوژن‌ها ممانعت می‌کند. محققان تأیید کرده‌اند که این ترکیبات فنولی که به‌وفور در این گونه یافت می‌شوند، می‌توانند متابولیسم کارسینوژن‌هایی را که باعث تولید جهش‌های فعال می‌شود، محدود کنند[۱۰]. این ترکیبات تولید سیتوکروم P450، که در تولید ژن‌های جهش یافته فعال نقش دارند را کاهش می‌دهند[۱۱]. علاوه بر این تحقیقات نشان دادند که فلاونوئیدهای موجود در این گونه از تکثیر بسیاری از سلول‌های سرطانی با سد کردن پیشرفت چرخه سلولی در

Archive of SID
www.SID.ir

نقاط کنترل G1/S یا G2/M ممانعت می‌کنند. ماتسوکاوا و همکاران [۱۵] گزارش کردند که فلاونوئیدها قادرند چرخهٔ سلولی را طی فاز G1 در سرطان روده و پروستات و در سلول‌های ملانوما متوقف کنند. رامفول و همکاران [۱۶] گزارش کردند که عصارهٔ جوانهٔ گل‌گونه *C. monogyna* دارای فعالیت ضدسرطانی زیادی است. این محققان آثار ضدسرطانی را با غلظت‌های بالای ترکیبات فنولی، به‌ویژه مقدار بسیار زیاد مشتقات کوئرستین[1] و اسیدهای فنولی مرتبط می‌دانند.

گومز و همکاران[۱۷]، نیز نشان دادند که اسیدهای فنولی، از جمله مشتقات اسید گالیک و اسید کافئیک نیز آثار ضدتکثیری را در مقابل سرطان دهانه رحم، سرطان پستان و سرطان خون از خود نشان دادند. علاوه بر این نشان داده شده است که درمان سلول‌های سرطانی پستان (MCF-7 و MAD-MB-231) با اسید کافئیک و اسید کلروژنیک، این ترکیبات از متیلاسیون ناحیه پروموتر در ژن RARb ممانعت می‌کنند. گذشته از این، آثار سینرژیستیک ترکیبات فنلی مختلف موجود در عصاره‌ها نباید نادیده گرفته شود.

همچنین برخی محققان با بررسی مکانیسم‌های اثر آنتی‌اکسیدانی این ترکیبات گزارش کردند که گونه‌های *Crataegus*، به علت دارا بودن ترکیبات فنولی و فلاونوئیدها می‌توانند به‌عنوان پاک‌کنندهٔ گونه‌های فعال اکسیژن عمل کنند و در نهایت می‌توانند دارای آثاری ضد سرطانی باشند. زیرا فلاونوئیدها و ترکیبات فنولی به‌عنوان یکی از مهم‌ترین گروه‌های متابولیت‌های ثانویه با ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی و خصوصیات شلاته‌کننده هستند. تاکنون پژوهش‌های بسیاری در زمینهٔ فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی در گونه‌های مختلف *Crataegus* و مکانیسم عمل آن انجام گرفته است. برای مثال عصاره‌های متانولی و آبی گونه *C. pentagyna* نشان داده شده است که فعالیت‌های پاک‌کنندگی رادیکال آزاد ۲، ۲-دی فنیل-پیکریل‌هیدرازیل (DPPH)، پاک‌کنندگی رادیکال اکسید نیتریک و خاصیت شلاته کننده Fe2+ هستند[۱۸]. ترکیبات اسید کلروژنیک، هایپروسید، روتین، اسپیرائوزید، ایزوکوئرسیتین، کوئرسیتین، (-)-اپی‌کاتچین و پروسیانیدین B2 از جمله ترکیباتی هستند که از عصارهٔ جوانه گل‌گونه *C. azarolus* استخراج شدند و پیشنهاد شده است دارای فعالیت‌های پاک‌کنندگی رادیکال آزاد قوی هستند[۱۹].

نتیجه‌گیری

به‌طور کلی بر اساس نتایج این آزمایش عصارهٔ اتانولی جوانهٔ برگ و گل گیاه *C. melanocarpa* دارای اثر بازدارندگی قوی بر رشد سلول‌های MCF-7 بوده و ازآنجایی‌که سرطان پستان یکی از شایع‌ترین سرطان‌ها در کشور است این گونه می‌تواند به‌عنوان درمانی طبیعی در این زمینه مفید باشد. همچنین این عصاره اثر مهارکنندگی بر رشد سلول‌های سالم خونی نداشت. به نظر می‌رسد که آثار سمیت سلولی دیده شده مربوط به متابولیت‌های ثانویه‌ای است که در این گیاه وجود دارد.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامه دانشجویی برای اخذ درجهٔ کارشناسی ارشد تکوین- سلولی دانشگاه آزاد اسلامی واحد قائم‌شهر با شماره ۱۰۷۳۰۵۱۷۹۲۲۰۲۵ است. بدین‌وسیله از مسئولان و اعضای محترم پژوهش و فناوری دانشگاه، که در این پژوهش همکاری کرده‌اند، سپاسگزاریم.

References

[1]. Parsa N. The cellular and molecular basis of cancer in humans. Journal of Cell and Texture. 2011; 2(4):365-376. [in Persian]
[2]. Yavari P, Mehrabi Y, Pourhoseingoli MA. Awareness and action of women toward breast self-examination: a case-control study. J Ardabil Univ Med Sci. 2006; 5(4):371-7. [in Persian].
[3]. Aghamolaei T, Hasani L, Tavafian SS, Zare S. Improving Breast self-examination: an educational intervention based on health belief model. Iran J Cancer Prev. 2011; 4(2):82-7.
[4]. Harirchi I, Ebrahimi M, Zamani N, Jarvandi S, Montazeri A. Breast cancer in Iran: a review of 903 case records. Public Health. 2000; 114(2):143–145.
[5]. Akbari ME, Mozaffar M, Heidari A, Zirakzadeh H, Akbari A, Akbari M, et al. Recurrence and Survival Effect in Breast Conserving Surgery: What are the Predictive and/or Prognostic Factors? Iran J Cancer Prev. 2011; 4(2):49-54.
[6]. Hacker N. Cervical cancer. In: Berek J, Hacker N. Practical gynecologic oncology. 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2005; 337-386.
[7]. Chi D, Abu-Rustum N, Hoskins W. Cancer of cervix.In: Rock J, Jones H. Telinde's operative gynecology. 9th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2003; 13731444.
[8]. Aynehchi, Y. Pharmacognosy and medicinal plants of Iran. Tehran: University Pub. 1986; 387-91.[in Persian]
[9]. Rodrigues S, Calhelha RC, Barreira JCM, Duenas M, Carvalho AM, Abreu RMV, Santos-Buelga C, Ferreira ICFR Crataegus monogyna buds and fruits phenolic extracts: growth inhibitory activity on human tumour cell lines and chemical characterization by HPLC–DAD–ESI/MS. Food Res Int. 2012; 49: 516–523. doi: 10.1016/j.foodres.2012.07.046
[10]. Lingrong W, Xingbo G, Rui HL, Lijun Y, Arshad MA, Xiong Fu. Phenolic contents and cellular antioxidant activity of Chinese hawthorn "Crataegus pinnatifida". Food chem. 2015; 186: 54-62.
[11]. Kao ES, Wang CJ, Lin WL, Chu CY, Tseng TH. Effects of polyphenols derived from fruit of Crataegus pinnatifida on cell transformation, dermal edema and skin tumor

1. Quercetin

Archive of SID
www.SID.ir

formation by phorbol ester application. Food Chem Toxicol. 2007; 45: 1795-1804.
[12]. Zhang Y, Li HW, Sun JP. Extraction-Separation of total flavone from the fruit of Crataegus pinnatifida and anticancer activities in vitro. Chin. Tradit. Herbal Drugs. 2004; 35: 787–789.
[13]. Min BS, Kim YH, Lee SM, Jung HJ, Lee JS, Na MK, Lee CO, Lee JP, Bae K. Cytotoxic triterpenes from Crataegus pinnatifida. Arch Pharm Res. 2000; 23: 155-158.
[14]. Numata A, Yang P, Takahashi C, Fujiki R, Nabae M, Fujita E. Cytotoxic triterpenes from a Chinese medicine, goreishi. Chem Pharm Bull. 1989; 37: 648–651.
[15]. Matsukawa Y, Marui N, Sakai T, Satomi Y, Yoshida M, Matsumoto K, Nishino H, Aoike A. Genistein arrests cell cycle progression at G2-M. Cancer Res. 1993; 53:1328–1331. [PubMed: 8443813]
[16]. Ramful D, Aumjaud B, Neergheen VS, Soobrattee MA, Googoolye K, Aruoma OI, Bahorun T. Polyphenolic content and antioxidant activity of Eugenia pollicina leaf extract in vitro and in model emulsion systems. Food Res. Int. 2011; 44: 1190-1196.
[17]. Gomes CA, Cruz TG, Andrade JL, Milhazes N, Borges F, Marques MPM. Anticancer Activity of Phenolic Acids of Natural or Synthetic Origin: A Structure-Activity Study. J Med Chem. 2003;46: 5395-5401
[18]. Ebrahimzadeh M.A, Bahramian F, Antioxidant activity of Crataegus pentaegyna subsp. elburensis fruits extracts used in traditional medicine in Iran. Pakistan J Biol Sci. 2009; 12(5): 413–419.
[19]. Bahri-Sahloul R, Ammar S, Fredj RB, Saguem S, Grec S, Trotin F, Skhiri FH. Polyphenol contents and antioxidant activities of extracts from flowers of two Crataegus azarolus L. varieties. Pakistan J Biol Sci. 2009; 12(9): 660-668.

.

Archive of SID

www.SID.ir

The cytotoxic effects of ethanolic extract of leaf and flower buds of *Crataegus melanocarpa* on human breast (MCF-7) and cervical (HeLa) cancer cell line

Mahmoud Alipour[1], Farkhondeh Nemati[2*]

1. Department of Biology, Biology Teacher of Qaemshahr Education Office, Qaemshahr, Iran
2. Assistant Professor in Animal Physiology, Department of Biology, Qaemshahr Branch, Islamic Azad University, Qaemshahr, Iran

Abstract

Background & Objectives In the last few decades, researches hane been focused on the use of natural products for cancer therapy, such as crude plant extracts or some of different plant secondary metabolits. The objective of this study was to examine the invitro cytotoxic activities of crude ethanolic extract of leaf and flower buds of *Crataegus melanocarpa*, on human MCF-7 and HeLa cell lines, with different concentrations, by Dye exclusion and Micro culture tetrazolium test (MTT) assay.

Materials & Methods The optical density (OD) colored solution was quantified at 570 nm wavelengths by an ELISA Reader, after 24, 48 and 72 h incubation. The results showed that ethanolic extracts.

Results After 48h incubation, at in 5 and 10 mg/ml suppressed the proliferation of cancerous MCF-7 cells by significant difference with control group (p<0.05). Also, after 72h incubation, concentrations of 0.156 mg/ml and upper doses had significant different with control group; and maximum inhibitory effects were showed at 10 mg/ml (86.14%). Results showed that the *C. melanocarpa* extracts suppressed dose dependently the proliferation of MCF-7 cells. Also, results showed that cytotoxic effects of *C. melanocarpa* extracts on Hela cell line is very low, and in 10 mg/ml concentrating, after 72h incubation, suppressed the proliferation of cancerous MCF-7 cells by significant diffrence with control group (p<0.05). Maximum inhibitory effects were found at 10 mg/ml (23.14%).

Conclusion Finally, this study emphasizes C. *melanocarpa* to be employed in new cancer therapeutic drugs and provide the basis for future research on the various species of this genus.

Received: 2016/09/07
Accepted: 2018/07/08

Keywords: *C. melanocarpa*, cytotoxity, ethanol extract, HeLa cell line, MCF-7 cell line.

Archive of SID

www.SID.ir