Archive of SID

اثرات عصاره آبی و اتانولی گل محمدی (*Rosa damascena mill* L.) بر علیه سلولهای سرطانی معده انسان

کتایون میمندی و محمدمهدی یعقوبی*

کرمان، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته کرمان، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، گروه بیوتکنولوژی

تاریخ دریافت: ۹۳/۶/۸ تاریخ پذیرش: ۹۳/۱۲/۹

چکیده

سرطان معده یکی از عوامل مهم بیماری و مرگ و میر در جهان است. گونه‌های گیاهی منحصر به فرد زیادی وجود دارد که برای یافتن ترکیبات ضد سرطانی باید مطالعه شوند. هدف در این تحقیق، بررسی خاصیت ضد سرطانی عصاره اتانولی و آبی گل محمدی بر رده سلولهای سرطانی معده انسان (**AGS**) می باشد. لذا بررسی بر روی هشت غلظت متفاوت از عصاره‌ها به همراه داروی ۵- فلورواوراسیل بر روی رده سلولی سرطان معده انجام گرفت. سمّیت عصاره‌ها با آزمون MTT و اثر عصاره‌ها بر تکثیر سلولی با سنجش مصرف BrdU بررسی گردید و روش TUNEL برای اندازه‌گیری مرگ آپوپتوزی سلول به‌کار رفت. از نتایج برآمده عصاره آبی و عصاره اتانولی گل محمدی بقای سلولهای سرطانی به‌طور معنی‌داری کاهش می‌یابد. شاخص IC_{50} برای این دو عصاره روی سلول AGS به ترتیب ۳/۸۸۷ و ۲/۵۱۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر به دست آمد. نتایج روش میزان مصرف BrdU نشان داد هر دو عصاره آبی و اتانولی سبب کاهش معنی‌دار تکثیر سلولهای سرطان معده (نسبت به سلول فیبروبلاست) می‌شوند. با افزایش غلظت هر دو عصاره میزان تکثیر نیز کاهش می‌یابد. همچنین اثر کشندگی و مهاری عصاره اتانولی بیشتر از عصاره آبی است. میزان بروز مرگ آپوپتوزی ناشی از افزودن هر دو عصاره آبی و اتانولی روی سلولهای سرطانی ۹۰ درصد برآورد گردید. در نتیجه عصاره آبی و اتانولی گل محمدی از طرق مختلف باعث کاهش بقاء و تکثیر و القای مرگ در سلول سرطانی معده انسان می‌شود.

واژه های کلیدی: سلول سرطان معده، عصاره آبی و اتانولی، گل محمدی، آپوپتوز، سمّیت

* نویسنده مسئول، تلفن:۰۳۴۳۳۷۷۶۶۱۰ ، پست الکترونیکی: m.yaghoobi@kgut.ac.ir

مقدمه

در بسیاری از کشورهای دنیا سرطان دومین عامل عمده مرگ و میر بعد از بیماریهای قلبی عروقی است. سرطان معده چهارمین سرطان رایج در جهان و با نرخ بالای مرگ و میر هفت صد هزار نفر در سال، بعد از سرطان ریه دومین عامل اصلی مرگهای سرطانی است(۲۵). مشکلات فعلی در استفاده از شیمی درمانی و پرتو درمانی و عوارض جانبی متعددی که در اثر استفاده از آنها برای بیمار ایجاد می‌شود و همچنین مقاومت سلولهای سرطانی به درمانهای رایج، سبب شده است محققین رو به سوی داروهای جدید با اثر بیشتر و سمّیت کمتر بیاورند. طبیعت منبعی شگفت انگیز از ترکیبات مناسب دارویی جدید با تنوع شیمیایی بسیار زیاد است که در میلیونها گونه گیاهی، جانوری، جانداران دریایی و میکروارگانیسم‌ها یافت می‌شود(۶ و ۱۶). متابولیتهای ثانویه موجود در گیاهان از جمله این ترکیبات هستند که بسیاری از آنها هنوز ناشناخته هستند. ترکیبات گیاهی که خاصیت ضد سرطانی و ضد توموری دارند در گروههای شیمیایی آلدهیدها، آلکالوئیدها، فلاوونوئیدها، گلیکوزیدها، ترپنوئیدها و ترکیبات فنلی قرار

www.SID.ir

Archive of SID

می‌گیرند(۱، ۱۱ و۲۶). قابل توجه است که هم اکنون بیش از ۶۰ درصد داروهای رایج ضد سرطانی از منابع طبیعی شامل گیاهان، جانداران دریایی و میکروارگانیسم‌ها مشتق شده‌اند(۱۶).

گل محمدی با نام علمی *Rosa damascena mill L.* از خانواده رزاسه می‌باشد. نام انگلیسی آن پرشیا رز (Persia Rose) است و عموماً به داماسک رز (Damask rose) معروف می‌باشد. این گیاه هیبریدی از *Rosa gallica L.* و *Rosa moschata Herrm.* است(۱۷ و ۲۳). گل محمدی، گل ملی ایران، بومی خاورمیانه و یکی از فراوان‌ترین گلها در ایران می‌باشد و چون بسیار مقاوم به خشکی است، هم به صورت طبیعی و هم زراعی در بسیاری از نقاط ایران می‌روید. مناطق تولید عمده آن در ایران، کاشان، فارس، آذربایجان و کرمان هستند(۳). ترکیبات مختلفی از گلها، گلبرگها و میوه‌های گل محمدی شامل ترپنها، گلیکوزیدها، فلاونوئیدها و آنتوسیانینها جدا شده است. این گیاه همچنین حاوی کربوکسیلیک اسید، میرسن، ویتامینC، کامپفرول و کوئرستین است(۳ و ۱۲). خواص دارویی خانواده رزاسه عمدتاً به فراوانی ترکیبات فنولی آنها نسبت داده می‌شود. ترکیبات فنولی خواص دارویی زیادی مثل آنتی‌اکسیدانت، از بین برنده رادیکالهای آزاد، ضد التهاب، ضد جهش و ضد افسردگی را دارند(۳). آنتی‌اکسیدانتهای گیاهی در پیشگیری از سرطان و کشندگی انتخابی سلولهای سرطانی از طرق مختلف مانند القای آپوپتوز، جلوگیری از رگ‌زایی و رشد متاستاتیک سرطان نقش دارند (۲، ۵، ۹، ۱۱، ۱۳، ۲۶ و ۲۷). در طب سنتی ایرانی برگهای رز به عنوان صفرابَر و ملیّن استفاده می‌شوند. همچنین برای درمان درد قفسه سینه شکمی، تقویت قلب، درمان خونریزی قاعدگی و ناراحتیهای گوارشی توصیه می‌شود. گل محمدی اثرات ضد باکتریایی قوی علیه انواع زیادی از باکتریها شامل آئروموناس، باسیلوس، انتروباکتر، انتروکوکوس، اشریشیا، کلبسیلا، مایکوباکتریوم، پروتئوس، سالمونلا، سودوموناس، استافیلوکوکوس و یرسینیا دارد(۱۷). ترکیبات جدا شده از عصاره آبی و متانولی گل محمدی شامل کامپفرول و کوئرستین اثر ضد ویروس نقص ایمنی اکتسابی انسان دارند(۱۴). همچنین اخیراً گزارش شده که بخش غیر محلول اسانس گل محمدی باعث کاهش تکثیر سلول سرطانی روده بزرگ انسان می شود(۱۹). با توجه به خواص زیاد دارویی گل محمدی که بخشی از آن در بالا ذکر گردید و وجود ترکیبات فنولی، ترپنها، گلیکوزیدها، فلاونوئیدها و آنتی اکسیدانتها در آن، مطالعه اثرات احتمالی ضد سرطانی این گیاه ضروری به نظر می‌رسد. از طرف دیگر در زمینه خواص ضد سرطانی عصاره گل محمدی با توجه به فراوانی آن در ایران، مطالعه منتشر شده‌ای دیده نشد و لذا این گیاه برای مطالعه و بررسی انتخاب شد. در این تحقیق اثر عصاره‌های آبی و اتانولی گل محمدی روی رشد و مرگ و میر سلول سرطان معده بررسی شد.

مواد و روشها

جمع آوری نمونه‌ها: گلهای محمدی از شهرستان بردسیر(۲۹/۶۵ درجه شمالی و ۵۶/۷۵ درجه شرقی) استان کرمان جمع‌آوری و توسط آقای دکتر سید محمدعلی وکیلی شهربابکی تأیید شد. گیاه فوق با شماره ۱۲۷۵ در هرباریوم دانشگاه شهید باهنر کرمان، کلکسیون آقای دکتر سید منصور میرتاج الدینی نگهداری می شود. گلها تا زمان انتقال به آزمایشگاه در یخ خشک نگهداری و پس از انتقال به آزمایشگاه تا زمان استفاده در فریزر ۸۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

تهیه عصاره آبی: حدود ۴۰ گرم از گلبرگهای گل محمدی در هاون چینی و با کمک نیتروژن مایع آسیاب شدند.۸۰ میلی‌لیتر آب مقطر به آن افزوده شد، سپس نمونه‌ها به مدت ۴۸ ساعت در شیکر با دمای ۴ درجه سانتی گراد و دور از نور برای نفوذ حلال قرار داده شدند. پس از این مدت نمونه‌ها به مدت ده دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد در دور ۱۲۰۰۰ بر ابر شتاب جاذبه زمین سانتریفیوژ شدند.

www.SID.ir

Archive of SID

محلول رویی حاصل در دستگاه فریزدرایر به صورت پودر خشک شد و برای استفاده در مراحل بعدی آزمایش دور از نور و در فریزر ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد(۴).

تهیه عصاره اتانولی: ۲۰۰ گرم از گلها به روش ذکر شده در بالا آسیاب و ۴۰۰ میلی‌لیتر اتانول اضافه شد. سپس به مدت ۴۸ ساعت در شیکر با دمای ۴ درجه سانتی گراد و دور از نور برای نفوذ حلال قرار داده شدند. بعد از این مدت محلول رویی با کاغذ واتمن شماره ۱ و پمپ خلأ فیلتر شد. محلول حاصل در دستگاه روتاری تغلیظ شده و باقیمانده حلال نیز با قرار دادن در معرض هوا تبخیر شد. عصاره حاصل برای استفاده در مراحل بعدی آزمایش در فریزر ۲۰- درجه سانتی گراد و دور از نور نگهداری شد(۴).

تهیه رده‌های سلولی و کشت آنها: رده سلولی فیبروبلاست ماهیچه انسان (HSkMC) به عنوان سلول شاهد و رده سلولی آدنوکارسینومای سرطان معده انسان (AGS) از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه گردید.

کلیه مراحل کشت سلول در شرایط استریل و در زیر هود لامینار در اتاق کشت سلول انجام شد. سلولها در فلاسکهای کشت سلولی ۲۵ سانتیمترمربع و در محیط کشت حاوی ۵ میلی‌لیتر از محیط کشت RPMI1640، حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاو (FBS)، ۵۰µg/ml آنتی-بیوتیک استرپتومایسین، ۵۰U/ml پنی سیلین و ۲µg/ml آمفوتریسینB در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و ۵ CO_2 درصد کشت داده شدند. وضعیت سلولها هر روز زیر میکروسکوپ معکوس مشاهده شده و سلولهای در مرحله رشد لگاریتمی در محیط انجماد (شامل محیط کشت به اضافه ۲۰ درصد سرم جنین گاو و ۱۰ درصد DMSO) منجمد شده و در ازت مایع نگهداری شدند.

سنجش سمّیت عصاره گیاهی روی سلولها به روش رنگ آمیزیMTT : تعداد ۵۰۰۰ سلول AGS در چهار ردیف افقی از چاهکهای پلیت ۹۶ خانه کف صاف با ۵۰µl محیط، کشت داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور با همان شرایط نگهداری شدند. ردیف بالا، پایین، چپ و راست به عنوان بلانک بدون سلول خالی نگه داشته شد. هفت غلظت متفاوت از عصاره آبی (۰/۳، ۰/۶، ۱/۲، ۱/۸، ۲/۴، ۳/۶، و ۴/۲) و هفت غلظت از عصاره اتانولی (۰/۲، ۰/۴، ۰/۸، ۱/۲، ۱/۶، ۲، ۲/۴ و ۲/۸) برحسب میکروگرم در میلی‌لیتر در حجم نهایی حداکثر ۵ میکرولیتر، غلظت صفر برای شاهد بدون عصاره و غلظت ۲/۶µg/ml داروی رایج ۵-فلورواوراسیل (نزدیک به IC_{50} این دارو برای سلول سرطان معده) روی هریک از ستونهای پلیت ۹۶ خانه به مدت ۴۸ ساعت اثر داده شد(۲۴). سپس با کیت Cell Proliferation Kit (MTT, 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl) طبق روش شرکت سازنده (Roche applied science ,Germany) آزمون MTT انجام شد. ابتدا ۵ میکرولیتر از معرف MTT به هر چاهک اضافه شده و پس از ۴ ساعت ۵۰ میکرولیتر حلال اضافه شد. پلیتها در روز بعد با روش اسپکتروفتومتری و با دستگاه الایزاریدر مدلELX808 (شرکت BioTek) در طول موجهای ۴۹۰nm و ۶۸۰nm (طول موج مبنا) خوانده شدند.

بررسی میزان اثر عصاره گیاهی بر تکثیر سلول با استفاده ازBrdU : تعداد ۵۰۰۰ سلول فیبروبلاست و سرطان معده در چهار ردیف از چاهک پلیت ۹۶ خانه کف صاف با حجم ۵۰µl از محیط کشت، کشت داده شده و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور نگهداری شدند. سپس هفت غلظت از عصاره‌های آبی و اتانولی در همان غلظتهایی که در روش MTT به‌کار رفت، به سلولها افزوده شد و به مدت ۴۸ ساعت در همان شرایط قرار گرفتند. غلظت صفر از عصاره برای شاهد بدون عصاره و غلظت ۲/۶µg/ml داروی رایج ۵-فلورواوراسیل نیز به کار رفت. بعد از این مدت با استفاده از کیت Cell Proliferation ELISA, BrdU kit طبق دستور شرکت سازنده ,Roche applied science)

www.SID.ir

Archive of SID

Germany) آزمون BrdU(5-bromo-2'-deoxyuridine) انجام شد. ابتدا ۵ میکرولیتر از محلول BrdU به هر چاهک افزوده شده و سه ساعت بعد محیط فوق برداشته شده و ۱۰۰ میکرولیتر محلول FixDenat به هر چاهک ریخته شد. ۳۰ دقیقه بعد این محلول نیز برداشته شده و ۵۰ میکرولیتر محلول آنتی بادی BrdU به هر چاهک ریخته شد. پس از ۹۰ دقیقه آنتی بادی نیز برداشته شده و چاهکها سه بار با بافر نمکی فسفات شسته شد. آنگاه ۵۰ میکرولیتر محلول سوبسترا به هر چاهک ریخته شد.۲۰ دقیقه بعد پلیتها توسط دستگاه الایزاریدر مدلELX808 (شرکت BioTek) در طول موج ۳۷۰nm و طول موج مبنای ۴۹۰nm خوانده شدند. از سلولهای فیبروبلاست به عنوان سلول طبیعی شاهد استفاده شد.

بررسی اثر عصاره در القای مرگ سلولی آپوپتوز به روش TUNEL : سلولهای AGS روی لامل و در پلیتهای ۶ خانه در انکوباتور با همان شرایط کشت داده شدند. پس از رسیدن به رشد حدود ۶۰ درصد ، میزان ۱/۶µg/ml از عصاره اتانولی و ۲/۴µg/ml از عصاره آبی به سلولها اضافه شد و پلیتها به انکوباتور منتقل شدند. این غلظت از وسط محدوده غلظتی مورد استفاده در آزمایشهای سنجش MTT و BrdU انتخاب شد. بعد از گذشت ۲۴ ساعت با کیت *In situ* cell death detection TMR Red طبق دستور شرکت سازنده (Roche applied science, Germany) روش TUNEL انجام شد. در نمونه کنترل منفی آنزیم ترمینال ترانسفراز حذف شد و در نمونه کنترل مثبت از آنزیم DNase I برای ایجاد شکستگی در DNA سلول استفاده شد. برای محاسبه درصد آپوپتوز، از سلولها در طول موج ۵۹۰ نانومتر با میکروسکوپ فلورسانس (Axioplan 2, Zeiss) عکس‌برداری و سلولهای رنگ گرفته و رنگ نگرفته در ۵ میدان تصادفی شمارش و درصد آپوپتوز محاسبه شد. به جهت مقایسه در همان میدان با میکروسکوپ نوری معمولی هم از سلولها عکس‌برداری شد.

روشهای آماری: آزمایش برای روش MTT و BrdU در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با ۴ تکرار انجام شد و نتایج به ترتیب به صورت درصد زنده ماندن (viability) و میزان جذب برآورد شد. در روش TUNEL میزان آپوپتوز بر اساس درصد از طریق شمارش سلولی برآورد شد. ۵۰ درصد سمیت سلولی (IC_{50}) با استفاده از نرم‌افزار plus ED_{50} V1.0 (INER,V1.0) محاسبه شد. تجزیه واریانس داده‌های حاصل از این آزمون به صورت تجزیه واریانس (ANOVA) و مقایسه میانگین در طرح پایه کاملاً تصادفی (CRD) با استفاده از نرم‌افزار SAS مورد بررسی قرار گرفتند. مقایسه میانگین تیمارها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد، مقایسه میانگین تیمارها با تیمار کنترل نیز با استفاده از آزمون دانت در سطح احتمال ۵ درصد مورد بررسی قرار گرفت.

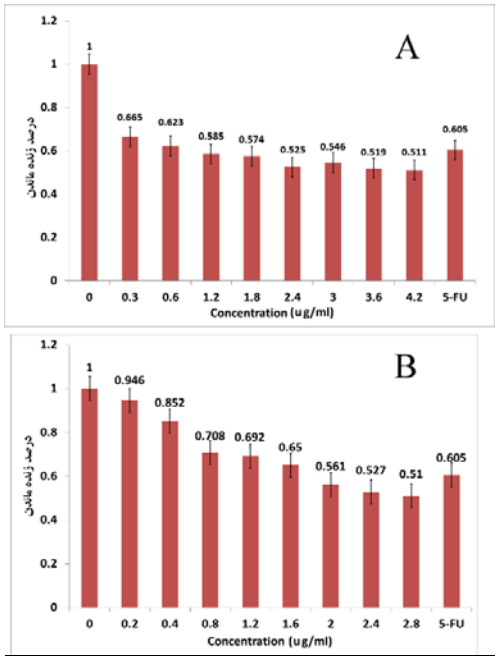
نتایج

برای بررسی اثر کشندگی عصاره روی سلولهای سرطان معده، غلظتهای ۰/۳ تا ۴/۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره آبی و غلظتهای ۰/۲ تا ۲/۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره اتانولی بر سلولهای سرطان معده اثر داده شد و اثر آنها با روش MTT بررسی شد. نتیجه نشان داد تمام غلظتهای عصاره آبی و عصاره اتانولی گل محمدی بقای سلولهای سرطانی را به طور معنی‌داری کاهش می‌دهند (P<%5) (شکل-۱). شاخص IC_{50} برای این دو عصاره روی سلول AGS به ترتیب ۳/۸۸۷ و ۲/۵۱۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر به دست آمد. نتایج حاکی از آن است که اثر کشندگی عصاره اتانولی بیشتر از عصاره آبی است. چرا که IC_{50} آن کمتر است و داده‌های شکل-۱ نشان می‌دهد که عصاره اتانولی در غلظت کمتری (نسبت به عصاره آبی) حدود نیمی از سلولها را کشته است. همچنین نتایج نشان داد که اثر کشندگی غلظتهای بالای هر دو عصاره از داروی ۵-فلوروییوراسیل قدری بیشتر است. درصد زنده مانی سلولها

www.SID.ir

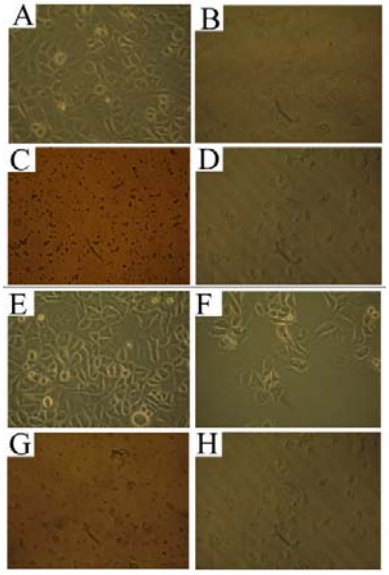
Archive of SID

در حضور دارو حدود ۶۰ درصد و در حضور بالاترین غلظت از هر دو عصاره حدود ۵۱ درصد است. (شکل-۱).



شکل-۱ درصد زنده ماندن سلولهای سرطان معده (AGS) تحت تیمار عصاره آبی (A) و اتانولی (B) گل محمدی در آزمایش سنجش MTT. سلولها به مدت ۴۸ ساعت با غلظتهای مشخص شده از عصاره تیمار شده و سپس با روش MTT سنجش انجام شد. داده‌ها به صورت میانگین چهار نمونه مختلف ارائه شده‌اند.

مشاهده تغییرات مورفولوژیک سلولها پس از دو روز تیمار با غلظتهای مختلف عصاره نیز یافته‌های آزمایش سنجش با MTT را تأیید نمود. با افزودن عصاره‌ها به ویژه در غلظتهای بالا سلولهای تغییر شکل داده و جدا شده از سطح و همچنین برخی لاشه‌های سلولی که دلالت بر سمّی بودن عصاره و وقوع مرگ سلول دارد به خوبی مشاهده می‌شد. این در حالی است که در نمونه کنترل (عدم تیمار با عصاره) چنین تغییراتی مشاهده نمی‌شد. همچنین اثرات داروی ۵-فلوروییوراسیل روی ظاهر سلولها کمتر از عصاره بود (شکل-۲). به جهت رعایت اختصار، تنها تصویر اثر دو غلظت از هشت غلظت به کار رفته از عصاره‌ها روی سلول نشان داده شده است.



شکل-۲ تغییرات ریخت‌شناسی سلولهای سرطان معده تحت تأثیر غلظتهای مختلف عصاره آبی (A و B و C) و عصاره اتانولی (E و F و G) گل محمدی به مدت ۴۸ ساعت (بزرگنمایی X ۳۲۰) :(A)شاهد، (B)غلظت ۰/۶µg/ml، (C) غلظت ۳µg/ml عصاره آبی گل محمدی، (D)۵-فلوروواوراسیل ۲/۶µg/ml، (E) شاهد، (F)غلظت ۰/۸µg/ml،(G) غلظت µg/ml ۲/۸عصاره اتانولی گل محمدی،(H) ۵-فلوروواوراسیل ۲/۶µg/ml.

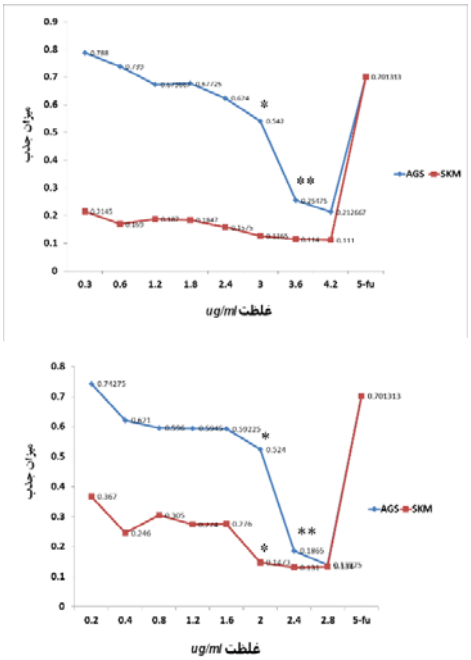
در بخش بعد، برای بررسی میزان تکثیر سلولها در حضور غلظتهای مختلف عصاره، میزان سنتز DNA که نشان دهنده میزان تکثیر سلول است به روش محاسبه میزان مصرف BrdU اندازه گیری شد. در این بخش نیز سلولهای در حال رشد AGS و HSkMC به مدت ۴۸ ساعت در معرض همان غلظتهایی از عصاره که در بخش قبل به‌کار رفت قرار گرفتند و میزان مصرف BrdU محاسبه شد. نتایج نشان داد هر دو عصاره آبی و اتانولی سبب کاهش معنی‌دار تکثیر سلولهای سرطان معده در مقایسه با گروه کنترل می‌شوند (P<%5). با افزایش غلظت هر دو عصاره میزان تکثیر نیز کاهش می‌یابد. اما میزان کاهش در غلظتهای بالاتر عصاره اتانولی بیشتر از عصاره آبی است (شکل-۳).

همچنین میزان تکثیر سلولهای فیبروبلاست در حالت عادی (عدم تیمار با عصاره) کمتر از سلول سرطانی است. اثر هر دو عصاره روی تکثیر سلول فیبروبلاست نیز کمتر از سلول

www.SID.ir

Archive of SID

سرطانی است و با افزایش غلظت عصاره آبی کاهش تکثیر فیبروبلاست معنی‌دار نمی‌باشد. اما افزایش غلظت عصاره اتانولی اثر مهارکنندگی بیشتری روی تکثیر سلولهای سرطانی دارد. علاوه بر این نتایج نشان می‌دهد که اثر هر دو عصاره از داروی ۵-فلورویوراسیل بیشتر بوده و اثر این دارو معادل کمترین غلظتهای عصاره آبی(حدود ۰/۶ میکروگرم بر میلی لیتر) یا اتانولی (حدود ۰/۳ میکروگرم بر میلی لیتر) است (شکل-۳).



شکل-۳ منحنی اثر غلظتهای مختلف عصاره آبی (بالا) و عصاره اتانولی (پایین) گل محمدی روی تکثیر سلولهای سرطان معده(AGS) و سلول فیبروبلاست(HSkMC) پس از ۴۸ ساعت. داده‌ها حاصل چهار تکرار بوده و به صورت میزان جذب BrdU در سلولهای سرطانی معده و سلول شاهد فیبروبلاست ارائه شده‌اند.

در انتها، برای بررسی نحوه کشندگی عصاره و نوع مرگ و میر از روشTUNEL که به طور اختصاصی سلولهای در حال آپوپتوز را شناسایی می‌کند استفاده شد. سلولهای سرطان معده به مدت ۲۴ ساعت در معرض غلظتهای ذکر شده از عصاره‌های آبی و اتانولی گل محمدی قرار گرفته و رنگ‌آمیزی شدند (شکل -۴). سیگنال فلورسانس قرمز که نشان دهنده قطعه قطعه شدن DNA ناشی از وقوع آپوپتوز است در نمونه تیمار شده با عصاره کاملاً مشهود است. این درحالی است که در نمونه کنترل که با عصاره تیمار نشده بود هیچ سیگنال فلورسانسی مشاهده نشد (به جهت سیاه بودن کامل، تصویر نمونه کنترل نشان داده نشده است).

میزان بروز آپوپتوز با هر دو عصاره آبی (۲/۴µg/ml) و اتانولی (۱/۶µg/ml) گل محمدی در سلولهای سرطان معده ۹۰ درصد برآورد شد.

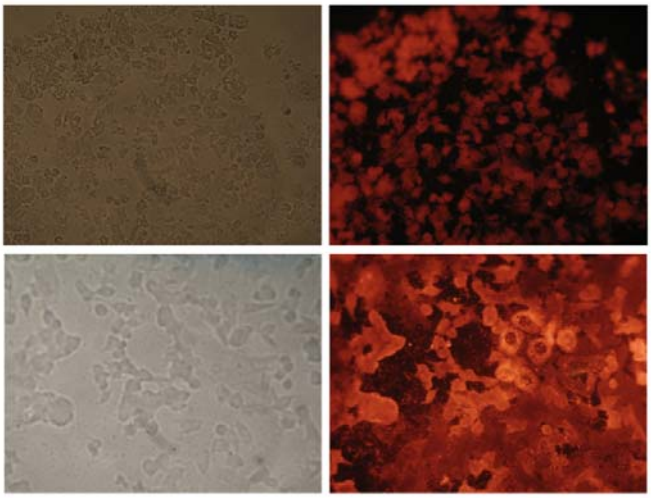
بحث

گیاهان دارویی و خوراکی به عنوان منبع ناشناخته‌ای از ترکیبات و متابولیتهای ثانویه هستند که پتانسیل شناسایی ترکیبات مختلف در آنها همیشه وجود دارد. مطالعه چندانی روی اثرات ضد سرطانی ترکیبات گل محمدی انجام نشده است. هدف از انجام این طرح بررسی اثر دو عصاره آبی و اتانولی گل محمدی روی رشد و تکثیر و یا القای مرگ در سلولهای سرطان معده بود. تستهای مختلف سنجش سمّیت به روش MTT، سنجش میزان تکثیر به روش BrdU و سنجش مرگ آپوپتوزی به روش TUNEL هر سه نشان دهنده این بود که هم عصاره آبی و هم عصاره اتانولی این گیاه ایجاد سمّیت برای سلول نموده، مانع تکثیر آن می شود و مرگ آپوپتوزی را هم به راه می‌اندازد (شکلهای ۱ تا ۴). نتایج حاکی از آن بود که سمّیت و اثر ضد تکثیری هر دو عصاره در برخی غلظتها از اثر داروی رایج ضد سرطان (۵- فلورویوراسیل) در غلظت ثابت ۲/۶µg/ml هم بیشتر بود (شکل۱ و ۲). البته چون عصاره حاوی چندین و شاید دهها ماده مختلف است اثر تَجَمّعی آنها می‌تواند نسبت به اثر یک داروی منفرد بیشتر باشد. همچنین غلظت به‌کار رفته از دارو و عصاره در میزان اثر آنها تأثیرگذار است. در این طرح تنها یک غلظت از داروی ۵-فلورویوراسیل به عنوان شاهد به کار رفته است و در این تحقیق هدف آن نبود که رگرسیون غلظتهای مختلف دارو و غلظتهای مختلف عصاره با هم مقایسه شود. چه بسا عصاره در غلظتهای کمتر یا بیشتر از آنچه در این تحقیق

www.SID.ir

Archive of SID

استفاده شد اثرات متفاوت و غیر منتظره‌ای داشته باشد.



شکل ۴ – بررسی آپوپتوز در سلول‌های سرطان معده به روش TUNEL. سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت تحت تأثیر غلظت ۲/۴µg/ml عصاره آبی (بالا) و ۱/۶µg/ml عصاره اتانولی (پایین) قرار گرفته و سپس با کیت In situ cell death detection رنگ‌آمیزی شدند. تصویر سمت چپ توسط میکروسکوپ نوری عکس‌برداری شده و تصویر سمت راست همان میدان زیر میکروسکوپ فلورسانس است.

بررسی میزان تکثیر دو سلول فیبروبلاست و سرطان معده در حضور عصاره‌ها نشان داد که میزان مصرفBrdU که نشان دهنده میزان سنتز DNA و تکثیر سلول است، در سلول سرطانی بیشتر از سلول طبیعی فیبروبلاست است. این نتیجه کاملاً قابل انتظار بود چرا که ویژگی سلولهای سرطانی تکثیر بی‌رویه و خارج از کنترل آنها می‌باشد. یافته جالب و کاربردی دیگر آن بود که تحت تأثیر هر دو عصاره آبی و اتانولی تکثیر سلول سرطانی بیشتر از سلول فیبروبلاست مهار می‌شود (شکل-۳). به عبارت دیگر عصاره روی سلول سرطانی اثری مهاری بیشتری دارد تا سلول طبیعی. این یافته به جهت کاربردی اهمیت دارد، چرا که اثر اختصاصی داروها روی سلولهای سرطانی یک مزیّت برای آنها محسوب می‌شود. شاید ترکیباتی که در عصاره گیاه گل محمدی حضور دارند به طور اختصاصی مهارکننده آنزیمها و پروتئینهایی هستند که در سلول سرطانی فعالیت غیرعادی دارند و تکثیر بی رویه آن را موجب می‌شوند. ضمیری اخلاقی و همکاران در سال ۲۰۱۱ عصاره اتانولی گل محمدی را روی سلول سرطانی Hela اثر داده و میزان زنده مانی سلول را پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به روش MTT سنجیدند(۲۹). اختلاف در زنده مانی سلول پس از ۷۲ ساعت به طور مشهودی معنی دار بود. البته آنها سلول طبیعی مانند فیبروبلاست را در کنار سلول سرطانی بررسی نکردند. همچنین فقط به تست MTT بسنده نمودند. در حالی که در این تحقیق روشهای BrdU و TUNEL نیز به کار رفت.

یافته دیگر این مطالعه آن بود که در همه تستهای به‌کار رفته اثر عصاره اتانولی نسبت به عصاره آبی بیشتر بود. البته در کنار همه آزمایشها اثر حلال به تنهایی (اتانول) نیز بررسی شد که به جهت رعایت اختصار داده‌های آن حذف شده است. بنابراین سمّیت و اثر مهاری و کشندگی عصاره اتانولی به خاطر ترکیبات موجود در آن است نه خود حلال. از آنجا که ترکیبات و متابولیتهای ثانویه زیادی در گیاهان و از جمله گل محمدی وجود دارد، میزان حل شدن این ترکیبات در دو حلال آب و اتانول متفاوت است(۲۶). لذا نوع ترکیباتی که در حلال اتانول حل می‌شوند اثر سمّی و مهاری بیشتری روی سلول سرطانی دارند تا موادی که در عصاره آبی حضور دارند. شناسایی اجزای موجود در عصاره و اسانس گل محمدی و بررسی اثر ترکیبات منفرد

www.SID.ir

Archive of SID

و خالص می‌تواند به شناسایی ترکیبات خاصی که اثرات فوق‌الذکر را دارند منجر شود. این ترکیبات ممکن است چرخه سلولی را مهار کرده و یا چک‌پوینت‌های آنرا فعال کنند، جلوی همانندسازی DNA را بگیرند و خاصیت ضد اکسیدانتی داشته باشند و یا مسیر داخلی یا خارجی آپوپتوز را به راه اندازند.

مطالعات قبلی نشان می‌دهد گیاه گل محمدی حاوی کربوکسیلیک اسید، ترپن، میرسن، ویتامینC و ترکیبات فنولی است(۳ و ۲۷). ترکیبات آنتی‌اکسیدانتی مثل فنولیک-اسیدها، پلی‌فنولها و فلاونوئیدها، رادیکالهای آزادی مثل پراکسید، هیدروپراکسید، یا لیپیدپروکسیل را جمع‌آوری می‌کنند و مانع از بروز فرآیندهای اکسیداتیو که منجر به آسیب به ژنوم و بروز جهش می‌شوند، می‌گردند. فلاونوئیدها به طور عمده‌ای فرآیندهای ایمنی و سلولی مرتبط با گسترش و پیشرفت سرطان را تحت تأثیر قرار می‌دهند. این ترکیبات انواع وقایع بیولوژیکی مرتبط با گسترش و پیشرفت سرطان مثل تکثیر سلولی، آپوپتوز، تمایز سلولی و ایجاد رگهای جدید را مانع می‌شوند (۵ و ۱۱). کوئرستین و کامپفرول موجود در گل محمدی دو تا از ترکیبات مهم فنلی هستند. اثرات آنتی‌اکسیدانت، اتصال به گیرنده اریل هیدروکربن (AhR) و واکنش با سیستمهای پیام رسان درون سلولی و تغییر مسیرهای پیام رسان جانبی به عنوان مکانیسمهای واسطه اثرات ضد سرطانی ترکیبات پلی فنول همانند کوئرستین و کامپفرول پیشنهاد شده‌اند(۵). تعدادی از آنتی اکسیدانتهای پلی فنولیک با سیستم تولید کننده نیتریک اکسید سینتاز(NOS) واکنش می‌دهند. نیتریک اکسید (NO) می‌تواند آپوپتوز را در بعضی سلولها شروع کند، در حالی که در برخی از سلولها مانع آپوپتوز می‌شود. این پیچیدگی در اثر، نتیجه میزان تولید NO و واکنش متقابل آن با مولکولهایی مثل یونهای فلزی، تیول، تیروزین و انواع اکسیژن واکنش‌گر است. NO با القای تمایز و کاهش گسترش متاستاتیک رده‌های مختلف سلولهای سرطانی، مانع تکثیر سلولی می‌شود(۲۲).

فلاونوئیدهای پلی‌هیدروکسیله شده و کوئرستین رشد رده-های سلولی بدخیم سرطان معده انسانی در شرایط آزمایشگاه را مهار کرده، میزان ساخت DNA را به ۱۴ درصد گروه کنترل کاهش دادند و مانع عبور سلول از مرحله G_1 چرخه سلول به مرحله S شده‌اند(۲۸). در بین مراحل چرخه سلولی، مرحله G_1 محل اصلی کنترل تکثیر سلول جانوری است و تفاوت مهم بین سلولهای طبیعی و تومورهای بدخیم بستگی به این مرحله دارد. لذا هر ترکیبی که بتواند عبور از مرحله G_1 به S را مانع شود می تواند کاندیدای بالقوه ای در کنترل رشد تومورهای سرطانی باشد. همچنین کوئرستین از فعالیت آنزیمهای توپوایزومراز یک و دو جلوگیری می‌کند در حالی که کامپفرول فقط مانع فعالیت آنزیم توپوایزومراز دو می‌شود(۱۵).

گزارشهای دیگری نشان می‌دهد که کوئرستین فعالیت ضد سرطانی خود را با القای آپوپتوز که ناشی از توقف چرخه سلولی است، بروز می‌دهد(۷، ۲۰ و ۲۱). به نظر می‌رسد که سلولهای بدخیم برای کنار زدن توقف چرخه سلولی وابسته به کوئرستین ناتوان هستند. همچنین کوئرستین مهار کننده گیرنده عامل رشد اپیدرمی (EGFR) و همچنین کیناز چسبندگی کانونی (FAK) است(۱۰ و ۲۰). هر دوی این پروتئینها برای رشد و تکثیر سلولهای سرطانی به ویژه سرطانهای اپی‌تلیال (کارسینوما) لازم بوده و فعالیت غیرعادی دارند. در حالی که کوئرستین که بیان ژنهای دخیل در سمیت‌زدایی را القاء می‌کند، می‌تواند بیان سایر فاکتورهای رونویسی را کم کند. در این مورد خانواده فاکتورهای رونویسی NF-kB و فاکتور رونویسی AP-1 کاملاً در شرایط آزمایشگاه بررسی شده‌اند. NF-kB بیان بسیاری از ژنها که نقش اساسی در تنظیم پاسخهای ایمنی و التهابی و محافظت سلولها از آپوپتوز دارند را القاء می-کند. گزارشهای متعدد نشان می‌دهد که NF-kB توسط مواد مشتق شده گیاهی از جمله کوئرستین تنظیم می‌شود که می‌تواند به طور بالقوه بیماریهای ناشی از فعال‌سازی کنترل نشده NF-kB را بهبود ببخشد(۱۸).

www.SID.ir

Archive of SID

یکی دیگر از ترکیبات گل محمدی جرانیول است. گزارشهای قبلی نشان داده است که ایزوپرنوئیدهایی مثل بتا–ایونون و جرانیول اثرات ضد تکثیر و بازدارندگی از چرخه سلولی و فعالیت CDK2 در سلولهای سرطان پستان انسانی MCF-7 دارند (۸ و ۲۷).

در مجموع می‌توان گفت عصاره گل محمدی باعث کاهش بقای سلول، مهار تکثیر آن و القای مرگ در سلول سرطان معده می‌شود و هر کدام از این اثرات می‌تواند توسط مواد متفاوت و همچنین از مسیرهای مختلفی اجرا شود. شناسایی ترکیبات موجود در عصاره و اسانس گل محمدی بومی مناطق مختلف ایران و بررسی اثرات هر کدام از آنها می‌تواند به فهم بیشتر نحوه بروز اثرات فوق کمک کند.

در پایان با توجه به بومی بودن گل محمدی، سازگاری این گیاه به شرایط اقلیمی مناطق مختلف ایران، پرورش آسان و کم هزینه این گیاه، وجود انواع متعدد فلاونوئیدهای گیاهی در آن، مطالعات بیشتر روی خواص ضد سرطانی ترکیبات این گیاه پیشنهاد می‌شود.

تشکر و قدردانی

این طرح با حمایت مالی پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی طی قرارداد شماره ۱/۲۷۰۸ انجام شده است. نویسندگان از آقای دکتر سید منصور میرتاج-الدینی عضو هیات علمی بخش زیست‌شناسی دانشگاه شهید باهنر کرمان و آقای سید محمدعلی وکیلی شهربابکی به خاطر همکاری در شناسایی و بررسی گیاه ثبت شده در هرباریوم تشکر می کنند.

منابع

1. Amin A, Gali-Muhtasib H, Ocker M, Schneider-Stock R (2009) Overview of major classes of plant-derived anticancer drugs. International journal of biomedical science : IJBS 5:1-11.
2. Borek C (2004) Dietary antioxidants and human cancer. Integrative cancer therapies 3:333-341.
3. Boskabady MH, Shafei MN, Saberi Z, Amini S (2011) Pharmacological effects of rosa damascena. Iranian journal of basic medical sciences 14:295-307.
4. Cseke LJ, Kirakosyan A, Kaufman PB, Warber SW, Duke JA, Brielmann HL (2006) Natural Products from Plants. 2nd ed. Taylor & Francis. pp 269-273.
5. Ciolino HP, Daschner PJ, Yeh GC (1999) Dietary flavonols quercetin and kaempferol are ligands of the aryl hydrocarbon receptor that affect CYP1A1 transcription differentially. The Biochemical journal 340 (Pt 3):715-722.
6. Cragg GM, Newman DJ (2013) Natural products: a continuing source of novel drug leads. Biochimica et biophysica acta 1830:3670-3695.
7. Dajas F (2012) Life or death: neuroprotective and anticancer effects of quercetin. Journal of ethnopharmacology 143:383-396.
8. Duncan RE, Lau D, El-Sohemy A, Archer MC (2004) Geraniol and beta-ionone inhibit proliferation, cell cycle progression, and cyclin-dependent kinase 2 activity in MCF-7 breast cancer cells independent of effects on HMG-CoA reductase activity. Biochemical pharmacology 68:1739-1747.
9. Evans P, Halliwell B (2001) Micronutrients: oxidant/antioxidant status. The British journal of nutrition 85 Suppl 2:S67-74.
10. Huang CY, Chan CY, Chou IT, Lien CH, Hung HC, Lee MF (2013) Quercetin induces growth arrest through activation of FOXO1 transcription factor in EGFR-overexpressing oral cancer cells. The Journal of nutritional biochemistry 24:1596-1603.
11. Kandaswami C, Lee LT, Lee PP, Hwang JJ, Ke FC, Huang YT, Lee MT (2005) The antitumor activities of flavonoids. In vivo 19:895-909.
12. Kodouri Mr, Tabaei Aghdaei Sr (2007) Evaluation Of Flower Yield And Yield Components In Nine Rosa Damascena Mill. Accessions Of Kerman Province. Iranian Journal Of Medicinal And Aromatic Plants 23:100-110.
13. Ma H, Das T, Pereira S, Yang Z, Zhao M, Mukerji P, Hoffman RM (2009) Efficacy of dietary antioxidants combined with a

www.SID.ir

Archive of SID

chemotherapeutic agent on human colon cancer progression in a fluorescent orthotopic mouse model. Anticancer research 29:2421-2426.

14. Mahmood N, Piacente S, Pizza C, Burke A, Khan AI, Hay AJ (1996) The anti-HIV activity and mechanisms of action of pure compounds isolated from Rosa damascena. Biochemical and biophysical research communications 229:73-79.
15. Moskaug JO, Carlsen H, Myhrstad M, Blomhoff R (2004) Molecular imaging of the biological effects of quercetin and quercetin-rich foods. Mechanisms of ageing and development 125:315-324.
16. Newman DJ, Cragg GM (2012) Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. Journal of natural products 75:311-335.
17. özkan G, Sagdiç O, Baydar NG, Baydar H (2004) Note: Antioxidant and Antibacterial Activities of Rosa Damascena Flower Extracts. Food Science and Technology International 10:277-281.
18. Potapovich AI, Lulli D, Fidanza P, Kostyuk VA, De Luca C, Pastore S, Korkina LG (2011) Plant polyphenols differentially modulate inflammatory responses of human keratinocytes by interfering with activation of transcription factors NFkappaB and AhR and EGFR-ERK pathway. Toxicology and applied pharmacology 255:138-149.
19. Rezaie-Tavirani M, Fayazfar S, Heydari-Keshel S, Rezaee MB, Zamanian-Azodi M, Rezaei-Tavirani M, Khodarahmi R (2013) Effect of essential oil of Rosa Damascena on human colon cancer cell line SW742. Gastroenterology and hepatology from bed to bench 6:25-31.
20. Richter M, Ebermann R, Marian B (1999) Quercetin-induced apoptosis in colorectal tumor cells: possible role of EGF receptor signaling. Nutrition and cancer 34:88-99.
21. Romano B, Pagano E, Montanaro V, Fortunato AL, Milic N, Borrelli F (2013) Novel insights into the pharmacology of flavonoids. Phytotherapy research : PTR 27:1588-1596.
22. Schmitt CA, Dirsch VM (2009) Modulation of endothelial nitric oxide by plant-derived products. Nitric oxide : biology and chemistry / official journal of the Nitric Oxide Society 21:77-91.
23. Setzer WN (2009) Essential oils and anxiolytic aromatherapy. Natural product communications 4:1305-1316.
24. Shchepotin IB et al. Antitumour activity of 5-fluorouracil, verapamil and hyperthermia against human gastric adenocarcinoma cell (AGS) in vitro. Surgical Oncology 1994, 3: 287-294.
25. Siegel R, Naishadham D, Jemal A (2013) Cancer statistics, 2013. CA Cancer J Clin 63:11-30.
26. Srivastava V, Negi AS, Kumar JK, Gupta MM, Khanuja SP (2005) Plant-based anticancer molecules: a chemical and biological profile of some important leads. Bioorganic & medicinal chemistry 13:5892-5908.
27. Ulusoy S, Bosgelmez-Tinaz G, Secilmis-Canbay H (2009) Tocopherol, carotene, phenolic contents and antibacterial properties of rose essential oil, hydrosol and absolute. Current microbiology 59:554-558.
28. Yoshida M, Sakai T, Hosokawa N, Marui N, Matsumoto K, Fujioka A, Nishino H, Aoike A (1990) The effect of quercetin on cell cycle progression and growth of human gastric cancer cells. FEBS letters 260:10-13.
29. Zamiri Akhlaghi A, Rakhshandeh H, Tayarani-Najaran Z, Mousavi S-H (2011) Study of cytotoxic properties of *Rosa damascena* extract in human cervix carcinoma cell line. Avicenna Journal of Phytomedicine. 1(2):74-77.

www.SID.ir

Archive of SID

Effects of aqueous and ethanolic extract of *Rosa damascena mill L.* against human gastric Cancer cells

Meimandi K. and yaghoobi M.M.

Biotechnology Dept., Graduate University of Advanced Technology, Kerman, I.R. of Iran

Abstract

Introduction: Gastric cancer is one of the important morbidity factors in the world. There are many unique plant species that should be explored for anti-cancer components. **Goal:** In this project, anti-cancer effects of aqueous and ethanolic extract of Persia rose (*Rosa damascena mill L.*) against human gastric cancer cell line (AGS) was studied. **Experimental procedure:** Eight different concentrations of extracts as well as 5-fluorouracil was applied on the cells. The toxicity of the extracts, their inhibitory effects on proliferation and apoptotic effects were studied by MTT, BrdU and TUNEL assays respectively. **Result:** The results showed that all concentrations of aqueous and ethanolic extracts reduced viability of the AGS cells significantly. The IC_{50} of these extracts on AGS cells was determined 2.517 and 3.887 µg/ml respectively. BrdU assay also showed the inhibitory effect of extracts on proliferation of AGS cells (in comparison to fibroblast cells). The proliferation of AGS cells was decreased as the concentration of both of the extracts was increased. Also, the toxicity and anti-proliferative effect of ethanolic extract was more than aqueous extract. The rate of apoptosis was determined 90% for both aqueous and ethanolic extract. **Conclusion:** Aqueous and ethanolic extract of *Rosa damascena mill L.* reduced viability and proliferation and induce apoptosis in human gastric cancer cells through different pathways.

Key words: Gastric cancer cell, Aqueous and ethanolic extract, Persia rose, Apoptosis, Toxicity

www.SID.ir