Archive of SID

نشریه علمی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران
جلد ۳۶، شماره ۳، صفحه ۴۴۷-۴۳۸ (۱۳۹۹)

شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/ijmapr.2020.128057.2652
شناسه دیجیتال (DOR): 98.1000/1735-0905.1398.36.438.101.3.1575.1610

اثر سیتوتوکسیک عصاره آبی *Echium amoenum* Fisch. et Mey. بر سلول‌های گلیوبلاستومای انسانی

ساسان محسن‌زاده[1*]، مهسا فرخ‌منش[2] و راحله مسعودی[3]

۱*- نویسنده مسئول، دانشیار، بخش زیست‌شناسی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران، پست الکترونیک: mohsenz@shirazu.ac.ir
۲- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، بخش زیست‌شناسی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران
۳- استادیار، بخش زیست‌شناسی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران

تاریخ دریافت: مهر ۱۳۹۸ تاریخ اصلاح نهایی: اردیبهشت ۱۳۹۹ تاریخ پذیرش: اردیبهشت ۱۳۹۹

چکیده

گیاهان دارویی به‌دلیل داشتن متابولیت‌های ثانویه احتمالاً دارای اثرهای سیتوتوکسیک بوده و اطلاع از میزان سمیّت آنها ضروریست. گل‌گاوزبان ایرانی (*Echium amoenum* Fisch. et Mey.) متعلق به شمال ایران و یکی از گیاهان دارویی مهم در طب سنتی ایرانی است. دارای گل‌های بزرگ قرمز رنگ می‌باشد که پس از خشک شدن به رنگ بنفش تیره در می‌آید و جوشانده آن استفاده‌های دارویی دارد. هدف از این تحقیق ارزیابی سیتوتوکسیک عصاره آبی گلبرگ‌های گاوزبان بر سلول‌های انسانی بود. در این پژوهش اثرهای سیتوتوکسیک غلظت‌های مختلف عصاره گل‌گاوزبان بر سلول‌های گلیوبلاستومای انسانی با آزمون رنگ تترازولیوم مطالعه شد. طرح آماری کاملاً تصادفی با سه تکرار برای شاهد و تیمارها استفاده گردید. عصاره آبی این گیاه با IC_{50} برابر ۱۹/۲۸ میلی‌گرم در میلی‌لیتر دارای اثر سیتوتوکسیک بر سلول‌های گلیوبلاستومای انسانی بود. مورفولوژی سلول‌های تیمار شده، از حالت چند ضلعی به کروی تغییر شکل دادند. مطالعات فوق نشان می‌دهد که هر چند عصاره آبی گلبرگ‌های گل‌گاوزبان ایرانی دارای اثرهای مفیدی می‌باشد، اما مصرف آن باید با احتیاط و طبق دستور انجام شود، چون همان‌گونه که دارای اثر سمی بر سلول‌های گلیوبلاستومای انسانی است ممکن است بر سلول‌های سالم نیز اثر سمی داشته باشد.

واژه‌های کلیدی: آزمون MTT، سلول گلیوبلاستومای انسانی، سمیّت سلولی، گل‌گاوزبان (*Echium amoenum* Fisch. et Mey.)، گیاه دارویی.

مقدمه

برخی گیاهان ازجمله گیاهان دارویی برای دفاع در برابر آفات و بیماری‌ها، ترکیب‌هایی با خواص سیتوتوکسیک تولید می‌کنند که می‌تواند اثرهای نامطلوبی ازجمله سمیّت، سرطان‌زایی و کشندگی بر سلول‌ها داشته باشد. این گونه تأثیرات بر مولکول‌های زیستی و حیات سلول‌ها معمولاً زمانی بروز می‌کند که این گیاهان به‌مدت طولانی و با دوز بالا مورد استفاده قرار گیرند (Silva *et al.*, 2011). گیاهان برای بقای خود در طبیعت موادی را تولید می‌کنند که معمولاً ۱٪ وزن خشک آنها را شامل می‌شود و به متابولیت‌های ثانویه معروف هستند. این ترکیب‌ها شامل آلکالوئیدها، ترپنوئیدها و ترکیب‌های فنولی می‌باشند (Tapsell *et al.*,

www.SID.ir

Archive of SID

2006). متابولیت‌های ثانویه در گیاهان مختلف ممکن است در یک یا چند اندام خاص مانند ریشه، ساقه، برگ و یا گل ذخیره شوند. امروزه گیاهانی به‌عنوان گیاهان دارویی در نظر گرفته می‌شوند که دارای چند ترکیب ثانویه خاص در پیکره خود باشند و بتوان از آنها به‌منظور پیشگیری یا درمان بیماری‌های مختلف استفاده کرد (Tapsell *et al*., 2006). اثرهای سیتوتوکسیک عصاره و اسانس گیاهان دارویی، توسط آزمایش‌های سیتوژنتیک ارزیابی می‌شود. از روش‌های حساس و کارآمد برای تشخیص سمیّت عصاره گیاهان دارویی، می‌توان از نمک تترازولیوم که بر پایه رنگ‌سنجی استوار می‌باشد نام برد. در این روش قابلیت احیایی سلول‌ها و مرگ سلولی بررسی می‌شود (Berridge *et al*., 2005). این روش، روش حساس و دقیقی می‌باشد که برای بررسی اثر سیتوتوکسیک یک عامل شیمیایی و سنجش حیات سلول‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد. این روش بر احیاء نمک زرد رنگ تترازولیوم و تشکیل رسوب ارغوانی رنگ استوار است (Hayon *et al*., 2003؛ Mohammadpour *et al*., 2015).

گل‌گاوزبان ایرانی، با نام علمی *Echium amoenum* از خانواده Boraginaceae، گیاهی یک‌ساله، پوشیده از کرک، دارای برگ‌های بدون انشعاب و گل‌های بزرگ قرمز رنگ می‌باشد که پس از خشک شدن به رنگ بنفش تیره در می‌آید. محل رویش این گیاه بیشتر در مناطق مدیترانه‌ای، اروپا و در ایران در کوه‌های شمالی کشور از گلستان تا اردبیل در ارتفاعات ۶۰ تا ۲۲۰۰ متری از سطح دریا می‌باشد (Abolhassani, 2004). قسمت اصلی مورد استفاده این گیاه گلبرگ‌های آن است (Heidari *et al*., 2006). از گذشته‌های دور تاکنون، این گیاه به‌صورت سنتی برای درمان زکام و سرماخوردگی، به‌عنوان افزایش‌دهنده فشار خون، آرام‌بخش، ضد التهاب، ضد درد، بهبوددهنده عملکرد قلب، ضد اضطراب، ضد افسردگی و معرق مورد استفاده قرار می‌گیرد (Rabbani *et al*., 2004؛ Sayyah *et al*., 2009؛ Mehrabani & Mehrabani, 2007). گلبرگ‌های این گیاه دارای ترکیب‌هایی مانند رزمارینیک اسید با فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالا، آنتوسیانین‌ها، دلفینیدین، گاما-لینولنیک اسید، آلفا-لینولنیک اسید، آلکالوئیدها و فلاونوئیدها می‌باشد (Stegelmeier, 2011؛ Etebari *et al*., 2012). گل‌گاوزبان از سرده یا جنس *Echium* در دامنه کوه‌های البرز می‌روید و با گیاه گاوزبان از سرده Borage که در اصفهان و آذربایجان و شهرهای دیگر ایران می‌روید، متفاوت است. هر دو گیاه از تیره گاوزبانیان هستند ولی از نظر سرده با هم متفاوت‌اند و این اشتباه برخی پزشکان و داروسازان را گمراه کرده است. بنابراین می‌توان *Echium* را گل‌گاوزبان ایرانی و Borage را گیاه گاوزبان اروپایی نامید. این دو گیاه متفاوت تنها گل‌هایشان کمی به هم شبیه است و خواص دارویی این دو گیاه کمی با هم تفاوت دارد. گل‌های گل‌گاوزبان ایرانی درشت‌تر از گل‌های گیاه گاوزبان اروپایی است (Abolhassani, 2004؛ Mehrabani & Mehrabani, 2007).

اثر سیتوتوکسیک برخی گیاهان بر روی رده‌های سلولی متفاوتی بررسی شده است. به‌عنوان مثال، اثر کشندگی عصاره برگ *Annona squamosal* بر روی دو رده سلولی سرطانی (Vivek *et al*., 2012) و همچنین اثر سیتوتوکسیک عصاره اتانولی پرسیاوشان بر روی چهار رده سلولی (Yuan *et al*., 2013) و اثر سیتوتوکسیک اسانس گیاه سیاه‌دانه، بر روی چهار رده سلول توموری (Ait Mbarek *et al*., 2007) و در مطالعه‌ای نیز میزان خاصیت سیتوتوکسیک آلکالوئیدهای استخراج شده از گیاه *Vinca minor* که در طب سنتی استفاده می‌شود، بر رده‌های سلولی بررسی شده است (Khanavi *et al*., 2010).

مواد و روش‌ها

تهیه نمونه‌های گیاهی و عصاره آبی

گلبرگ‌های گیاه گاوزبان ایرانی جمع‌آوری شده از استان گیلان، از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه شد و بعد از آسیاب کردن نمونه‌های مورد نظر توسط آسیاب برقی، ۲۰ گرم از گل‌گاوزبان در ارلن‌های جداگانه ریخته شد و ۱۰۰ میلی‌لیتر آب‌مقطر به هر یک اضافه گردید و به‌مدت ۲۴ ساعت بر

www.SID.ir

Archive of SID

روی شیکر قرار گرفتند. سپس عصاره‌ها سانتریفیوژ گردید و در یخچال نگهداری شدند. عصاره‌های بدست‌آمده به‌عنوان عصاره استاک در آزمایش مورد استفاده قرار گرفتند. آزمایش‌های مقدماتی نشان دادند که بهترین زمان استفاده از عصاره‌ها حداکثر یک هفته می‌باشد.

آزمون MTT

MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] یک محلول نمک تترازولیوم در آب است که وقتی در محیط کشت فاقد فنول رد و یا در بافر PBS (Phosphate Buffered Saline) آماده‌سازی می‌شود، ترکیب زرد رنگی ایجاد می‌کند (Iselt *et al.*, 1989). هنگامی که رنگ آماده شده MTT به سلول‌های کشت داده شده افزوده می‌شود، حلقه MTT در میتوکندری سلول‌های زنده توسط آنزیم سوکسینات دهیدروژناز شکسته شده و به ترکیب نامحلول و ارغوانی رنگ فورمازان تبدیل می‌شود. کریستال‌های فورمازان توسط حلال‌هایی مانند SDS، DMSO و ایزوپروپانول اسیدی حل شده و بعد جذب نوری رنگ ارغوانی ظاهر شده توسط دستگاه الیزا در طول موج ۵۷۰ نانومتر اندازه‌گیری می‌شود (Denizot & Lang 1986؛ Iselt *et al.*, 1989). احیاء MTT در خارج از میتوکندری و در سیتوپلاسم سلول‌ها به‌دلیل NADH و NADPH نیز رخ می‌دهد (Berridge & Tan, 1993؛ Fotakis & Timbrell, 2006).

از آزمون MTT برای بررسی اثر سیتوتوکسیک عصاره آبی گل‌گاوزبان بر سلول‌های سرطانی گلیوبلاستومای انسانی (U87MG) تهیه شده از دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شیراز استفاده گردید. سلول‌ها در محیط کشت DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) حاوی سرم جنینی گاو ۱۰٪ و پنی‌سیلین- استرپتومایسین ۱٪، در انکوباتور (شرکت بهداد، ایران) با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و غلظت CO2 ۵٪ کشت داده شدند. این محیط دارای فرمول پیشرفته‌تری نسبت به Eagel Medium بوده و میزان ویتامین و آمینواسید آن ۴ برابر بیشتر است. DMEM محیطی پایه‌ای با مصرف گسترده برای کشت بسیاری از انواع سلول‌های پستانداران می‌باشد (Yao & Asayama, 2017). پس از آن که سلول‌ها رشد نمودند و از لحاظ تعداد و شکل به حد مطلوب رسیدند، توسط تریپسین-EDTA با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد از سطح فلاسک جدا گردیدند. شمارش و ارزیابی حیاتی سلول‌ها با استفاده از آزمون Trypan blue exclusion test انجام گردید. بدین صورت که ۹ میکرولیتر از سوسپانسیون حاوی سلول با یک میکرولیتر رنگ تریپان‌بلو به‌خوبی مخلوط شد و بعد تعداد سلول‌های زنده توسط لام هموسایتومتر در زیر میکروسکوپ شمارش گردیدند. از آنجا که این رنگ از غشاء سلول‌های مرده عبور کرده اما توسط سلول‌های زنده جذب نمی‌شود. سلول‌های مرده به رنگ آبی تیره دیده می‌شوند اما سلول‌های زنده رنگ نمی‌گیرند. سپس سلول‌ها در پلیت‌های ۹۶ خانه کشت داده شدند. به‌طوری که در هر چاهک حدود ۱×۱۰^{۴} سلول وجود داشته باشد. پلیت‌های حاوی سلول‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و غلظت ۵٪ CO_2 به‌مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند تا سلول‌ها به کف چاهک‌ها اتصال پیدا کنند.

به‌منظور بررسی قابلیت سیتوتوکسیک عصاره گل‌گاوزبان با استفاده از آزمون MTT، چاهک‌ها پس از برداشتن کامل محیط کشت دسته‌بندی گردید. **دسته اول:** اضافه نمودن ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت حاوی غلظت‌های مختلف عصاره گل‌گاوزبان به تعدادی از چاهک‌های حاوی سلول؛ در این دسته بعد از انکوبه نمودن، محلول درون چاهک‌ها به آرامی برداشته و دور ریخته شد. **دسته دوم:** اضافه نمودن ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت حاوی غلظت‌های مختلف عصاره گل‌گاوزبان به تعدادی از چاهک‌های حاوی سلول؛ در این دسته نیز بعد از انکوبه کردن، مایع درون چاهک‌ها برداشته و سلول‌ها دو بار توسط PBS شسته شدند. **دسته سوم:** اضافه نمودن ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت به تعدادی از چاهک‌های دارای سلول؛ پس از انکوبه نمودن مایع درون چاهک‌ها برداشته شد. این دسته به‌عنوان کنترل منفی دسته اول در نظر گرفته شد. **دسته چهارم:** اضافه نمودن ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت به تعدادی از چاهک‌های دارای سلول؛ پس از انکوبه نمودن مایع درون چاهک‌ها برداشته و سلول‌ها دو بار توسط

www.SID.ir

Archive of SID

PBS شسته شدند. این دسته به‌عنوان کنترل منفی دسته دوم در نظر گرفته شد. **دسته پنجم:** اضافه نمودن ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت حاوی محلول سیس پلاتین به تعدادی از چاهک‌های دارای سلول؛ این دسته از چاهک‌ها به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شدند. **دسته ششم:** اضافه نمودن ۱۰۰ میکرولیتر عصاره گل‌گاوزبان رنگ‌بری شده توسط ذغال فعال به چاهک‌های فاقد سلول. **دسته هفتم:** اضافه نمودن ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت به تعدادی از چاهک‌های فاقد سلول؛ این دسته از چاهک‌ها به‌عنوان کنترل زمینه استفاده شدند. انکوباسیون تمام دسته‌ها در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و غلظت CO_2 پنج درصد به‌مدت ۴۸ ساعت انجام شد. پس از گذشت این مدت زمان، محلول درون چاهک‌ها را برداشته و ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت به هر یک از چاهک‌ها اضافه گردید. سپس به هر یک از چاهک‌های هر هفت دسته، ۱۰ میکرولیتر محلول MTT ۵٪ اضافه گردید و پلیت‌ها به‌مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و در تاریکی انکوبه شدند. پس از گذشت این مدت زمان، ۱۰۰ میکرولیتر بافر حل‌کننده بلور فورمازان به تمامی چاهک‌ها اضافه گردید. پس از ۱۶ ساعت، جذب نوری هریک از چاهک‌ها توسط دستگاهELISA Reader در طول موج ۵۷۰ نانومتر ثبت شد (Iselt *et al*., 1989). لازم به ذکر است که دامنه غلظتی ۶/۷ تا ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره آبی گل‌گاوزبان فیلتر شده برای انجام این آزمون مورد استفاده قرار گرفت. همچنین برای هر یک از شاهدها و تیمارها سه تکرار بیولوژیک در نظر گرفته شد و طرح آماری کاملاً تصادفی استفاده گردید. سلول‌های زنده توسط رابطه زیر محاسبه و بعد در عدد ۱۰۰ ضرب شد.

$$\text{درصد سلولهای زنده} = \frac{\text{جذب شاهد زمینه} - \text{جذب سلولهای تیمار شده با عصاره}}{\text{جذب شاهد زمینه} - \text{جذب شاهد منفی}}$$

IC_{50} برابر با غلظتی از عصاره است که باعث کاهش ۵۰ درصدی سلول‌های زنده نسبت به شاهد منفی می‌شود که در این آزمایش با بکارگیری غلظت‌های مختلف عصاره و درصد سلول‌های زنده محاسبه گردید.

تجزیه‌وتحلیل آماری

تجزیه‌وتحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS 24 و مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن در سطح ۰/۰۰۵٪ انجام شد. برای رسم نمودارها از برنامه Excel 2016 و به‌منظور محاسبه IC_{50} از نرم‌افزار Graphpad Prism 6.07 استفاده گردید.

نتایج

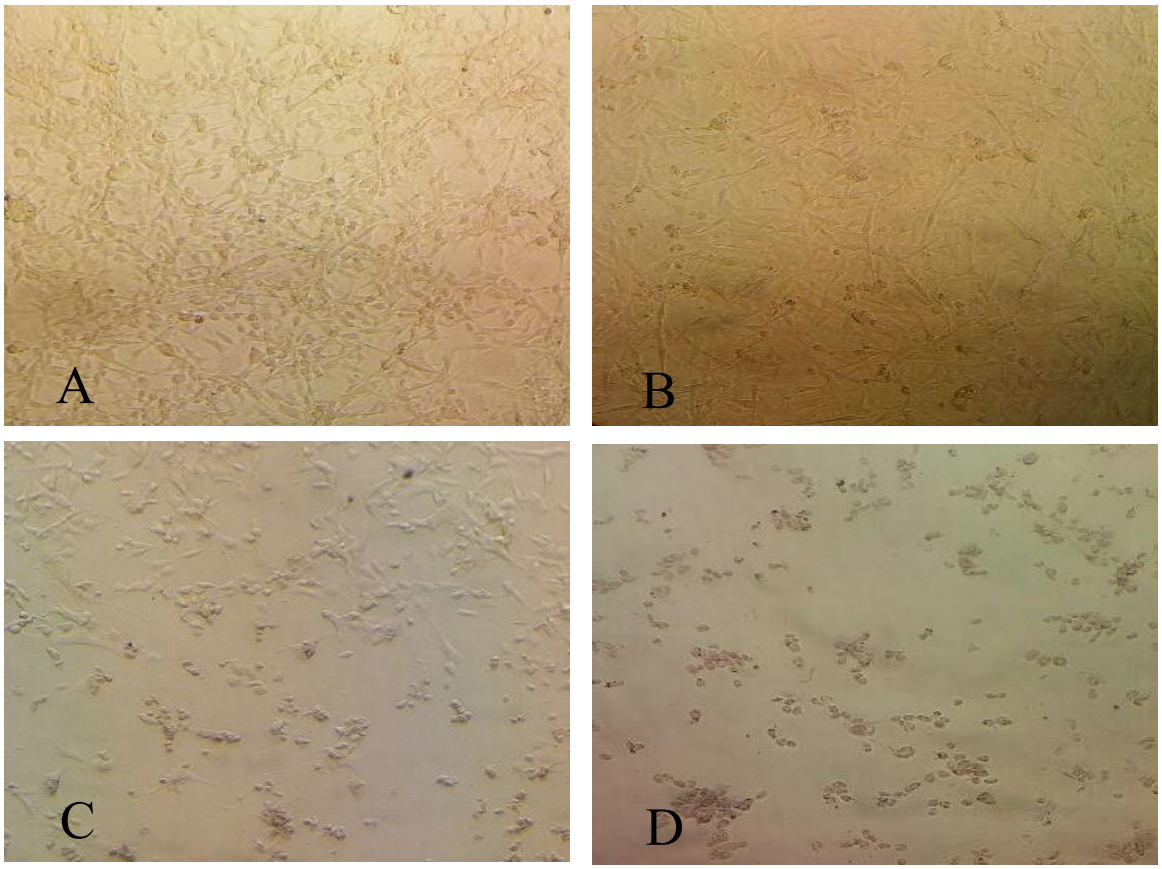
شکل ۱ نشان‌دهنده مورفولوژی سلول‌های U87MG در کنترل منفی (غلظت صفر عصاره) و گروه‌های تیمار شده با غلظت‌های متفاوت عصاره آبی گل‌گاوزبان می‌باشد. همان‌گونه که مشخص است مورفولوژی سلول‌های تیمار شده تغییر کرده است، بدین صورت که از حالت چند ضلعی به کروی تغییر شکل داده و سلول‌ها قابلیت اتصال خود به سطح پلیت را از دست داده‌اند که نشان‌دهنده از بین رفتن سلول‌ها می‌باشد. در نتیجه با افزایش غلظت عصاره درصد سلول‌های زنده کاهش پیدا کرده است، به‌طوری که در بالاترین غلظت آزمایش شده (۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) بیشتر سلول‌ها از بین رفته‌اند. شکل ۲ نمودار اثر غلظت‌های مختلف عصاره آبی گل‌گاوزبان را بر میزان جذب در آزمون MTT نشان می‌دهد. همان‌طور که مشخص است جذب در تیمارهای شسته نشده با PBS از غلظت ۶/۷ تا ۲۸/۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تغییری نسبت به کنترل منفی نداشته است، در حالیکه در غلظت‌های ۳۷/۵ و ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر افزایش چشمگیری در جذب مشاهده می‌شود. این در حالیست که جذب تیمارهای شست‌وشو داده شده با PBS دارای یک روند کاهشی نسبت به جذب کنترل

www.SID.ir

Archive of SID

منفی می‌باشد. همچنین جذب تیمارهای شست‌وشو داده شده و شسته نشده با PBS از غلظت صفر تا ۱۱/۹ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره اختلافی با یکدیگر ندارند، در حالیکه از غلظت ۱۵/۹ تا ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر با افزایش غلظت عصاره، اختلاف در جذب دو تیمار نیز افزایش یافته است.

همچنین با افزایش غلظت عصاره گل‌گاوزبان رنگ‌بری شده، یک روند صعودی در جذب عصاره بدون سلول مشاهده می‌شود. IC_{50} بدست‌آمده از این آزمایش برابر با ۱۹/۲۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و میانگین جذب ثبت شده برای شاهد مثبت و شاهد زمینه به‌ترتیب ۲۹ و ۱۱/۶۷ نانومتر بود.



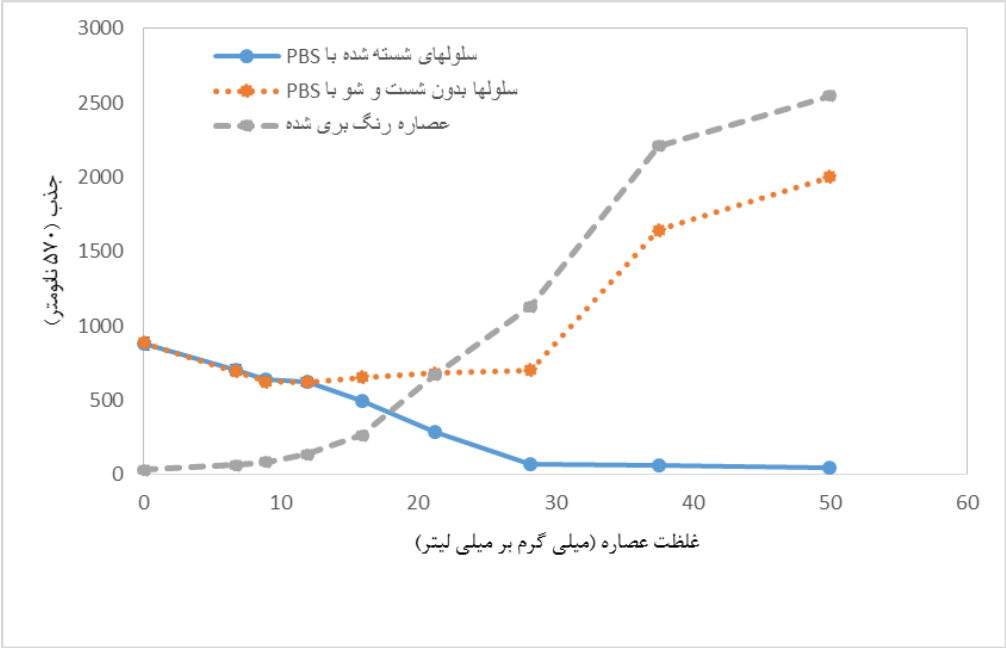
شکل ۱- مورفولوژی سلول‌های گلیوبلاستومای انسانی (U87MG) در گروه کنترل منفی (A)
پس از ۴۸ ساعت تیمار با غلظت ۶/۷ (B)، ۲۱/۲ (C) و ۵۰ (D) میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره آبی گل‌گاوزبان

بحث

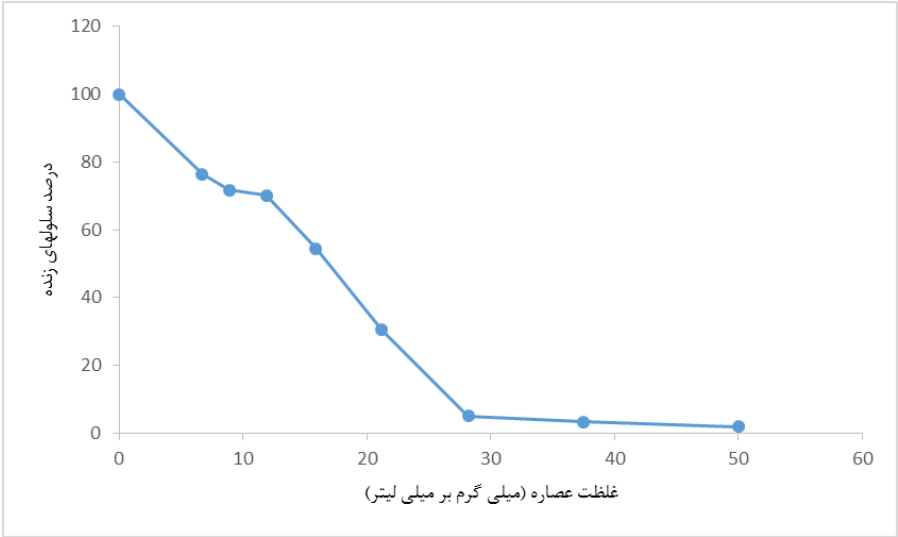
استفاده از گیاهان دارویی برای درمان انواع بیماری‌ها قدمتی چند هزار ساله دارد. امروزه نیز استفاده از گیاهان دارویی و داروهای ساخته شده از ترکیب‌های گیاهی، رو به افزایش می‌باشد. با وجود صفات مطلوب گیاهان دارویی، به‌دلیل وجود ترکیب‌هایی از قبیل آلکالوئیدها، ترپنوئیدها و ترکیب‌های فنولی در گیاهان، استفاده نادرست از آنها می‌تواند عوارض متعددی ازجمله تأثیر نامطلوب بر محتوای ژنتیکی سلول، ساختار و عملکرد پروتئین‌ها و حیات سلول را به‌همراه داشته باشد. به همین دلیل اطلاع از اثرهای سیتوتوکسیک گیاهان دارویی امری ضروریست. همچنین شناسایی گیاهانی با اثر سیتوتوکسیک بالا بر رده‌های سلول‌های سرطانی می‌تواند به درمان انواع سرطان‌ها کمک شایان توجهی نماید.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۲- اثر غلظت‌های مختلف عصاره بر میزان جذب در آزمون MTT



شکل ۳- اثر غلظت‌های مختلف عصاره‌های گل‌گاوزبان بر سلول‌های U87MG شست‌وشو داده شده با PBS

اثر سیتوتوکسیک عصاره آبی گل‌گاوزبان بر سلول‌های گلیوبلاستومای انسانی (U87MG) با استفاده از آزمون MTT مورد ارزیابی قرار گرفت و IC_{50} محاسبه گردید. MTT یک نمک تترازولیوم محلول در آب است و هنگامی که در محلول بافر نمکی فسفات (PBS) آماده‌سازی می‌شود، ترکیب زرد رنگی ایجاد می‌کند. هنگامی که محلول زرد رنگ MTT به سلول‌های کشت داده شده افزوده می‌شود، حلقه MTT در میتوکندری سلول‌های زنده توسط آنزیم سوکسینات دهیدروژناز شکسته شده و ترکیب نامحلول و ارغوانی رنگ فورمازان ایجاد می‌گردد.

در این پژوهش سلول‌های گلیوبلاستومای انسانی توسط غلظت‌های مختلف عصاره گل‌گاوزبان به‌مدت ۴۸ ساعت تیمار

www.SID.ir

Archive of SID

شدند. مورفولوژی و حیات سلول‌ها در زیر میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفت. شکل ۱ نشان‌دهنده مورفولوژی سلول‌های کنترل منفی و سلول‌های تیمار شده با عصاره گل‌گاوزبان می‌باشد. همان‌طور که پیداست در کمترین غلظت آزمایش شده (۶/۷ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)، مورفولوژی سلول‌ها تفاوت زیادی با کنترل منفی ندارد. با افزایش غلظت عصاره، مورفولوژی سلول‌ها تغییر کرده است و از حالت چند ضلعی به کروی تغییر شکل داده‌اند که نشان‌دهنده مرگ سلولی می‌باشد، به‌طوری که در بالاترین غلظت عصاره (۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) بیشتر سلول‌ها از بین رفته‌اند.

از آنجا که این عصاره دارای رنگ می‌باشد و ممکن است در جذب خوانده شده اختلال ایجاد کند، ازاین‌رو مایع روی سلول‌ها قبل از اضافه کردن MTT برداشته شده و محیط کشت جدید اضافه شد. شکل ۲ نشان‌دهنده جذب تیمارهای شست‌وشو داده شده و شسته نشده با PBS می‌باشد. همان‌گونه که پیداست جذب تیمارهایی که توسط بافر نمکی شسته نشده‌اند، از غلظت ۲۸/۲ تا ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، بر خلاف شواهد دیده شده در زیر میکروسکوپ، افزایش پیدا کرده است. از سویی جذب تیمارهای شست‌وشو داده شده با PBS برخلاف تیمارهای شسته نشده، از غلظت ۱۵/۹ تا ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر دارای روند کاهشی می‌باشد. به‌طوری که اختلاف جذب ثبت شده در دو غلظت آخر بین دو گروه بسیار زیاد است. همچنین اضافه کردن محلول MTT به غلظت‌های مختلف عصاره گل‌گاوزبان رنگ‌بری شده توسط ذغال فعال، تشکیل بلور فورمازان را به‌همراه داشت. همان‌طور که از شکل ۲ مشخص است، جذب عصاره گل‌گاوزبان رنگ‌بری شده، بعد از اضافه نمودن MTT دارای روند افزایشی می‌باشد، به‌طوری که با افزایش غلظت عصاره، جذب نیز افزایش یافته است. تشکیل بلور فورمازان در عصاره گیاهی بدون سلول به‌دلیل وجود ترکیب‌های احیاکننده موجود در عصاره می‌باشد که می‌تواند به‌خودی خود و بدون دخالت آنزیم سوکسینات دهیدروژناز، باعث احیاء MTT و تشکیل بلور فورمازان شود. همچنین در گروهی از سلول‌ها که توسط PBS شسته نشده‌اند به‌دلیل باقی ماندن ترکیب‌های احیاءکننده عصاره گیاهی در محیط چاهک‌ها، به‌ویژه در غلظت‌های بالا، بلور فورمازان تشکیل شده، در نتیجه جذب ثبت شده بسیار بالاست. از آنجا که تمامی عصاره‌های گیاهی دارای ترکیب‌های احیاءکننده هستند، شست‌وشوی سلول‌ها قبل از اضافه نمودن MTT امری ضروریست. همچنین آزمون MTT می‌تواند به‌عنوان سنجشی برای ارزیابی خاصیت احیاءکنندگی مواد مورد استفاده قرار گیرد.

شکل ۳ نشان‌دهنده درصد سلول‌های زنده U87MG شسته شده با PBS نسبت به کنترل منفی می‌باشد. همان‌گونه که پیداست به‌طور کلی با افزایش غلظت عصاره گل‌گاوزبان درصد سلول‌های زنده کاهش پیدا کرده است. این روند کاهشی از غلظت ۱۱/۹ تا ۲۸/۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره، کاملاً مشهود می‌باشد. IC_{50} بدست‌آمده از این نمودار برابر با ۱۹/۲۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر محاسبه گردید. نتایج این آزمون نشان‌دهنده خاصیت سیتوتوکسیک عصاره آبی گل‌گاوزبان بر سلول‌های U87MG در بازه غلظتی آزمایش شده می‌باشد.

در مورد سازوکار احتمالی اثر *Echium amoenum* بر سلول‌های U87MG می‌توان بیان کرد که خصوصیات سمّیت‌زایی *Echium amoenum* احتمالاً به‌دلیل حضور آلکالوئیدهای پیرولیزیدین (pyrrolizidine alkaloids) باشد (Timothy & Richard, 2007؛ Mehrabani *et al*., 2006). در مطالعه‌ای که اعتباری و همکاران (۲۰۱۲) انجام دادند، نشان داده شد که این گیاه اثرهای ژنوتوکسیک بر سلول‌های hepG2 دارد. این گروه با آزمایش کامل نشان دادند که عصاره آبی این گیاه در غلظت ۲۵mg/ml می‌تواند باعث تخریب DNA سلول‌های hepG2 شود. البته تخریب DNA در نهایت مرگ سلول را به‌دنبال خواهد داشت. در این مطالعه، اثر این گیاه بر سلول‌های U87MG با استفاده از آزمون MTT مورد بررسی قرار گرفته است که میزان سلول‌های زنده را تشخیص می‌دهد. با توجه به نتایج مشاهده شده و کاهش سلول‌های زنده در غلظت‌های بالاتر، می‌توان به اثرهای کشندگی عصاره این گیاه در غلظت‌های خاص پی‌برد. این کشندگی همان‌طور که ذکر شد (Etebari *et al*., 2012) می‌تواند به‌دلیل صدمه وارد شده به DNA سلولی باشد. بنابراین به‌نظر می‌رسد که عصاره این گیاه

www.SID.ir

Archive of SID

می‌تواند با افزایش ژن‌های درگیر در آپوپتوز مانند Caspase 3 و Caspase 9 و همچنین کاهش ژن‌های پروآپوپتوتیک مانند BCL2 باعث مرگ سلولی شود (Firoozan, 2019). تمام موارد ذکر شده حاصل نتایج آزمایش‌های In vitro می‌باشد. برای یافتن غلظت‌های مناسب از این گیاهچه برای درمان سرطان در رابطه با اثرهای مفید آن بر روی سلول‌های نرمال، آزمایش In vivo ضروری می‌باشد که نتایج آزمایش In vitro می‌تواند به طراحی آزمایش In vivo کمک نماید.

در مطالعه‌ای که بر روی سیتوتوکسیک عصاره اتانولی دانه گیاه *Descurianaia sophia* بر سلول‌های U87MG توسط آزمون MTT انجام گردید، مشخص شد که عصاره اتانولی دانه این گیاه دارای اثر سیتوتوکسیک بر این رده سلولی می‌باشد (Khan *et al*., 2012). در پژوهش دیگری، اثر سیتوتوکسیک گاما-مانگوستین استخراج شده از میوه *Garcinia mangostana* بر سلول‌های U87MG توسط آزمون MTT مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج این آزمون نشان‌دهنده اثر سیتوتوکسیک ماده استخراج شده از این گیاه بر روی این سلول‌ها می‌باشد (Chang *et al*., 2010). پژوهشگران دیگری قابلیت سیتوتوکسیک اسانس استخراج شده از برگ *Nectandra leucantha* را با استفاده از آزمون MTT بر سلول‌های گلیوبلاستومای انسانی (U87MG) مورد بررسی قرار دادند و آزمایش مشخص کننده اثر سیتوتوکسیک اسانس استخراج شده از برگ‌های این گیاه بر سلول‌های U87MG بود (Grecco *et al*., 2015).

بررسی اثرهای سیتوتوکسیک گیاه مورد مطالعه در این پژوهش توسط آزمون MTT نشان می‌دهد که برخی گیاهان دارویی به‌دلیل داشتن متابولیت‌های ثانویه، دارای اثرهای سیتوتوکسیک می‌باشند. با توجه به خاصیت سیتوتوکسیک عصاره آبی گل‌گاوزبان، مطلوب است که ترکیب‌های مؤثره با خاصیت سیتوتوکسیک، در گلبرگ‌های این گیاه استخراج و شناسایی شوند تا بتوان از این ترکیب‌ها برای ساخت داروهایی برای درمان تومورها استفاده نمود. با توجه به خاصیت سیتوتوکسیک گیاه مطالعه شده، لازم است که در استفاده از این گیاه ملاحظات لازم بعمل آید. بهتر است به جای استفاده مستقیم از گیاه دارویی، از داروهای گیاهی ساخته شده توسط علوم داروسازی گیاهی (فارماکوگنوزی)، با دستور مصرف مشخص استفاده گردد تا از عوارض مصرف خودسرانه این گیاهان و همچنین تداخلات دارویی احتمالی با گیاهان دیگر یا داروهای سنتتیک کاسته شود.

سپاسگزاری

این پژوهش با حمایت مالی دانشگاه شیراز انجام شده است که بدین‌وسیله از معاون محترم پژوهشی دانشگاه شیراز سپاسگزاری می‌گردد.

منابع مورد استفاده

- Abolhassani, M., 2004. Antibacterial effect of borage (*Echium amoenum*) on *Staphylococcus aureus*. Brazilian Journal of Infectious Diseases, 8(5): 382-385.
- Ait Mbarek, L., Ait Mouse, H., Elabbadi, N., Bensalah, M., Gamouh, A., Aboufatima, R., Benharref, A., Chait, A., Kamal, M. and Dalal, A., 2007. Anti-tumor properties of blackseed (*Nigella sativa* L.) extracts. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 40(6): 839-847.
- Berridge, M.V., Herst, P.M. and Tan, A.S., 2005. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. Biotechnology Annual Review, 11: 127-152.
- Berridge, M.V. and Tan, A.S., 1993. Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. Archives of Biochemistry and Biophysics, 303(2): 474-482.
- Chang, H.F., Huang, W.T., Chen, H.J. and Yang, L.L., 2010. Apoptotic effects of γ-mangostin from the fruit hull of *Garcinia mangostana* on human malignant glioma cells. Molecules, 15(12): 8953-8966.
- Denizot, F. and Lang, R., 1986. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival: modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. Journal of Immunological Methods, 89(2): 271-277.
- Etebari, M., Zolfaghari, B., Jafarian-Dehkordi, A. and

www.SID.ir

Archive of SID

pyrrolizidine alkaloids of *Echium amoenum* Fisch and Mey. Daru, 14: 122-127.
- Mohammadpour, G., Tahmasbpour, R., Noureini, S., Tahmasbpour, E. and Bagherpour, G., 2015. In vitro antimicrobial and cytotoxicity assays of *Satureja bakhtiarica* and *Zataria multiflora* essential oils. American Journal of Phytomedicine and Clinical Therapeutics, 3(6): 502-511.
- Rabbani, M., Sajjadi, S., Vaseghi, G. and Jafarian, A., 2004. Anxiolytic effects of *Echium amoenum* on the elevated plus-maze model of anxiety in mice. Fitoterapia, 75(5): 457-464.
- Sayyah, M., Boostani, H., Pakseresht, S. and Malaieri, A., 2009. Efficacy of aqueous extract of *Echium amoenum* in treatment of obsessive-compulsive disorder. Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry, 33(8): 1513-1516.
- Silva, D.S., Garcia, A.C., Mata, S.S., Oliveira, B.D., Estevam, C.S., Scher, R. and Pantaleao, S.M., 2011. Genotoxicity and cytotoxicity of Erythrina velutina Willd. Fabaceae, on the root meristem cells of *Allium cepa*. Revista Brasileira de Farmacognosia, 21(1): 92-97.
- Stegelmeier, B.L., 2011. Pyrrolizidine alkaloid-containing toxic plants (*Senecio, Crotalaria, Cynoglossum, Amsinckia, Heliotropium*, and *Echium* spp.). Veterinary Clinics: Food Animal Practice, 27(2): 419-428.
- Tapsell, L.C., Hemphill, I., Cobiac, L., Sullivan, D.R., Fenech, M., Patch, C.S., Roodenrys, S., Keogh, J.B., Clifton, P.M. and Williams, P.G., 2006. Health benefits of herbs and spices: the past, the present, the future. Medical Journal of Australia, 185(4): S4-24.
- Timothy, S.T. and Richard, L.K., 2007. Herbal Products, Toxicology and Clinical Pharmacology. New Jersey: Humana Press, 288p.
- Vivek, R., Thangam, R., Muthuchelian, K., Gunasekaran, P., Kaveri, K. and Kannan, S., 2012. Green biosynthesis of silver nanoparticles from *Annona squamosa* leaf extract and its in vitro cytotoxic effect on MCF-7 cells. Process Biochemistry, 47(12): 2405-2410.
- Yao, T. and Asayama, Y., 2017. Animal-cell culture media: History, characteristics, and current issues. Reproductive Medicine and Biology, 16(2): 99-117.
- Yuan, Q., Zhang, X., Liu, Z., Song, S., Xue, P., Wang, J. and Ruan, J., 2013. Ethanol extract of *Adiantum capillus-veneris* L. suppresses the production of inflammatory mediators by inhibiting NF-κB activation. Journal Ethnopharmacology, 147(3): 603-611.

Rakian, R., 2012. Evaluation of DNA damage of hydro-alcoholic and aqueous extract of *Echium amoenum* and *Nardostachys jatamansi*. Journal of research in medical sciences, 17(8): 782-786.
- Firoozan, J., 2019. Evaluation of cytotoxic effect of *Echium amoenum* Fisch & C.A. Mey. and *Cuscuta epithymum* extracts on breast cancer cells in in vitro system. Dissertation, Tabriz University of Medical Sciences, 18: 825-831.
- Fotakis, G. and Timbrell, J.A., 2006. In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. Toxicology Letters, 160(2): 171-177.
- Grecco, S.D.S., Martins, E.G.A., Girola, N., de Figueiredo, C.R., Matsuo, A.L., Soares, M.G., Bertoldo, B.D.C., Sartorelli, P. and Lago, J.H.G., 2015. Chemical composition and in vitro cytotoxic effects of the essential oil from *Nectandra leucantha* leaves. Pharmaceutical Biology, 53(1): 133-137.
- Hayon, T., Dvilansky, A., Shpilberg, O. and Nathan, I., 2003. Appraisal of the MTT-based assay as a useful tool for predicting drug chemosensitivity in leukemia. Leukemia & Lymphoma, 44(11): 1957-1962.
- Heidari, M.R., Azad, E.M. and Mehrabani, M., 2006. Evaluation of the analgesic effect of *Echium amoenum* Fisch & C.A. Mey. extract in mice: possible mechanism involved. Journal of Ethnopharmacolgy, 103(3): 345-349.
- Iselt, M., Holtei, W. and Hilgard, P., 1989. The tetrazolium dye assay for rapid in vitro assessment of cytotoxicity. Arzneimittel-Forschung, 39(7): 747-749.
- Khan, M., Xiao, Y., Yu, B., Wang, N., Rasul, A., Yi, F., Yang, L., Yang, H., Ma, T. and Artabotryside, A., 2012. A constituent from *Descurainia sophia* (L.) induces cell death in U87 glioma cells through apoptosis and cell cycle arrest at G2/M phase. Journal of Medicinal Plants Research, 6(21): 3754-3765.
- Khanavi, M., Pourmoslemi, S., Farahanikia, B., Hadjiakhoondi, A. and Ostad, S.N., 2010. Cytotoxicity of *Vinca minor*. Pharmaceutical Biology, 48(1): 96-100.
- Mehrabani, M. and Mehrabani, M., 2007. Evaluation of hepatotoxicity of common doses of decoction of *Echium amoenum* Fisch and CA Mey in rats. Journal of Kerman University of Medical Sciences, 14(1): 44-54.
- Mehrabani, M., Ghannadi, A., Sajjadi, S.E., Ghassemi, N. and Shams-Ardakani, M., 2006. Toxic

www.SID.ir

Archive of SID

Cytotoxicity of *Echium amoenum* Fisch. et Mey. petals aqueous extract on human glioblastoma cells

S. Mohsenzadeh[1*], M. Farrokhmanesh[2] and R. Masoudi[3]

1*- Corresponding author, Biology Department, Shiraz University, Shiraz, Iran, E-mail: mohsenz@shirazu.ac.ir
2- M.Sc. graduated, Biology Department, Shiraz University, Shiraz, Iran
3- Biology Department, Shiraz University, Shiraz, Iran

Received: October 2019 Revised: May 2020 Accepted: May 2020

Abstract

Medicinal plants have potentially cytotoxic effects due to their secondary metabolites, and it is important to know their cytotoxicity. *Echium amoenum* Fisch. et Mey., native to the northern part of Iran, is one of the important medicinal herbs in traditional Iranian medicine. It has large red flowers that turn dark purple after drying, and its decoction has medicinal uses. The aim of this study was to evaluate the cytotoxicity of aqueous extract of *E. amoenum* petals on human cells. In this study, the cytotoxic effects of different concentrations of *E. amoenum* extract on human glioblastoma cells was studied by MTT assay in a completely randomized statistical design with three replications. The results showed that the aqueous extract of this plant with IC_{50}=19.28 mg ml^{-1} had a cytotoxic effect on human glioblastoma cells. The morphology of the treated cells changed from polygonal to spherical. The results of the present study showed that although the aqueous extract of *E. amoenum* petals had beneficial effects, it should be used with caution according to the instructions, because as it has a cytotoxic effect on human glioblastoma cells, it may also have a cytotoxic effect on healthy cells.

Keywords: MTT assay, human glioblastoma cells, cytotoxicity, *Echium amoenum* Fisch. et Mey., medicinal plant.

www.SID.ir