Archive of SID

ISSN: 2538-5887; Pathobiology Research. 2020;23(4):177-183

Effect of Hydroalcoholic Extract of Lavender on Apoptosis of Liver Cancer Cells (HepG2)

ARTICLE INFO

Article Type
Original Research

Authors
Rezaei M.[1] *PhD,*
Rajabbeigi E.*[2] *PhD*

How to cite this article
Rezaei M, Rajabbeigi E. Effect of Hydroalcoholic Extract of Lavender on Apoptosis of Liver Cancer Cells (HepG2). Pathobiology Research. 2020; 23(4):177-183.

ABSTRACT

Aims Despite many advances in cancer treatment and control, significant deficiencies remain and the rate of cancer growth is increasing. Due to the side effects of using chemicals and radiation, the use of herbs can have fewer side effects for the patient. The aim of the current study is to investigate the potential anticancer effects of alcoholic extract of Lavender on inhibition and growth of HepG2 cell lines.

Materials & Methods In this study, the effect of alcoholic extract of lavender (1, 10, 100, and 1000µg/ml) on HepG2 liver cancer cell line was studied. MTT assay was used to evaluate the toxicity of lavender extract and cell viability. Cell cycle changes were assessed using a flow cytometer. Oxygen-free species production and membrane lipid peroxidation were also measured.

Findings The results showed that alcoholic extract of Lavender has anticancer effect on HepG2 cell line. After confirming the effect of lavender extract on cell cycle, the results obtained from the evaluation of membrane lipid peroxidation and production of free reactive species were also significant.

Conclusion According to the results of this study, the alcoholic extract of Lavender was reported as a potential anticancer agent and is one of the therapeutic strategies in liver cancer.

Keywords Apoptosis; Lavender; Cell Cycle; Hepatic Cancer (HepG2)

[1]Department of Biochemistry-Biophysics, Faculty of Advance Science and Technology, Medical Sciences Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
[2]Department of Developmental Biology, Faculty of Advance Science and Technology, Medical Sciences Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Correspondence
Address: Islamic Azad University of Medical Sciences, Shariati St, Tehran, Iran, Post Code: 19395/1495.
Phone: +98 (21) 22006660
Fax: +98 (21) 22006660
rajabbeigi@iautmu.ac.ir

Article History
Received: February 18, 2020
Accepted: September 02, 2020
ePublished: December 20, 2020

CITATION LINKS

[1] Colorectal cancer in Iran: Molecular epidemiology ... [2] Effective medicinal plant in cancer treatment ... [3] Estimates of worldwide burden of cancer in 2008 ... [4] Aflatoxin B1-induced hepatocellular carcinoma in developing countries: Geographical ... [5] The changing pattern of epidemiology in hepatocellular ... [6] Medicinal plants and cancer ... [7] A comparative study of anti-mutation and anti-carcinogenic ... [8] The evaluation of lavender aqueous extract ... [9] Effect of Lavander (Lavandula angustifolia) essential ... [10] In vitro and in vivo efficacy studies of Lavender ... [11] Aqueous extract of Lavender angustifolia inhibits lymphocytes ... [12] Effects of aromatherapy with lavender and peppermint ... [13] Evaluation of Lavandula angustifolia cytotoxic and apoptotic ... [14] Total phenols from grape leaves counteract cell proliferation ... [15] Apoptotic and inhibitory effects on cell proliferation ... [16] Hepatoprotective and renoprotective effects of Lavender ... [17] Histopathological and macroscopical evaluation of Lavandulla ... [18] The Antioxidant and cytotoxic effects of Lavandulla ... [19] Proteomics analysis of MKN45 cell line before ... [20] Gas chromatographic-mass spectrometric analysis ... [21] Cytotoxicity of lavender oil and its major components ... [22] Stepwise activation of BAX and BAK by tBID, BIM, and PUMA ... [23] Jolkinolide B induces apoptosis in MDA-MB-231 cells ... [24] Lavender and the nervous ... [25] Lavender (Lavandula stoechas L.) essential oils ... [26] The role of p21 in apoptosis, proliferation ... [27] Hepatoprotective potential of Lavandula coronopifolia ...

Copyright© 2020, TMU Press. This open-access article is published under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License which permits Share (copy and redistribute the material in any medium or format) and Adapt (remix, transform, and build upon the material) under the Attribution-NonCommercial terms.

www.SID.ir

Archive of SID

تاثیر عصاره هیدروالکلی گیاه اسطوخودوس بر آپوپتوز سلول‌های سرطانی کبد ($HepG_2$)

مهتاب رضایی MSc

گروه بیوشیمی- بیوفیزیک، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین، واحد علوم پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

الهام رجب‌بیگی* PhD

گروه تکوین، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین، واحد علوم پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

چکیده

اهداف: با وجود پیشرفت‌های فراوان در زمینه درمان و کنترل سرطان، همچنان کمبودهای قابل توجهی در این زمینه وجود دارد و نرخ افزایش سرطان رو به رشد است. با توجه به عوارض جانبی استفاده از مواد شیمیایی و پرتودرمانی، استفاده از گیاهان می‌تواند عوارض کمتری برای بیمار داشته باشد. هدف از مطالعه حاضر بررسی آثار احتمالی ضدسرطانی عصاره الکلی اسطوخودوس بر مهار و رشد سلول‌های کبدی رده سلولی $HepG_2$ است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تاثیر عصاره الکلی اسطوخودوس با غلظت‌های ۱، ۱۰، ۱۰۰ و ۱۰۰۰میکروگرم بر میلی‌لیتر بر رده سلولی سرطان کبد $HepG_2$ مورد مطالعه قرار گرفت. برای بررسی میزان سمیت عصاره الکلی اسطوخودوس و میزان زنده‌مانی سلول‌ها از روش MTT استفاده شد. تغییرات چرخه سلولی با استفاده از دستگاه فلوسایتومتر مورد بررسی قرار گرفت. تولید گونه‌های آزاد اکسیژنی و پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی نیز سنجیده شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد عصاره الکلی گیاه اسطوخودوس بر رده سلولی $HepG_2$ اثر ضدسرطانی دارد. در پی تایید تاثیر عصاره اسطوخودوس بر سیکل سلولی، نتایج ناشی از بررسی میزان پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی و تولید گونه‌های آزاد واکنشگر نیز معنادار گزارش شد.

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج حاصل از این مطالعه عصاره الکلی گیاه اسطوخودوس به‌عنوان عامل بالقوه ضدسرطانی گزارش شده است و از جمله استراتژی‌های درمانی در سرطان کبد به شمار می‌رود.

کلیدواژه‌ها: آپوپتوز، اسطوخودوس، چرخه سلولی، رده سلولی سرطان کبد ($HepG_2$)

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۱/۲۹

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۶/۱۲

*نویسنده مسئول: rajabbeigi@iautmu.ac.ir

مقدمه

سرطان یکی از مشکلات عمده سلامتی در جهان است[1] و با تغییر شکل سلول‌های طبیعی ناشی از جهش‌های ژنتیکی در DNA آغاز می‌شود[2]. سرطان بعد از بیماری‌های قلبی- عروقی دومین علت مرگ و میر در جهان به شمار می‌رود[3]. به‌طور متوسط در سراسر جهان از هر ۱۰۰۰۰۰ انسان، ۱۸۲ نفر مبتلا به سرطان هستند که از این بین ۱۰۲ نفر جان خود را از دست می‌دهند[2]. رایج‌ترین سرطان‌ها در سراسر دنیا شامل سرطان ریه با ۱/۶۱ میلیون (۱۲/۷%)، سرطان پستان با ۱/۳۸ میلیون (۱۰/۹%) و سرطان کلورکتال با ۱/۲۳ میلیون (۹/۷%) نفر است[3]. در این میان، کارسینوم هپاتوسلولار (Hcc) شناخته‌شده‌ترین بدخیمی اولیه به شمار می‌رود و بروز آن در نرخ هشدار قرار گرفته است و تبدیل به یک نگرانی عمومی شده است[4]. سرطان کبد در مردان پنجمین و در زنان هفتمین سرطان شایع است و سالانه بیش از ۵۰۰۰۰۰ نفر در جهان به این بیماری مبتلا می‌شوند[3].

امروزه مهم‌ترین علل ایجاد سرطان کبد شناخته شده است. از جمله این عوامل می‌توان به هپاتیت، مصرف الکل، استعمال دخانیات و مواجهه با مواد شیمیایی سمی از جمله آفلاتوکسین‌ها اشاره کرد[5]. با وجود شناسایی علل سرطان کبد و همچنین پیشرفت‌های زیادی که در زمینه درمان سرطان انجام شده است، همچنان کمبودهای قابل توجهی در روند درمانی این بیماری وجود دارد[6]. روش‌های مختلفی برای درمان این بیماری وجود دارد که از جمله آنها می‌توان به شیمی‌درمانی، رادیوتراپی، جراحی و گیاه‌درمانی اشاره کرد. در حال حاضر محققین به دنبال ترکیباتی هستند که دارای عوارض جانبی کمتر و اثر القای سمیت سلولی بیشتر در سلول‌های سرطانی باشند. یکی از استراتژی‌های درمان سرطان مداخلات دارویی است که بتواند سبب القای مرگ برنامه‌ریزی‌شده در سلول‌های سرطانی شود[7, 8]. امروزه ۶۰% ترکیبات ضدسرطانی برای درمان بیماران از منابع گیاهی، دریایی و میکروارگانیزم‌ها به دست می‌آید[7]. استفاده از گیاهان دارویی برای درمان بیماری‌ها سابقه‌ای ۵میلیون‌ساله دارد[8]. براساس مطالعات عصاره گیاهانی با خاصیت ضدسرطانی دارای ترکیبات آنتی‌اکسیدانی است و وجود این ترکیبات موجب تحریک آپوپتوز در رده‌های سلول‌های سرطانی می‌شود[8].

گیاه اسطوخودوس (*Lavandula angustifolia* Mill) متعلق به خانواده نعناعیان حاوی ترکیبات شیمیایی ژرانیوا، بورنئول، تیمول، پریلیل‌الکل، فلاونوئید و فیتوسترول است[9]. اسانس‌های آن در صنایع آرایشی و بهداشتی، عطرسازی و دارویی کاربرد دارد. مهم‌ترین ترکیبات موجود در عصاره آن لینالول و لینالول‌استات است که کاهش‌دهنده استرس هستند و در درمان سردرد، میگرن، سرماخوردگی، بی‌خوابی، تحریک‌پذیری، خستگی، سوء هاضمه، ناراحتی‌های گوارشی و غیره به کار می‌رود[10, 11]. گزارش شده است که برخی مونوترپن‌ها و مشتقات پرلیل‌الکل‌های موجود در *L. auguatifoli* ویژگی‌های لازم برای جایگزینی شیمی‌درمانی را دارند[11, 12]. *امیری* و همکاران با بررسی اثر سیتوتوکسیک و آپوپتوتیک اسانس اسطوخودوس بر رده سلول‌های Hela مهار رشد سلول‌های سرطانی فاز G_1 را گزارش کردند[13].

همچنین مطالعه‌ای دیگر، در رابطه با بررسی تاثیر اسانس اسطوخودوس بر سرطان پروستات ناشی از توقف چرخه سلول در فاز G_2 و تایید اثر ضدتوموری با مهار تکثیر سلولی و القای آپوپتوز بود[10]. مطالعات گذشته نشان داده‌اند که عصاره اتانولی گیاه اسطوخودوس با غلظت ۵میلی‌گرم بر میلی‌لیتر پس از ۴۸ ساعت می‌تواند اثر سایتوتوکسیک بر روی رده سلولی 8305C داشته باشد. تاکنون اثر عصاره اتانولی گیاه مذکور بر رده $HepG_2$ مورد بررسی قرار نگرفته است. در مطالعه حاضر اثر سمیت عصاره اسطوخودوس با غلظت‌های ۱، ۱۰، ۱۰۰ و ۱۰۰۰میکروگرم بر

www.SID.ir

Archive of SID

میلی‌لیتر طی دو زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت در رده سلول‌های سرطانی کبد $HepG_2$ و میزان تولید گونه‌های آزاد اکسیژنی و پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

به‌منظور تهیه عصاره گیاهی ابتدا قسمت هوایی گیاه اسطوخودوس جدا شد. پس از شست‌وشو و خشک‌شدن کامل، بخش هوایی گیاه به‌خوبی ساییده شد تا کاملاً به‌صورت پودرشده درآمد. در ادامه به ۲۵۰گرم از پودر خشک یک‌لیتر اتانول ۷۰% (زکریا؛ ایران) اضافه شد و به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷°C قرار گرفت. سپس محتوای ظرف با استفاده از فیلتر، صاف و مایع به‌دست‌آمده روی بن‌ماری (Memmert؛ آلمان) قرار گرفت تا زمانی که آب آن به‌طور کامل بخار و یک ماده قیرمانند حاصل شد. در پایان عصاره‌های خشک جمع‌آوری و برای تهیه غلظت‌های مورد نظر به فریزر ۲۰°C- منتقل شدند. هنگام تیمار با سلول‌های مذکور در غلظت‌های ۱، ۱۰، ۱۰۰ و ۱۰۰۰میکروگرم در میلی‌لیتر از عصاره‌ها استفاده شد. برای تعیین غلظت‌های فوق اتانول به کار برده شد. برای گروه کنترل هم حدود ۱۰۰میکرولیتر از محیط کشت DMEM به آن اضافه شد و مجدداً در انکوباتور قرار گرفت.

رده سلولی مورد استفاده، رده سلولی $HepG_2$ مربوط به سرطان کبد بود که از مرکز تحقیقاتی انستیتو پاستور ایران تهیه شد. برای کشت این سلول‌ها محیط DMEM (Gipco؛ ایالات متحده) غنی‌شده با سرم ۱۰% FBS (Medicago؛ سوئد) در دمای ۳۷°C و میزان ۵% CO_2 مورد استفاده قرار گرفت.

محیط کشت فلاسک کاملاً تخلیه و سطح سلول‌ها یک‌بار با حجم کمی از PBS (Medicago؛ سوئد) به‌آرامی شست‌وشو داده شدند. بعد از خارج‌کردن PBS، به‌منظور جداشدن سلول‌ها از کف فلاسک، آنزیم تریپسین (Gipco؛ ایالات متحده) همراه با EDTA (Gipco؛ ایالات متحده) اضافه شد و در دمای ۳۷°C به مدت ۲ تا ۳ دقیقه انکوبه شد. محیط کشت روزانه تعویض و هر ۳ تا ٤ روز پاساژ داده شد.

به‌منظور سنجش سمیت سلولی، نمک MTT (Merk؛ آلمان) به نمونه‌ها اضافه و توسط یک آنزیم میتوکندریایی شکسته می‌شود و تولید فورمازون نامحلول می‌کند که قابل‌اندازه‌گیری است. به‌منظور بهینه‌سازی تعداد سلول‌ها برای تیمار با عصاره الکلی تهیه‌شده شمارش سلولی توسط لام هموسایتومتر انجام شد و در ادامه انجام تست MTT در دو سری پلیت ۹۶خانه در دو زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت انجام شد و ده‌هزار سلول (معادل ۱۰۰میکرولیتر) در هر چاهک قرار گرفت. در ادامه چهار غلظت ۱، ۱۰، ۱۰۰ و ۱۰۰۰میکروگرم در میلی‌لیتر از عصاره الکلی اسطوخودوس تهیه و سلول‌های رده $HepG_2$ با آنها تیمار شدند. در این آزمون گروه تیمارشده با عصاره هیدروالکلی آرتمیزیا با گروه کنترل (سلول‌های فاقد عصاره) مقایسه شدند. پس از انکوباسیون میزان جذب رنگ تولیدی با دستگاه الیزاریدر (BioTec؛ ایالات متحده) در طول موج ۶۰۰-۵۰۰نانومتر قرائت شد. اعداد به‌دست‌آمده به‌صورت نمودار گزارش شدند.

براساس نتایج غلظتی از عصاره که دارای میزان جذب به اندازه نصف جذب مشاهده‌شده در کنترل منفی است به‌عنوان IC_{50} در نظر گرفته شد. یعنی غلظتی از عصاره که باعث مرگ سلولی در ۵۰% جمعیت سلولی تیمارشده می‌شود.

به‌منظور بررسی تاثیر عصاره اسطوخودوس بر سیکل سلولی، پس از شست‌وشوی سلول‌ها، انکوباسیون و شمارش سلولی، ۲/۵میلی‌لیتر از حجم سلولی معادل (۲۰۰۰۰۰ سلول) و ۹/۵میلی‌لیتر محیط کشت به هر چاهک از پلیت ۶خانه‌ای (SPL؛ کره)، افزوده و به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت انکوبه و پس از گذر زمان مذکور و انتقال محتویات پلیت به فالکون، سانتریفیوژ (ژال تجهیز؛ ایران) با سرعت ۱۲۰۰دور بر دقیقه و به مدت ۵دقیقه انجام و به قسمت پلاک ۱میلی‌لیتر PBS (Medicago؛ سوئد) افزوده شد و پس از چندین مرتبه پیپتاژ مجدداً سانتریفیوژ با سرعت ۱۲۰۰دور بر دقیقه و به مدت ۵دقیقه انجام گرفت.

سپس به رسوب حاصل ۴/۵میلی‌لیتر اتانول ۷۰% و ۰/۵میلی‌لیتر PBS افزوده شد. پس از چندین مرتبه پیپتاژکردن در مرحله انتهایی تست سیکل سلولی محلول پروپیدیوم‌یدید (Sigma؛ ایالات متحده) به ترکیب نهایی افزوده و جذب در طول موج ۶۰۰-۵۳۰نانومتر توسط دستگاه فلوسایتومتر (BD؛ انگلستان) قرائت شد.

گونه‌های فعال اکسیژنی (ROS) مولکول‌های کوچک ناپایدار و بسیار واکنش‌پذیری هستند که می‌توانند پروتئین‌ها، لیپیدها و DNA را اکسید کنند و با احیای ناقص، یک الکترون اکسیژن تشکیل دهند. آماده‌سازی سلول‌ها در این مرحله مشابه آنالیزهای مربوط به سیکل سلولی بود. بعد از پایان مدت زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت مربوط به هر یک از پلیت‌های ۶خانه، دو عدد فالکون مجزا (شامل استوک اولیه و محیط کشت) برای انتقال محتویات از فالکون‌ها به چاهک‌های مربوط به خود انتخاب شد. در انتها، ۰/۵میلی‌لیتر DCHF (کربوکسی‌دی‌کلرودی‌هیدروفلئورسین) ۲۵میکرومولار (AB CAM؛ انگلستان) به پلیت سلولی اضافه شد. جذب و نشر با دستگاه فلوسایتومتر و در طول موج ۶۰۰-۵۳۰نانومتر سنجیده شد. باید در نظر داشت که فالکون حاوی گروه کنترل، فاقد محلول DCFH است.

به‌منظور اندازه‌گیری میزان پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی، ۵۰۰۰۰۰ سلول شمارش و سپس سانتریفیوژ با سرعت ۳۰۰۰دور بر دقیقه به مدت ۵دقیقه انجام شد. به رسوب حاصل تری‌کلرواستیک‌اسید ۱۰% (Sigma؛ ایالات متحده) اضافه شد. سپس سلول‌ها به‌مدت ۲ دقیقه با تعداد ۶۰سیکل در ثانیه سونیکیت شدند و بعد از شفاف‌شدن محلول حاوی سلول و همگن‌سازی، سانتریفیوژ با سرعت ۱۲۰۰دور بر دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد.

در مرحله بعد به محلول رویی ۰/۵میلی‌لیتر تیوباربیورتیک‌اسید

www.SID.ir

Archive of SID

۰/۵% (Sigma؛ ایالات متحده) اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه در بن‌ماری (Memmert؛ آلمان)، در دمای ۱۰۰°C قرار گرفت.

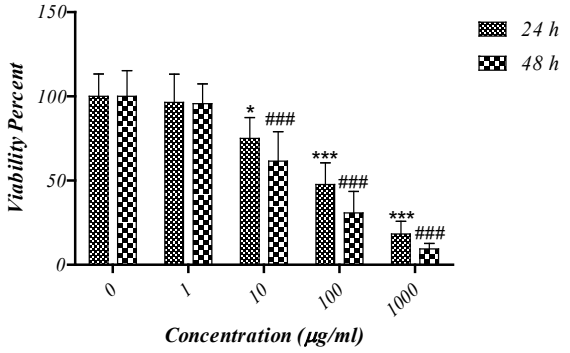
در نهایت میزان مالونیل‌دی‌آلدئید حاصل از تخریب لیپیدهای غشایی با اندازه‌گیری جذب در طول موج ۶۰۰-۵۳۲نانومتر و با استفاده از ضریب ثابت $\varepsilon = 155 mM^{-1}cm^{-1}$ محاسبه شد.

محاسبات آماری با استفاده از نرم‌افزار آماری Graphpad prism 5 انجام شد. اطلاعات پس از ورود به نرم‌افزار با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه تجزیه و تحلیل شدند. به دنبال آن از آزمون تکمیلی بونفرونی برای مقایسه گروه شاهد و گروه‌های مختلف تیمار استفاده شد.

نتایج به‌صورت میانگین آماری حاصل از حداقل ۳ تکرار مستقل بیان شدند. تفاوت معنی‌داری میان گروه‌ها با حدود اطمینان ۹۵% ($p<0/05$) گزارش شد.

یافته‌ها

در مطالعه حاضر از رده سلول‌های سرطانی کبد ($HepG_2$) استفاده شد. سلول‌ها تحت دو گروه شاهد و تیمار با عصاره تقسیم‌بندی شدند. انتخاب زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت نیز طبق تحقیقات صورت‌گرفته انجام شد. اثر سمیت سلولی عصاره الکلی اسطوخودوس در غلظت‌ها و زمان‌های مختلف بر سلول‌های سرطانی و سلول‌های سرطانی تحت تاثیر عصاره بررسی شد. نمودار ۱ تاثیر عصاره اسطوخودوس به روش MTT بر رده سلول‌های سرطانی کبد را نشان می‌دهد. مقدار IC_{50} حاصل از تیمار با عصاره اسطوخودوس در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت به ترتیب ۸۰/۶۲ و ۲۶/۵۷میکروگرم بر میلی‌لیتر بود.



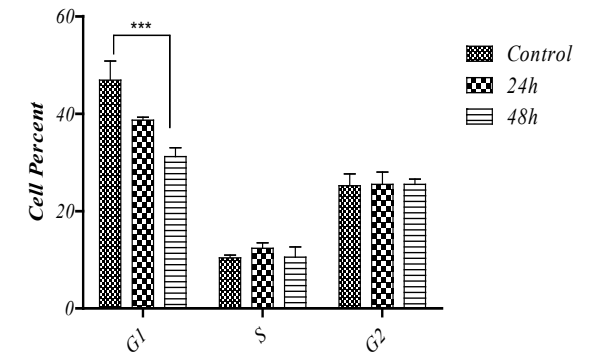
نمودار ۱) نمودار دوز- پاسخ؛ نتایج حاصل از تست سمیت با استفاده از MTT در غلظت‌های مختلف عصاره اسطوخودوس (۱، ۱۰، ۱۰۰ و ۱۰۰۰میکروگرم بر میلی‌لیتر و غلظت صفر به‌عنوان شاهد) در ۲۴ و ۴۸ ساعت؛ نتایج به‌صورت میانگین آماری گزارش شده‌اند.

آنالیزهای انجام‌شده توسط نرم‌افزار Graph pad prism، اختلاف معناداری در فازهای G_1، S و G_2 میان گروه شاهد و گروه تیمار ۲۴ ساعت نشان نداد. بنابراین عصاره اسطوخودوس در مدت زمان ۲۴ ساعت فاقد اثر قابل توجه بر سیکل سلولی به معنای افزایش، کاهش و یا حتی القای آپوپتوز در هر یک از فازهای سیکل سلولی و تاثیر بر سلول‌های سرطانی بافت کبد $HepG_2$ بوده است.

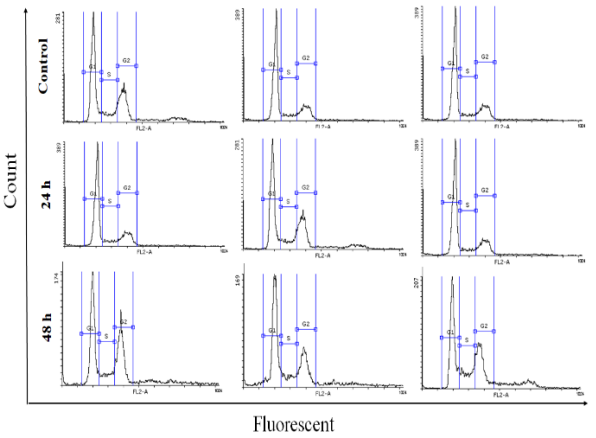
اما تیمار ۴۸ساعته سلول‌های سرطانی $HepG_2$ با عصاره هیدروالکلی اسطوخودوس بر فاز G1 چرخه سلولی اثر داشته است و موجب افزایش میزان نرخ مرگ و میر و القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی شده است.

از آنجا که این تاثیرگذاری در گروه تیمار ۲۴ ساعت مشاهده نشد بنابراین زمان عامل دخیل در القای آپوپتوز در فاز G_1 چرخه سلولی به شمار می‌آید. نمودار ۲ نتایج حاصل از معناداری فازهای سیکل سلولی در دو گروه شاهد و تیمار را نشان می‌دهد.

طی آنالیزهای آماری انجام‌شده مقدار p-value در گروه تیمار ۲۴ ساعت و همچنین در گروه تیمار ۴۸ ساعت نسبت به گروه شاهد به‌صورت معنادار گزارش شد ($p\leq0/05$). نتایج حاصل از میزان تولید گونه‌های آزاد اکسیژنی در نمودار ۳ مشاهده می‌شود. شدت تاثیرگذاری در ۲۴ ساعت دوم بیشتر گزارش شد و میزان تولید گونه‌های آزاد واکنشگر افزایش یافت.



(A)



(B)

نمودار ۲) اثر عصاره اسطوخودوس روی توزیع چرخه سلولی رده سلولی HepG2؛ هیستوگرام فلوسایتومتری گروه شاهد و غلظت‌های مختلف تیمار (A)؛ مقایسه سه فاز چرخه سلولی تحت تاثیر عصاره اسطوخودوس پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت (B)؛ عصاره اسطوخودوس سلول را در فاز G1 پس از ۲۴ ساعت متوقف می‌کند؛ *** بیانگر معناداری در سطح $p<0/001$ است؛ نتایج به‌صورت میانگین آماری نشان داده شده‌اند.

www.SID.ir

Archive of SID

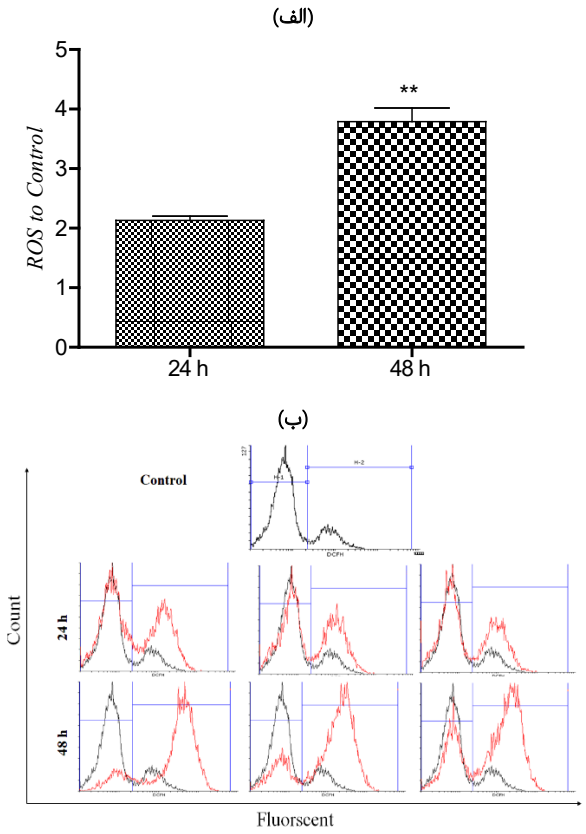
بحث و نتیجه‌گیری

طی دهه‌های گذشته با توجه به هزینه‌های قابل توجهی که در تولید جدیدترین مواد شیمیایی در درمان سرطان انجام شده (در اروپا به‌طور تقریبی هزینه‌های درمانی سرطان بالغ بر پنج‌میلیارددلار در سال تخمین زده شده است) نتایج قابل قبولی حاصل نشده و در مقابل طی سی‌سال گذشته استفاده از محصولات طبیعی بسیار مورد توجه قرار گرفته است[11]. تقریباً ۹۰ مورد از ۱۲۱ داروی مرتبط با درمان سرطان منشاء گیاهی دارند[14]. براساس مطالعات انجام‌شده عصاره گیاهانی با خاصیت ضدسرطانی دارای ترکیبات آنتی‌اکسیدانی است که وجود این ترکیبات موجب تحریک آپوپتوز رده‌های مختلف سلول‌های سرطانی می‌شود[15]. در این میان، اسطوخودوس گیاهی است که قرن‌ها برای مصارف درمانی در فارماکوپه چندین کشور قرار گرفته است[16]. غربالگری فیتوشیمیایی این گیاه حاکی از وجود مولکول‌های زیستی فعال بوده و ترکیبات شیمیایی غالب اسانس این گیاه شامل لینالول، ژرانیول، بورنئول، تیمول، کامفور، فیتوسترول، پریلیل‌الکل و همچنین ترکیبات فنلی (تانن و فلاونوئید) است[9]. در حال حاضر الکل‌پریلیل و فلاوونوئید موجود در اسطوخودوس نیز از جمله ترکیبات مهم در شیمی‌درمانی به شمار می‌روند[15, 17].

در سال‌های اخیر مطالعات زیادی بر روی خاصیت سیتوتوکسیک عصاره گیاه اسطوخودوس انجام شده است. مطالعات انجام‌شده روی سلول‌های تیروئید آناپلاستیک نشان داد که غلظت ۵میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره اتانولی اسطوخودوس پس از ۴۸ ساعت می‌تواند بر رده سلولی 8305C اثر سیتوتوکسیک داشته باشد[18]. مطالعات *دلیلان* و همکاران نشان داد که عصاره آبی اسطوخودوس اثر موثری بر مهار سلول‌های سرطانی لنفاوی، روده و معده دارد[11]. همچنین عصاره آبی اسطوخودوس بر تکثیر سلول‌های مذکور اثرگذار است و رشد را از طریق نکروز مهار می‌کند[8].

مطالعات انجام‌شده بر روی عصاره آبی گیاه اسطوخودوس نیز نشان داد که غلظت‌های ۱۰۰میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصاره موجب مهار تکثیر سلول‌های لنفوم هوجکین و غلظت ۱۰۰-۳۰۰میکروگرم بر میلی‌لیتر موجب مهار تکثیر رده سلولی MKN45 می‌شود[12, 19]. تاکنون مطالعاتی در مورد بررسی خواص سرطانی عصاره اتانولی گیاه اسطوخودوس بر روی رده سلولی HepG2 انجام نشده، بنابراین مطالعه حاضر اولین مطالعه در این زمینه است. در میان ترکیبات موثر اسطوخودوس اثرات ضدسرطانی و درمانی اسانس‌های آن و به‌ویژه لینالول و لینالیل‌استات و همچنین پرلیل‌الکل‌های آن بیشتر مورد توجه قرار گرفته است[11, 20, 21].

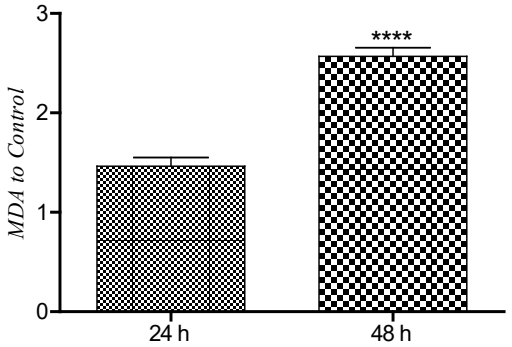
در سال‌های اخیر مطالعات متعددی به‌منظور شناسایی ترکیبات موجود در عصاره استخراج‌شده از گیاهان دارویی و نقش هر یک از آنها در تنظیم مسیرهای مرتبط با بروز آپوپتوز انجام پذیرفته است. کیم و همکاران نقش بیوتین به‌عنوان یک پلی‌فنل در القای آپوپتوز بر رده سلولی HL-60 سرطان خون انسانی را مورد بررسی



نمودار ۳) مقایسه میزان تولید گونه‌های آزاد واکنشگر در گروه تیمار در ۲۴ و ۴۸ ساعت (الف) و گروه شاهد (ب) رده سلولی HepG2 که با دستگاه فلوسایتومتری مورد بررسی قرار گرفت (** نشان‌دهنده معناداری در سطح p<۰/۰۰۱ است)؛ نتایج به‌صورت میانگین آماری گزارش شده‌اند.

پس از آنالیزهای انجام‌شده حاصل از نتایج اولیه، توسط نرم‌افزار Graph pad prism، اختلاف معناداری بین میزان تولید مالون‌دی‌آلدهید در گروه‌های شاهد و تیمار ۲۴ ساعت و همچنین در مقایسه گروه شاهد و تیمار ۴۸ ساعت سلول‌های سرطانی بافت کبد HepG2 در سطح p<۰/۰۵ مشاهده شد.

همچنین طبق نمودار ۳ میزان تولید مالون‌دی‌آلدهید در گروه تیمار ۴۸ ساعت نسبت به میزان تولید آن در گروه تیمار ۲۴ ساعت بیشتر گزارش شد (نمودار ۴).



نمودار ۴) مقایسه میزان تولید مالون‌دی‌آلدهید در گروه‌های تیمار (۲۴ و ۴۸ ساعت) و شاهد رده سلولی HepG2؛ **** نشان‌دهنده معناداری در سطح p<۰/۰۵ است.

www.SID.ir

Archive of SID

قرار دادند که نتایج این مطالعه حاکی از افزایش فعالیت کاسپاز۳ و کاهش میزان بیان Bcl_2 و القای آپوپتوز بود[22]. در مطالعه دیگری که تاثیر عصاره *Euphorbia fischeriana* بر سلول‌های سرطانی سینه مورد بررسی قرار گرفت، نتایج نشان داد نسبت بیان Bax/Bcl_2 کاهش یافته و فعالیت کاسپاز۳ و آپوپتوز از طریق مسیر میتوکندریایی القا شده است[23].

در این مطالعه، فعالیت سمیت عصاره با استفاده از سنجش MTT (۲، ۳ و ۵ دی‌فنیل‌تترازولیوم‌بروماید) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل نشان داد عصاره اتانولی اسطوخودوس موجب مهار چرخه سلولی سلول‌های سرطانی بافت کبد ($HepG_2$) در فاز G_1 در گروه تیمار ۴۸ ساعت می‌شود. در مطالعه دیگری اثر عصاره اسطوخودوس بر سلول‌های سرطانی دهانه رحم مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد بیان پروتئین پروآپوپتوتیک Bax در پاسخ به عصاره مذکور افزایش یافته است که در نهایت منجر به القای آپوپتوز شد[24]. بررسی دیگری نشان داد عصاره گیاه اسطوخودوس موجب آپوپتوز سلول‌های سرطانی دهانه رحم و توقف چرخه سلولی در فاز G_1 می‌شود، در حالی که اسانس‌های استخراج‌شده از این گیاه رده سلولی PC3 چرخه سلولی در G2/M مهار می‌شود[14, 23]. بنابراین به نظر می‌رسد عصاره اسطوخودوس می‌تواند با افزایش بیان برخی پروتئین‌های دخیل در مسیر آپوپتوز نظیر پروتئین Bax و یا آزادی سیتوکروم c و افزایش فعالیت کاسپاز۳ منجر به القای آپوپتوز در این رده سلولی شده است[21].

نتایج فلوسایتومتری حاصل از این مطالعه بیانگر افزایش تولید گونه‌های آزاد اکسیژنی در گروه تیمار ۲۴ و ۴۸ ساعت سلول‌های سرطانی لاین کبدی $HepG_2$ در مواجهه با عصاره اتانولی اسطوخودوس بود و شدت تولید ROS در تیمار ۴۸ ساعت نسبت به تیمار ۲۴ ساعت روند صعودی تولید گونه‌های آزاد اکسیژنی را گزارش کرد. نتایج پژوهش *ساندیا* و همکاران بر عصاره متانولی برگ گیاه کاستوس روی سلول‌های سرطانی کبد ($HepG_2$) حاکی از افزایش گونه‌های آزاد اکسیژنی و در پی آن القای آپوپتوز بر این رده سلولی بود[15]. نتایج مطالعه دیگری بر سلول‌های سرطانی کبد نمونه موش صحرایی تحت تیمار با عصاره اسطوخودوس افزایش رادیکال هیدروکسیل را گزارش کرد و با تایید خاصیت آنتی‌اکسیدانی، این گیاه را عاملی برای کاهش آسیب‌های کبدی و کلیوی معرفی کرد[25].

بررسی میزان پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی در این مطالعه بیانگر افزایش پراکسیداسیون لیپیدی در تیمار ۲۴ و ۴۸ ساعت سلول‌های سرطانی $HepG_2$ در مقایسه با گروه شاهد و افزایش میزان مالون‌دی‌آلدهید بود. در حقیقت می‌توان گفت افزایش محتوای MDA به‌عنوان بیومارکری برای تعیین میزان آسیب غشایی است[26]. مطالعات انجام‌شده نشان داده است عصاره *Lavandula coronopi* folia دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی بوده است و تفاوت معناداری در تیمار ۲۴ ساعت سلول‌های سرطانی بافت کبد $HepG_2$ نسبت به گروه شاهد در تولید گونه‌های آزاد اکسیژنی و پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی را نشان داد[27]. نتایج مطالعه انجام‌شده بر روی موش صحرایی افزایش رادیکال هیدروکسیل به‌عنوان اصلی‌ترین عامل پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی را نشان داد. از سوی دیگر در سلول‌های سرطانی بافت کبد نمونه موش صحرایی در تیمار با عصاره اسطوخودوس میزان مالون‌دی‌آلدهید افزایش یافت[25].

با توجه به مطالعات مختلف، به نظر می‌رسد روش عصاره‌گیری، محلولی که عصاره در آن استخراج می‌شود و همچنین نوع سلول مورد مطالعه، همگی بر دوز مناسب برای استفاده از عصاره اسطوخودوس موثر هستند[11]. به‌طور کلی نتایج این مطالعه نشان داد عصاره اتانولی اسطوخودوس در توقف چرخه سلولی و القای آپوپتوز در رده سلول‌های سرطانی کبد $HepG_2$ موثر است. این مطالعه پیشنهاد می‌کند که عصاره الکلی اسطوخودوس می‌تواند به‌عنوان عامل بالقوه ضدسرطانی محسوب شود و در درمان بیماری سرطان کاربرد داشته باشد. چنین نتیجه‌گیری نیازمند انجام آزمایش‌های تکمیلی در محیط *در شیشه* و *در محیط زنده* است.

تشکر و قدردانی: مطالعه حاضر بخشی از پایان‌نامه مقطع کارشناسی‌ارشد رشته بیوشیمی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم پزشکی تهران است و نویسنده بر خود لازم می‌داند از زحمات و مساعدت‌های همه عزیزانی که در به‌ثمررسیدن این مطالعه یاری نمودند تشکر نماید.

تاییدیه اخلاقی: موردی توسط نویسندگان ذکر نشده است.

تعارض منافع: هیچ‌گونه تعارض منافعی وجود ندارد.

سهم نویسندگان: مهتاب رضایی (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر اصلی (۵۰%)؛ الهام رجب بیگی (نویسنده دوم)، روش‌شناس/تحلیلگر آماری/نگارنده بحث (۵۰%)

منابع مالی: مطالعه حاضر بخشی از پروژه دانشجویی بوده و هزینه آن شخصی است.

منابع

1- Dolatkhah R, Somi MH, Bonyadi MJ, Asvadi Kermani I, Farassati F, Dastgiri S. Colorectal cancer in Iran: Molecular epidemiology and screening strategies. J Cancer Epidemiol. 2015;2015:643020.

2- Kooti W, Servatyari K, Behzadifar M, Asadi-Samani M, Sadeghi F, Nouri B, et al. Effective medicinal plant in cancer treatment, part 2: Review study. J Evid Based Complement Altern Med. 2017;22(4):982-95.

3- Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. Int J Cancer. 2010;127(12):2893-917.

4- Hamid AS, Tesfamariam IG, Zhang Y, Zhang ZG. Aflatoxin B1-induced hepatocellular carcinoma in developing countries: Geographical distribution, mechanism of action and prevention. Oncol Lett. 2013;5(4):1087-92.

5- Nordenstedt H, White DL, El-Serag HB. The changing pattern of epidemiology in hepatocellular carcinoma. Dig Liver Dis. 2010;42:S206-14.

6- Desai AG, Qazi GN, Ganju RK, El-Tamer M, Singh J, Saxena AK, et al. Medicinal plants and cancer

www.SID.ir

Archive of SID

induced oxidative stress in young male mice. J Med Food. 2015;18(10):1103-11.
17- Shadkhast M, Bigham-Sadegh A, Nourani H, Eslami F. Histopathological and macroscopical evaluation of Lavandulla officinalis effects on wound healing in rabbit model. Iran J Vet Surg. 2015;8(2):91-6. [Persian]
18- Mehdinezhad Doghikolayi S, Mohammadi M. The Antioxidant and cytotoxic effects of Lavandulla anguostifouliya on the 8305C cell line. New Cell Mol Biotechnol J. 2018;8(32):91-8. [Persian]
19- Zamanian-Azodi M, Rezaie-Tavirani M, Heydari-Kashal S, Kalantari S, Dailian S, Zali H. Proteomics analysis of MKN45 cell line before and after treatment with Lavender aqueous extract. Gastroenterol Hepatol Bed Bench. 2012;5(1):35-42.
20- Zhang Z, Chen H, Chan KK, Budd T, Ganapathi R. Gas chromatographic-mass spectrometric analysis of perillyl alcohol and metabolites in plasma. J Chromatogr B Biomed Sci Appl. 1999;728(1):85-95.
21- Prashar A, Locke IC, Evans CS. Cytotoxicity of lavender oil and its major components to human skin cells. Cell Prolif. 2004;37(3):221-9.
22- Kim H, Tu HC, Ren D, Takeuchi O, Jeffers JR, Zambetti GP, et al. Stepwise activation of BAX and BAK by tBID, BIM, and PUMA initiates mitochondrial apoptosis. Mol Cell. 2009;36(3):487-99.
23- Lin Y, Cui H, Xu H, Yue L, Xu H, Jiang L, et al. Jolkinolide B induces apoptosis in MDA-MB-231 cells through inhibition of the PI3K/Akt signaling pathway. Oncol Rep. 2012;27(6):1976-80.
24- Koulivand H, Khaleghi Ghadiri M, Gorji A. Lavender and the nervous system. Evid Based Complement Alternat Med. 2013;2013;681304.
25- Sebai H, Selmi S, Rtibi K, Souli A, Gharbi N, Sakly M. Lavender (Lavandula stoechas L.) essential oils attenuate hyperglycemia and protect against oxidative stress in alloxan-induced diabetic rats. Lipids Health Dis. 2013;12(1):189.
26- Chen A, Huang X, Xue Z, Cao D, Huang K, Chen J, et al. The role of p21 in apoptosis, proliferation, cell cycle arrest, and antioxidant activity in UVB-irradiated human HaCaT keratinocytes. Med Sci Monit Basic Res. 2015;21:86-95.
27- Farshori NN, Al-Sheddi ES, Al-Oqail MM, Hassan WH, Al-Khedhairy AA, Musarrat J, et al. Hepatoprotective potential of Lavandula coronopifolia extracts against ethanol induced oxidative stress-mediated cytotoxicity in HepG2 cells. Toxicol Ind Health. 2015;31(8):727-37.
chemoprevention. Curr Drug Metab. 2008;9(7):581-91.
7- Majd A, Mehrabian S, Jonoobi P, Modaresi A. A comparative study of anti-mutation and anti-carcinogenic properties of rosemary (Rosmarinus officinalis L.) and Lavender (Lavandula angustifolia Mill.) during their different developmental stages. Iran J Med Microbiol. 2011;5(3):61-7.
8- Dalilian S, Heidari Kashl S, Zamanian Azodi M, Omidi R, Roeintan R, Hoseini R. The evaluation of lavender aqueous extract on human fibroblast cells. J Ilam Univ Med Sci. 2013;21(1):143-9.
9- Cardia GF, Silva-Filho SE, Silva EL, Uchida NS, Cavalcante HA, Cassarotti LL, et al. Effect of Lavander (Lavandula angustifolia) essential oil on acute infhammatory response. Evid Based Complement Alternat Med. 2018;2018:1413940.
10- Zhao Y, Chen R, Wang Y, Qing Ch, Wang W, Yang Y. In vitro and in vivo efficacy studies of Lavender angustifolia essential oil and its active constituents on the proliferation of human prostate cancer. Integr Cancer Ther. 2017;16(2):215-26.
11- Dalilan S, Rezaei-Tavirani M, Nabiuni M, Heidari-Keshel S, Azodi MZ, Zali H. Aqueous extract of Lavender angustifolia inhibits lymphocytes proliferation of Hodgkin's lymphoma patients. Iran J Cancer Prev. 2013;6(4):201-8.
12- Hamzeh S, Safari-Faramani R, Khatony A. Effects of aromatherapy with lavender and peppermint essential oils on the sleep quality of cancer patients: A randomized controlled trial. Evid Based Complement Alternat Med. 2020;2020:7480204.
13- Amiri A, Tayarani-Najaran Z, Karimi G, Mousavi S. Evaluation of Lavandula angustifolia cytotoxic and apoptotic effects on human cervical cancer cell line (Hela) in compare with normal cells. Res Pharm Sci. 2012;7(5):141.
14- Ferhi S, Santaniello S, Zerizer S, Cruciani S, Fadda A, Sanna D, et al. Total phenols from grape leaves counteract cell proliferation and modulate apoptosis-related gene expression in MCF-7 and HepG2 human cancer cell lines. Molecules. 2019;24(3):612.
15- Nair SG, Hettihewa M, Rupasinghe H. Apoptotic and inhibitory effects on cell proliferation of hepatocellular carcinoma HepG2 cell by methanol leaf extract of costus speciosus. Biomed Res Int. 2014;2014:637098.
16- Selmi S, Jallouli M, Gharbi N, Marzouki L. Hepatoprotective and renoprotective effects of Lavender (Lavandula stoechas L.) essential oils against malathion-

www.SID.ir