Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 12:49 +0430 on Sunday May 28th 2017

مقاله پژوهشی

اثر سایتوتوکسیک عصاره گیاه دارویی گل میمونی گونه شاه بیلی (Scrophularıa oxysepala) بر میزان تکثیر در سلول‌های سرطان پستان موش رده سلولی 4T1

پونه چوخاچی برادران[۲،۱] بهزاد برادران*[۳]

تاریخ دریافت ۱۳۹۵/۰۶/۲۸ تاریخ پذیرش ۱۳۹۵/۰۸/۲۹

چکیده

پیش‌زمینه و هدف: گیاهان دارویی از زمان قدیم به‌عنوان منبع اصلی ترکیبات ضد سرطانی موردمطالعه قرار می‌گرفت. اثرات ضد سرطانی گیاه دارویی گل میمونی شاه بیلی بر روی سلول‌های سرطان پستان موشی رده 4T1 موردبررسی قرار نگرفته بود به همین خاطر در این مطالعه اثرات سایتوتوکسیک عصاره گیاه دارویی شاه بیلی بر روی القاکنندگی آپوپتوز در رده سلولی 4T1 مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش کار: اثر سایتوتوکسیکی عصاره گیاه دارویی گل میمونی شاه بیلی بر روی رده سلولی ۴ T1 با استفاده از تست MTT و تریپان بلو بررسی شد. برای بررسی اثر القاء کنندگی آپوپتوز این گیاه تست DNA Fragmentation انجام گردید.

یافته‌ها: بر اساس این تحقیق عصاره گیاه دارویی گل میمونی شاه بیلی باعث تغییر مورفولوژی رده سلول‌های 4T1 شد. بنابراین عصاره این گیاه باعث توقف رشد سلولی در رده سلولی 4T1 شده که این مهارکنندگی رشد وابسته به دوز و زمان است. IC50 به‌دست‌آمده از این عصاره برای رده سلولی L929 در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت به ترتی‌ب ۱،۰۶ ± ۲۲۶،۵ و ۱،۰۵ ± ۲۱۷،۵ بود. همچنین برای رده سلولی 4T1 به ترتی‌ب ۱،۱۱ ± ۱۳۳،۶ و ۱،۰۸ ± ۱۰۴،۶ شد. نتایج تست DNA fragmentation نشان داد که این عصاره باعث شکسته شدن DNA در رده سلولی 4T1 می‌شود.

بحث و نتیجه‌گیری: نتایج این آزمایی‌ش‌ها به ما نشان داد که عصاره گیاه دارویی گل میمونی اثر مهارکنندگی بر روی رده سلولی 4T1 دارد. همچنین مشاهده شد که این عصاره در invitro باعث القا آپوپتوز در رده سلولی 4T1 شد و ممکن است این عصاره در درمان سرطان پستان مفید باشد. مکانیسم عمل این عصاره که از آن طریق باعث القاء آپوپتوز می‌شود هنوز به‌صورت کامل مشخص نگردیده است.

کلیدواژه‌ها: گل میمونی، سرطان پستان موشی، سایتوتوکسیک، آپوپتوز، 4T1

مجله پزشکی ارومیه، دوره بیست و هفتم، شماره دهم، ص ۸۸۱-۸۷۱، دی ۱۳۹۵

آدرس مکاتبه: تبریز، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، مرکز تحقیقات ایمونولوژی، تلفن: ۰۴۱-۳۳۳۷۱۴۴۰

Email: behzad_im@yahoo.com

مقدمه

امروزه سرطان پستان دومین علت مرگ در سراسر جهان است. ارقام نشان می‌دهد که سرطان بیش از یک‌سوم از جمعیت را در برگرفته است(۱، ۲) ازجمله شایع‌ترین سرطان‌ها سرطان پستان می‌باشد. سرطان پستان یکی از علل عمده مرگ‌ومیر مرتبط با سرطان در میان زنان می‌باشد. با توجه به اطلاعات آماری از Globocan در سال ۲۰۰۸، حدود ۱/۳۸ میلیون بیمار مبتلا به سرطان پستان تشخیص داده شده است. بنابراین تشخیص زودهنگام و جستجو برای ترکیبات آنتی تومور از عوامل مهم در کنترل سرطان پستان می‌باشد(۱، ۳-۵). از طرفی پس از سال‌ها پیشرفت در زمینه بهداشت امروزه کشورهای درحال‌توسعه درگیر مبارزه و رویارویی با بی‌ماری‌های مرگبار سرطان می‌باشند(۱). سرطان‌ها بی‌ماری‌های ژنتیکی می‌باشد که باعث کاهش مرگ سلول‌های سرطانی می‌شود. روش‌های درمانی جدیدی ابداع‌شده که هدف آن خنثی‌سازی مسیر رشد سرطان می‌باشد، به همین علت این درمان‌ها علاقه فزایی‌نده‌ای در فعال کردن مسیر مرگ سلول‌های سرطانی دارند و درنتی‌جه باعث وادار کردن سلول‌های سرطانی به تخریب خود می‌شوند. چند مسیر مرگ سلول وجود دارد که از آن جمله: آپوپتوز، اتوفاژی و

[۱] گروه ژنتیک دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات آذربایجان شرقی، تبریز، ایران

[۲] گروه ژنتیک، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران

[۳] مرکز تحقیقات ایمنولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران (نویسنده مسئول)

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 12:49 +0430 on Sunday May 28th 2017

نکروز را می‌توان نام برد(۶). امروزه برای درمان سرطان داروهایی که حداقل معایب را داشته باشد، موردنیاز است. ازاین‌رو از گیاهان و یا برخی فرآورده‌های گیاهی استفاده می‌شود که در طول عصر طلائی تمدن عربی اسلامی موردمطالعه بسیاری از پزشکان در درمان سرطان بوده‌اند. به‌عنوان‌مثال ازجمله این پزشکان، ابن‌سینا را می‌توان نام برد(۲). اطلاعات علمی در مورد ایمنی و اثربخشی درمان‌های گیاهی نشان داده است که این گیاهان دارای فعالیت‌های ضد سرطان می‌باشند(۷-۱۰). یک استراتژی در کنترل سرطان بنام (Chemoprevention) وجود دارد که از ترکیبات مصنوعی جهت توقف در پیشرفت سرطان استفاده می‌کند که یک رویکرد امیدوارکننده ضد سرطان به‌منظور کاهش عوارض و مرگ‌ومیر ناشی از سرطان در به تأخیر انداختن روند سرطان می‌باشد. ژن‌هایی که در بقاء و مرگ سلول‌های سرطانی نقش دارند تأثیر عمده‌ای در سرطان از طریق اختلال در روند آپوپتوز گذاشته، که منجر به شروع رشد و متاستاز تومور می‌شوند. بنابراین القای آپوپتوز به‌عنوان یکی از درمان‌ها و از اهداف مهم در Chemoprevention در نظر گرفته شده است(۱۱). انسان جزئی از طبیعت است و به‌طور مسلم برای هر بیماری، طبیعت، درمان آن را عرضه کرده است. بهره‌گیری از گیاهان دارویی استمداد از طبیعت در جهت سالم زیستن است. طی سالیان متمادی داروهای گیاهی اساس درمان بیماری‌های گوناگون محسوب می‌شد(۱۲).

Scrophulariacea یکی از گیاهان دولپه‌ای از سری پیوسته گلبرگان چهارچرخه‌ای با تخمدان زبرین است، این تیره در ایران دارای ۲۴ جنس است که در ۳ زیر تیره و ۸ طایفه قرار می‌گیرد(۱۳). با توجه به درمان‌های رایج در سرطان امروزه استفاده از داروهای موجود محدود شده است، زیرا اثرات آن‌ها بسیار سمی، ناکارآمد و گران‌قیمت می‌باشند و از طرفی فراتر از دسترس اکثریت و عموم می‌باشند. درواقع در درمان سرطان داروهایی که حداقل عوارض جانبی را داشته باشد، موردنیاز است با توجه به اهمیت گیاهان دارویی در درمان سرطان و نتایج گزارش‌شده از گونه‌های دیگر Scrophularia بر آن شدیم تا برای اولین بار اثر عصاره گیاه داروئی Scrophularia oxysephala را در میزان پرولیفرشین و القاء آپوپتوز در سلول‌های سرطان پستان رده 4T1 بررسی کنیم تا ازاین‌رو بتوانیم کمک شایانی به جامعه خود در جهت بهبود بی‌ماری‌های صعب‌العلاج ازجمله سرطان کرده باشیم.

مواد و روش کار

آماده‌سازی عصاره:

ساقه، برگ و ریشه گیاه گل میمونی شاه بیلی از ارتفاعات منطقه آذربایجان شرقی جمع‌آوری گردید. گیاهان در محیط تاریک و رطوبت ۱۵-۱۰ درصد خشک گردیدند. گیاه پس از جمع‌آوری در آسیاب دستی (خانگی) آسیاب گردید (آسیاب کردن به صورتی باشد که ایجاد حرارت نکند) و سپس جهت استخراج به راکتور ده لیتری مجهز به کنترل دور و حرارت انتقال داده شدند و به ازای هر ۲۰۰ گرم از ماده طبیعی اولیه (گیاه خشک آسیاب شده) مقدار ۲،۵ لیتر حلال اتانولی اضافه نموده و به مدت ۲۴ ساعت مخلوط بهم زده شد. سپس محتویات را از راکتور خارج نموده و با استفاده از فیلتر فشاری، تفاله را جدا نموده و محلول زیر صافی که حاوی ماده مؤثر استخراج شده است جهت فیلتراسیون بهتر از فیلتر کاغذی واتمن شماره ۴۰۰ عبور داده شد سپس حلال تحت‌فشار کاهش یافته تقطیر و جدا گردید. باقیمانده تقطیر که تا حجم ۱۵ می‌لی‌لی‌تر است به یک کریستالیزور منتقل و مابقی حلال در آون خلأ (دمای اتاق) تبخیر گردید. پس از تبخیر کامل حلال، باقیمانده حاصله به مدت ۶ ساعت در آون خلأ جهت خارج نمودن هرگونه رطوبت یا حلال نگه داشته شد. باقیمانده حاصله جهت تست و ارزیابی مورداستفاده قرار گرفت.

کشت سلول:

در این مطالعه از رده‌های سلولی T14 و L929 استفاده گردید. این رده‌های سلولی از انستیتو پاستور ایران به‌صورت ویال خریداری شد. رده سلولی توموری موشی 4T1 یکی از چند رده سلولی سرطان پستان است که توانایی متاستاز مؤثر را دارد. رده سلولی L929 مدل نرمال موشی با منشأ سلول‌های فیبروبلاست عضلانی می‌باشد. برای کشت این رده‌های سلولی از محیط کشت RPMI-1640+10% FBS استفاده شد که شکل پودر بوده و حاوی گلوتامین و فاقد بی‌کربنات سدیم می‌باشد. محیط کشت RPMI-1640 استفاده‌شده از شرکت Sigma خریداری شد.

بررسی خاصیت سایتوتوکسیک با روش MTT:

MTT (3-(4,5-dimetylthiazol-z-yl)2,5-diphenyltetrazolium bromide) ماده تترازولیوم زردرنگ محلول در آب است که توسط میتوکندری سلول‌های زنده احیاشده و به نمک فورمازان غیر محلول در آب تبدیل می‌شود. تست MTT یک روش رنگ سنجی می‌باشد که فعالیت آنزیم‌های سلولی را بررسی می‌کند که باعث تبدیل ماده تترازولیوم زردرنگ به فورمازان بنفش‌رنگ می‌شود. از این تست برای بررسی میزان تکثیر سلول‌ها و اثرات سایتوتوکسیک داروها استفاده می‌شود. در این تست سلول‌های 4T1 و L929 ابتدا در فلاسک‌های کوچک کشت داده شدند. بعد از رسیدن سلول‌ها به فراوانی موردنظر، سلول‌ها از کف فلاسک جدا شدند. سپس با استفاده از لام هموسایتومتر تعداد سلول‌ها شمارش گردید. سپس ۲۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلول حاوی ۱۵×۱۰^{۳} سلول در هر چاهک از پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 12:49 +0430 on Sunday May 28th 2017

پخش گردید. در مرحله بعد سلول‌ها به‌صورت تریپلیکت با استفاده از عصاره اتانولی گیاه scrophularia oxysepala و در غلظت‌های 50,75,100,150,200,300,400 میکروگرم بر می‌لی‌لی‌تر در زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت تیمار شدند. بعد از گذشت زمان انکوباسیون (۲۴ و ۴۸ ساعت)، کل محیط داخل چاهک‌ها خارج شد سپس ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت کامل به همراه ۵۰ میکرولیتر محلول MTT(2mg/ml) (Roch Diagnostics GmbH, Germany) به هر چاهک اضافه شد. سپس سلول‌ها به مدت ۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه و CO2 5% قرار داده شدند. بعد از انکوباسیون، محیط داخل چاهک‌ها خارج شد و ۲۰۰ میکرولیتر از DMSO و ۲۵ میکرولیتر از بافر سورنسون به هر چاهک اضافه شد. سپس پلیت‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و در جای تاریک انکوبه شدند. درنهایت جذب پلیت‌ها توسط دستگاه الایزاریدر در طول‌موج ۵۷۰ نانومتر قرائت گردید.

جذب نوری (OD) ثبت‌شده از خانه‌های حاوی سلول‌هایی که در مجاورت عصاره بودند، با جذب نوری خانه‌هایی که تحت تأثیر عصاره نبودند (خانه‌های کنترل) مقایسه گردید. میزان IC50 (میزان ۵۰ درصد از ممانعت از رشد سلول‌ها) مطابق فرمول زیر محاسبه گردید:

$$IC50 = \frac{\text{OD سلول کنترل‌های} - \text{OD نمونه}}{\text{OD سلول کنترل‌های}} \times 100$$

تعیین قابلیت زیست‌پذیری سلول‌ها با رنگ‌آمی‌زی تریپان بلو:

سنجش قابلیت حیات و رشد سلول‌ها به روش تریپان بلو روشی آسان برای ارزیابی یکپارچگی غشاء سلول‌ها و درنتیجه تکثیر یا مرگ آن‌ها می‌باشد. برای این تست 5×10^4 سلول را در هر یک از چاهک‌های پلیت ۲۴ خانه‌ای توزیع شد و بعد از تیمار سلول‌ها با عصاره scrophularia oxysepala با گذشت زمان‌های ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ روز شمارش سلول‌ها با استفاده از رنگ تریپان بلو صورت گرفت. درصد سلول‌های زنده با فرمول زیر محاسبه گردید:

$$\text{درصد سلول‌های زنده} = \frac{\text{میانگین تعداد سلول زنده‌های}}{\text{میانگین تعداد سلول مرده‌های}} \times 100$$

قطعه‌قطعه شدن DNA:

قطعه‌قطعه شدن DNA فرایند طبیعی است که در سلول‌هایی که دچار آپوپتوز (مرگ سلولی برنامه‌ریزی‌شده) می‌شوند دیده می‌شود. قطعه‌قطعه شدن DNA مشخصه بیوشیمیایی آپوپتوز است. DNA سلول‌های در حال مرگ توسط یک آنزیم اندونکلئازی به قطعات ۱۸۰bp شکسته می‌شود و زمانی که DNA روی ژل آگارز ۱،۵ درصد ران شود باندها به شکل نردبان مشاهده می‌شوند که نشان‌دهنده وقوع آپاپتوز است. برای این تست سلول‌ها ابتدا در فلاسک‌های کوچک کشت داده شدند سپس ۳ میلی‌لیتر از سوسپانسیون سلولی حاوی 5×10^5 سلول در پلیت‌های ۶ خانه‌ای پخش شدند. چاهک‌های کنترل (سلول‌هایی که تحت تأثیر عصاره قرار نمی‌گیرند) و تست انتخاب‌شده و چاهک‌های تست با استفاده از دوز IC50 از عصاره گل میمونی (۱۳۳،۶ µg/ml) تیمار شدند و به مدت ۴۸ ساعت داخل انکوباتور co2 دار انکوبه شدند. سپس سلول‌ها به میکروتیوپ منتقل شدند و ۱ میلی‌لیتر محلول لیز کننده بر روی آن‌ها اضافه شد سپس در داخل Dry bath دمای ۵۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ دقیقه انکوبه گردید. سپس به میکرو تیوپ‌ها ۳۰۰ میکرو لیتر کلروفرم اضافه شد. سپس در دور g ۱۲۰ به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شدند. بعد از سانتریفوژ فاز رویی به یک میکرو تیوپ دیگر منتقل شد و به آن ۹۰۰ میکرو لیتر اتانول ۱۰۰ درصد سرد اضافه شد در دور g۱۲۰ به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شد. در مرحله بعد بر روی رسوب ۲۰۰ میکرو لیتر اتانول ۷۰ درصد اضافه کرده و به مدت ۵ دقیقه در دور g۱۲۰ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شد. بر روی رسوب ۳۰ میکرو لیتر DEPC treated – water اضافه شد. نمونه DNA به‌دست‌آمده بروی ژل آگاروز ۱/۵ درصد الکتروفورز گردید. درنهایت نتیجه با استفاده از ترانس لومیناتور مشاهده شد.

آنالیز آماری:

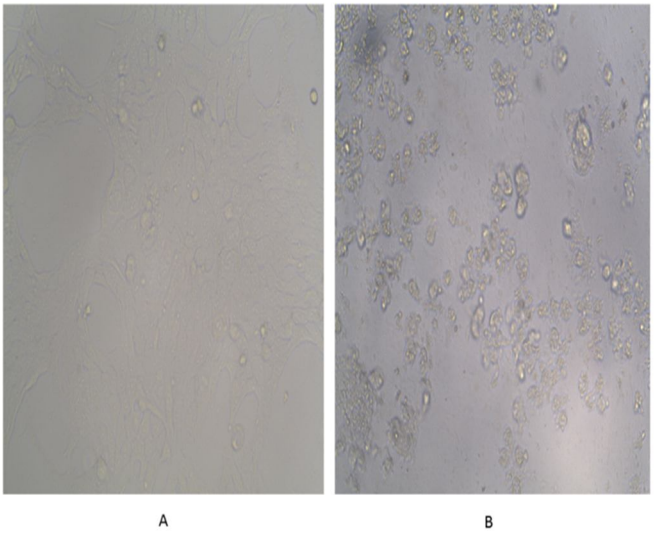
در این تحقیق تمام آزمایش‌ها به‌صورت تریپلیکت انجام گردید. آنالیزهای آماری با استفاده از نرم‌افزار GraphPad Prism 6 صورت گرفت، شاخص‌های مرکزی شامل میانگین و انحراف معیار توسط آمار توصیفی به‌دست آمد. برای مقایسه گروه‌ها از آنالیز آماری ANOVA یک‌طرفه استفاده گردید. سطح معنی‌داری $p< 0.05$ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

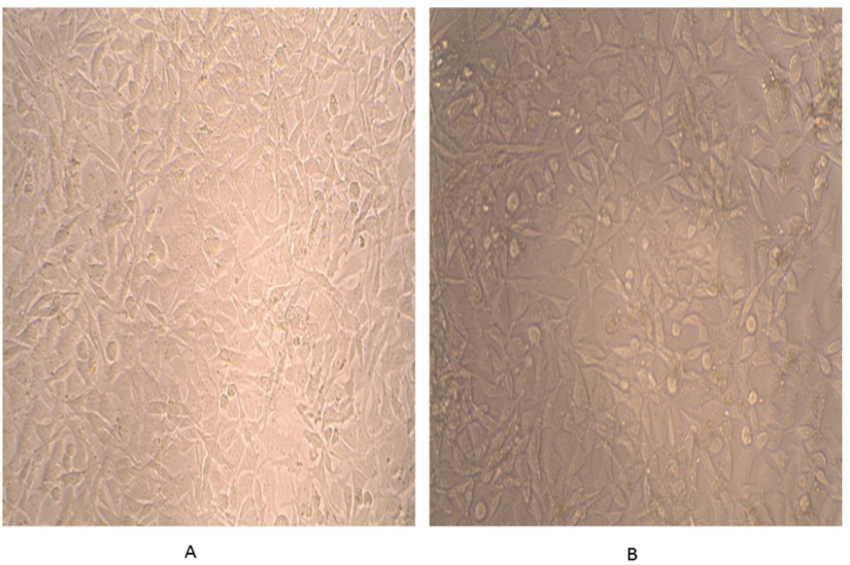
کشت سلول:

سلول‌های 4T1 و L929 در محیط کشت RPMI-1640 حاوی ۱۰ درصد FBS کشت داده شدند (سلول‌های T14 جزو رده سلولی سرطان پستان موشی و سلول‌های L929 جزو رده نرمال مدل فیبروسارکومای موشی با منشأ بافت همبند می‌باشند) و سپس تحت تأثیر عصاره گل میمونی قرار گرفتند. نتایج حاصل از تغییرات مورفولوژیکی در تصویر ۱ و ۲ آورده شده است.

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 12:49 +0430 on Sunday May 28th 2017



تصویر (۱): سلول‌های سرطانی 4T1. A) سلول‌های 4T1 بدون تیمار با عصاره گل میمونی. B) سلول‌های 4T1 تیمار شده با دوز IC50 (۱۳۳،۶ µg/ml) از عصاره گل میمونی بعد از ۲۴ ساعت.

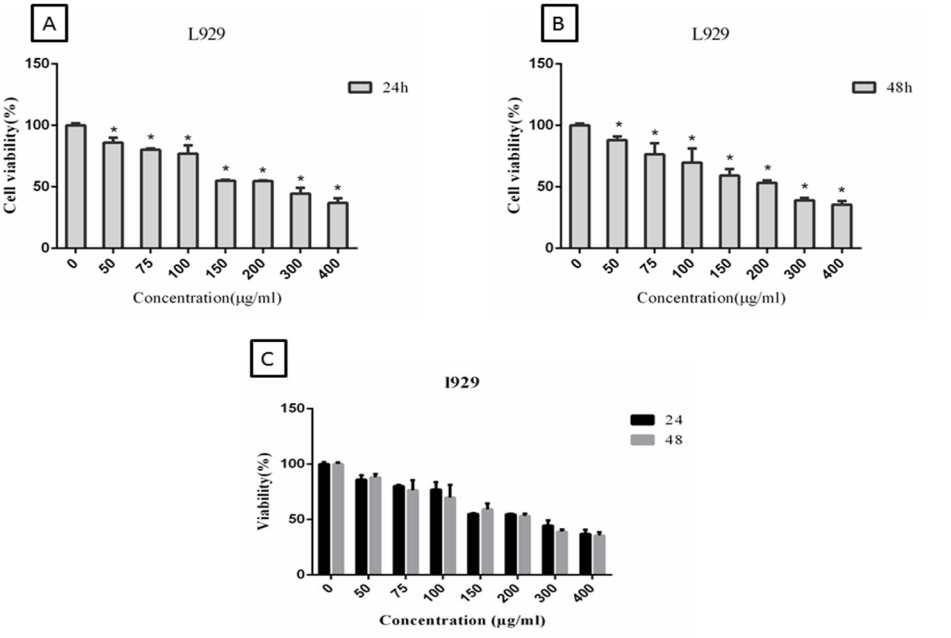


تصویر (۲): سلول‌های نرمال L929 مدل فیبروسارکوما رده موشی با منشأ بافت همبند بوده و ازنظر مورفولوژی دوکی شکل می‌باشند. A) سلول‌های l929 بدون تیمار با عصاره گل میمونی. B) سلول‌های L929 تیمار شده با دوز IC50 (۱۳۳،۶ µg/ml) از عصاره گل میمونی بعد از ۲۴ ساعت.

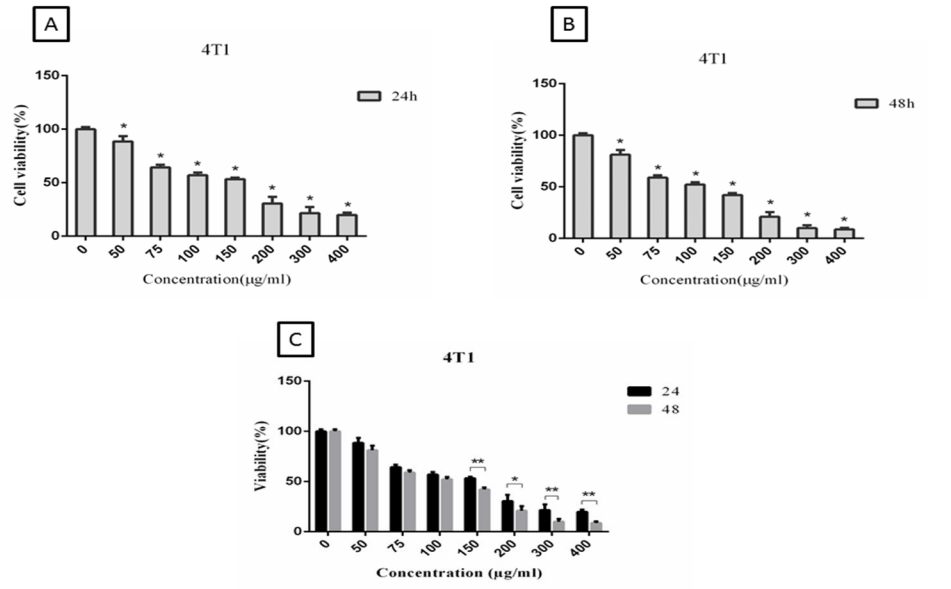
بررسی اثر سایتوتوکسیک عصاره گیاه scrophularia oxysepala:

جهت بررسی و تعیین اثرات سایتوتوکسیک عصاره موردمطالعه و تعیین IC50 آزمایش MTT انجام گرفت. نتایج حاصل از تیمار سلول‌های L929 با غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ۴۰۰ (µg/ml) از عصاره در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت به‌صورت نمودار ۱ نشان داده می‌شود. نتایج حاصل از تیمار سلول‌های 4T1 با غلظت‌های ۰، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ۴۰۰ (µg/ml) از عصاره در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت به‌صورت نمودار ۲ نشان داده می‌شود. مقدار IC50 عصاره برای رده‌های سلولی 4T1 و L929 در جدول ۱ نشان داده می‌شود.

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 12:49 +0430 on Sunday May 28th 2017



نمودار (۱): اثر سایتوتوکسیک عصاره اتانولی گیاه scropholoria oxysepala روی سلول‌های L929. A اثر عصاره در زمان ۲۴ ساعت را نشان می‌دهد. B اثر عصاره در زمان ۴۸ ساعت را نشان می‌دهد. C مقایسه کاهش زیست‌پذیری سلول‌های L929 در ۲۴ و ۴۸ ساعت را نشان می‌دهد. ستون‌هایی که با × نشان داده شده‌اند کاهش زیست‌پذیری سلول‌ها با $p<.05$ نسبت به سلول کنترل (غلظت 0 از عصاره) معنی‌دار است.



نمودار (۲): اثر سایتوتوکسیک عصاره اتانولی گیاه scropholoria oxysepala روی سلول‌های 4T1. A اثر عصاره در زمان ۲۴ ساعت را نشان می‌دهد. B اثر عصاره در زمان ۴۸ ساعت را نشان می‌دهد. C مقایسه کاهش زیست‌پذیری سلول‌های 4T1 در ۲۴ و ۴۸ ساعت را نشان می‌دهد. ستون‌هایی که با × نشان داده شده‌اند کاهش زیست‌پذیری سلول‌ها با $p<.05$ و ستون‌های که با ×× نشان داده شده است کاهش زیست‌پذیری سلول‌ها با $p<.002$ را نشان می‌دهند.

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 12:49 +0430 on Sunday May 28th 2017

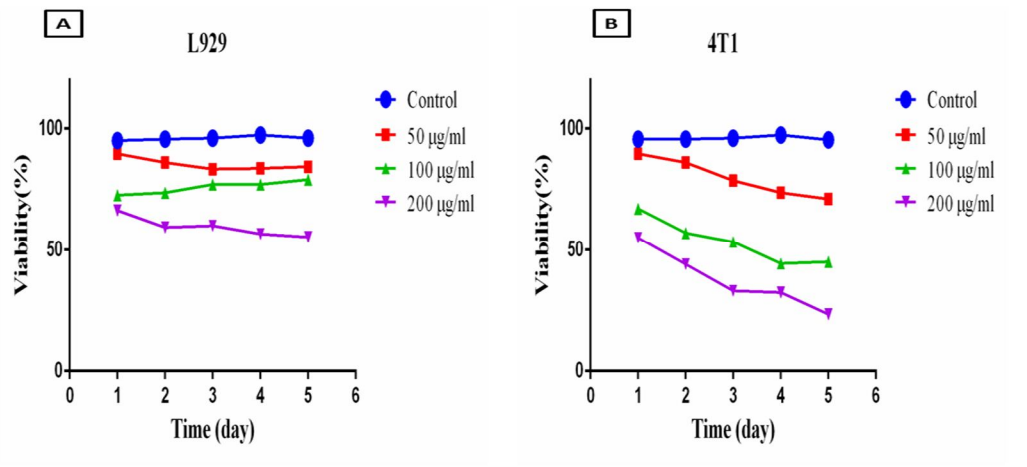
جدول (۱): مقادیر Ic50 عصاره اتانولی گیاه scropholoria oxysepala روی سلول‌های 4T1 و L929در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت را نشان می‌دهد.

IC50 (µg/ml)		
Time	24 h	48 h
L929	1.06±226.5	1.05±217.5
4T1	1.11±133.6	1.08±104.6

نتایج MTT نشان داد که سلول‌های سرطانی 4T1 تیمار شده با عصاره اتانولی گیاه scropholoria oxysepala نسبت به سلول‌های کنترل دارای اثرات سایتوتوکسیک معنی‌دار بود و این اثرات سایتوتوکسیک وابسته به غلظت و زمان می‌باشد چنانکه با افزایش غلظت عصاره و با گذشت زمان اثرات سایتوتوکسیک افزایش می‌یابد. همچنین نشان داده شد که اثرات سایتوتوکسیک عصاره اتانولی scropholoria oxysepala بروی سلول‌های L929 در مقایسه با سلول‌های 4T1 به‌طور قابل‌توجهی کم‌تر می‌باشد.

قابلیت زیست‌پذیری سلول‌ها:

جهت این مطالعه سلول‌های L929 و T14 تحت تیمار با عصاره scropholoria oxysepala در زمان‌های ۱، ۲، ۳، ۴، ۵ روز قرار گرفتند. بعد از رنگ‌آمی‌زی سلول‌ها با تریپان بلو و تعیین نسبت سلول‌های زنده به مرده نتایج نشان داد که عصاره scropholoria oxysepala نسبت به کنترل باعث کاهش زیست‌پذیری سلول‌های 4T1 و L929 می‌شود که این کاهش قابلیت زیست‌پذیری سلول‌ها وابسته به غلظت و زمان می‌باشد به‌طوری‌که با افزایش غلظت عصاره و گذشت زمان قابلیت زیست‌پذیری سلول‌ها به‌طور قابل‌توجهی کاهش می‌یابد. همچنین نشان داده شد که اثرات سایتوتوکسیک عصاره اتانولی scropholoria oxysepala بروی سلول‌های L929 در مقایسه با سلول‌های 4T1 به‌طور قابل‌توجهی کم‌تر می‌باشد. (نمودار ۳).

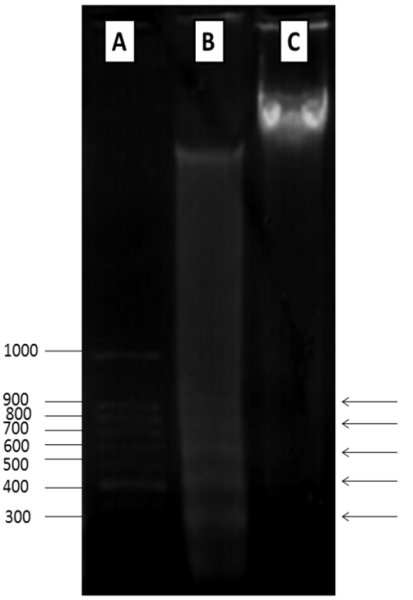


نمودار (۳): A: قابلیت زیست‌پذیری سلول‌های L929 تحت تیمار با دوزهای ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ میکروگرم بر می‌لی‌لی‌تر عصاره گل میمونی شاه بیلی در زمان‌های ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ روز. B: قابلیت زیست‌پذیری سلول‌های 4T1 تحت تیمار با دوزهای ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ میکروگرم بر می‌لی‌لی‌تر عصاره گل میمونی شاه بیلی در زمان‌های ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ روز.

تست DNA Fragmentation:

انجام این تست با عصاره‌ی اتانولی گیاه گل میمونی شاه بیلی در زمان ۲۴ ساعت القا آپوپتوز و شکسته شدن DNA را در سلول‌های 4T1 نشان داد. نتایج در تصویر ۳ نشان داده شده است.

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 12:49 +0430 on Sunday May 28th 2017



تصویر (۳): تست DNA Fragmentation برای نشان دادن الگوی قطعه‌قطعه شدن DNA در سلول‌های 4T1. A) مارکر. B) سلول‌های 4T1 کنترل (بدون تیمار با عصاره گل میمونی). C) سلول‌های 4T1 تیمار شده با دوز IC50 از عصاره گل میمونی (۱۳۳.۶ µg/ml) به مدت ۲۴ ساعت.

بحث و نتیجه‌گیری

داروهای گیاهی طی قرن‌ها در درمان انواع مختلف بی‌ماری‌ها کاربرد داشته‌اند و بیشتر افراد این شیوه درمانی را به‌عنوان روشی جایگزین یا مکمل در نظر می‌گیرند که به آن‌ها کمک می‌کنند تا وضعیت جسمی و روانی بهتری داشته باشند. مصرف داروهای گیاهی اغلب به‌عنوان شیوه‌ای طبیعی برای حفظ آرامش و رفع افسردگی و اضطراب و سایر بی‌ماری‌ها و ناراحتی‌های جسمی و روانی به کار می‌رود(۸، ۱۰)؛ اما جدا از تمام ناراحتی‌ها و بی‌ماری‌ها، داروهای گیاهی حتی به‌عنوان یک شیوه درمانی مکمل یا جایگزین برای معالجه سرطان نیز کاربرد دارند. آمار نشان می‌دهد که از بین هر ۱۰ فرد مبتلا به سرطان، حدود ۶ نفر در کنار شیوه‌های درمانی مرسوم در درمان سرطان از داروهای گیاهی نیز استفاده می‌کنند این نوع داروها اغلب به توصیه متخصصان طب گیاهی و به‌صورت قرص، خام، جوشیدنی، یا کرم استفاده می‌شوند (۱۴، ۱۵) به‌طور مثال نتایج مطالعه انجام‌شده در آلمان نشان می‌دهد زنانی که از «فیتواستروژن» ها و گیاه Actaea recemosa برای کاهش علائم یائسگی استفاده می‌کنند کم‌تر در معرض ابتلا به سرطان هستند اما همچنان بررسی‌های بیشتر برای تائید این ارتباط لازم است(۱۶).

همچنین شواهد پزشکی وجود دارند مبنی بر این‌که برخی داروهای گیاهی خاص می‌توانند از علائم بیماری سرطان و عوارض جانبی شیوه‌های درمانی مورداستفاده برای کنترل این بیماری، پیشگیری کنند و یا شدت علائم سرطان را کاهش دهند. همچنین در سال ۲۰۰۵ میلادی گروهی از متخصصان به بازبینی مطالعات انجام‌شده در مورد تأثیر داروهای گیاهی چینی بر کاهش عوارض جانبی شیمی‌درمانی در مبتلایان به سرطان روده پرداختند. آنان با جمع‌آوری مجموعه محدودی از اطلاعات دریافتند نوعی داروی گیاهی موسوم به Huangqi دارای ترکیب‌هایی است که عوارض جانبی شیمی‌درمانی را کاهش می‌دهد(۱۷). همچنین در مطالعه دیگری اثرات سایتوتوکسیک عصاره Scrophularia fruteseus در برابر سلول‌های Hep-2 (که از اپیتلیوم سرطانی سلول‌های حلقی جداسازی شده است) و نیز سلول‌های Mcoy (که از مایع سینوویال بیماران مبتلا به آرتریت روماتوئید جداسازی شده است) موردمطالعه قرار گرفته است و فعالیت قابل‌مشاهده‌ای که ناشی از ترکیبات وابسته به گروه‌های فنولیک می‌باشند در این موارد مشاهده گردیده است (۱۸).

Scrophulariaceae یکی از گیاهان دو لپه‌ای از سری پیوسته گلبرگان چهارچرخه‌ای با تخمدان زیرین است، این تیره در ایران دارای ۲۴ جنس است که در ۳ زیر تیره و ۸ طایفه قرار می‌گیرد Scrophularia گیاهان پایا، دوساله، بندرت یک‌ساله، علفی و یا بوته‌هایی در پایه سخت و کمی چوبی هستند. از جنس‌های مهم این تیره در ایران که توزیع وسیعی دارند. می‌توان به Euphrasia, Pedicularis, Linares Verbascum, Veronica اشاره نمود.

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 12:49 +0430 on Sunday May 28th 2017

برگ‌های این جنس متقابل یا در بخش‌های بالایی ساقه متناوب (بندرت همگی متناوب) دارای پهنک کامل، بدون دندانه، گاهی نیز به صورت‌های مختلف بخش شانه‌ای و پوشیده از کرک و غده یا فقط غده می‌باشند. گل‌آذین‌ها خوشه گرزن، بندرت خوشه‌ای هستند. گل‌ها دارای کاسه دندانه‌دار، غالباً در حاشیه سفید و دارای بام لوله‌ای یا کوزه‌ای شکل متورم هستند (۱۹-۲۱) دسته‌های مهم ترکیبات گزارش‌شده از این جنس عبارت‌اند از: ترکیبات گلیکوزیله ایریدوئیدی(۱۹، ۲۲) ترکیبات استری قندی (۱۱، ۲۲، ۲۳) ترکیبات فنیل اتانوئیدی و فنیل اتانوئید گلیکوزیدها (۲۴) ترکیبات ساپونیتی و رزین‌های گلیکوزیله (۲۴، ۲۵) ترکیبات فلاونوئیدی و مشتقات فنیل پروپانوئیدی (۲۶) مشتقات مختلف مونوترپنوئیدی (۲۱) و ترکیبات اسانسی می‌باشند (۲۷) روش‌های مختلفی جهت جداسازی و شناسایی ترکیبات گوناگون ذکرشده به‌کاررفته است. در بررسی‌های انجام‌شده بر روی ریشه Scrophlaria ningpoensis ۱۱ نوع مختلف از مشتقات آسیله قندی جداسازی شدند. این ترکیبات به خانواده ترکیبات فنیل اتانوئیدی، فنیل پروپانوئیدی، وابسته می‌باشند (۷، ۲۸، ۲۹). گیاه Scrophularia canina نیز حاوی ایریدوئیدهای گلیکوزیله ضدالتهاب می‌باشد که اثر ضدالتهابی آن ناشی از ترکیبات فنیل پروپانوئید گلیکوزیدی می‌باشد (۳۰-۳۲).

تابه‌حال هیچ گزارشی از اثر گیاه Scrophularıa oxysepala بر روی سلول‌های 4T1 نشده است. در مطالعه حاضر اثرات سایتوتوکیک عصاره اتانولی scropholoria oxysepalaبر روی سلول‌های 4T1 موشی بررسی شد.

بررسی توانایی زیستی سلول‌های سرطانی با استفاده از آزمون MTT نشان داد که عصاره گل میمونی موجب کاهش چشم‌گیر توانایی زیستی سلول‌های سرطانی شد. با افزایش غلظت و زمان میزان مرگ‌ومیر سلول‌های 4T1 افزایش می‌یابد. نتایج حاصل مشابه مطالعه US Harput و همکارانش بود که بر روی لنفوسیت‌ها انجام داده بودند(۳۳).

آپوپتوز یا مرگ سلولی برنامه‌ریزی‌شده، یک پاسخ فیزیولوژی نرمال است که در حفظ هموستاز بافت اهمیت دارد. آپوپتوز کنترل نشده، نقش اساسی در پاتوژنز بسیاری از بی‌ماری‌ها مانند بی‌ماری‌های تحلیل برنده‌ی اعصاب و نارسایی قلبی دارد. در طی آپوپتوزیس سلول‌ها تحت یکسری تغییرات مولکولی و ظاهری قرار می‌گیرند که شامل: ظهور فسفوتیدیل سرین در سطح سلول، بازآرایی اسکلت سلولی، کوچک شدن سلول، فروپاشی غشاء هسته، قطعه‌قطعه شدن DNA و درنهایت تشکیل اجسام آپوپتوتیک که به‌وسیله‌ی فاگوسیت‌ها به‌منظور جلوگیری از التهاب بلعیده می‌شوند. در مطالعه ما پس از تیمار سلول‌های سرطانی با عصاره گل میمونی اجسام آپوپتوتیک که از نشانه‌های آپوپتوز می‌باشد مشاهده گردید. همچنین قطعه‌قطعه شدن DNA از شاخص‌های مورفولوژیک در آپوپتوز می‌شد که این ویژگی با انجام DNA-Fragmentation ثابت شد. نتایج به‌دست‌آمده از مطالعه با نتایج مطالعه‌ای که آقای محمدی و همکارانش در سال ۲۰۱۵ برای درمان سرطان سینه به کمک گیاه گزنه انجام داده بودند مشابه بود (۸).

نتایج مطالعه ما نشان داد که این عصاره به‌صورت معنی‌داری باعث کاهش زیست‌پذیری سلول‌های سرطانی 4T1 می‌شود تأثیر این عصاره بر سلول‌های نرمال به‌مراتب کم‌تر بود. نتایج ما مشابه نتایج مطالعه‌ای بود که در سال ۱۳۹۰ در مرکز تحقیقاتی تبریز انجام شده بود که اثر سایتوتوکسیک فراکسی‌ون‌های دی کلرومتانی عصاره scropholoria oxysepala بر روی رده سلولی MCF -7 بررسی کرده بودند که نشان داده بودند که این عصاره بر روی این رده سلولی دارای اثر سایتوتوکسیک می‌باشد و باعث القاء آپوپتوز می‌شود؛ و در سال ۱۹۹۳ اثر مهاری این عصاره بر روی رده سلولی WEHI-164 ثابت‌شده در ضمن مشاهده شد که این عصاره بر روی سلول‌های نرمال اثر مهاری معنی‌داری ندارد، همچنین افزایش بیان ژن‌های کاسپاز ۳ و ۹ نشان داد که این عصاره از طریق مسیر داخلی باعث القاء آپوپتوز می‌شود. (۳۴). درنهایت پیشنهاد می‌شود مکانی‌سم‌های مولکولی که از آن طریق این عصاره باعث مهار سلول‌های سرطانی می‌شوند بیشتر موردبررسی قرار بگیرد و اثرات آ در in vivo مورد ارزیابی قرار بگیرد.

تشکر و قدردانی

از تمامی همکاران در مرکز تحقیقات ایمونولوژی دانشگاه علوم پزشکی تبریز که در انجام این تحقیق مرا همیاری کردند نهایت تشکر و قدردانی را دارم.

References:

1. Morrison BJ, Schmidt CW, Lakhani SR, Reynolds BA, Lopez JA. Breast cancer stem cells: implications for therapy of breast cancer. Breast Cancer Res 2008;10(4): 210.
2. Zaid H, Rayan A, Said O, Saad B. Cancer treatment by Greco-Arab and Islamic herbal medicine. Open Nutraceuticals J 2010;3: 203-12.
3. Yang X, Wang W, Qin J-J, Wang M-H, Sharma H, Buolamwini JK, et al. JKA97, a novel benzylidene analog of harmine, exerts anti-cancer effects by

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 12:49 +0430 on Sunday May 28th 2017

inducing G1 arrest, apoptosis, and p53-independent up-regulation of p21. PLoS ONE 2012;7(4):e34303.

4. Devi PS, Kumar MS, Das SM. Evaluation of antiproliferative activity of red sorghum bran anthocyanin on a human breast cancer cell line (mcf-7). Int J Breast Cancer 2011;2011:891481.
5. 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.
6. Bellail AC, Qi L, Mulligan P, Chhabra V, Hao C. TRAIL agonists on clinical trials for cancer therapy: the promises and the challenges. Rev Recent Clin Trials 2009;4(1): 34-41.
7. Kang JX, Liu J, Wang J, He C, Li FP. The extract of huanglian, a medicinal herb, induces cell growth arrest and apoptosis by upregulation of interferon-β and TNF-α in human breast cancer cells. Carcinogenesis 2005;26(11): 1934-9.
8. Mohammadi A, Mansoori B, Goldar S, Shanehbandi D, Khaze V, Mohammadnejad L, et al. Effects of Urtica dioica dichloromethane extract on cell apoptosis and related gene expression in human breast cancer cell line (MDA-MB-468). Cell Mol Biol 2015;62(2): 62-7.
9. Mohammadi A, Mansoori B, Aghapour M, Baradaran B. Urtica dioica dichloromethane extract induce apoptosis from intrinsic pathway on human prostate cancer cells (PC3). Cell Mol Biol 2015;62(3): 78-83.
10. Mohammadi A, Mansoori B, Aghapour M, Baradaran PC, Shajari N, Davudian S, et al. The Herbal Medicine Utrica Dioica Inhibits Proliferation of Colorectal Cancer Cell Line by Inducing Apoptosis and Arrest at the G2/M Phase. J Gastrointest Cancer 2016;47(2): 187-95.
11. Chong HZ, Rahmat A, Yeap SK, Akim AM, Alitheen NB, Othman F, et al. In vitro cytotoxicity of Strobilanthes crispus ethanol extract on hormone dependent human breast adenocarcinoma MCF-7 cell. BMC Complement Altern Med 2012;12(1): 35.
12. Kubota A, Okamura S, Shimoda K, Harada N, Omori F, Niho Y. A traditional chinese herbal medicine, juzen-taiho-to augments the production of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor from human peripheral blood mononuclear cells in vitro. Int J Immunotherapy 1992;8(4): 191-5.
13. de Bruin EC, Medema JP. Apoptosis and non-apoptotic deaths in cancer development and treatment response. Cancer Treat Rev 2008;34(8): 737-49.
14. Gray MA. Herbs: multicultural folk medicines. Orthopaedic Nurs 1996;15(2): 49-56.
15. Schulz V, Hänsel R, Tyler VE. Rational phytotherapy: a physician's guide to herbal medicine. Psychology Press; 2001.
16. Rebbeck TR, Troxel AB, Norman S, Bunin GR, DeMichele A, Baumgarten M, et al. A retrospective case–control study of the use of hormone-related supplements and association with breast cancer. Int J Cancer 2007;120(7): 1523-8
17. Ko H-C, Wei B-L, Chiou W-F. The effect of medicinal plants used in Chinese folk medicine on RANTES secretion by virus-infected human epithelial cells. J Ethnopharmacol 2006;107(2): 205-10.
18. Qian J, Hunkler D, Rimpler H. Iridoid-related aglycone and its glycosides from Scrophularia ningpoensis. Phytochemistry 1992;31(3): 905-11.
19. Valiyari S, Jahanban-Esfahlan R, Shahneh FZ, Yaripour S, Baradaran B, Delazar A. Cytotoxic and apoptotic activity of Scrophularia oxysepala in MCF-7 human breast cancer cells. Toxicol Environ Chem 2013;95(7): 1208-20.
20. Orangi M, Pasdaran A, Shanehbandi D, Kazemi T, Yousefi B, Hosseini B-A, et al. Cytotoxic and Apoptotic Activities of Methanolic Subfractions of

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 12:49 +0430 on Sunday May 28th 2017

Scrophularia oxysepala against Human Breast Cancer Cell Line. Evid Based Complement Alternat Med 2016;2016:8540640.

21. Valiyari S, Baradaran B, Delazar A, Pasdaran A, Zare F. Dichloromethane and methanol extracts of Scrophularia oxysepala induces apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells. Adv Pharm Bull 2012;2(2): 223.
22. Pasdaran A, Delazar A, Nazemiyeh H, Nahar L, Sarker SD. Chemical composition, and antibacterial (against Staphylococcus aureus) and free-radical-scavenging activities of the essential oils of Scrophularia amplexicaulis Benth. Rec Nat Prod 2012;6: 350-5.
23. Küpeli E, Harput US, Varel M, Yesilada E, Saracoglu I. Bioassay-guided isolation of iridoid glucosides with antinociceptive and anti-inflammatory activities from Veronica anagallis-aquatica L. J Ethnopharmacol 2005;102(2): 170-6.
24. Tasdemir D, Güner ND, Perozzo R, Brun R, Dönmez AA, Calıs I, et al. Anti-protozoal and plasmodial FabI enzyme inhibiting metabolites of Scrophularia lepidota roots. Phytochemistry 2005;66(3): 355-62.
25. Çalş I, Zor M, Wright A, Sticher O. Triterpene Saponins from Scrophularia ilwensis. Planta Medica.57(S 2): A68-A9.
26. Monsef-Esfahani HR, Hajiaghaee R, Shahverdi AR, Khorramizadeh MR, Amini M. Flavonoids, cinnamic acid and phenyl propanoid from aerial parts of Scrophularia striata. Pharmaceutical biol 2010;48(3): 333-6.
27. Miyazawa M, Okuno Y. Volatile components from the roots of Scrophularia ningpoensis Hemsl. Flavour Fragr J 2003;18(5): 398-40.۰
28. Li Y-M, Jiang S-H, Gao W-Y, Zhu D-Y. Phenylpropanoid glycosides from Scrophularia ningpoensis. Phytochemistry 2000;54(8): 923-5.
29. Garcia M, Ahumada M, Saenz M. Cytostatic activity of some phenolic acids of Scrophularia frutescens L. var. frutescens. Z Naturforsch C 1998;53(11-12): 1093-5.
30. Díaz AMa, Abad MaJ, Fernández L, Silván AM, De Santos J, Bermejo P. Phenylpropanoid glycosides from Scrophularia scorodonia: in vitro anti-inflammatory activity. Life Sci 2004;74(20):2515-26.
31. Ronco D. Bibliografia per la parte italiana del Progetto RUBIA. 2004 [cited 2017 Jan 22]; Available from: http://eprints.adm.unipi.it/364/.
32. Pardo-de-Santayana M, Tardío J, Blanco E, Carvalho AM, Lastra JJ, San Miguel E, et al. Traditional knowledge of wild edible plants used in the northwest of the Iberian Peninsula (Spain and Portugal): a comparative study. J Ethnobiol Ethnomed 2007;3(1): 27.
33. Harput US, Saracoglu I, Ogihara Y. Stimulation of lymphocyte proliferation and inhibition of nitric oxide production by aqueous Urtica dioica extract. Phytotherapy Res 2005;19(4): 346-8.
34. Hosseini B-A, Pasdaran A, Kazemi T, Shanehbandi D, Karami H, Orangi M, et al. Dichloromethane fractions of Scrophularia oxysepala extract induce apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells. Bosn J Basic Med Sci 2015;15(1): 26.

Original Article

ANTI-PROLIFERATION EFFECTS OF SCROPHULARIA OXYSEPALA MEDICINAL PLANT EXTRACT ON THE 4T1 MOUSE BREAST CANCER CELL LINE

*Pooneh Chokhachi Baradaran[1,2] , Behzad Baradaran[3]**

Received: 19 Sep, 2015; Accepted: 20 Nov, 2015

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 12:49 +0430 on Sunday May 28th 2017

Abstract

Background & Aims: Medical plants have been intensively studied as a source of antitumor compounds. The antitumor effects of the Scrophularia oxysepala medicinal plant extract is not studied on the 4T1 mouse breast cancer cell lines. In the present study, cytotoxic effects of the Scrophularia oxysepala extract were investigated on viability of 4T1 cells, mouse breast cancer cell line.

Materials & Methods: The cytotoxic effects of Scrophularia oxysepala on 4T1 cells were studied using MTT assay, Trypan blue staining, and DNA fragmentation assay were done at selected concentrations of the plant extract.

Results: According to the findings, the Scrophularia oxysepala medicinal plant extract (stems and leaves) can alter cells morphology. So the Scrophularia oxysepala extract inhibits cell growth albeit in a time and dose dependent manner and results in degradation of chromosomal DNA.

Conclusion: Our data well established the anti-proliferative effect of Scrophularia oxysepala extract, and clearly showed that the plant extract can induce apoptosis in vitro, but the mechanism of its activities remained unclear.

Keywords: Scrophularia oxysepala, Mouse breast cancer, Cytotoxicity, Apoptosis, 4T1

Address: Department of Genetic, East Azarbaijan Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran
Tel: +9841133371440
Email: behzad_im@yahoo.com

SOURCE: URMIA MED J 2016: 26(10): 851 ISSN: 1027-3727

[1] Department of Genetics, East Azarbaijan Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran
[2] Department of Genetics, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran
[3] Immunology Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran (Corresponding Author)