بررسی اثر سایتوتوکسیک عصاره اتانولی گیاه عاقرقرحا بر روی سرطان دهان رده سلولی KB

علی محمدی[1]، بهزاد منصوری[2]، کتایون چقاکبودی[3]، بهزاد برادران[4*]

تاریخ دریافت ۱۳۹٤/۱۱/۰۳ تاریخ پذیرش ۱۳۹۵/۰۱/۲۰

چکیده

پیش‌زمینه و هدف: سرطان یک بیماری مهلک با آمار مرگ‌ومیر بالاست که درگیری‌های روانی و اقتصادی زیادی به دنبال دارد. استفاده از ترکیبات گیاهان دارویی القاکننده آپوپتوز از روش‌های درمان سرطان محسوب می‌گردند، لذا مطالعه بر روی گیاهان، جهت تولید داروهای ضد سرطانی جدید از فعالیت‌های تحقیقاتی مهم در دنیا می‌باشد. در مطالعه‌ی حاضر برای اولین بار اثرات سایتوتوکسیک و آپوپتوتیک عصاره گیاه عاقرقرحا در سلول‌های سرطانی KB مطالعه شد.

مواد و روش کار: برای بررسی اثرات سایتوتوکسیک عصاره گیاه عاقرقرحا تست MTT انجام گرفت. در مرحله‌ی بعد بررسی نوع مرگ سلولی و القا آپوپتوز با DNA Fragmentation و تست TUNEL بررسی شد.

یافته‌ها: نتایج این مطالعه نشان داد که عصاره گیاه عاقرقرحا به‌طور معنی‌داری سلول‌های سرطانی را از بین برد. با تست DNA Fragmentation و تست TUNEL شکسته شدن DNA که از خصوصیات مهم آپوپتوز است، در سلول‌های تیمار شده با عصاره گیاه عاقرقرحا نشان داده شد.

بحث و نتیجه‌گیری: نتایج مطالعات نشان داد که عصاره گیاه عاقرقرحا باعث القا آپوپتوز در سلول‌های KB شده و ممکن است این عصاره در درمان سرطان مفید باشد.

کلیدواژه‌ها: عاقرقرحا، آپوپتوزیس، سایتوتوکسیک، KB

مجله پزشکی ارومیه، دوره بیست و هفتم، شماره چهارم، ص ۲۶۵-۲۵۷، تیر ۱۳۹۵

آدرس مکاتبه: آذربایجان شرقی، تبریز، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، مرکز تحقیقات ایمونولوژی تلفن: ۳۳۳۷۱۳۴۶-۰۴۱

Email: Behzad_im@yahoo.com

مقدمه

سرطان یا به‌عبارت‌دیگر تومور یا نئوپلازی بدخیم دربرگیرنده‌ی گروهی از بیماری‌ها ا ست که با ر شد غیرطبیعی سلول‌ها، حمله و انتشار به سایر نقاط بدن همراه می‌باشد (۱). طبق گزارش سازمان بهداشت جهانی (WHO)، سرطان یکی از علت‌های اصلی مرگ‌ومیر در جهان می‌باشد. به‌عبارت‌دیگر سرطان سالانه ۷/۶ میلیون نفر از همه موارد مرگ در سرتا سر جهان را منجر می شود. پیش‌بینی می‌شود میزان تلفات ناشی از سرطان در سال ۲۰۳۰ به بیش از ۱۱ میلیون نفر افزایش یابد (۲). سرطان به‌عنوان دومین علت مرگ بعد از بیماری‌های قلبی شناخته شده است (۳). شایع‌ترین انواع سرطان در مردان سرطان ریه، سرطان پروستات، سرطان کولون، سرطان معده و در زنان سرطان پستان، سرطان کولورکتال، سرطان ریه و سرطان دهانه رحم می‌باشد (۴). غیر حساس شدن به سیگنال‌های مهارکننده‌ی ر شد، اجتناب از مرگ سلولی برنامه‌ریزی‌شده، پتانسیل نامحدود تکثیر، تهاجم بافتی و متاستاز منجر به بدخیم شدن سرطان می‌شود (۵).

سرطان دهان هشتمین سرطان شایع آقایان و پانزدهمین سرطان شایع در میان خانم‌ها ا ست (۶)؛ که شامل تومورهای لب، ز بان، ل ثه، کف د هان، کام سخت و نرم، لوزه ها، غدد بزاقی، اروفارنکس، نازوفارنکس، هیپوفارنکس می‌باشد. بیشتر از ۹۰ درصد سرطان‌های دهان، از نوع ا سکواموس سل کار سینوما هستند و در حدود ۹ درصد از سرطان‌ها شامل کارسینوماهای غدد بزاقی، سارکوما و لنفوماها می‌باشند. ۱ درصد باقیمانده سرطان‌های متاستاتیک از ریه، پستان، پروستات و کلیه را تشکیل می‌دهند

[1] کارشناسی ارشد ژنتیک، مرکز تحقیقات ایمونولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز

[2] کارشناسی ارشد ایمونولوژی، مرکز تحقیقات ایمونولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز

[3] دانشجوی دوره تخصصی رزیدنت پاتولوژی دهان، دندان و فک، دانشکده دندان پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز

[4] دانشیارایمونولوژی،مرکز تحقیقات ایمونولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز (نویسنده مسئول)

(۷). اسکواموس سل کارسینوما از اپیتلیوم سطحی دیس پلاستیک به وجود می‌آید و ازنظر هیستوپاتولوژی با جزایر و طناب های مهاجم از سلول‌های اپیتلیایی سنگفرشی بدخیم مشخص می‌گردد (۸).

ابتلا به سرطان دهان موجب تغییر در ظاهر بیمار، کاهش توانایی بیمار در غذا خوردن و کاهش کیفیت زندگی بیمار می شود (۸). ازآنجایی‌که میزان بقای ۵ ساله ارتباط مستقیمی با staging بیماری در هنگام تشخیص دارد، اقدامات پیشگیرانه و درمان‌های مداخله‌ای زودهنگام باعث کاهش و حتی توقف پیشرفت بیماری می‌شود(۸, ۹). درمان استاندارد سرطان شامل ترکیبی از جراحی یا شیمی‌درمانی و رادیوتراپی می‌باشد که هرکدام به‌نوبه‌ی خود دارای عوارض و مشکلاتی هستند. عوارض رادیوتراپی شامل خشکی دهان، حساسیت مخاط و دندان‌ها و پوسیدگی‌های وسیع دندانی و مشکل در حین بلع می‌باشد. عوارض شیمی‌درمانی شامل سوزش دهان یا گلو، کاهش وزن، ترومبوسیتوپنی، عفونت، تهوع و استفراغ و بی‌اشتهایی و اسهال و یبوست بوده و بیمارانی که در مراحل پیشرفته‌تر بیماری جراحی می شوند ممکن است دچار اختلال در تکلم، بلع، جویدن و یا تغییر شکل صورت شوند (۱۰). هنوز باوجود پیشرفت‌های اخیر، درمان‌های پیچیده و ترکیبی، شانس بقای بیماران مبتلا به اسکواموس سل کارسینوما در حد ۵۰ تا ۵۹ درصد باقی‌مانده است(۶). امروزه در اغلب کشورهای جهان از طب سنتی بخصوص طب گیاهی برای پیشگیری و درمان بیماری‌ها استفاده می‌شود (۱۱-۱۴).

فرآورده‌های طبیعی به‌ویژه گیاهان دارای پتانسیل بالایی برای ساخت ترکیبات دارویی می‌باشند. بسیاری از داروهای ضد سرطانی که سنتز شده‌اند ازجمله taxan ها، وینکا آلکالوئید ها، پودوفیلوتوکسین‌ها و کمپتوتسین‌ها و.... از ترکیبات گیاهی مشتق شده‌اند و برای درمان سرطان‌های مختلف متاستاتیک و غیر متاستاتیک استفاده می‌شود (۱۵).

مطالعات مختلف انجام‌شده نشان داده است که گیاهان هم در پیشگیری و هم در درمان بیماری سرطان نقش چشمگیری دارند. این ترکیبات با مکانیسم‌های مختلف عمل می‌کنند اما القا آپوپتوز نقطه مشترک بسیاری از این ترکیبات می‌باشند. ازجمله این گیاهان می‌توان به گیاه عاقرقرحا اشاره کرد که علاوه بر خاصیت ضد میکروبی و خواصی همچون افزایش ترشح براق و کاهش درد دندان، دارای خاصیت ضد سرطانی و آنتی‌اکسیدانی است. در طب سنتی ایران از آن برای پیشگیری از پوسیدگی دندان و درمان بیماری‌های لثه استفاده می‌شد (۱۶-۲۰). در مطالعه‌ای که آقای Kalim و همکارانش انجام دادند، عصاره این گیاه در محیط آزمایشگاهی با خاصیت آنتی‌اکسیدانی، موجب کاهش آسیب وارده به DNA شده بود (۲۱).

با توجه به این نکته که تابه‌حال گزارشی از اثر ضد توموری عصاره‌ی عاقرقرحا در رده‌ی سلول سرطان دهان دیده نشده است، در این تحقیق اثر سایتوتوکسیتی عصاره گیاه عاقرقرحا بر روی سلول‌های سرطان دهان موردبررسی قرار گرفت.

مواد و روش کار

آماده‌سازی عصاره:

ابتدا گیاه عاقرقرحا از شرکت پژوهان سبز (یاشیل درمان) خریداری شد و توسط هر باریم دانشکده دارو سازی تبریز اصالت آن‌ها تأیید شد. از گیاه ۲۵۰ گرم وزن و توسط آسیاب خانگی آسیاب شد و پودر گیاه را در یک ارلن (۴ لیتری) ریخته شد. در ادامه روی آن ۲ لیتر اتانول ۱۰۰درصد اضافه گردید. محتویات ارلن را خوب به هم زده و به مدت ۳ روز خیسانده شد. در طی این ۳ روز هر از چند گاهی محتویات ارلن به هم زده شد.

بعد از ۳ روز محتویات ارلن از کاغذ صافی عبور داده و عصاره صاف‌شده را برداشته و باقی‌مانده تفاله پودر را دوباره با ۲ لیتر اتانول ۱۰۰درصد مجدداً خیسانده شدند (طبق مراحل قبل به مدت ۳ روز) و بعد از ۳ روز عصاره استخراج‌شده را روی عصاره قبلی اضافه گردید. درنهایت عصاره استخراج‌شده توسط دستگاه روتاری تبخیر شد تا تمام اتانول آن‌ها تبخیر شود. این مرحله (تبخیر) به مدت یک روز به طول انجامید. درنهایت عصاره را داخل ارلن ریخته و در دمای 4° تا روز انجام آزمایش نگه‌داری گردید.

کشت سلولی:

رده سلولی KB از انستیتو پاستور ایران به‌صورت ویال خریداری شد. سلول‌های KB مربوط به مدل سلولی اسکواموس سل کارسینوما می‌باشد. این سلول‌ها جزو رده سلولی انسانی بوده و اپی تلیالی شکل می‌باشند. این رده سلولی در محیط کشت RPMI-1640، 10% FBS ، ۲mM از L-گلوتامین، پنی‌سیلین به میزان unit/ml ۱۰۰، استرپتومایسین به میزان µg/ml ۱۰۰ در دمای ۳۷0C و فشار درصد۵ از co۲ کشت داده شدند.

به‌منظور تعیین اثرات بهینه عصاره، ۲ متغیر دوز و زمان در این تحقیق در نظر گرفته شد. سلول‌های سرطانی، با غلظت‌های ۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ۴۰۰، ۵۰۰ و ۶۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تیمار شدند و بعد از ۲۴ و ۴۸ ساعت موردمطالعه قرار گرفتند.

تست MTT:

آزمون MTT آزمون یکمی و رنگی است که اساس آن بر پایه احیاء نمک زردرنگ محلول در آب و تشکیل کریستال‌های آبی‌رنگ تیره و نامحلول فورمازان در آب می‌باشد. احیا MTT، به‌وسیله

آنزیم میتوکندریاییس وکسیناتد هیدروژن از و تنها در سلول‌های زنده رخمی دهد. بلورهای فورمازان در حلال های آلی همچون ایزوپروپانولو DMSO قابل‌حل می‌باشند که با سنجش میزان جذب نوری آن می‌توان تعداد سلول‌های زنده را که فعالیت سوخت‌وسازی دارند تعیین نمود. روش کار به این صورت انجام گرفت که در هر یک از چاهک‌های یک پلیت ۹۶ خانه‌ای، ۱۰۳×۱۵ سلول کشت داده شد و پس از ۲۴ ساعت و چسبیدن سلول‌ها به کف پلیت، سلول‌ها با غلظت‌های مختلف از عصاره عاقرقرحا تیمار شدند . بررسی هر غلظت از عاقرقرحا در سه چاهک تکرار می‌شود . در هر ردیف از چاهک‌های هر پلیت در کنار غلظت‌های مختلف عاقرقرحا یک چاهک به‌عنوان کنترل در نظر گرفته شد که شامل تمامی مواد اضافه‌شده به سلول‌ها، به‌استثنای عاقرقرحا بود. بعد از گذشت زمان‌های موردنظر، بلیت‌ها را از انکوباتور خارج کرده، محیط رویی چاهک‌ها را برداشته و به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر محیط RPMI حاوی ۱۰ درصد FBS همراه با ۵۰ میکرولیتر محلول MTT اضافه گردید. سپس پلیت‌ها را مجدداً به انکوباتور منتقل کرده و به مدت ۴ ساعت در ۳۷ درجه نگه‌داشته شدند. در مرحله بعد محصول فورمازان تولیدشده با افزودن ۲۰۰ میکرولیتر حلال دیمتیل سولفوکساید (DMSO) حل و میزان رنگ تولیدی توسط دستگاه لایزار یدر درطول‌موج ۵۷۰ نانومترتعیین شد. توان زیستی سلول‌های تیمار شده با عاقرقرحا به شکل نسبت درصد جذب نوری نمونه در قیاس با میزان جذب نوری فورمازان تولیدی در نمونه کنترل تعیین شدند .

:DNA Fragmentation

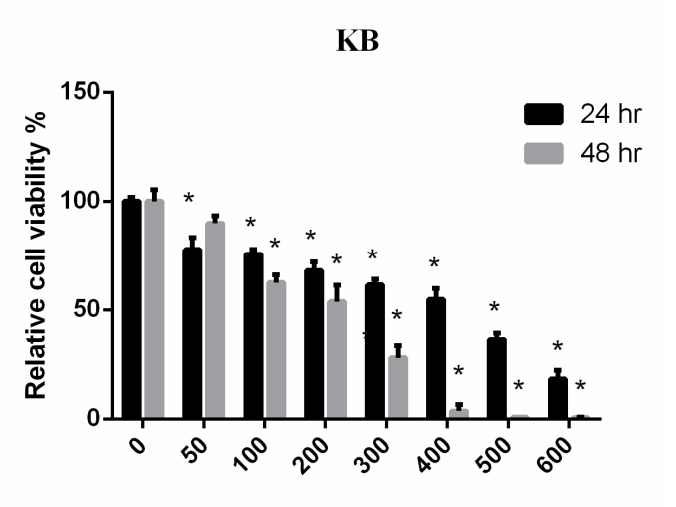
آپوپتوز، مرگ برنامه ریزی شده سلول می‌باشد که با یکسری ویژگی‌هاازجمله تراکم سیتوپلاسم، جوانه زدن غشای سیتوپلاسمی و شکسته شدن DNA به قطعات حدود 200 bp مشخص می‌شود. تست DNA Fragmentation تکنیکی است که الگوی شکسته شدن DNA را با استفاده از ژل الکتروفورز بررسی می‌کند. برای انجام تست ۳ میلی‌لیتر از سوسپانسیون سلولی حاوی ۱۰۵×۵ سلول در پلیت های ۶ خانه‌ای پخش شدند. سلول‌ها با عصاره عاقرقرحا در زمان ۴۸ ساعت تیمار شدند. بعد از گذشت زمان انکوباسیون (۴۸ ساعت)، محیط رویی پلیت ها خارج شد و دوبار با بافر PBS شستشو انجام شد. سپس سلول‌ها به میکروتیوب ها منتقل شدند و با بافر PBS در دور 12000 rpm به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ انجام گرفت. بعد از خارج کردن مایع رویی به رسوب سلولی میکروتیوب ها به ترتیب: ۲۵۰ میکرولیتر محلول لیزکننده، ۳۰ میکرولیتر SDS ۱۰درصد و ۱۰ میکرولیتر پروتئیناز K اضافه گردید. سپس در بن ماری ۵۶ درجه سانتی‌گراد به‌صورت over night انکوبه شدند. سپس میکروتیوب‌ها را در دور 12000 rpm به مدت ۱۲ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شدند. در مرحله بعد مایع رویی به یک میکروتیوب دیگر منتقل گردید. در ادامه ۵۰۰ میکرولیتر کلروفرم اضافه کرده و سانتریفوژ انجام گرفت. بعد از سانتریفوژ فاز رویی به یک میکروتیوب دیگر منتقل نموده و به آن ۴-۳ میکرولیتر RNase اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. بعد از زمان انکوباسیون ۹۰۰ میکرولیتر اتانول ۱۰۰درصد سرد اضافه نموده و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. بعد از انکوباسیون، میکروتیوب ها در دور ۱۲۰۰۰ rpm به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شدند. در مرحله بعد بر روی رسوب ۲۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۰درصد اضافه کرده و به مدت ۵ دقیقه در دور 12000 rpm در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژگردید. بروی رسوب ۳۰ میکرولیتر DEPC water اضافه شد. نمونه DNA بهدست آمده بروی ژل آگاروز ۱/۵در صد الکتروفورز گردید. نتیجه با استفاده از ترانس لومیناتور مشاهده شد.

:TUNEL

به دنبال شکستن DNA ژنومیک طی فرآیند آپوپتوز DNAهای دو رشته‌ای با وزن مولکولی پایین (منو و الیگونوکلئوزم) و همچنین انتهاهای تک‌رشته‌ای به وجودمی‌آید که این DNA های شکسته شده با نشان‌دار کردن انتهای 3′oH طی یک واکنش آنزیمی قابل‌تشخیص‌می‌باشد. آنزیم ترمینال داکسی نوکلئوتیدیل ترانسفراز (TdT) پلیمریزاسیون نوکلئوتیدهای نشان‌دار را به انتهای 3′oH بدون الگو کاتالیز می‌کند که به‌وسیله anti-fluorescein antibody Fab fragment که با پراکسید هورس ردیش (HRP) نشان‌دار شده است با میکروسکوپ فلورسنت قابل شناسایی می‌باشد. در مرحله‌ی بعد می‌توان با اضافه کردن محلول DAB سلول‌ها را ازنظر آپوپتوز با میکروسکوپ نوری بررسی کرد.

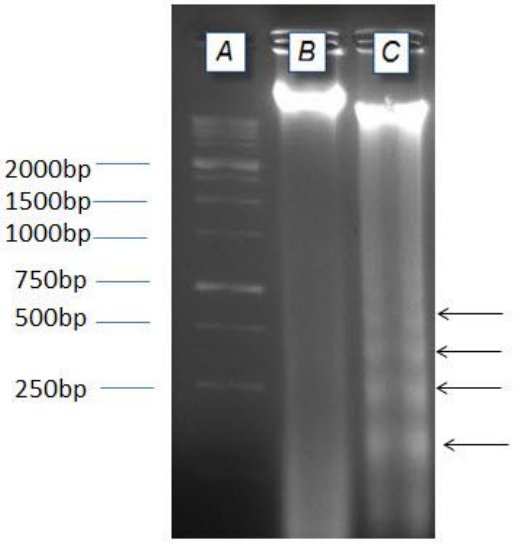
یافته‌ها

جهت بررسی و تعیین اثرات سایتوتوکسیک عصاره عاقرقرحا آزمایش MTT انجام گرفت. نتایج حاصل از تیمار سلول‌های KB با غلظت‌های ۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ۴۰۰، ۵۰۰ و ۶۰۰ (µg/ml) از عصاره در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت در نمودار ۱ نشان داده شده‌اند.



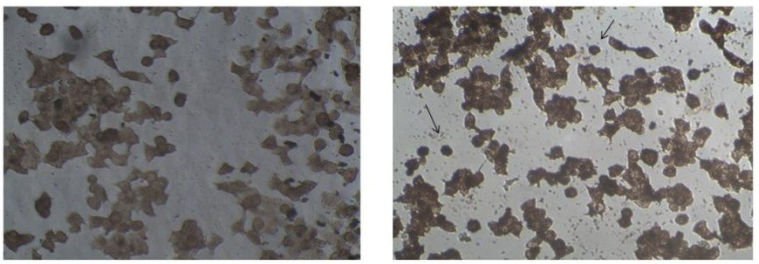
نمودار (۱): اثر سایتوتوکسیک عصاره اتانولی عاقرقرحا روی سلول‌های KB در زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت.
ستون‌هایی که با ستاره نشان داده‌شده با p value<۰/۰۵ نسبت به کنترل معنی‌دار است.

آپوپتوز، مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی می‌باشد که با یکسری از ویژگی‌ها مشخص می شود. یکی از شاخص‌های برجسته و مهم آپوپتوز شکسته شدن DNA به قطعات حدود 200bp می‌باشد. انجام این آزمون با عصاره‌های عاقرقرحا در زمان ۴۸ ساعت القا آپوپتوز و شکسته شدن DNA به قطعات حدود 200bp را در سلول‌های KB نشان داد. نتایج در تصویر ۱ نشان داده‌شده است.



تصویر (۱): آزمون DNA Fragmentation برای نشان دادن الگوی قطعه‌قطعه شدن DNA در سلول‌هایKBA (مارکر). B) سلول‌های کنترل (بدون تیمار). C) سلول‌های تیمار شده با عاقرقرحا.

بعد از بررسی خاصیت آپوپتوتیک عصاره‌های عاقرقرحا، برای تأیید آپوپتوز از آزمون تانل استفاده شد. به‌واسطه آزمون تانل می‌توان قطعات DNA را در صورت القاء آپوپتوز مشاهده نمود. تیمار سلول‌های KB با عصاره‌های اتانولی عاقرقرحا در زمان ۴۸ ساعت القا آپوپتوز در این سلول‌ها را تأیید کرد. هسته سلول‌های تیمار شده در مقایسه با گروه کنترل رنگ قهوه‌ای به خود گرفتند (تصویر ۲).



تصویر (۲): آزمون تانل برای تأیید القاء آپوپتوز: A) کنترل منفی (سلول‌های سرطان دهان رده KB بدون تیمار با عصاره عاقرقرحا). B) سلول‌های سرطان دهان رده KB تیمار شده با عصاره اتانولی عاقرقرحا. (نوک پیکان سلول‌های دچار آپوپتوز شده را نشان می‌دهد).

بحث و نتیجه گیری

۸۰-۷۵ درصد جمعیت جهان و به‌ویژه کشورهای درحال‌توسعه از داروهای گیاهی برای درمان‌های بیماری‌ها استفاده می‌کنند. به‌این‌علت که معتقدند داروهای گیاهی در کنار ارزان بودن و قابل‌دسترس بودن فاقد عوارض جانبی می‌باشند. بسیاری از داروهای متداول از منابع گیاهی منشأ گرفته‌اند. درگذشته پایه بسیاری از داروها گیاهی بود ازجمله آسپیرین (willow bark)، دیگوسین (fox glove) مورفین (opium poppy) و... (۲۲).

جهان امروز با شیوع بالای بیماری سرطان مواجه می‌باشد به‌طوری‌که این بیماری دومین علت مرگ‌ومیر بعد از بیماری‌های قلبی می‌باشد. شناخت مکانیسم‌های مهم دخیل در ایجاد سرطان برای پیشبرد روش‌های درمانی برای درمان نئوپلاسم‌ها مهم می‌باشد (۱۵). یکسری جهش‌ها در سلول‌ها سبب خروج سلول‌ها از چرخه کنترل رشد سلول شده و می‌توانند منجر به بروز سرطان شوند. وقوع این جهش‌ها در سلول‌ها سبب مقاوم شدن سلول‌ها به محرک‌های مرگ و آپوپتوز می‌شود، لذا استفاده از ترکیبات شیمیایی القاکننده آپوپتوز یکی از اهداف اصلی درمان سرطان می‌باشد(۲۳).

فرآورده‌های طبیعی به‌ویژه گیاهان دارای پتانسیل بالایی برای ساخت ترکیبات دارویی می‌باشند. بسیاری از داروهای ضد سرطانی که سنتز شده‌اند ازجمله taxan ها، وینکا آلکالوئیدها، پودوفیلوتوکسین‌ها و کمپتوتسین‌ها و... از ترکیبات گیاهی مشتق شده‌اند و برای درمان سرطان‌های مختلف متاستاتیک و غیرمتاستاتیک استفاده می‌شوند (۱۵).

مطالعات مختلف انجام‌شده نشان داده است که گیاهان هم در پیشگیری و هم در درمان بیماری سرطان نقش چشمگیری دارند. این ترکیبات با مکانیسم‌های مختلف عمل می‌کنند اما القا آپوپتوز نقطه مشترک بسیاری از این ترکیبات می‌باشد.

Selaginellotamariscina که تحت عنوان keoun Back مشهور می‌باشد گزارش شده است که این ترکیب گیاهی برای درمان بیماران مبتلابه سرطان و در مراحل پیشرفته بیماری استفاده می‌شود. Lee.et al نشان داده‌اند که عصاره آبی این گیاه به‌طور قابل‌توجهی بیان ژن p53 را افزایش می‌دهد و باعث توقف سیکل سلولی در فاز G1 می‌شود. همچنین نشان داده‌شده که این گیاه دارای اثرات سایتوتوکسیک بوده و باعث قطعه‌قطعه شدن DNA در سلول‌های U937 و سلول‌های تخمدانی انسان به نام A-2780 می‌شود(۱۵). در یک مطالعه بر روی عصاره گیاه strobilanthescrispus نشان داده‌شده است که این گیاه باعث القا آپوپتوز در سلول‌های MCF-7 در غلظت IC50 ۳۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر شده است. مکانیسم آپوپتوز القا شده توسط این عصاره گیاهی در سلول‌های MCF-7 افزایش بیان ژن P53، پروتئین cdk2 و کاسپاز ۳ و ۷ بوده و از طرفی این عصاره گیاهی باعث کاهش بیان پروتئین‌های مهارکننده آپوپتوز بنام XIAP می‌شود (۲۴).

Xanthorrhizol یک ترکیب مشتق شده از ریشه curcumaranthorrhizza می‌باشد. مطالعات مختلف بر روی این ترکیب گیاهی اثر ضد تکثیری Roxb آن را نشان می‌دهد. در یک مطالعه‌ای اثر ضد تکثیری Xanthorrhizol بر روی سل لاین‌های مختلف سرطان پستان بررسی‌شده و نشان داده شد که باعث مهار رشد ۵۰ درصد سلول‌های MDA-MB231 در غلظت ۰/۷۹ ± ۸/۶۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر می‌شود. همچنین نشان داده شد که تیمار با Xanthorrhizol باعث القا آپوپتوز از طریق مسیر میتوکندریایی شده و باعث آزاد شدن سیتوکروم C، فعال شدن کاسپاز ۳ و ۹ و تجزیه پروتئین PARP-1 می‌شود. همچنین مطالعات invivo در موش نشان داد که این ترکیب گیاهی باعث مهار تشکیل تومور و مهار پیشرفت سرطان شده و از طرف دیگر با کاهش میزان سیکلواکسیژناز -۲ و ماتریکس متالوپروتئیناز ۹ منجر به توقف متاستاز در مدل موشی متاستاز ریه می‌شود(۲۵).

AmmarSaleem و همکارانش در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۲ بر روی رده‌های سرطانی سینه، استوسارکوما و پروستات

انجام شد، نشان دادند که عصاره فنولی گیاه Terminaliachebula باعث مهار تکثیر سلول‌های سرطانی و القا آپوپتوز در این سلول‌ها می‌شود. همچنین نشان دادند این عصاره در غلظت‌های پایین باعث آپوپتوز و در غلظت‌های بالا باعث نکروز در این سلول‌ها می‌شود (۲۶). در مطالعه دیگر D. Bendjeddou و همکارانش در سال ۲۰۰۲ بامطالعه اثر عصاره Anacyclus pyrethrum بر روی رده‌های سلول‌های ایمنی نقش فعال‌کنندگی این عصاره بر روی سلول‌های ایمنی را ثابت کردند. همچنین بامطالعه اثر این عصاره بر روی سلول‌های سرطانی اثر مهارکنندگی این عصاره را بر روی سلول‌های سرطانی اثبات نمودند(۱۶).

ChaoukiSelles و همکارانش در مطالعه‌ای دیگر نقش آنتی‌اکسیدانی عصاره Anacyclus pyrethrum را اثبات نمودند(۲۷).

M. BadrulAlam و همکارانش در مطالعه‌ای که اثر عصاره گیاه دارویی BRASSICA NIGRA را بر روی موش‌های سوئیسی انجام دادند، نشان دادند که این عصاره هم نقش آنتی‌اکسیدانی و هم نقش ضدالتهابی را در موش‌های سوئیسی بازی می‌کند(۲۸).

در مطالعه‌ی حاضر، اثرات سایتوتوکسیک عصاره عاقرقرحا بر روی رده سلولی KB برای اولین بار موردبررسی قرارگرفته است. نتایج این مطالعه نشان داد که عصاره عاقرقرحا در مقایسه با کنترل دارای اثرات سایتوتوکسیک معنی‌داری بر روی سلول‌های سرطانی بودند و اجسام آپوپتوتیک مشاهده شدند. اثرات سایتوتوکسیک عصاره عاقرقرحا وابسته به زمان و غلظت می‌باشند. به‌طوری‌که با افزایش زمان و افزایش غلظت عصاره این اثرات بر روی سلول‌های KB بیشتر می‌شوند.

فرآیند آپوپتوز با چروکیدگی و ایجاد حباب‌هایی در سطح سلول آغاز می‌شود، سپس سلول چندقسمتی می‌شود، به‌گونه‌ای که غشاء سیتوپلاسمی از بین نرفته و محتویات سیتوپلاسمی آزاد نمی‌شود و درنهایت ایجاد اجسام آپوپتوتیک می‌کند. جهت بررسی القا آپوپتوز مرگ سلولی القاء شده توسط عصاره عاقرقرحا آزمایش TUNEL انجام شد. بررسی نتایج نشان داد که القاکنندگی آپوپتوز در سلول‌های KB با عصاره عاقرقرحا صورت گرفته است.

قطعه‌قطعه شدن DNA از شاخص‌های مورفولوژیک در آپوپتوز می‌باشد که این ویژگی با انجام DNA-Fragmentation برای عصاره عاقرقرحا ثابت شد.

تیمار سلول‌های KB با عصاره عاقرقرحا باعث تغییر مورفولوژی این سلول‌ها شده و اثرات سایتوتوکسیک القاشده توسط این عصاره بازمان و غلظت ارتباط مستقیم دارد، به‌طوری که قابلیت زیست‌پذیری سلول‌ها با افزایش غلظت و زمان کاهش می‌یابد. همچنین نشان داده شد که این عصاره در سلول‌های KB به‌طور قابل‌توجهی باعث القا آپوپتوز می‌شود. با توجه به نتایج به‌دست‌آمده عصاره عاقرقرحا می‌تواند کاندید مناسبی جهت شناسایی ترکیبات فعال ضد سرطانی باشد.

تشکر و قدردانی

از کلیه کارکنان و دانشجویان مرکز تحقیقات ایمونولوژی به‌خصوص آقای بهزاد کفاش که در انجام این پروژه کمال همکاری را انجام دادند، تشکر و قدردانی می‌شود.

References:

1. Medina-Ramirez CM, Goswami S, Smirnova T, Bamira D, Benson B, Ferrick N, et al. Apoptosis inhibitor ARC promotes breast tumorigenesis, metastasis, and chemoresistance. Cancer Res 2011; 71: 7705-15.
2. Bhalla KN, Rao R, Sharma P, Das Gupta S, Chauhan L, Stecklein S, et al. Treatment with Histone Deacetylase Inhibitors Creates' BRCAness' and Sensitizes Human Triple Negative Breast Cancer Cells to PARP Inhibitors and Cisplatin. Cancer Res 2012; 72: S3-7.
3. Kerbel RS.Reappraising antiangiogenictherapy for breast cancer. Breast 2011; 20: S56-S60.
4. Zhang Y, Peng L, Mumper RJ, Huang L. Combinational delivery of c-mycsiRNA and nucleoside analogs in a single, synthetic nanocarrier for targeted cancer therapy. Biomaterials 2013; 34: 8459-68.
5. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013. CA Cancer J Clin 2013;63(1):11–30.
6. Kacher JE. Oral and maxillofacial pathology. Case of the month. Histoplasmosis. Tex Dent J 2013;130(3):198, 232.
7. Zukanović A, Gržić R. Dental management of the medically compromised patient. Elsevier Mosby;2012.
8. Neville BW. Oral and maxillofacial pathology. Elsevier Brasil; 2009.

9. da Silva SD, Ferlito A, Takes RP, Brakenhoff RH, Valentin MD, Woolgar JA, et al. Advances and applications of oral cancer basic research. Oral Oncol 2011;47(9):783–91.
10. Petersen PE. Oral cancer prevention and control–The approach of the World Health Organization.Oral Oncol 2009; 45: 454-60.
11. Kumar VK, Lalitha KG. In vitro study on α-amylase inhibitory activity of an Ayurvedic medicinal plant, Anacyclus pyrethrum DC root. Indian J Pharmacol 2014;46(3):350–1.
12. Pahuja M, Mehla J, Reeta KH, Tripathi M, Gupta YK. Effect of Anacyclus pyrethrum on pentylenetetrazole-induced kindling, spatial memory, oxidative stress and rho-kinase II expression in mice. Neurochem Res 2013;38(3):547–56.
13. Prakash S, Shelke AU. Role of Triphala in dentistry. J Indian Soc Periodontol 2014;18(2):132–5.
14. Velmurugan A, Madhubala MM, Bhavani S, Satheesh Kumar KS, Sathyanarayana SS, Gurucharan N. An in-vivo comparative evaluation of two herbal extracts Emblica officinalis and Terminalia Chebula with chlorhexidine as an anticaries agent: A preliminary study. J Conserv Dent 2013;16(6):546–9.
15. HemaIswarya S, Doble M. Potential synergism of natural products in the treatment of cancer. Phytother Res 2006;20(4):239–49.
16. Bendjeddou D, Lalaoui K, Satta D. Immunostimulating activity of the hot water-soluble polysaccharide extracts of Anacyclus pyrethrum, Alpinia galanga and Citrullus colocynthis. J Ethnopharmacol 2003;88(2–3):155–60.
17. Boonen J, Sharma V, Dixit VK, Burvenich C, De Spiegeleer B. LC-MS N-alkylamide profiling of an ethanolic Anacyclus pyrethrum root extract. Planta Med 2012;78(16):1787–95.
18. Pahuja M, Mehla J, Reeta KH, Joshi S, Gupta YK. Root extract of Anacyclus pyrethrum ameliorates seizures, seizure-induced oxidative stress and cognitive impairment in experimental animals. Epilepsy Res 2012;98(2–3):157–65.
19. Selles C, Dib MEA, Djabou N, Beddou F, Muselli A, Tabti B, et al. Antimicrobial activity and evolution of the composition of essential oil from Algerian Anacyclus pyrethrum L. through the vegetative cycle. Nat Prod Res 2013;27(23):2231–4.
20. Sharma V, Boonen J, Spiegeleer BD, Dixit VK. Androgenic and spermatogenic activity of alkylamide-rich ethanol solution extract of Anacyclus pyrethrum DC. Phytother Res 2013;27(1):99–106.
21. Kalim MD, Bhattacharyya D, Banerjee A, Chattopadhyay S. Oxidative DNA damage preventive activity and antioxidant potential of plants used in Unani system of medicine. BMC Complement Altern Med 2010;10:77.
22. Pal SK, Shukla Y. Herbal medicine: current status and the future. Asian Pac J Cancer Prev 2003;4(4):281–8.
23. Ait-Mohamed O, Battisti V, Joliot V, Fritsch L, Pontis J, Medjkane S, et al. Acetonic extract of Buxus sempervirens induces cell cycle arrest, apoptosis and autophagy in breast cancer cells. PLoS ONE 2011;6(9):e24537.
24. Chong HZ, Rahmat A, Yeap SK, Md Akim A, 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;12:35.
25. Cheah YH, Nordin FJ, Tee TT, Azimahtol HLP, Abdullah NR, Ismail Z. Antiproliferative property and apoptotic effect of xanthorrhizol on MDA-MB-231 breast cancer cells. Anticancer Res 2008; 28: 3677-89.

26. Saleem A, Husheem M, Härkönen P, Pihlaja K. Inhibition of cancer cell growth by crude extract and the phenolics of Terminalia chebula retz. fruit. J Ethnopharmacol 2002;81(3):327–36.
27. Selles C, Dib MEA, Allali H, Tabti B. Evaluation of antimicrobialand antioxidant activities of solvent extracts of Anacyclus pyrethrum L., from Algeria. Mediterranean J Chem 2012; 2: 408-15.
28. Alam MB, Hossain MS, Haque ME. Antioxidant and anti-inflammatory activities of the leaf extract of Brassica nigra. Int J Pharm Sci Res 2011; 2: 303-10.

Original Article

CYTOTOXIC EFFECTS OF ANACYCLUS PYRETHRUM PLANT EXTRACT IN ORAL CANCER CELL (KB CELL LINE)

*Ali Mohammadi[1], Behzad Mansoori[2], Katayon Chaghakaboodi[3], Milad Ghanizadeh[4], Behzad Baradaran[5]**

Received: 22 Jan, 2016; Accepted: 9 Apr, 2016

Abstract

Background & Aims: Cancer is one of the most causes of mortality worldwide. Products derived from natural plants that induce apoptosis are used for cancer treatment. Therefore investigation of different herbal components for new anti-cancer drug is one of the main research activities throughout the world. This study is the first to investigate the cytotoxic and apoptotic effect of Anacyclus pyrethrum plants extract in KB cancer cell lines.

Materials & Methods: Cytotoxic effects of Anacyclus pyrethrum plant extract was measured using MTT assays. To show induction of apoptosis by this plant TUNNEL assay and DNA Fragmentation were performed.

Results: In the present study, Anacyclus pyrethrum extract noticeably killed cancer cells. TUNNEL test and DNA Fragmentation assay showed apoptotic characteristic in Anacyclus pyrethrum extract treated cells.

***Conclusion*:** Our studies revealed that ethanol extracts of Anacyclus pyrethrum is effective in apoptosis inducing in KB cancer cells which may be beneficial in cancer therapy.

Keywords: Anacyclus pyrethrum, Apoptosis, Cytotoxic, KB cancer cell lines

Address: Immunology Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Daneshghah Ave, Tabriz, Iran
Tel: +984133371440
Email: Behzad_im@yahoo.com

SOURCE: URMIA MED J 2016: 27(4): 265 ISSN: 1027-3727

[1] *Master in Genetics, Immunology Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran*

[2] *Master in Immunology, Immunology Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran*

[3] *Resident Student in Specialized Pathology Mouth, Teeth and Jaw, Dental School, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran*

[4] *Associate Professor of Immunology, Immunology Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran (Corresponding Author)*