دوماهنامه علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران
جلد ۳۱، شماره ۵، صفحه ۸۹۰-۸۸۱ (۱۳۹۴)

ارزیابی اثر ضدتکثیری فراکسیون‌های حاصل از عصاره گل سنجد (*Elaeagnus angustifolia* L.) و اندام هوایی مفراح (*Nepeta crispa* L.) بر سلول‌های سرطان خون لاین K562

اعظم بدرحداد[۱]، خسرو پیری[۲*] و کامران منصوری[۳]

۱- کارشناسی ارشد، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران

۲*- نویسنده مسئول، دانشیار، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران، پست الکترونیک: khpiri@gmail.com

۳- استادیار، مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران

تاریخ دریافت: شهریور ۱۳۹۱ تاریخ اصلاح نهایی: تیر ۱۳۹۳ تاریخ پذیرش: تیر ۱۳۹۳

چکیده

در بررسی‌های گذشته اثر ضدسرطانی در برخی از گیاهان که دارای ترکیب‌های مشابه با عصاره سنجد (*Elaeagnus angustifolia* L.) و مفراح (*Nepeta crispa* L.) هستند بر انواع سرطان‌ها انجام و تأیید شده‌است. هدف از این تحقیق ارزیابی اثر فراکسیون‌های مختلف سنجد و مفراح بر سلول‌های سرطان خون انسان لاین k562 می‌باشد. ابتدا سلول‌های سرطانی در محیط کشت DMEM/F12 و FCS به همراه آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین ۱۰۰U/ml و استرپتومایسین ۱۰۰µg/ml کشت داده شده و تکثیر یافتند، سپس غلظت‌های ۱۰ تا ۱۶۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر فراکسیون‌های هگزانی، اتیل استاتی، کلروفرمی و آبی حاصل از عصاره گل سنجد و اندام هوایی مفراح بر سلول‌های k562 اثر داده شد و پس از ۷۲ ساعت اثر عصاره‌ها بر تکثیر سلول‌ها توسط دستگاه سل‌کانتر و اثر بر بقاء سلول‌ها به‌وسیله کیت‌های LDH بررسی شد. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که غلظت‌های بالای فراکسیون‌های اتیل استاتی و کلروفرمی در هر دو گیاه اثر قابل توجهی در کاهش تکثیر و رشد مناسبی برای انجام تحقیقات بیشتر مربوط به درمان سلول‌های سرطانی باشند و جداسازی و خالص‌سازی ترکیب‌های مؤثر این گیاهان و شناسایی مکانیسم عمل آنها توصیه می‌شود.

واژه‌های کلیدی: سنجد (*Elaeagnus angustifolia* L.)، مفراح (*Nepeta crispa* L.)، فراکسیون، سلول سرطانی لاین k562، ضدتکثیر.

مقدمه

سرطان دومین عامل عمده مرگ در ایالت متحده می‌باشد (Hoyert *et al*., 2003). نسبت بالای مرگ و میر، با سرطان و اثرات جانبی جدی شیمی درمانی و اشعه درمانی مرتبط است. همچنین کم بودن خاصیت انتخابی عوامل شیمی درمانی سبب بروز توکسیسیته در بافت‌های طبیعی و ظهور سریع مقاومت بر علیه این داروها شده‌است که موفقیت فاکتورهای درمان را محدود می‌کند. بنابراین نیاز به منابع درمانی بهتر و جدید، شامل عوامل شیمی درمانی جدیدی می‌باشد (Verweil & de Jonge, 2001؛ Eikesdal *et al*., 2001).

بررسی عوامل ضدسرطان از منابع گیاهی در سال ۱۹۵۰ با کشف و توسعه آلکالوئیدهای وین‌بلاستین و وین‌کریستین آغاز شد. آنها اولین عوامل پیشرفت به سمت مصرف طبی برای درمان سرطان بودند. سال‌های اخیر، بررسی‌های قابل توجه در طبیعت افزایش یافته که منجر به کشف داروهای مؤثر برای درمان سرطان شد (Philipson, 2001). یکی از مهمترین مثال‌ها ترکیب‌های تاکسوئید است که از انواع جنس‌های *Taxus* بدست آمده‌است (Walker & Croteau, 2001)، همچنین مشتقات کامپتوتکین که از *Camptotheca acuminate* حاصل شده‌اند (Mattos *et al*., 2001).

ازجمله گیاهانی که در طب سنتی مورد توجه هستند سنجد با نام علمی *Elaeagnus angosifolia* از خانواده Elagnaceae می‌باشد که دارای خواص دارویی و صنعتی متفاوتی در ریشه، چوب، پوست و میوه است. سنجد دارای اثرات ضددرد بوده و به‌عنوان داروی ضدتشنج کاربرد دارد (Hosseinzadeh *et al*., 2003). میوه و گل این گیاه در طب سنتی، برای درمان تهوع، استفراغ، آسم، زردی و نفخ شکم بکار می‌رود (Wang *et al*., 2006). گل سنجد محتوی ۱/۷۳-۰/۹ فلاون‌ها و ۱/۴۹٪-۱/۰۶۶ پلی‌فنلها و همچنین ترکیب‌های آروماتیک رزینی می‌باشد. ۴۲ ترکیب در گل سنجد شناخته شده که از قبیل هیدروکربون‌های لیمونن و اسکوالن، مونوترپن و تری‌ترپنی هستند و خاصیت ضدالتهابی و ضدعفونی‌کنندگی دارند. آنیتول، فنل-متیل اترونرولیدیل (الکل سزکویی ترپن)، اتیل سینامات و ۲-فنیل-اتیل ایزووالرنت و ۲-فنیل-اتیل بنزوات که مشتقات اسید سینامیک و بنزویک هستند و همچنین استوفنون را می‌توان نام برد.

گیاه مفراح (*Nepeta crispa*) از خانواده Lamiaceae از گیاهان بومی همدان است که مسکن، آرامش‌بخش، ضدنفخ، مقوی برای ناراحتی‌های عصبی و تنفسی است؛ همچنین دارای فعالیت ضدمیکروبی و ضدقارچی می‌باشد (Sonboli *et al*., 2004). ترکیب‌های مهم گیاه مفراح شامل ۸،۱-سینئول (۷۱٪)، ۷aα-۷α-۴aα-پنتا-لاکتون (۱۰/۳٪) و ۷βα-۷α-۴aβ-پنتا-لاکتون (۹/۲٪) (Sefidkon *et al*., 2006)، همچنین بتا-پینن و گاما-ترپینئول (Mojab *et al*., 2009) می‌باشد. با توجه به موارد اشاره شده، هدف از این تحقیق بررسی قابلیت دارویی این گیاهان در فعالیت‌های ضدتوکسیک سرطان خون می‌باشد.

خانواده Lamiaceae دارای ترکیب‌های ترپنی هستند، ترپن‌ها سبب بلوکه شدن بسیاری از عوامل سرطانی و رشد سلول‌های سرطانی می‌شود. در گونه‌های این خانواده مهار سرطان کلون در موش مورد بررسی قرار گرفته و ترکیب‌های ترپنی به‌عنوان مهارکننده این سرطان از طریق ترمیم سلول‌ها و حفاظت آنها از توسعه بیماری شناخته شده‌اند (Mimica-Dukic *et al*., 2004). ویژگی دارویی گونه‌های *Nepeta* با ترپنوئیدها و فلاونوئیدها مرتبط است. برخی آنالوگهای ویتامین E ازجمله آلفا-توکوفرول که در عصاره گل سنجد نیز موجود است ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و تومورزایی را در شرایط *In vitro* نشان می‌دهند (Neuzil *et al*., 2002).

در مطالعه گیاه دارویی *Elaeagnus glabra* از خانواده Elaeagnaceae بر روی سلول‌های سرطانی HT1080، عصاره متانولی این گیاه سبب مهار بیان mRNA و پروتئین MMP-2 و MMP-9 در سلول‌های HT1080 شده که در نتیجه آن از تولید پروتئین‌های MMP-2 و MMP-9 که برای توسعه و هجوم سلول‌های سرطانی ضروری است، جلوگیری می‌کند (Li *et al*., 2009).

با توجه به اینکه تأثیر ضدسرطانی عصاره‌های سنجد و مفراح بر رده سلول‌های سرطان خون هنوز بررسی نشده، بنابراین در این تحقیق عصاره‌های آبی، کلروفرمی، اتیل استاتی و هگزانی این دو گیاه دارویی تهیه و بر سلول‌های سرطان خون بررسی گردید تا با یافتن عصاره مؤثر امکان جداسازی ترکیب‌های خالص و جدیدتر از این گیاهان فراهم شود. هر فراکسیون با توجه به میزان قطبیت حاوی ترکیب‌های متفاوتی است.

مواد و روشها

تهیه فراکسیون‌های گیاهی

گل سنجد و اندام هوایی مفراح پس از جمع‌آوری از باغ گیاهان دارویی و شناسایی در دانشکده کشاورزی همدان در شرایط سایه و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد خشک شده و عصاره هیدروالکلی از آنها تهیه گردید، پس از ۴۸ ساعت، با استفاده از کاغذ واتمن صاف شده و بعد در روتاری تغلیظ و پودر شد. سپس به‌منظور تهیه فراکسیون‌ها از حلال‌های مختلف (غیرقطبی تا قطبی به‌منظور تعیین ترکیب‌های مؤثر قابل حل در هر حلال) شامل n–هگزان، اتیل استات، کلروفرم (مرک) و آب مقطر استفاده شد و هریک از فراکسیون‌های حاصل توسط دستگاه فریز درایر به‌صورت پودر خشک درآمد و در یخچال نگهداری شد. برای هر بار استفاده، مقدار مورد نیاز از آن وزن و در محیط کشت حل گردید.

کشت سلول‌های سرطانی

سلول‌های سرطان خون لاین K562، از بانک سلولی انستیتو پاستور فراهم شد. سلول‌ها در محیط کشت DMEM/F12 و FCS (سرم جنین گاوی از شرکت Gipco) به همراه آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین ۱۰۰U/ml و استرپتومایسین ۱۰۰µg/ml کشت داده شدند. در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه‌ای مقدار ۲۵۰ میکرولیتر از محیط کشت DMEM/F12 و ۱٪FCS ریخته و مقدار ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی (۵×۱۰^{۴} سلول) به هر یک از چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای حاوی محیط کشت اضافه گردید؛ برای ۲۴ ساعت پلیت‌ها درون انکوباتور قرار داده شدند. سلول‌های کشت داده شده بعد از ۲۴ ساعت از رشد تحت تیمار با غلظت‌های ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۸۰ و ۱۶۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر فراکسیون‌های حاصل قرار گرفتند. چند چاهک نیز به‌عنوان کنترل انتخاب شد. پلیت به انکوباتور منتقل شد و پس از ۷۲ ساعت اثر عصاره‌ها بر تکثیر سلول‌ها توسط دستگاه سل کانتر (مدل kx-21N) و اثر بر بقاء سلول‌ها به‌وسیله کیت‌های LDH بررسی شدند (هر آزمایش سه بار تکرار شد).

آزمون LDH

سنجش لاکتات دهیدروژناز یک مارکر شناخته شده جهانی برای بررسی نفوذپذیری غشاء سلولی و تخمین مرگ سلولی می‌باشد (Calixto, 2000). تمامی مراحل این قسمت از پژوهش براساس دستورالعمل پیوست کیت LDH شرکت Roche (۲۰۰۵) انجام شد. کیت سنجش سایتوتوکسیسیتی LDH روشی سریع و ساده بوده که برای کمّیت‌سنجی سایتوتوکسیسیتی براساس اندازه‌گیری فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروژناز آزاد شده از سلول‌های آسیب دیده مورد استفاده قرار می‌گیرد. فعالیت LDH را می‌توان به‌وسیله یک واکنش آنزیمی تعیین کرد. LDH موجب اکسید شدن لاکتات به پیروات می‌شود. سپس با نمک تترازولیوم INT واکنش داده و تشکیل فورمازان می‌دهد. افزایش در مقدار فورمازان تولید شده در مایع رویی کشت به‌طور مستقیم مرتبط با افزایش در تعداد سلول‌های لیز شده‌است. رنگ فورمازان قابل حل در آب است و توسط اسپکتوفتومتر در طول موج ۵۰۰ نانومتر تشخیص داده می‌شود.

برای انجام این آزمایش، پس از اثر دادن غلظت های ۱۰– ۱۶۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر فراکسیون های هگزانی، اتیل استاتی، کلروفرمی و آبی حاصل از عصاره گل سنجد و اندام هوایی مفراح بر روی سلول ها، برای ارزیابی زوال و یا بقای سلول ها، ۱۰۰ میکرولیتر از محیط رویی سلول‌ها و ۱۰۰ میکرولیتر هم از مخلوط واکنشی کیت با استفاده از سمپلر به پلیت ۹۶ خانه‌ای جدید منتقل شد. کیت دارای دو ظرف شامل ظرف شماره ۱ یا کاتالیست و ظرف شماره ۲ یا محلول رنگ می‌باشد. برای تهیه مخلوط واکنش، ابتدا کاتالیست کیت در یک میلی‌لیتر آب دیونیزه حل شد. سپس برای آماده‌سازی مخلوط واکنش به ازاء هر ۱۰۰ آزمایش، ۲۵۰ میکرولیتر از محلول کاتالیست با ۱۱/۲۵ میلی‌لیتر محلول رنگ مخلوط شد. پس از افزودن مخلوط واکنش به هر چاهک، پلیت‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق و به دور از نور انکوبه شد. بعد از ۳۰ دقیقه عمل توقف واکنش انجام گردید. برای این منظور به هر چاهک مقدار ۵۰ میکرولیتر اسید

هیدروکلریک یک نرمال اضافه شد. سپس جذب نمونه‌ها در ۵۰۰– ۴۹۰ نانومتر با استفاده از دستگاه الیزا ریدر مدل Awareness State Fax-2100 خوانده شده و طول موج ۶۰۰ نانومتر نیز به‌عنوان رفرانس انتخاب شد.

ارزیابی تکثیر سلول‌ها با استفاده از سل کانتر

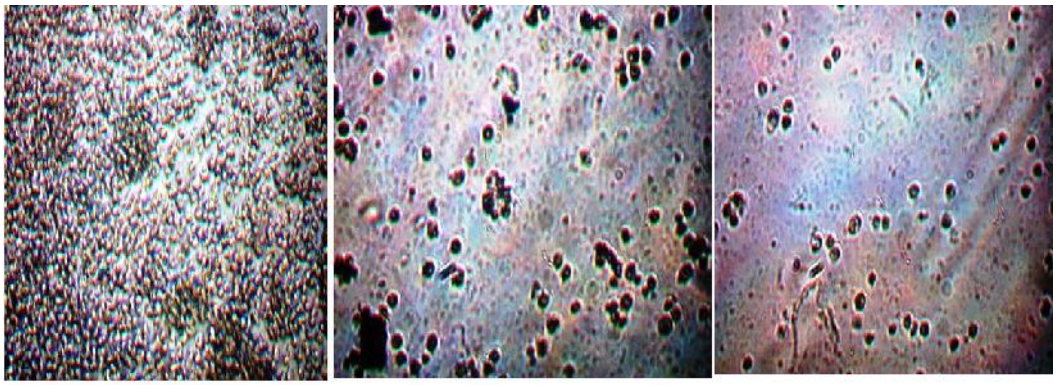
در این دستگاه (مدل kx-21N) سلول‌ها به روش امپدانس الکتریکی شمارش و سایزبندی می‌شوند. این روش براساس اندازه‌گیری تغییرات در مقاومت الکتریکی بین دو الکترود مثبت و منفی که ناشی از عبور ذرات و سلول‌ها با اندازه‌های مختلف از روزنه بین الکترودهای مثبت و منفی است پایه‌گذاری شده‌است. بدین‌ترتیب می‌توان افزایش امپدانس‌های الکتریکی حاصل از عبور سلول‌ها از روزنه را به سلول‌های مشخص نسبت داد. در این پژوهش حجم مشخصی از نمونه رقیق شده آماده قرائت از روزنه عبور کرده و شمارش انجام شد. نتایج حاصل به‌صورت درصد مهار رشد سلولی و IC_{50} (غلظتی که سبب مهار رشد سلولی تا میزان ۵۰٪ شود) از روی منحنی غلظت (میکروگرم در میلی‌لیتر)– درصد مهار رشد سلولی، گزارش شدند (Emami *et al.*, 2010).

آنالیز آماری

برای بدست آوردن واریانس داده‌ها از آزمون ANOVA و از آزمون دانکن برای مقایسه میانگین داده‌ها استفاده شد.

نتایج

بررسی رشد و تغییرات ظاهری سلول‌ها قبل و پس از اثر دادن عصاره‌ها توسط میکروسکوپ معکوس به‌طور مستمر انجام گردید. سلول‌ها ابتدا به حالت گرد و منفرد دیده می‌شدند اما رفته‌رفته با رشد کامل به حالت کشیده و دوکی‌شکل درآمده و تراکم آنها به‌طور چشمگیر افزایش یافت. پس از اثر دادن عصاره‌ها مشاهده گردید سلول‌های مرده سرطانی که در شرایط عادی به‌صورت کشیده و دوکی شکل دیده می‌شدند، حالت کشیده ندارند بلکه شکل گرد یا نیمه‌گرد به خود گرفته و در ضمن تراکم آنها نشان‌دهنده تأثیر سایتوتوکسیک و ضدتوموری عصاره‌ها می‌باشد (شکل ۱).

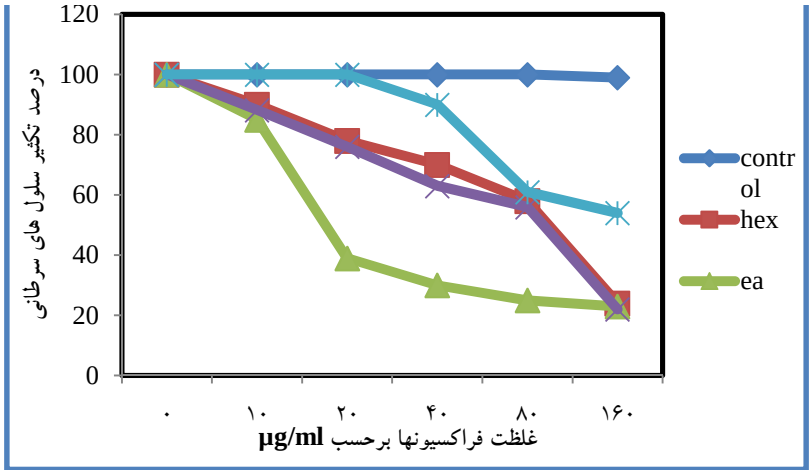


شکل ۱– اثر سایتوتکسیک عصاره‌های گیاهی بر مورفولوژی سلول‌های سرطان خون لاین K562 (بزرگنمایی ۴۰x)

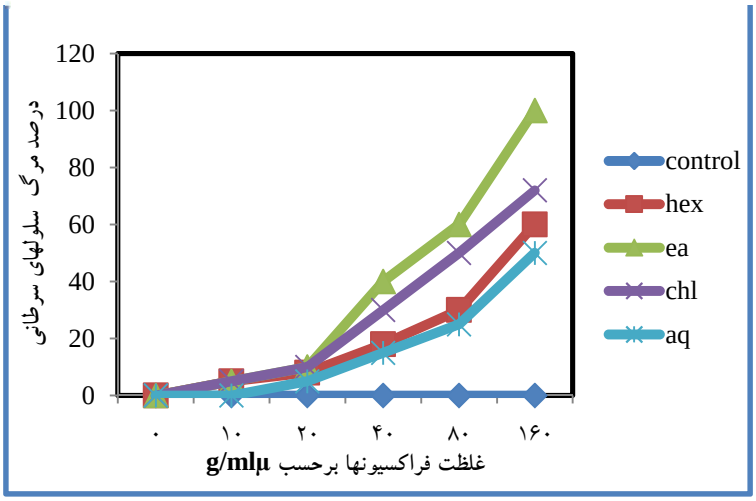
A) رشد پرتراکم و دوکی سلول‌های سرطان خون در شرایط کنترل و بدون تیمار با عصاره‌های گیاهی؛ B) کاهش تراکم و رشد کروی شکل سلول‌های سرطان خون پس از تیمار با عصاره سنجد؛ C) کاهش تراکم و رشد کروی شکل سلول‌های سرطان خون پس از تیمار با عصاره مفراح

پس از اثر دادن غلظت‌های مختلف فراکسیون‌ها بر روی سلول‌های سرطانی، برای بررسی میزان تکثیر سلول‌ها، نمونه‌ها توسط دستگاه سل کانتر مورد ارزیابی قرار گرفتند. باتوجه به شکل ۲ مشخص شد که در سلول‌های سرطانی،

با افزایش غلظت هریک از فراکسیون‌های سنجد میزان اثر ضدتکثیری به‌طور قابل توجهی افزایش یافته است. در فراکسیون مورد بررسی اتیل استات اختلاف معنی‌داری را با سایر فراکسیون‌ها در مهار تکثیر سلول‌ها نشان داد، به‌طوری که از غلظت ۲۰ میکروگرم کاهش ناگهانی و قابل توجهی در تکثیر سلول‌ها رخ داد. سایر فراکسیون‌ها به‌طور مشابه و با اختلاف معنی‌دار نسبت به گروه کنترل سبب کاهش تکثیر سلول‌ها گردید (p>۰/۰۰۱). میزان IC_{50} فراکسیون‌های هگزان، اتیل استات، کلروفرم و آبی به‌ترتیب ۷۲ و ۱۵ و ۷۴ و ۱۶۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بدست آمد.



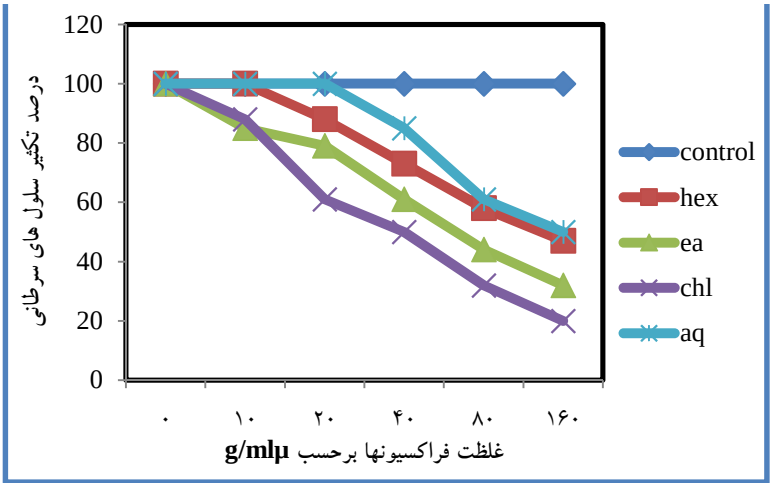
شکل ۲– کاهش درصد تکثیر سلول‌های سرطانی **k562** در تیمار با فراکسیون‌های هگزان، اتیل استات، کلروفرم و آبی گل سنجد



شکل ۳– افزایش درصد مرگ سلول‌های سرطانی **k562**، برحسب افزایش لاکتات دهیدروژناز آزاد شده از سلول‌ها در تیمار با فراکسیون‌های هگزان، اتیل استات، کلروفرم و آبی گل سنجد

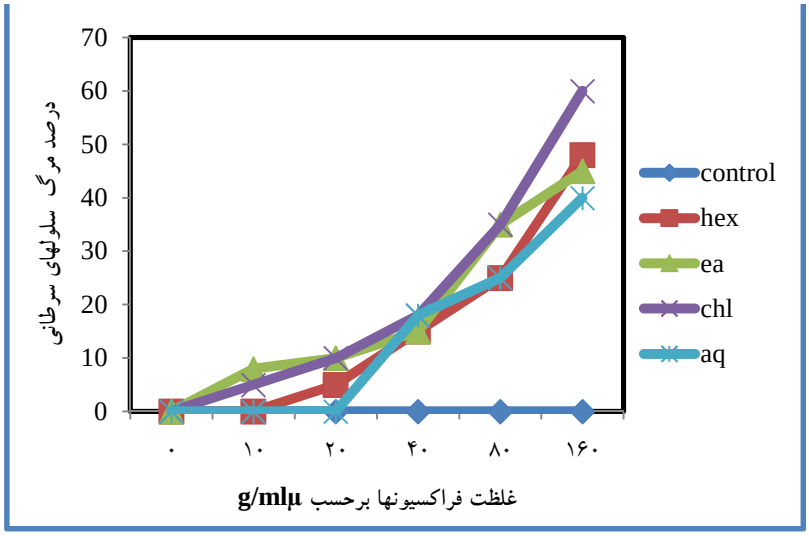
در بررسی میزان زوال یا بقاء سلول‌های سرطانی در تیمار با فراکسیون‌های گل سنجد که توسط کیت‌های LDH مورد بررسی قرار گرفتند، نتایج حاصل طبق شکل ۳ نشان می‌دهد که مرگ سلول‌ها به‌صورت وابسته به دوز افزایش یافته است. بیشترین اثر بر بقاء سلول‌ها متعلق به بالاترین غلظت (۱۶۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) فراکسیون اتیل استاتی بود، که سبب ۱۰۰٪ مرگ سلولی شد. در تیمار با فراکسیون‌های هگزان و آبی نیز به‌طور مشابه و قابل توجهی مرگ سلول‌های سرطانی اتفاق افتاد. در مقایسه تأثیر مهاری فراکسیون‌ها با یکدیگر، اتیل استات و کلروفرم به‌طور مشابه اختلاف معنی‌داری با سایر فراکسیون‌ها و گروه کنترل داشتند و بیشترین تأثیر مهاری را بر سلول‌های سرطان خون داشتند. همچنین در مقایسه غلظت‌های فراکسیون‌ها مشاهده شد که در غلظت‌های ۸۰، ۴۰ و ۱۶۰ میکروگرم در میلی‌لیتر رشد سلول‌های سرطانی به‌طور معنی‌داری نسبت به غلظت‌های پایین‌تر کاهش یافت.

در ارزیابی فراکسیون‌های مفراح، در میان فراکسیون‌های بکار رفته فراکسیون آبی و هگزانی مفراح در غلظت‌های اولیه (تا ۲۰ میکروگرم) تأثیر کمتری بر کاهش تکثیر سلول‌ها داشته‌اند، در حالی‌که بیشترین اثر بر کاهش تکثیر سلول‌های سرطانی در تیمار سلول‌ها با فراکسیون اتیل استاتی و به‌طور چشمگیر در فراکسیون کلروفرمی مشاهده شد (شکل ۴). میزان IC_{50} فراکسیون‌های هگزان، اتیل استات، کلروفرم و آبی مفراح بر سلول‌های K562 به‌ترتیب ۷۲، ۴۰، ۴۹ و ۱۶۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بدست آمد. در غلظت‌های ۴۰، ۸۰ و ۱۶۰ میکروگرم در میلی‌لیتر رشد سلول‌های سرطانی به‌طور معنی‌داری نسبت به غلظت‌های پایین‌تر کاهش یافت.



شکل ۴- کاهش درصد تکثیر سلول‌های سرطانی k562 در تیمار با فراکسیون‌های هگزان، اتیل استات، کلروفرم و آبی مفراح

همچنین براساس نتایج حاصل از سنجش لاکتات دهیدروژناز آزاد شده از سلول‌ها که نمایانگر مرگ سلول‌ها می‌باشد، بیشترین مرگ سلولی و اثر ضد توموری در سلول‌های تیمار شده با فراکسیون کلروفرمی مفراح به‌ویژه در غلظت ۱۶۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر مشاهده شد. در سایر فراکسیون‌ها نیز با افزایش غلظت فراکسیون‌ها به‌طور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل افزایش مرگ سلول‌های سرطانی مشاهده شد (p>۰/۰۰۱). در مقایسه تأثیر مهاری فراکسیون‌ها با یکدیگر، بیشترین تأثیر مهاری را فراکسیون اتیل استاتی و کمترین تأثیر را عصاره آبی بر سلول‌های سرطان خون داشت. در مقایسه غلظت‌ها نیز غلظت‌های ۴۰، ۸۰ و ۱۶۰ میکروگرم در میلی‌لیتر رشد سلول‌های سرطانی به‌طور معنی‌داری نسبت به غلظت‌های پایین‌تر کاهش یافت (شکل ۵).



شکل ۵- افزایش درصد مرگ سلول‌های سرطانی k562
در تیمار با فراکسیون‌های هگزان، اتیل استات، کلروفرم و آبی مفراح

بحث

به‌طور کلی، استفاده از گیاهان در درمان سرطان دارای تاریخچه‌ای طولانی است و در این راستا گیاهان، منابع اولیه برای تهیه داروهای سنتی مؤثر در درمان این بیماری هستند. بیش از ۲۵ هزار ماده شیمیایی گیاهی وجود دارد که اغلب دارای اثرات و خواص مهمی هستند. توانایی اتصال عوامل درمانی به مولکول‌های حامل که به سوی تومورهای ویژه هدایت می‌شوند، نشان‌دهنده این امیدواری است که بتوان فراورده‌های طبیعی از گیاهان بدست آورد که به‌طور مؤثری برای تومورها بسیار سمّی باشند و علاوه‌بر این، اثرات جانبی سمّی بر روی بافت‌های سالم نداشته باشند. طبق شواهد بدست آمده از تحقیق حاضر، فراکسیون‌های تهیه شده از گل‌های سنجد در غلظت‌های مشابهی هم بر کاهش تکثیر سلول‌ها مؤثر بودند و هم بر بقای آنها و سبب زوال و نابودی سلول‌های سرطانی شدند البته میزان تکثیر و بقاء سلول‌ها با افزایش غلظت فراکسیون‌ها کاهش یافت. در عصاره سنجد مؤثرترین فراکسیون بر کاهش میزان تکثیر و بقاء سلول‌ها در تیمار با فراکسیون اتیل‌استاتی مشاهده شد. در میان فراکسیون‌های مفراح کاهش تکثیر سلول‌ها در غلظت‌های پایین‌تری نسبت به غلظت‌های مؤثر بر مرگ سلولی مشاهده شد و نیز بیشترین اثر توکسیک و ضدتوموری به‌ترتیب در تیمار فراکسیون‌های کلروفرم و اتیل استات حاصل شد که به‌طور وابسته به دوز میزان مرگ سلولی افزایش یافت. بنابراین با توجه به علاقه محققان برای کشف و استفاده از داروهای گیاهی به علت عوارض جانبی کمتر برای درمان بسیاری از بیماری‌ها به‌ویژه سرطان، این گیاهان می‌توانند مورد توجه و بررسی بیشتر قرار بگیرند.

در سال ۲۰۰۷ فعالیت ضدتکثیری گیاهان دارویی ازجمله برگ‌های سنجد و گونه‌هایی از خانواده Lamiaceae همانند *Nepeta curvifolia* بر علیه لاین‌های سلولی سرطان سینه (MCF7) توسط Abu-Dahab نشان داده شد و بررسی فیتوشیمیایی حضور فلاونوییدها، تری‌ترپن‌ها و فنول‌ها را در تمام عصاره‌های فعال و مؤثر بر تکثیر و بقاء سلول‌ها نشان داد (Abu-Dahab & Afifi, 2007). مکانیسم این اثرات شاید با مهار سنتز DNA، تحریک آپوپتوسیس و توقف چرخه سلولی در سلول‌های سرطانی مرتبط باشد. فلاونوییدها از ترکیب‌های فیتوشیمیایی هستند که به‌طور گسترده در غذاهایی با منشأ گیاهی وجود دارند، و ویژگی‌های دارویی وسیعی شامل اثرات ضداکسیداتیو، ضدالتهاب، ضدتکثیری و ضدسرطانی را نشان می‌دهند

(Li *et al*., 2007 ؛Ren *et al*., 2003). ازجمله ترکیب‌های مؤثره گیاهان که در ایجاد اثرات ضدسرطانی و جلوگیری از تقسیم سلول‌های سرطانی نقش اساسی دارند، ترکیب‌های آنتی‌اکسیدان به خصوص فلاونوئیدها می‌باشند. مطالعات اپیدمیولوژیک پیشنهاد می‌کند که ترکیب‌های فلاونوییدها شاید سبب حفاظت چندین بافت انسان بر علیه سرطان می‌شود. Falson و همکاران (۱۹۸۲) نوعی ترکیب ترپنی با خاصیت بیولوژیکی از گیاهی از جنس فرفیون ایزوله کردند که اثر سمّیت خود را از طریق ممانعت سیستم NADH اکسیداز زنجیره تنفسی میتوکندریایی ایفا می‌کنند. آنان با توجه به اثر ممانعت‌کنندگی بر عملکرد صحیح زنجیره تنفسی، این ترکیب‌ها را به‌عنوان عوامل ضدتوموری معرفی کردند. در مطالعه فعالیت ضدسرطانی عصاره گیاهی *Rosmarinus officinalis*، ۳ ترکیب اصلی آن یعنی ۱،۸-سینئول، آلفا-پینن و بتا-پینن که در مفراح نیز موجود است توسط تست MTT آزمایش شد، تمام ترکیب‌ها سبب مهار لاین‌های Sk-OV-3، H0-8910 و BE1-7402 شدند (Wang *et al*., 2012). با توجه به تحقیقات ذکر شده، و نتایج مشاهده شده در این تحقیق که فراکسیون‌ها به‌طور مؤثر سبب مهار تکثیر سلول‌ها و مرگ سولهای سرطانی شدند، می‌توان احتمال داد که خواص ضدتوموری و ضدسرطانی فراکسیون‌های گیاه سنجد به‌دلیل وجود ترکیب‌های فنلی و فلاونوئیدی قابل حل در کلروفرم و اتیل سینامات و آلفاتوکوفرول که قابل حل در اتیل استات است، باشند. همچنین در مفراح خاصیت ضدسرطانی می‌تواند ناشی از وجود ترکیب‌های فنلی فلاونوئیدی ترپنوئیدهای ۱،۸-سینئول، آلفا-پینن و بتا-پینن، آلفا و گاما-ترپینئول موجود در عصاره این گیاه باشد که در کلروفرم قابل حل هستند. به‌دلیل نامشخص بودن نحوه تأثیر این ترکیب‌ها بر تکثیر یا مرگ و میر سلول‌های سالم لازم است که در مطالعات بعدی اثر این عصاره‌ها بر روی سلول‌های سالم مورد مطالعه قرار گیرد. همچنین جداسازی و خالص‌سازی ترکیب‌های مؤثر این گیاهان و شناسایی مکانیسم عمل آنها توصیه می‌شود.

سپاسگزاری

نویسندگان این مقاله بر خود لازم می‌دانند که از مسئولان محترم مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی کرمانشاه که ما را در انجام این تحقیق یاری کردند، تشکر و قدردانی نمایند.

منابع مورد استفاده

- Abu-Dahab, R. and Afifi, F., 2007. Antiproliferative activity of selected medicinal plants of Jordan against a breast adenocarcinoma cell line (MCF7). Sciential Pharmaceutical, 75: 121-136.
- Calixto, J.B., 2000. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines phytotherapeutic agents. Brazilian Journal and Biological Research, 33: 179-189.
- Eikesdal, H.P., Bjerkvig, R., Mella, O. and Dahl, O., 2001. Combretastatin A-4 and hyperthermia; a potent combination for the treatment of solid tumors. Radiotherapy and Oncology, 60(2): 147-154.
- Emami, A., Zamanitaghizadeh Arba, Sh., Ahi, A. and Mahmoudi, M., 2010. The inhibitory effect of Artemisia annua extracts on gastric cancer cells via apoptosis induction. Journal of Shahrekord University of Medical Sciences, 11(4): 1-11.
- Falson, G., Glea, A.E. and Noack, E.A., 1982. Constituents of Euphorbiaceae, 7.20-deoxyingenol monoesters and ingenol diesters from biglandulosa. Archive of Pharmacology Journal, 315(12): 1026-1032.
- Hosseinzadeh, H., Ramezani, M. and Namjo, N., 2003. Muscle relaxant activity of *Elaeagnus angustifolia* L. fruit seeds in mice. Journal of Ethnopharmacology, 84(2-3): 275-278.
- Hoyert, D.L., Kung, H.C. and Smith, B.L., 2003. Deaths: Preliminary Data for 2003. National Vital Statistics Reports, 53(15): 1-4.
- Li, L.H., Baek, I.K., Kim, J.H., Kang, K.H., Koh, Y.S., Jung, Y.D., Cho, C.K., Choi, S.Y. and Shin, B.A., 2009. Methanol extract of *Elaeagnus glabra*, a Korean medicinal plant, inhibits HT1080 tumor cell invasion. Oncology Reports, 21(2): 559-563.
- Li, Y., Fang, H. and Xu, W., 2007. Recent advance in the research of flavonoids as anticancer agents. Mini Reviews of Medicinal Chemistry, 7(7): 663-678.
- Mattos, D., Gomes, M.L., Freitas, R.S. and Bernardo-Filho, M., 2001. Model to evaluate the toxic effect of drugs: vincristine effect in the mass of organs and in the distribution of radiopharmaceuticals in mice. Mutation Research Journal, 496: 137-143.

- Mimica-Dukic, N., Bozin, B., Sokovic, M. and Simin, N., 2004. Antimicrobial and antioxidant activities of *Melissa officinalis* L. (Lamiaceae) essential oil. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52(9): 2485-2489.
- Mojab, F., Nickavar, B. and Hooshdar Tehrani, H., 2009. Essential oil analysis of *Nepeta crispa* and *N. menthoides* from Iran. Indian Journal of Pharmaceutical Sciences, 5(1): 43-46.
- Neuzil, J., Zhao, M., Ostermann, G., Sticha, M., Gellert, N., Weber, C.H., Eaton, J. and Brunk, U., 2002. Alpha-tocopheryl succinate, an agent with in vivo anti-tumour activity, induces apoptosis by causing lysosomal instability. Biochemical Journal, 362(3): 709-715.
- Philipson, J.D., 2001. Phytochemistry and medicinal plants. Phytochemistry journal, 56(3): 237-243.
- Ren, W., Qiao, Z., Wang, H., Zhu, L. and Zhang, L., 2003. Flavonoids: promising anticancer agents. Medicinal Research Reviews, 23(4): 519-534.
- Sefidkon, F., Jamzad, Z. and Mirza, M., 2006. Chemical composition of the essential oil of five Iranian *Nepeta* species (*N. crispa*, *N. mahanensis*, *N. ispahanica*, *N. eremophila* and *N. rivularis*). Flavour and Fragrance Journal, 21(5): 764-767.
- Sonboli, A., Salehi, P. and Yousefzadi, M., 2004. Antimicrobial activity and chemical composition of the essential oil of *Nepeta crispa* Willd from Iran. Zeitschrift für Naturforschung C, 59:653-656.
- Verweil, J. and de Jonge, M.J.A., 2001. Achievements and future of chemotherapy. European Journal of Centre, 36(12): 1479-1487.
- Walker, K. and Croteau, R., 2001. Taxol biosynthesis: molecular cloning of a benzoyl-CoA: taxane 2alpha-O-benzoyltransferase cDNA from taxus and functional expression in *Escherichia coli*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 97(25): 13591-13596.
- Wang, Q., Ruan, X., Huang, J.H., Xu, N.Y. and YAN, Q.C., 2006. Intra-specific genetic relationship analyses of *Elaeagnus angustifolia* based on RP-HPLC biochemical markers. Journal of Zhejiang University Science, 7(4):272-278.
- Wang, W., Li, N., Luo, M., Zu, Y. and Efferth, T.H., 2012. Antibacterial activity and anticancer activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil compared to that of its main components. Molecules Journal, 17(3): 2704-2713.

Anti-proliferative effects of some fractions of *Elaeagnus angustifolia* L. flower and aerial part of *Nepeta crispa* L. on K562 leukemic cells

A. Badrhadad[1], Kh. Piri[2*] and K. Mansouri[3]

1- M.Sc., Department of Biotechnology, Faculty of Agriculture, Bu Ali Sina University, Hamadan, Iran
2*- Corresponding author, Department of Biotechnology, Faculty of Agriculture, Bu Ali Sina University, Hamadan, Iran, E-mail: khpiri@gmail.com
3- Medical Biology Research Center, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran

Received: September 2012 Revised: June 2014 Accepted: June 2014

Abstract

Previous studies have shown an anti-tumoral effect for different species of plant having similar component with *Elaeagnus angustifolia* L.and *Nepeta crispa* L. on cancer cells. This study was performed to evaluate the anti-tumural effects of *Elagnus angustifolia* and *Nepeta crispa* extracts on leukemia cancer cells. Cancer cells, grown in DMEM/F12 culture medium, were supplemented with fetal calf serum, 100U/ml penicillin and 100µg/ml streptomycint, then incubation at 37°C in a 5% CO_2. The fractions of Hexane, ethyl acetate, chloroform and aquesse at 10-160 µg/ml concentration were applied on K562 leukemic cells, and their effects were evaluated on proliferation and viability of cells by cell counter and LDH kits, respectively. Result showed that chloroform (chf), ethylacetate (EA) fractions of *Elaeagnus angustifolia* and *Nepeta crispa* showed an important cytotoxic effect on K562 cells. Isolated extracts from *E. angustifolia* flower and *N. crispa* caused a significant decrease in lukemia cancer cell growth. Therefore, this plant could be candidate for therapeutic or preventive activity against cancer-related disorders. Isolation and purification of effective compound/s from this extract and determination of their mechanisms of action are suggested.

Keywords: *Elaeagnus angustifolia* L., *Nepeta crispa* L., fractions, K562 leukemic cells, Anti-proliferative.