اثرات ضد سرطانی عصاره هیدروالکلی گل انگشتانه (*Digitalis nevrosa*) بر رده سلولی سرطان پستان MCF-7

فاطمه جوادی[۱]، نسترن اصغری‌مقدم[۲] و زهرا کشتمند (نویسنده مسئول)[۳*]

۱- کارشناسی‌ارشد، گروه زیست‌شناسی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران،javadifatemeh48@yahoo.com

۲- استادیار، گروه زیست‌شناسی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران، moghadam_na91@yahoo.com

۳*- استادیار، گروه زیست‌شناسی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران،zkeshtmand2001@gmail.com

تاریخ دریافت: فروردین ۱۴۰۱ تاریخ پذیرش: تیر ۱۴۰۱

Anti-cancer effects of hydroalcoholic extract of *Digitalis nervosa* in breast cancer (MCF7) cell line

Fatemeh Javadi[1], Nastaran Asgharei Moghaadm[2] and Zahra Keshtmand (Corresponding author)*[3]

1- M.Sc student, Department of Biology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran, javadifatemeh48@yahoo.com

2- Assistant Professor, Department of Biology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran, moghadam_na91@yahoo.com

3*- Assistant Professor, Department of Biology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran, zkeshtmand2001@gmail.com

Received: April 2022 Accepted: July 2022

چکیده

از سرطان‌های شایع در زنان سرطان پستان است و به دلیل عوارض جانبی روش‌های درمانی شیمیایی، گیاهان که منابع مهم ترکیبات ضدسرطان هستند، می‌توانند گزینه درمانی مناسب باشند. هدف از این مطالعه بررسی اثرات ضدسرطانی عصاره هیدروالکلی گل انگشتانه(*Digitalis nevrosa*) بر رده سلولی سرطان پستان MCF-7 است. در این مطالعه تجربی پس از تهیه عصاره هیدروالکلی گل‌انگشتانه اثر غلظت‌های مختلف ۳/۱۲۵، ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره گیاه بر رده‌های سلولی MCF-7 به مدت ۲۴ ساعت بررسی شد. اثرات سمیت سلولی عصاره با روش MTT و تغییرات بیان ژن‌های P53، Bax، Bcl2 و CDH1 با روش Real-time PCR بررسی شد. داده‌های حاصل بااستفاده از نرم‌افزار SPSS و آزمون آماری واریانس یک طرفه و تست توکی ارزیابی شد. نتایج حاصل از MTT نشان داد، اثر عصاره بر درصد زنده‌مانی وابسته به دوز بوده و ۵۰ درصد غلظت‌کشندگی سلول‌ها در غلظت عصاره ۳۹/۴۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر تعیین شد. همچنین تاثیر غلظت IC50 بر بیان ژن‌های P53، Bax، Bcl2 و CDH1 در رده سلول پستان در مقایسه با ژن کنترل تغییراتی را نشان داد. عصاره گیاه گل انگشتانه موجب القاء آپوپتوز در رده سلول MCF-7 می‌شود و استفاده از این گیاه احتمالا می‌تواند به عنوان یک انتخاب امیدوار کننده در درمان سرطان پستان مورد توجه قرارگیرد.

کلمات کلیدی: آپوپتوز، زنده‌مانی، سرطان پستان، گل انگشتانه

Abstract

The *Digitalis nevrosa* has anti-cancer properties due to its glycosidic compounds The aim of this study was to investigate the anticancer effects of hydroalcoholic extract of digitalis nevrosa on MCF-7 breast cancer cell line. In this experimental study, hydroalcoholic extract of thistle was produced. MCF-7 cells were then treated with different concentrations (3.125, 6.25, 12.5, 25, 50 and 100 µg / ml). The effects of cytotoxicity of the extract were analyzed by MTT method and after determining the concentration of 50% lethality of the extract, the expression changes of P53, Bax, Bcl2 and CDH1 genes were analyzed by real-time PCR. The data were evaluated using SPSS software and one-way ANOVA and Tukey test. The results of MTT showed that the effect of the extract on viability was dose-dependent and the highest cytotoxicity was related to the concentration of the extract at 39/45µg / ml. Which were statistically significant were shown to be significant.(P<0.001). Also, the effect of silver nanoparticles with a concentration of 50% lethality of 39/45 µg / ml on the expression of P53, Bax, Bcl2 and CDH1 genes in comparison with the control gene showed significant changes. *Digitalis nevrosa* extract induces apoptosis in MCF-7 cell line and the use of this plant can be considered as a promising choice in the treatment of breast cancer.

Keywords: Apoptosis, Breast cancer, *Digitalis nevrosa*, Viability cell

مقدمه و کلیات

سرطان از جمله بیماری‌های مزمن و غیرواگیر است که بافت‌ها و اندام‌های مختلف را درگیر می‌کند و این احتمال وجود دارد که در هر فرد، گروه سنّی و هر نژادی رخ دهد و به عنوان یک مشکل عمده بهداشتی بر سلامت جامعه مطرح است (Siegel *et al.*, 2011). سرطان پستان شایع‌ترین بدخیمی زنان در سراسر دنیاست و مطالعات انجام شده در داخل کشور نشان می‌دهد سرطان پستان در ایران به عنوان شایع‌ترین سرطان در زنان ایرانی مطرح بوده و اطلاعات موجود از افزایش شیوع این بدخیمی طی دو دهه گذشته در ایران، حکایت از آن دارد (Hushmandi *et al.*, 2019). سرطان پستان حاصل رشد بیش از حد توده‌های سلول اپیتلیال مجاری یا لبول‌های بافت پستان در زنان و در موارد نادر در مردان است (Karimi *et al.*, 2011). روش‌های درمانی متفاوت ازجمله جراحی، بافت‌برداری، شیمی درمانی و پرتودرمانی برای این بیماری وجود دارد، اما اثرات جانبی این روش‌ها و ناکارآمدی برای حذف کامل سرطان موجب شده است که محققان به دنبال روش‌های ایمن برای از بین بردن بی‌خطر سلول‌ها و تومورهای سرطانی باشند (Mansoori *et al.*, 2007 ;Ramer *et al.*, 2015). یکی از مکانیسم‌های فیزیولوژیکی با اهمیت در حفظ سلامتی، آپوپتوز می‌باشد. آپوپتوز، مرگ برنامه‌ریزی شده سلول است یک مسیر بسیار مهم برای همه موجودات زنده پرسلولی جهت کنترل تکثیر سلول‌ها، حفظ هموستاز طبیعی بدن و نیز فرآیندی برای از بین بردن سلول‌های مضر و غیر ضروری می‌باشد(Jain *et al.*, 2014; Jordan *et al.*, 2016). آپوپتوز با ایجاد تعادل بین تکثیر و مرگ سلولی و نیز حذف سلول‌های مسن و آسیب دیده سبب حفظ هموستاز بافت‌های طبیعی بدن شده و مهار یا اختلال در آن در فرآیندهای تغییر شکل بدخیمی، پیشرفت سرطان و متاستاز نقش دارد (Goldar *et al.*,2015 ;Jordan *et al.*, 2016). نقص درمکانیسم‌های فیزیولوژیکی، ممکن است منجر به ایجاد بیماری‌های مختلف مانند سرطان‌شود (Lee, 2013). با توجه به اهمیت مسیرآپوپتوز، به ویژه در سال‌های اخیر توجه زیادی به شناسایی ترکیبات یا روش‌هایی که بتواند مسیر سیگنالیک آپوپتوز را به سلول‌های سرطانی برگرداند و آنها را از بین ببرد، شده است (Mahmood and Shukla, 2010). از این رو، بسیاری از استراتژی‌های درمانی بر اساس راه‌اندازی مجدد مرگ سلولی برنامه ریزی شده یا آپوپتوز در سلول‌های سرطانی استوار است (Jain *et al.*, 2014; Jordan *et al.*, 2016). در سال‌های اخیر، به علت افزایش شیوع مرگ و میر ناشی از سرطان ها و نقص روش‌های شیمی درمانی و رادیوتراپی در فرم‌های پیشرفته سرطان، نیاز به یافتن شیوه‌های جدید برای کنترل سرطان احساس می‌شود که یکی از این روش‌ها استفاده از گیاهان دارویی است. از ابتدای تمدن بشر استفاده از گیاهان به عنوان منابع دارویی وجود داشته و در عصر جدید نیز ادامه دارد (Lee, 2013). سازمان بهداشت جهانی تخمین زده است که بیش از ۸۰ درصد از مردم به صورت سنتی و یا مدرن از گیاهان دارویی استفاده می‌کنند، به‌علاوه بسیاری از داروهای شیمیایی نیز با

الگـو بـرداری از ترکیبـات شـیمیایی گیاهی ساخته شده‌اند (Tripathi and Tripathi, 2003). معمـولا داروهای گیاهی خواص متعدد و عوارض کمتـری داشـته و در برخی موارد به عنوان تنها درمان مؤثر برای یک بیماری خـاص است. گیاهان دارویی همواره جهت درمان بیماری‌های مختلف از جمله سرطان‌ها از دیرباز مورد توجه محققان بوده است در پژوهش‌های مختلف گزارش شده است که گیاهان دارویی به دلیل داشتن ترکیبات مختلف فیتوشیمیایی از جمله آلکالوییدها، فلاونوییدها و فنل‌ها باعث القاء سمیت و مهار رشد در رده‌های مختلف سلول‌های سرطانی گردیده‌اند. امروزه بسیاری از داروهای مورد استفاده در درمان و کنترل سرطان‌های مختلف (شیمی درمانی) ازجمله تاکسان‌ها،وین کریستین و وین بلاستین از گیاهان داوریی مشتق شده اند (Shabkhiz *et al.*, 2016; Keshtmand *et al.*, 2020). از گیاهان دارویی مهم، گیاهان جنس *Digitalis* هستند که متعلق به تیره *Scrophulariaceae* و منبع بسیار مهم ترکیبات دارویی نظیر دیگوکسین و دیژیتوکسین می باشند. گونه *Digitalis nervosa* تنها گونه بومی ایران بوده و پراکندگی وسیعی در شمال ایران دارد. این گیاه دارای ساپونین، تری‌ترپنوئید، تانن، فلاونوئید و گلیکوزیدهای قلبی (شامل‌لاناتوزیدE، لاناتوزید B، لاناتوزیدA، گلوکوژیتوروزید، نئوگلوکودیژیفوکوزید، آلفا استیل دیژیتوکسین و آلفا استیل ژیتوکسین) می‌باشد، این گیاه با داشتن ترکیبات گلیکوزیدی خاصیت ضدسرطانی و تقویت‌کنندگی قلب و عروق را دارد (Ayoubinejad *et al.*,2016). ازخـواص این گیاه خاصیت درمانی آن بـرای بیمـاری سـرطان بـه ویـژه سـرطان پروستات و پستان در انسان می‌باشـد (Maroufi *et al.*, 2017). با توجه به کاربرد گیاهان در درمان بیماری‌ها و عوارض جانبی کمتر آن‌ها نسبت به روش‌های درمانی دیگر و اهمیت درمان انواع سرطان‌ها به ویژه مواردی که شیوع بالایی دارند، تحقیق حاضر به منظور بررسی استفاده از عصاره هیدروالکلی گیاه گل انگشتانه (*Digitalis nevrosa*) و تاثیر آن بر رده سلول سرطان پستان(MCF-7) انجام شد.

فرآیند پژوهش

تهیه گیاه و عصاره هیدروالکلی گل انگشتانه: گیاه گل انگشتانه (*Digetalis nervosa*) از بانک گیاهی مرکز ذخایر زیستی ایران تهیه شد. برای تهیه عصاره، گیاه را ابتدا در جریان هوا قرار داده، سپس در سایه کاملا خشک و با آسیاب پودر گردید. از پودر تهیه شده برای عصاره گیری به روش سوکسله استفاده شد. بدین ترتیب که ۵۰ گرم از پودر گیاه گل‌انگشتانه *Digetalis nevrosa* به ۵۰۰ میلی‌لیتر حلال اتانول اضافه گردید. عصاره گیری به مدت ۱۲ ساعت صورت گرفت. پودر جامد بدست آمده توسط آب مقطر دو بار تقطیر به حجم رسانیده شد و عصاره ی تهیه شده در دمای ٤ درجه سانتیگراد تا زمان استفاده برای بررسی تاثیر بر سلول سرطانی نگهداری شد (Chegini *et al.*, 2020).

تهیه رده سلولی: رده سلولی سرطان پستان (MCF-7) از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران تهیه شد.

کشت سلولی و بررسی اثر سمیت سلولی عصاره هیدروالکلی گل انگشتانه بر رده سلولی MCF-7: سلولهای MCF-7 در محیط کشت RPMI 1640 حاوی ۱۰٪ سرم جنین گاوی (FBS) و ۱٪ آنتی بیوتیک (Pen/Strep) کشت داده شده در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و CO_2 ۵٪ نگهداری شدند. پس از تکثیر سلول‌های MCF-7، سلول‌ها توسط Trypsin–EDTA از کف فلاسک جداسازی شده و ۱۰۰ میکرولیتراز سوسپانسیون حاصل حاوی 10^5 سلول به هرکدام از چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه اضافه شد. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور با شرایط فوق‌الذکر نگهداری شدند. عصاره هیدروالکلی به روش زیستی با غلظت‌های مختلف (۳/۱۲۵، ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰میکرگرم بر میلی‌لیتر) تهیه شد. سپس محیط کشت را تخلیه نموده و به جای آن ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت‌های ساخته شده اضافه گردید. سپس، اضافه شدن رنگ MTT(سیگما، آلمان) انجام گرفت. مرحله بعد به هر خانه ۱۰۰ میکرولیتر از محلول تهیه شده اضافه و پس از سه ساعت ظرف کشت از انکوباتورخارج و محیط سلول‌ها تخلیه شده و برای حل نمودن فورمازان تولید شده، به هر خانه ۱۰۰ میکرولیترDMSO (مرک، آلمان) اضافه و ظرف کشت سی دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد تا فورمازان به خوبی حل گردد. در مرحله‌ی بعد جذب توسط دستگاه خوانشگر الایزا (reader ELISA Teknika Oraganon، هلند) و در طول موج ۵۷۰ نانومتر اندازه گیری شد (Khatami *et al.*, 2015). درصد زنده‌مانی رده سلولی MCF-7 تیمار شده با عصاره هیدروالکلی گیاه گل انگشتانه با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد.

و در نهایت غلظت مهار ۵۰ درصد رشد سلول‌ها به عنوان IC50 در نظر گرفت شد (Mohebifar *et al.*, 2021)

ارزیابی بیان ژن‌ها به روش Real time: برای این منظور ابتدا RNA رده سلولی MCF-7 گروه‌های کنترل و تیمار شده با عصاره در غلظت IC50 طبق روش ذکر شده در کیت Bioflux استخراج شد. در نهایت در راستای افزایش دقت و کارایی روش مورد استفاده در استخراج RNA از دستگاه اسپکتروفتومتری نانودراپ استفاده‌گردید. در این روش میزان یک میکرولیتر از RNA استخراج شده در طول موج‌های ۲۶۰/۲۸۰ و ۲۶۰/۲۳۰ ارزیابی شد. سنتز cDNA، با استفاده از کیت سنتز Fermentase و پروتکل موجود در آن انجام شد. برای انجام واکنش‌های CR Real Time، از cDNA ساخته شده، از پرایمرهای طراحی شده برای ژن‌ها که در جدول ۱ ذکر شده اند، استفاده شد. برای کنترل داخلی، از ژن بتا اکتین استفاده گردید.شرایط چرخه دمایی و زمانی شامل دمای واسرشتگی اولیه ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه، سپس برای ۴۰ چرخه، دمای واسرشتگی ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ ثانیه و در انتها اتصال پرایمر و طویل شدن در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه انجام شد. با استفاده از فرمول $2^{-\Delta\Delta CT}$ داده‌های حاصل از دستگاه

Real time PCRآنالیز گردید (keshtmand *et al.*, 2020). Real time PCR به کمک دستگاه BioRad انجام شد. در انتهای سیکل‌های تکثیر، منحنی دمای ذوب به منظور حصول اطمینان از اختصاصی بودن و عدم وجود محصول غیراختصاصی رسم شد.

جدول ۱- توالی پرایمر مورد استفاده در ریل تایم

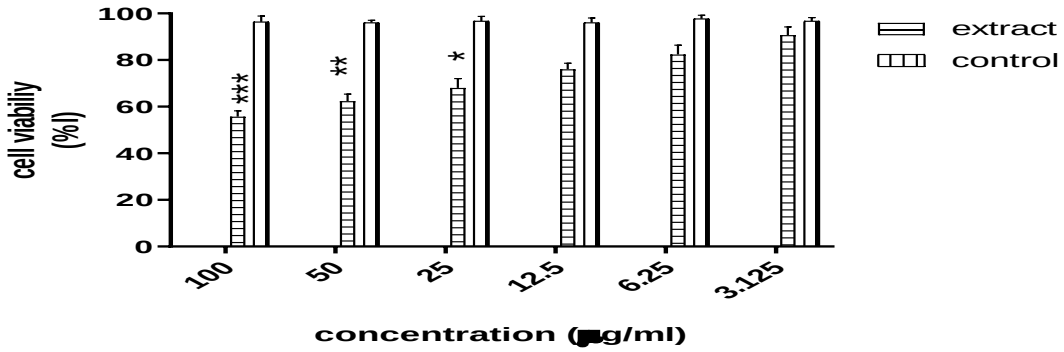
Table 1- Primer sequence used in real time

ژن	توالی پرایمر
b-actin	Forward: 5'- TCCTCCTGAGCGCAAGTAC-3' Revers: 5'- CCTGCTTGCTGATCCACATCT-3'
P53	Forward:5'- CAGCCAAGTCTGTGACTTGCACGTAC -3 Revers: 5'- CTATGTCGAAAAGTGTTTCTGTCATC -3'
CDH1	Forward: 5'- GCAGAACTGTCCCTGTCCCAG -3 Revers: 5'- GAACAGCACGTACACAGCCCT -3'
Bax	Forward: 5'- GAGCTGCAGAGGATGATTGC-3′ Revers: 5'- AAGTTGCCGTCAGAAAACATG-3'
Bcl2	Forward: 5'- ATTGGGAAGTTTCAAATCAGC-3′ Revers: 5'- CAGTCTACTTCCTCTGTGATGTTG-3'

آنالیز آماری: به منظور تجزیه و تحلیل نتایج حاصل از این پژوهش از نرم افزار SPSS 22، روش آماری آنالیز واریانس یک طرفه و تست توکی استفاده گردید. اطلاعات به صورت میانگین ± انحراف معیار نمایش داده شد و P<۰/۰۵ معنادار در نظر گرفته شد.

نتایج و بحث

نتایج درصد زنده مانی: تیمار سلول‌های MCF-7 با غلظت‌های مختلف ۳/۱۲۵، ٦/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ میکروگرم بر کیلوگرم عصاره گیاه با استفاده از تست MTT طی مدت ٢٤ ساعت انجام شد. نتایج حاصل از تست MTT نشان داد که سمیت سلولی عصاره وابسته به دوز می‌باشد. بیشترین تاثیر مهار رشد سلول‌های سرطانی مربوط به عصاره، در غلظت ۱۰۰ و کمترین غلظت عصاره ۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. غلظت IC50 عصاره، ۳۹/٤۵ میکروگرم بر میلی لیتر تعیین شد. نتایج حاصل نشان داد که درصد زنده‌مانی رده سلول سرطان پستان MCF-7تحت تیمار با غلظت های مختلف عصاره هیدروالکلی گیاه گل انگشتانه (۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) در مقایسه با گروه کنترل معنادار نشان داده شد (نمودار ۱).



نمودار ۱- مقایسه غلظت‌های مختلف عصاره هیدروالکلی گل انگشتانه بر درصد زنده مانی سلول‌های MCF-7. پس از ۲٤ ساعت با روش رنگ سنجی MTT

نتایج براساس میانگین ±انحراف معیار

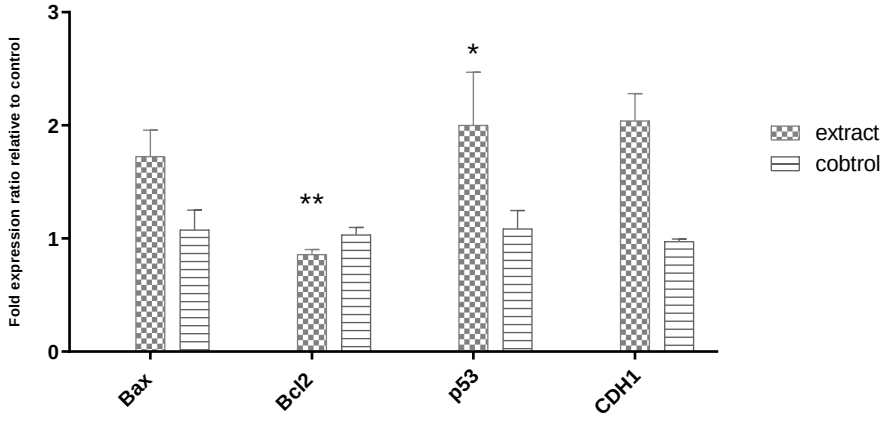
***P<۰/۰۵ در مقایسه با گروه کنترل، **: P<۰/۰۱ در مقایسه با گروه کنترل، ***:۰/۰۰۱ > P در مقایسه با گروه کنترل**

Figure1- Comparison of different concentrations of hydroalcoholic extracts of *Digitalis nevrosa* on the viability percentage of MCF-7 cells. After 24 hours by MTT method

Results based on mean± standard deviation

***: P< 0.050 compared to the control group, **: P <0.01 compared to the control group, *** :P <0.001 compared to the control group**

بررسی بیان ژن‌های آپوپتوزی: در این مطالعه جهت ارزیابی بیان ژن‌های P53،CDH1، Bax، Bcl2 و b-actin در سلول‌های تیمار شده با غلظت ۵۰ درصد کشندگی (IC50) عصاره گیاه گل انگشتانه (۳۹/٤۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) از روش Real Time PCR استفاده شد. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد بیان ژن‌های مورد بررسی تیمار شده با غلظت IC50 عصاره هیدورالکلی گل انگشتانه در مقایسه با گروه کنترل تغییراتی را نشان داد و این تغییرات در مورد ژن‌های Bcl2 و P53 معنادار نشان داده شد (نمودار ۲).



نمودار۲- مقایسه غلظت ۵۰ درصدکشندگی عصاره هیدروالکلی گل انگشتانه(۳۹/۴۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) بر بیان ژن‌های P53، CDH1 و Bcl2 بر رده سلولی سرطان پستان MCF-7

نتایج براساس میانگین ±انحراف معیار

***: P<۰/۰۵ در مقایسه با ژن کنترل، **: P<۰/۰۱ در مقایسه با ژن کنترل**

Figure 2- Comparison of 50% lethal concentration of hydroalcoholic extract *of Digitalis nevrosa* (39.45 µg / ml) on the expression of P53, CDH1, Bax and Bcl2 genes in MCF-7 breast cancer cell line
Results based on mean ± standard deviation
***: P <0.050 compared to control gene, **:P <0.01 compared to control gene**

خاصیت ضدسرطانی و برخی دیگر از خواص عصاره‌های گیاهی از چندین سال قبل شناخته شده است و بازگشت مجدد به فرآورده های طبیعی همچون گیاهان دارویی می‌تواند رویکرد مثبتی در کنترل و درمان طیف وسیعی از بیماری‌های از جمله سرطان داشته باشد. به طوری که مطالعات مختلفی روی اثرات سمیت سلولی عصاره گیاهان بر رده‌های سلولی سرطانی صورت پذیرفته است (Rezaiyan Gharagozlu *et al.*, 2018). در این پژوهش تاثیر عصاره هیدروالکلی گیاه بومی گل انگشتانه (*Digitalis nevrosa*) بر درصد زنده‌مانی و بیان ژن-های P53، Bax، Bcl2 وCDH1 رده سلول سرطان پستان (MCF-7) بررسی شد. همچنین غلظت ۵۰ درصدکشندگی عصاره، ۳۹/۴۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر تعیین شد. نتایج بررسی‌های حاصل از آزمون MTT نشان داد که عصاره می‌تواند به صورت وابسته به غلظت منجر به کاهش درصد زنده مانی سلول‌ها شود. موضوع دیگری که در این پژوهش مورد بررسی قرارگرفت. بیان برخی ژن‌های آپوپتوزی P53، Bax، Bcl2 و CDH1 در سلول‌های سرطانی رده MCF-7 تیمار شده باعصاره هیدروالکلی گیاه گل انگشتانه بود که بیان ژن‌ها در مقایسه با گروه کنترل تغییراتی را نشان داد. در پژوهش اثر عصاره هیدروالکلی گیاه سنبله خاردار (*Stachys setifera*) بر رده سلول سرطانی MCF-7 تاثیر عصاره بر زنده مانی رده سلولی به صورت وابسته به دوز نشان داده شد (*Panahi* Kokhdan *et al.*, 2021). در تحقیق بررسی اثر سمیت عصاره‌های هیدروالکلی گیاه پونه و مرزه تابستانی بر رده‌های سلولی سرطان سینه انسانی (MCF-7 و MCF-10)، نتایج به دست آمده

نشان داد که عصاره هیدروالکلی برگ گیاه پونه و مرزه تابستانی، اثر سمیت سلولی قابل توجهی بر رده سلول‌های سرطان پستان داشته و منجر به مهار شدید رشد رده سلولی سرطانی می‌شود(Mohebifar *et al.*, 2021). گزارش نتایج بررسی اثرات سیمیت و آپوپتوزی عصاره آبی زنجبیل بر رده سلول MCF-7 توسط محقی وهمکاران نشان می‌دهد که سلول‌های سرطانی نسبت به غیرسرطانی تیمار شده با عصاره‌ی زنجبیل تغییرات مورفولوژیکی داشته و اثر عصاره وابسته به دوز و زمان گزارش داده شد (Moheghi *et al.*, 2020). در پژوهش دیگر اثرات سمیت سلولی عصاره هیدروالکلی برگ گیاه سدر و ایجاد تغییر در بیان ژن‌های bcl2 و bax در رده سلولی سرطان پستان MCF-7 نشان داده شد (Ahmadi *et al.*, 2017). در تحقیق حاضر نیز، نتایج آزمون MTT نشان داد که اثرسمیت سلولی گل انگشتانه بر درصد زنده مانی سلول‌های سرطانی پستان رده MCF-7، به صورت وابسته به غلظت بوده که این نتایج همسو با مطالعات پژوهشگران قبلی می‌باشد. در تحقیقی اثر عصاره هیدروالکلی کلم قرمز بر مهار رشد و القاء آپوپتوز در سلول‌های سرطانی پستان MCF-7 نشان داده شد که، اثر عصاره کلم قرمز به صورت وابسته به دوز و زمان بوده، همچنین عصاره در غلظت‌های ۱۰۰۰، ۱۵۰۰ و ۲۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به صورت وابسته به دوز باعث تحریک آپوپتوز در سلول‌های سرطان پستان شد (Mehdian *et al.*, 2015). در پژوهش دیگری نشان داده شد که اثر عصاره آبی *A.princeps* بر رده سلولی سرطان پستان MCF-7 وابسته به دوز بوده و منجر به مهار رشد این نوع از سلول‌های سرطانی شد (Kim *et al.*,2015). در بررسی دیگر اثر عصاره متانولی *A.anma* بر کاهش بقا تمام رده‌های سلولی معده (AGC)، سرویکس (Hela)، کولون (HT-29) و پستان (MCF-7) با غلظت‌های مختلف به مدت ۷۲ گزارش شده است (Mashati *et al.*, 2017). پژوهش حاضر نشان داد که عصاره گیاه انگشتانه می‌تواند بر بیان ژن‌های آپوپتوزی رده سرطانیMCF-7 موثر باشد. در این مطالعه در گروه‌های دریافت کننده عصاره سلولی افزایش بیان ژن‌های P53، Bax و CDH1 وکاهش بیان ژن Bcl2 نشان داده شد. اگرچه مکانیسم تأثیر عصاره بر تغییر بیان ژن نامشخص است، اما به نظر می‌رسد که کاهش بیان ژن‌ها، به واسطه ترکیبات آنتی اکسیدانتی عصاره بوده که در القاء مرگ برنامه‌ریزی شده در سلول‌های سرطانی نقش دارد (Mostahsan and Mortazavi, 2019) و احتمالاً یکی از مکانیسم پیشنهادی تاثیر عصاره بر رده سلولی این است که عصاره گیاهان دارویی به دلیل دارا بودن ترکیبات آنتی اکسیدانتی سبب کاهش فعالیت تلومراز شده و بدین شکل از تکثیر و نامیرایی سلول‌های سرطانی جلوگیری می‌شود (Rezadoost *et al.*, 2019). عقیده بر این است که اثرات ضدسرطانی گیاهان از طریق مهار آنزیم‌های محرک سرطان و تحریک تولید آنزیم های ضدتوموری در سلول موجب افزایش ایمنی بدن و القاء اثرات آنتی‌اکسیدانی می‌شود (Liu *et al.*, 2016). مطالعات مختلف نشان داده است که عصاره سلولی گیاهان می‌توانند در رده‌های مختلف سلول سرطانی آپوپتوز را القا کنند. مسیر مرگ سلولی می‌تواند شامل

فعالسازی رویدادهای پروآپوپتوتیک در اندامک میتوکندری سلول باشد که با آزادسازی سیتوکروم c از آن آغاز می‌شود (Abedini *et al.*, 2016). القا مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی یکی از رویکردهای جذاب در درمان سرطان به شمار می‌رود. از این رو بیشتر مطالعات سال‌های اخیر در جهت یافتن داروهایی است که بتواند آپوپتوز را در سلول‌های سرطانی بدون ایجاد التهاب، القا کند تا سلول سرطانی فاگویسته‌شده و در نهایت از بین رود. مسیر مرگ‌سلولی می‌تواند شامل فعال‌سازی رویدادهای پروآپوپتوتیک در سلول باشد که با نفوذپذیری غشا اندامک میتوکندری توسط پروتئین‌های bax و bcl2 شروع شده و موجب آزادسازی سیتوکروم c از بین دو غشا میتوکندری و نهایتاً فعال شدن کاسپاز ۹ و سپس کاسپاز ۳ می‌شود (Shakhseniaie *et al.*, 2019; Abdi *et al.*, 2021).

نتیجه‌گیری کلی

در این پژوهش اثر عصاره هیدروالکلی گل انگشتانه بر میزان بقای و بیان ژن‌های P53، Bax، Bcl2 و CDH1در سلول‌های سرطانی پستان رده MDA-7 مورد بررسی قرارگرفت. نتایج حاصل از آزمون MTT نشان داد که این عصاره به صورت وابسته به غلظت، زیست پذیری سلول‌ها را کاهش می‌دهند، همچنین نتایج تغییرات بیان مورد نظر را بااستفاده از Real time PCRدر غلظت IC50 مشخص کرد که عصاره هیدروالکلی بیان ژن آنتی آپوپتیک - Bcl 2کاهش و بیان ژن‌های پروآپوپتیک (P53، Bax و CDH1) افزایش یافته است و سبب راه اندازی فرآیند مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده می شوند.

بطورکلی القاء مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی یکی از رویکردهای موثر در درمان سرطان به شمار می‌رود که به نظر می‌رسدعصاره هیدرو الکلی می‌توانند جایگزین مناسب برای درمان باشند. اگرچه یافته‌های قطعی توقف رشد این سلول‌ها نیاز به پژوهش‌های بیشتر و دقیق‌تر دارد. بنابراین با توجه به عوارض جانبی داروهای شیمی درمانی سرطان می‌توان این دسته از گیاهان داوریی بومی را مورد بررسی بیشتر قرارداد و پس از بررسی و تایید عملکرد آنها در شرایط آزمایشگاهی، اثر ضد سرطانی آنها را در مدل حیوانی نیز مورد بررسی قرارداد.

منابع

1) Abdi, H., Alijani, E. and M, Mohsenzadeh. 2021.The effect of intense periodic exercise and consumption of black grape seed extract on bax and bcl-2 gene expression in pancreatic tissue of male rats with type 2 diabetes. The International Journal of Damage Mechanics, 20(2): 105-116.
2) Abedini, M.R., Erfanian, N., Nazem, H., Jamali, S. and R, Hoshyar.2016. Anti-prolifer ative and apoptotic effects of Ziziphus Jujube on cervical and breast cancer cells. Avicenna Journal of Phytomedicine, 6(2): 142-148.
3) Ahmadi, R., Rahimi, S. and N, Ehteshamzad. 2017. The effect of hydroalcoholic Ziziphus spina-christi leaf extract on viability of breast cancer cell line (MCF7) and evaluation of Bax and Bcl2 genes expression level. Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences, 21(5): 407-413.
4) Ayoubinejad, L., Nazari, H. and A, Mohammadi Sani. 2016. Study of antibacterial and synergistic effect of Digitalis nervosa extract and ciprofloxacin on Staphylococcus aureus. Journal of Food Microbiology, 3(1): 25-31.

high stable AgNPs with high antifungal and antibacterial activity, IET Nanobiotechnology, 9(4): 184-190.

14) Kim, J., Jung, S., Yang, Y., Ahn, J., Cho J.G, Lee K.T. and N.I, Baek. 2013. Artemisia leaf extract induces apoptosis in human endometriotic cells through regulation of the p38 and NF kB pathways. The Journal of Ethnopharmacology ,145(3) : 767-775.
15) Lee, J.S. Genomic profiling of liver cancer. 2013. Genomics Informatics; 11(4): 180-185.
16) Liu, Z., Ding, Y., Ye, N., Wild, C., Chen, H. and J, Zhou. 2016. Direct Activation of Bax Protein for Cancer Therapy. Medicinal Research Reviews, 36(2): 313-341.
17) Mahmood Z. and Y, Shukla. 2010. Death receptors: targets for cancer therapy. Experimental Cell Research, 316(6): 887-899.
18) Maroufi, A., Salimi, V. and M, Majdi. 2017. Isolation of Δ5-3β-hydroxysteroid dehydrogenase involved in the biosynthetic pathway of cardenolides and its expression level under the influence of salicylic acid and methyl jasmonate elicitors in foxglove (Digitalis nervosa L) .Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 25(1): 97-110.
19) Mashati, P., Esmaeili, S., Dehghan Nayeri, N., Darvishi, M. and A, Gharehbaghan. 2017. The effect of methanolic extract of aerial parts of Artemisia annua on proliferation and apoptosis of acute lymphoblastic leukemia cell lines. Journal of Iranian Blood Transfusion Organization,14(1): 34-42.
20) Mehdian, D., Hosseini, A., Mousavi, S.H., Vahedi, M.M. and M, Bi Hemta. 2015. Investigation of the effect of hydroalcoholic extract of red cabbage on growth and induction Apoptosis in breast cancer cells (MCF7).Iranian Journal of Obstetrics, Gynecology and Infertility, 18(151): 1-11.
21) Mohebifar, A ., Yazdani, H., Nourian, S., Torabi Godarzi , R. and Y, SarveAhrabi. 2021. Cytotoxicity of Hydroalcoholic
5) Chegini, S., Tafvizi, F., and H, Noorbazargan. 2020.Effect of Valeriana Sysimberifolia Extract on VEGF Expression in A549 Cell Line. Journal of Babol University of Medical Sciences, 22(1): 222-228.
6) Emami, Sh., Zamani TaghizadehRabe, A. and M, Mahmoudi. 2010.The inhibitory effect of Artemisia annua extracts on gastric cancer cells via apoptosis induction. Journal of Shahrekord University of Medical Sciences,11(4): 1-14 .
7) Goldar,S., Khaniani, M.S., Derakhshan,S.M. and B, Baradaran. 2015. Molecular mechanisms of apoptosis and roles in cancer development and treatment. The Asian Pacific Journal of Cancer Prevention, 16(6): 2129-2144.
8) Hushmandi, K., Gooraninejad, S., Hoveizi, E., M.R. and Tabandeh. 2019. Comparison of Apoptotic Effects of S14161 and Citrus limon Leaves Hydroalcoholic Extracts on Breast Cancer Cells MCF-7. Journal of Developmental Biology, 11(1): 65-77.
9) Jain, M., Kasetty, S., Khan, S. and A, Desai. 2014. An Insight to Apoptosis. Journal of Research and Practice in Dentistry, 1-12.
10) Jordan, V.C., Fan, P., Abderrahman, B., Maximov, P.Y., Hawsawi, Y.M. and P, Bhattacharya. 2016. Sex steroid induced apoptosis as a rational strategy to treat anti-hormone resistant breast and prostate cancer. Journal of Medical Discovery, 21(117): 411-27.
11) Karimi, M., Kazemitabar, S.K., Azad Bakht, A. and G, Nematzadeh. 2011. Tissue Cultur Studty in Foxglove Plant(Digitalis Nervosa Staud & Hochst). Journal of Crop Breeding, 6(13): 18-28.
12) Keshtmand , Z., Akbaribazm , M., Bagheri , Y. and R, Oliaei. 2020. The ameliorative effects of Lactobacillus coagulans and Lactobacillus casei probiotics on CCl4-induced testicular toxicity based on biochemical, histological and molecular analyses in rat. Andrologia, 00:e13908.
13) Khatami, M. and S, Pourseyedi. 2015. Phoenix dactylifera (date palm) pit aqueous extract mediated novel route for synthesis

Extracts of Mentha pulegium L. and Satureja hortensis, L. on Human Breast Cancer Cell Lines (MCF-7 and MCF-10). Mashhad University of Medical Sciences, 24(77): 50-58.

22) Moheghi, N., Tavakko Afshari, J. and A, Brook. 2011.The Cytotoxic Effect of Zingiber Afficinale in Breast Cancer (MCF7) Cell Line. Ofogh-e-danesh ,17(4): 28-33.
23) Mostahsan, Z. and P, Mortazavi. 2019. The effects of Tilia (Tilia plathyphyllos) extract on gene expression of caspase 3 and caspase 9 in canine mammary gland cancer cell line. Veterinary Clinical Pathology ,13(49): 1-14.
24) Ramar, M., Manikandan, B., Marimuthu, P.N., Raman, T., Mahalingam, A. and P, Subramanian. 2015.Synthesis of silver nanoparticles using Solanum trilobatum fruits extract and its antibacterial, cytotoxic activity against human breast cancer cell line MCF 7. Spectrochimica Acta Part A: Molecular Spectroscop,140: 223-228.
25) Rezadoost, M.H., Hassani Kumleh, H. and A.R, Ghasempour. 2019. Cytotoxicity and apoptosis induction in breast cancer, skin cancer and glioblastoma cells by plant extracts.Molecular Biology Reports, 46(5): 5131-5142.
26) Rezaiyan Gharagozlu, N., Shandiz, S.A. and S, Baghbani-Arani. 2018. Anti-cancer effects of aqueous and alcoholic licorice root extracts on human hepatocarcinoma (HepG2) cell line. Medical Journal of Tabriz University of Medical Sciences and Health Services, 40(2): 40-49.
27) Panahi Kokhdan, E., Sadeghi, H., Danaei, N. and H, Sadeghi. 2021.Cytotoxic Effect of Hydroalcoholic Extract of Stachys setifera on MCF-7 Human Breast Cancer Cell Lin.Medicinal Plants Research Center, Yasuj University of Medical Sciences, 26(1): 33-43.
28) Siegel, R., Ward, E., Brawley, O. and A, Jemal. 2011.Cancer statistics: the impact of eliminating socioeconomic and racial disparities on premature cancer deaths. CA Cancer Journal Clinical, 61(4): 212-236.
29) Shabkhiz, M.A., Eikani, M.H., Bashiri Sadr, Z. and F, Golmohammad. 2016. Super-heated water extraction of glycyrrhizin acid from licorice root. Food Chemistry, 210(1): 396-401.
30) Shakhseniaie, M., Nikoonahad Lotfabadi, N. and F, Haghirossadat. 2019. Effect of rosemary essential oil on the expression of BCL-XL, an anti-apoptotic gene, in MCF-7 cell line breast cancer . Daneshvar Medicine , 27(143): 45-53.
31) Tripathi, L. and J. N, Tripathi. 2003. Role of biotechnology in medicinal plants. Tropical Journal of Pharmaceutical Research, 2(2): 243-253.