فصلنامه (علمی – پژوهشی)
زیست شناسی تکوینی
سال یازدهم، شماره ۲، بهار ۱۳۹۸ ص ۴۲-۳۵

مقاله پژوهشی

بررسی اثر سمیت سلولی عصاره آبی میوه نوپال بر سلول‌های سرطانی کبد انسان (HepG2)

معصومه رجبی مقدم[۱]، الهام عزت زاده[۱*] و المیرا میکائیلی آگاه[۲]

[۱] گروه شیمی، واحد اردبیل، دانشگاه آزاد اسلامی، اردبیل، ایران
[۲] گروه زیست شناسی، واحد اردبیل، دانشگاه آزاد اسلامی، اردبیل، ایران

[*] Email: dr.ezzatzadeh@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۷/۰۸/۱۶ تاریخ پذیرش: ۹۷/۱۲/۲۶

چکیده

استفاده از گیاهان دارویی در درمان سرطان از اهمیت زیادی برخوردار است. میوه گیاه نوپال (*Opuntia ficus-indica*) به دلیل داشتن ترکیبات فنولی و خواص آنتی اکسیدانی در مطالعات سمیت سلولی اهمیت دارد. هدف از این مطالعه بررسی و مقایسه اثر مهاری عصاره آبی میوه نوپال روی رشد سلول‌های سرطان انسانی کبد (HepG2) و سلول‌های طبیعی فیبروبلاستی (L929) بعنوان شاهد می‌باشد. پس از تهیه عصاره به روش ماسراسیون و تیمار سلول‌ها با غلظت‌های مختلف عصاره به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت، اثر سمی عصاره بر مورفولوژی و کمیت سلول‌ها به ترتیب توسط میکروسکوپ معکوس و روش MTT (دی متیل تیازول- دی فنیل تترازولیوم بروماید) بررسی شد. آنالیز داده‌ها توسط نرم‌افزار Prism نسخه Demo و آزمون واریانس یک طرفه در سطح معنی‌دار $P<0.05$ انجام گرفت. نتایج نشان داد که این عصاره اثر معناداری بر موفولوژی و رشد ($P>0.05$) سلول‌های طبیعی ندارد و در بالاترین دوز پس از ۴۸ ساعت میزان مرگ ۱۵٪ بود. اما باعث تغییرات موفولوژیک و توقف رشد معنادار ($P<0.05$) در سلول‌های سرطانی پس از ۴۸ ساعت گردید و IC_{50} پس از ۴۸ ساعت غلظت ۰/۶۴ میلی‌گرم بر میلی لیتر برای سلول‌های سرطانی بود. بنابراین عصاره آبی میوه نوپال بر خلاف سلول‌های طبیعی، اثر مهاری بر رشد سلول‌های سرطانی کبد دارد و از آن در پیشگیری از سرطان یا به‌عنوان مکمل در شیمی درمانی می‌توان بهره جست. همچنین با توجه به تام بودن عصاره، بررسی تاثیر مواد موثره گیاه پیشنهاد می‌شود.

کلیدواژه‌ها: نوپال، روش MTT، سرطان کبد، عصاره.

مقدمه

سرطان دومین عامل شایع مرگ و میر در کشورهای توسعه یافته و سومین عامل در کشورهای کمتر توسعه یافته است [6]. بنابراین یکی از چالش‌های عمده در علوم پزشکی پیشگیری، درمان مؤثر و به هنگام سرطان است. روش های درمان

متفاوتی برای سرطان‌ها وجود دارد که می‌توان به جراحی، شیمی درمانی، رادیوتراپی، هورمون درمانی و ایمونوتراپی اشاره داشت. غیر از درمان های رایج ذکر شده، استفاده از گیاهان دارویی در درمان سرطان از اهمیت فوق العاده‌ای برخوردار است. زیرا داروهای گیاهی طبیعی بوده و از این رو نسبت به درمان‌های دیگر عوارض جانبی کمتری دارند [۱۵]. در کشورهای مختلف مطالعات متعددی جهت بررسی اثرات ضد سرطانی گیاهان دارویی بومی انجام شده و اثر داروهای گیاهی بر انواع رده‌های سلول‌های سرطانی مورد ارزیابی قرار گرفته است [۹،۱۷]. مطالعات نشان داده است که افزایش مصرف میوه‌ها، غلات و حبوبات با کاهش خطر ابتلا به بیماری در ارتباط است. این امر به‌وجود آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی از قبیل توکوفرول، ویتامین، کارتنوئیدها، پلی‌فنول‌ها و فلاونوئیدها که در جلوگیری از صدمه ناشی از رادیکال‌های آزاد نقش دارند، نسبت داده شده است. خاصیت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات فنولیک عمدتا به دلیل خواص ردوکس آن‌ها می‌باشد. آن‌ها به عنوان عوامل کاهش، اهداکنندگان هیدروژن و شلاته کننده‌های فلز عمل می‌کنند و می‌توانند نقش مهمی در تعدیل یا پیشگیری از بیماری‌های دژنراتیو ناشی از رادیکال‌های آزاد از جمله سرطان و دیابت ایفا کنند [۱۱].

میوه کاکتوس، گونه (*Opuntia ficus-indica*) متعلق به خانواده *Cactceae* می‌باشد. گونه مذکور در ایران با نام‌های کاکتوس، انجیر هندی و زبان مادر شوهر معروف است. قسمت‌های هوایی کاکتوس شامل میوه و ساقه به‌عنوان غذا و دارو مصرف می‌شوند. میوه نوپال حاوی تانن، بتالین، بیو فلاونوئیدها، آنتوسیانین و مقدار زیادی ویتامین C است [۱۳].

وجود انواع مختلف ترکیبات آنتی اکسیدانی شامل آنتوسیانین‌ها و فلاونوئیدها و مقدار زیادی مواد معدنی و ویتامین‌ها سبب شده است تا تحقیقات گوناگونی روی این گونه و گونه‌های دیگر این جنس صورت گیرد، به طوری که خواص ضد دیابتی، ضد التهابی، اثر ضدپلاکتی، التیام دهنده زخم معده، کاهنده کلسترول و تری گلیسیرید ونوروپروتکتیو و غیره این گیاه گزارش شده است [۳، ۴، ۱۲، ۱۴].

لذا با توجه به این که تاکنون تحقیق مشابهی از این گونه در ایران بر روی رده سلولی سرطانی کبد انجام نشده است، برآن شدیم در این پژوهش اثر عصاره آبی میوه رسیده نوپال در مهار رشد سلول‌های سرطانی کبد HepG2 را مورد ارزیابی قرار دهیم و با تعیین IC_{50} (Inhibition of concentration) غلظتی از عصاره را که باعث خاموش نمودن و در نهایت مرگ سلول‌ها می شود را به دست آوریم.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری گیاه و عصاره‌گیری

در این مطالعه تجربی (آزمایشگاهی)، میوه کاکتوس در اواخر مهر ماه ۱۳۹۵ از گلخانه‌ای در غرب مازندران، چالوس تهیه و جمع‌آوری گردید و توسط هرباریوم مرکز تحقیقات کشاورزی مازندران شناسایی شد. در این پژوهش از روش ماسراسیون برای تهیه عصاره آبی استفاده شد. ابتدا میوه خشک شده و به قطعات کوچک خرد گردید. همچنین دانه‌های موجود در میوه نیز توسط دستگاه خرد کن به میزان اندکی خرد گردید. سپس حدود ۵ گرم از میوه و دانه خرد شده توسط ترازو توزین گردید و در یک بشر ۵۰۰ میلی لیتری ریخته شد و در حدود ۱۵۰

سی سی آب مقطر دیونیزه به آن اضافه گردید. این مخلوط به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق قرار داده شد تا آب جذب میوه شود سپس به مدت ٢٤ ساعت روی شیکر تحت دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. عصاره حاصله، توسط کاغذ واتمن شماره ۱ صاف گردید و به منظور ته‌نشین شدن ذرات معلق موجود در عصاره، عمل سانتریفیوژ عصاره به مدت ۲۰ دقیقه و با دور ٤٠٠٠*rpm* انجام گرفت. عصاره حاصله در دمای ٤٥ درجه سانتی‌گراد تغلیظ و توسط فریز درایر کاملا خشک گردید و در ظرف شیشه ای تیره دربسته و در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد برای استفاده‌های بعدی نگهداری شد.

نحوه کشت سلول‌های سرطانی کبد انسان رده Hep-G2 و سلول‌های طبیعی فیبروبلاستی موش رده L929

در این مطالعه رده سلولی سرطانی کبد Hep-G2 و سلول‌های سالم فیبروبلاست موش در پاساژ دوم از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه شد. سلول‌های سرطانی و سلول‌های فیبروبلاستی موش به ترتیب توسط محیط‌کشت RPMI-1640 و DMEM حاوی ۱۰٪FBS، پن/استرپ ۱٪، جنتامایسین ۰/۰۰۱٪ و آمفوتریسین ۰/۰۰۱٪ در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۹۵٪ و CO_2 ۵٪ کشت داده شدند. پس از آن که کف فلاسک ها حدود ۸۰٪ پر شدند، سلول‌ها توسط Trypsin/EDTA ۰/۲۵٪ پاساژ داده شدند.

تیمار سلول‌های سرطانی و سلول‌های سالم فیبروبلاستی توسط عصاره آبی میوه نوپال

به‌منظور انجام آنالیزهای بعدی، زمانی که سلول‌ها حداقل به ۸۰٪ تلاقی رسیدند، توسط EDTA- Trypsin از ته فلاسک جدا و در دور *rpm* ۲۰۰۰ به مدت ٦ دقیقه سانتریفیوژ شدند. رسوب سلولی حاصل در ۱ میلی‌لیتر محیط‌کشت به حالت سوسپانسیون درآمد و درصد زنده بودن سلول‌های موجود در آن با افزودن نسبت مساوی از رنگ تریپان بلو با استفاده از لام نئوبار و بررسی با میکروسکوپ نوری معکوس تعیین شد. پس از اطمینان از زنده مانی سلول‌ها بالای ۹۰٪، سلول‌های سرطانی و سالم به طور جداگانه با تراکم ۵۰۰۰ سلول در هر چاهک در ٦ پلیت ۹٦ خانه‌ای جداگانه کشت شدند. پس از گذشت ٢٤ ساعت و چسبیدن سلول‌ها به کف چاهک‌های پلیت، سلول‌ها تحت مجاورت با غلظت‌های مختلف (۰/۰٤ ،۰/۰۸، ۰/۱٦، ۰/۳۲، ۰/٦٤، ۱/۲۵، ۲/۵، ۵،۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) عصاره میوه نوپال قرار گرفتند و برای هر گروه یک ردیف از چاهک‌های پلیت را به عنوان ردیف کنترل در نظر گرفته شد و توسط محیط‌کشت بدون عصاره تیمار شدند. تغییرات مورفولوژیکی و خصوصیات عمومی سلول‌ها با استفاده از میکروسکوپ معکوس پس از گذشت ٢٤ و ٤٨ ساعت مورد ارزیابی قرار گرفت.

بررسی کمی اثر سمیت سلولی عصاره با روش رنگ سنجی MTT

میزان حیات سلولی توسط تست MTT بررسی شد. این ماده از نمک‌های تترازولیوم به رنگ زرد و محلول در آب بوده که توسط آنزیم‌های دهیدروژناز موجود در میتوکندری احیا شده به فرم کریستال‌های فورمازان غیر محلول در سلول های زنده رسوب می‌نماید. این کریستال‌ها به رنگ بنفش بوده و میزان تولید کریستال غیرمحلول متناسب با فعالیت سلول می‌باشد، از طرفی سلول‌هایی که از نظر متابولیکی

فعال هستند روند احیای MTT را انجام داده که به عنوان سلول زنده در نظر گرفته می‌شود. پس از طی مراحل زیر جذب نوری محلول حاصله با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۷۰ نانومتر قرائت می‌شود.

پس از گذشت ۲٤ و ٤۸ ساعت از تیمار سلول های سرطانی و غیر سرطانی در پلیت های جداگانه توسط عصاره، محیط‌کشت هر پلیت خالی و به هرچاهک ۱۰۰µl محیط تازه حاوی ۲۰µl از محلول رنگی ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر MTT اضافه شد. پلیت‌ها به مدت ٤-۳ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. سپس محتویات داخل چاهک‌ها را با سمپلر خالی شد و DMSO۱۰۰µl به هر خانه اضافه گردید تا فورمازان حاصل حل گردد. پلیت ها را به مدت ۱۰ دقیقه روی شیکر گذاشته تا رنگ محیط به رنگ صورتی مایل به ارغوانی درآید. سپس میزان جذب را در هر خانه توسط دستگاه الایزا ریدر در طول موج ۵۷۰ نانومتر قرائت شد.

این آزمایش با سه بار تکرار در هر بازه زمانی انجام گرفت و میزان بقای سلولی از فرمول زیر محاسبه گردید:

$$\text{میزان بقای سلولی (٪)} = \left(\frac{\text{جذب نوری گروه آزمایش}}{\text{جذب نوری گروه کنترل}}\right) \times ۱۰۰$$

آزمون‌های آماری

تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار Prism5 نسخه Demo با استفاده از آزمون واریانس یک طرفه (One-way ANOVA) تجزیه و تحلیل شدند و نتایج با $P< ۰/۰۵$ معنادار در نظر گرفته شدند و رسم نمودارها توسط نرم‌افزار Excel انجام شد.

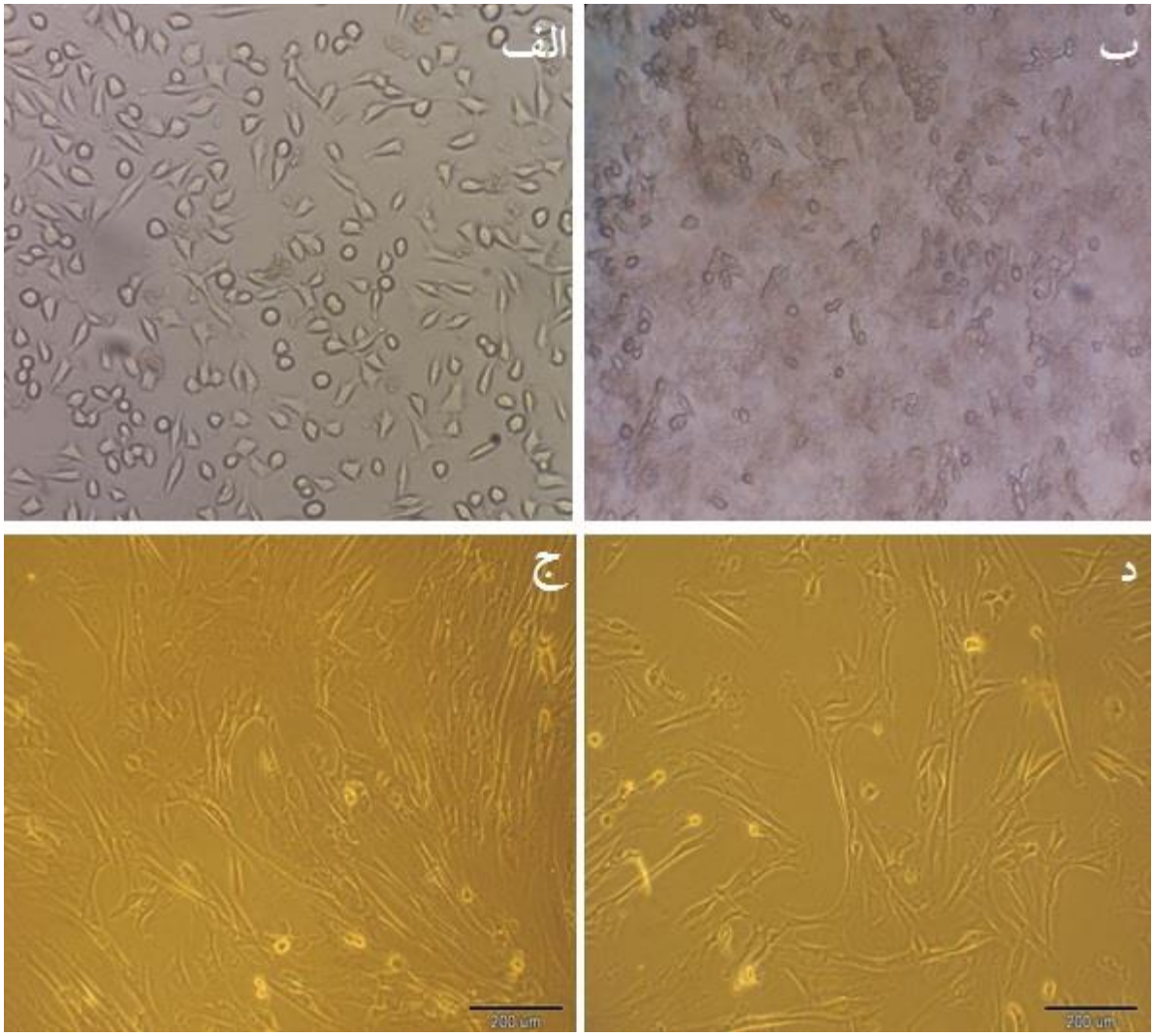
نتایج

بررسی و مقایسه تغییرات مورفولوژیکی سلول‌های سرطانی و طبیعی

سلول‌های فیبروبلاستی L929 شاهدی که تحت تاثیر عصاره قرار گرفته بودند پس از ۲٤ و ٤۸ ساعت تیمار، هیچگونه تغییرات مورفولوژیک خاصی نسبت به سلول‌های شاهدی بدون تیمار با عصاره نشان ندادند (تصویر ۱). سلول‌های سرطانی (Hep-G2) که با عصاره تیمار نشده بودند نیز تغییر مورفولوژیک و ظاهری قابل توجهی را بروز ندادند. اما سلول‌های سرطانی که با عصاره به مدت ٤۸ ساعت تیمار شده بودند تفاوت بارز و وابسته به دوزی را نشان دادند و تغییر شکل سلول و هسته در آنها کاملا واضح بود. جدا شدن سلول‌ها از کف چاهک‌ها، افزایش اندازه واکوئل، دانه‌دار شدن هسته و تحلیل سیتوپلاسم مشخص بود. تحلیل سیتوپلاسم و افزایش واکوئل‌های سطحی نشان دهنده آپوپتوز (مرگ سلولی) و دانه دار شدن و کوچک شدگی هسته از علائم تغییرات متابولیکی و ژنتیکی است که تنها در سطح ملکولی در سلول‌های تیمار شده با عصاره نوپال قابل بررسی خواهد بود. این تغییرات مورفولوژیک در سیتوپلاسم و هسته نشان دهنده اثرات سمی عصاره این میوه بر سلول‌های سرطانی و عدم تاثیر آن بر سلول های طبیعی است.

مقایسه سمیت سلولی عصاره در سلول‌های سرطانی و طبیعی

پس از انجام MTT assay، با استفاده از OD خوانده شده توسط دستگاه الایزا ریدر در طول موج ۵۷۰ nm، میانگین زنده مانی سلول‌ها در غلظت‌های



تصویر ۱- عکس میکروسکوپی مربوط به بازه زمانی ٤٨ ساعت تیمار با غلظت ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر عصاره آبی میوه نوپال. الف- سلول های سرطانی HepG2 بدون تاثیر عصاره، ب- سلول های سرطانی HepG2 در حال آپوپتوز پس از تاثیر عصاره، ج- سلول های طبیعی فیبروبلاست موش L929 بدون تاثیر عصاره و د- سلول های طبیعی فیبروبلاست موش L929 تیمار شده با عصاره.

مختلف عصاره میوه نوپال نسبت به گروه کنترل به ترتیب پس از گذشت ٢٤ و ٤٨ ساعت تیمار با عصاره محاسبه گردید (تصویر ۲). همانطور که مشاهده می‌نمایید پس از گذشت ٢٤ ساعت از تاثیر عصاره بر سلول‌ها، میزان زنده مانی سلول‌ها در سلول‌های سرطانی و سلول‌های فیبروبلاستی سالم کاهش معنی‌داری ($P<0.05$) نسبت به گروه کنترل نشان ندادند (تصویر ۲ الف).

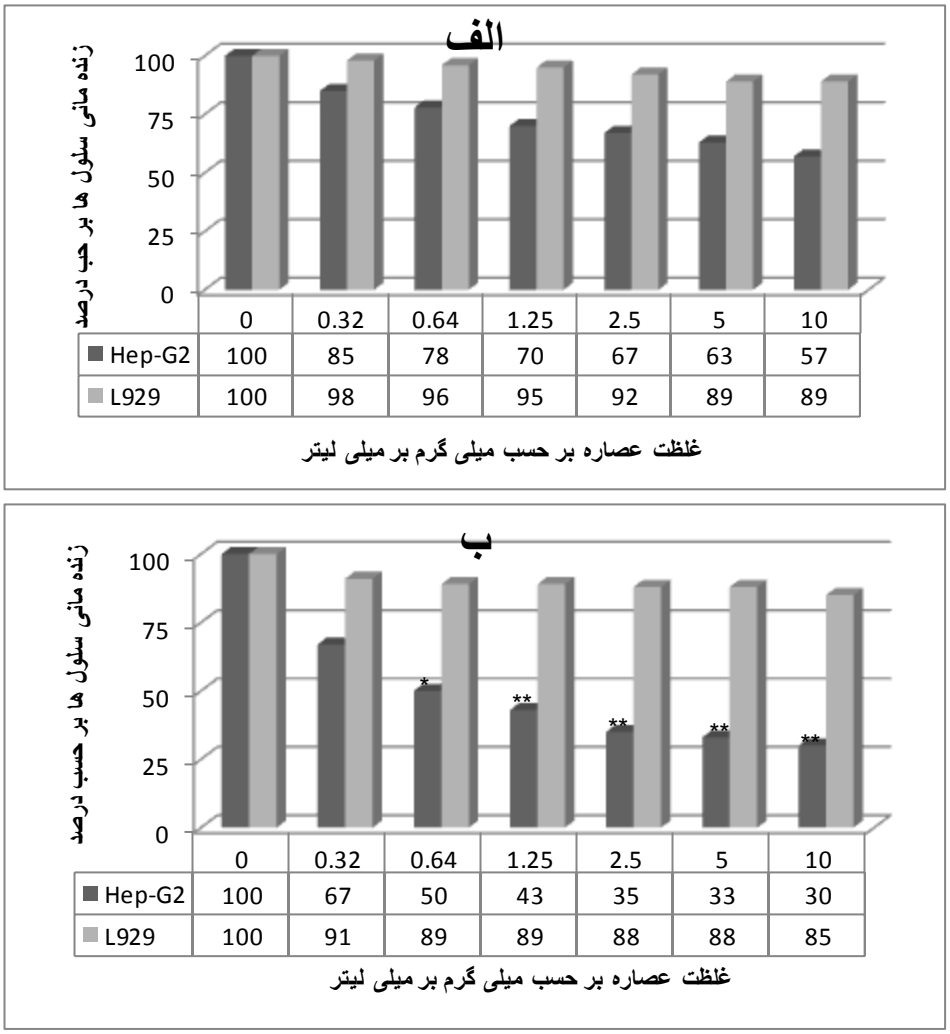
برخلاف بازه زمانی ٢٤ ساعت، نتایج در ٤٨ ساعت بیانگر افزایش مرگ و میر معنادار ($P<0.05$) در سلول‌های سرطانی کبد بود و با افزایش غلظت عصاره میزان زنده مانی سلول‌های سرطانی در غلظت‌های ۱/۲۵ میلی‌گرم در میلی لیتر و بالاتر به زیر ۵۰ درصد رسید. همچنین با مقایسه نمودارها، IC_{50} (غلظتی از عصاره که در آن نیمی از سلول‌ها زنده باشند) در مورد سلول‌های سرطانی Hep-G2 در بازه زمانی ٤٨ ساعت، غلظت ۰/٦٤ میلی‌گرم در میلی لیتر عصاره تعیین گردید. علیرغم کاهش چشمگیر و

معنادار زنده مانی با افزایش زمان و غلظت عصاره در سلول‌های سرطانی، همچنان تاثیر معنی‌دار بر زنده مانی سلول‌های سالم فیبروبلاستی پس از ٤٨ ساعت انکوباسیون مشاهده ننمودیم و کمترین زنده مانی در سلول‌های فیبروبلاستی غیرسرطانی ۸۵٪ گردید. (تصویر ۲ ب)

بحث

سرطان یکی از عوامل اصلی مرگ و میر در سراسر جهان است. در آمار سازمان بهداشت جهانی تخمین زده شده است که سرطان عامل ۸۳/۲ میلیون مرگ در بین سال‌های ۲۰۰۵ تا ۲۰۱۵ خواهد بود [۵].

بیماری سرطان، بدخیمی است که مشخصه‌ی بارز آن میزان پایین آپوپتوز است. آپوپتوز یا مرگ برنامه‌ریزی شده، یک مکانیسم فیزیولوژیک مرگ سلولی است. در طی آپوپتوز، حجم سلولی به سرعت کاهش یافته و به دنبال آن کروماتین هسته‌ای متراکم شده و DNA آن قطعه قطعه می‌شود. این روند در حالت نرمال باعث پاک‌سازی سلول‌هایی دارای اختلال ژنتیکی می‌شود [10].



تصویر ۲- تاثیر غلظت های مختلف عصاره بر سلول های سرطانی و سالم با آزمون MTT. الف- عصاره در طول ٢٤ ساعت تیمار، تاثیری بر سلول های سرطانی و سالم ندارد. ب- عصاره بر سلول های سالم پس از ٤٨ ساعت بی تاثیر بوده اما باعث افزایش مرگ و کاهش زنده مانی در سلول های سرطانی با افزایش غلظت عصاره می شود.(P<0.01, * P<0.05)**

چگونگی تنظیم آپوپتوز یکی از دغدغه‌های اصلی توسعه داروهای ضدسرطانی و شیمی درمانی سلول‌های بدخیم است. در سال‌های اخیر استفاده از ترکیبات طبیعی برای مقابله با سرطان با توجه به عوارض جانبی کم و هزینه‌های ناچیز وهم چنین تاثیرات امید بخش مورد توجه قرار گرفته است، امروزه ترکیبات گیاهی فراوانی با اثرات بیولوژیک مختلف جداسازی شده و در علم داروسازی نوین وارد شده‌اند که در درمان سرطان‌های مختلف موثرند [۱].

میوه نوپال از خانواده کاکتوس‌ها بوده و نزدیک به ۳۰۰ گونه گیاه بسیار متنوع از نظر شکل و اندازه دارد که بومی آمریکای جنوبی هستند و بطور وحشی در ایران نمی‌رویند. ولی بعضی از گونه‌های آن از جمله نوپال در مناطق جنوب ایران و سواحل دریای مازندران در گلخانه‌ها کاشته و نگهداری می‌شوند. دانه آن در طب سنتی و میوه آن به‌عنوان مکمل غذایی استفاده می‌شود. میوه نوپال منابعی غنی از فلاونوئیدها، پلی‌فنول‌ها، پرو آنتوسیانیدین، کاروتونیدها، بتالین‌ها و اسید آلی می‌باشند که این مواد به‌عنوان آنتی‌اکسیدانت عمل کرده و رادیکال‌های آزاد را جاروب می‌کنند و موجب تحریک سیستم ایمنی بدن می‌شوند و همچنین تشکیل ترکیبات اضافی DNA با کارسینوژن‌ها را مهار نموده و علاوه بر این مسیرهای متابولیک مرتبط با گسترش سرطان را مهار می کنند [۲].

مطالعه‌ی دیگری که توسط Livrea و همکاران نشان داده است که عصاره میوه نوپال دارای طیف وسیعی از اثرات دارویی و درمانی به مانند فعالیت‌های آنتی اکسیداتیو، ضد التهابی و ضدمیکروبی می‌باشد [۷] و در تحقیقی که توسط Loro و همکاران صورت گرفته است، نشان داده شده که عصاره آبی *Opuntia dillenii* مانع از تکثیرسلول‌های سرطانی گردن رحم، تخمدان و سلول‌های مثانه در شرایط آزمایشگاهی و همچنین مانع رشد توموری سرطان تخمدان در موش‌ها در شرایط برون تنی شده است. این آزمایش‌ها نشان می دهد که تیمارهای (۱، ۵، ۱۰ و ۲۵ درصد عصاره کاکتوس) و زمان (۱، ۳ و ۵ روزه) اثر بازدارندگی و مهاری بر رشد سلول‌های سرطانی کشت شده با افزایش تعداد سلول‌های آپوپتوتیک و توقف چرخه سلولی دارد [۸].

همچنین در مطالعه‌ای که توسط Sreekanth و همکاران در سال ۲۰۰۷ جهت ارزیابی ویژگی مهارکنندگی تکثیر و تهاجم سلولی بتالین‌های میوه *Opuntia ficus-indica* بر روی سلول‌های لوسمی میلوئید مزمن انسانی (K562) در *in vitro* از تست الایزا و سنجش فلوسیتومتری استفاده گردید. بتالین‌ها توانایی مهار تکثیر و تهاجم سلولی را توسط مهار چرخه سلولی و همچنین القای آپوپتوز داشتند [۱۶].

با توجه به عدم بررسی اثرات ضد سرطانی گیاه کاکتوس در ایران در مطالعه حاضر اثر عصاره قطبی (عصاره آبی) میوه گیاه کاکتوس از گونه نوپال بر روی سلول‌های سرطان کبد HepG2 در غلظت‌های مختلف (۰/۳۲، ۰/٦٤، ۱/۲۵، ۲/۵، ۵،۱۰ میلی‌گرم بر میلی لیتر) با استفاده از تست MTT، بررسی گردید و نتایج حاصل از مطالعه ی حاضر نشان داد که عصاره آبی میوه نوپال دارای اثر سمیت سلولی و مهار کننده رشد بر روی رده سرطانی کبد در مقایسه با سلول‌های طبیعی می‌باشد. بنابراین بر اساس نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر و تایید اثرات سمیت سلولی عصاره آبی میوه نوپال، پیشنهاد می‌شود که در مطالعات بعدی از عصاره‌های مختلف قطبی و غیر قطبی میوه نوپال برروی سایر رده‌های سرطانی بررسی شود. همچنین

اثرات القا کنندگی آپوپتوتیک، مکانیسم‌های مولکولی درگیر در القای آپوپتوز و میزان سمیت دارویی آن با استفاده از مدل های سلولی و حیوانی در آزمایشگاه مشخص گردد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از پرسنل محترم آزمایشگاه تحقیقاتی دانشگاه آزاد اسلامی واحد اردبیل که نهایت همکاری را در اجرای این پژوهش داشتند کمال تشکر و قدر دانی را داریم.

منابع

[1] Cragg, G.M. and Newman, D.J., 2005. Plants as source of anti-cancer agents. Journal Ethnopharmacology, 100(12): 72-79.

[2] Craig, W.J., 1999. Heaith promoting properties of common herbs. American journal of clinical nutrition, 70(3): 491-499.

[3] Galati, E.M., Mondello, M.R., Giuffrida, D., Dugo, G., Miceli, N., Pergolizzi ,S. and Taviano, M.F., 2003. Chemical characterization and biological effects of Sicilian *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. fruit juice: antioxidant and antiulcerogenic activity. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51(17): 4903-4918.

[4] Gentile, C., Tesoriere, L., Allegra, M., Livrea, M.A. and D'Alessio, P., 2004. Antioxidant betalains from cactus pear (*Opuntia ficus-indica* L.) inhibit endothelial ICAM-1 expression. *Annals* of the *New York Academy* of Sciences, 1028: 481-486.

[5] Kamesaki, H., 1998. Mechanisms involved in chemotherapy-induced apoptosis and their implications in cancer chemotherapy. International Journal of Hematology, 68(1): 29-43.

[6] Kuete, V. and Efferth, T., 2011. Pharmacogenomics of Cameroonian traditional herbal medicine for cancer therapy. Journal of Ethnopharmacology, 137(1): 752-766.

[7] Livrea, M.A. and Tesoriere, L., 2006. Health Benefits and Bioactive Components of the Fruitsfrom *Opuntia ficus-indica*. Journal of the Professional Association for Cactus Development, 1: 1-18.

[8] Loro, J.F., Rio, I. and Perez-Santana, L., 1999. Preliminary studies of analgesic and anti-inflammatory properties of Opuntia dillenii aqueous extract. Journal Ethnopharmacology, 67: 213-8.

[9] Mahady, G., 2001. global harmonisation of herbal health claims. Journal of Nutrition, 131(3): 1120-1123.

[10] Reed, J.C. and Pellecchia, M., 2005. Apoptosis-based therapies for hematologic malignancies. Blood, 106(2): 408-418.

[11] Rekha, C., Poornima, G., Manasa, M., Abhipsa, V., Pavithra Devi, J. and Vijay Kumar, H.T., 2012. Ascorbic Acid, Total Phenol Content and Antioxidant Activity of Fresh Juices of Four Ripe and Unripe Citrus Fruits. Chemical Science Transactions, 1(2): 303-311.

[12] Roman-Ramos, R., Flores-Saenz, J.L. and Alarcon-Aguilar, F.J., 1995. Anti-hyperglycemic effect of some edible plants. Journal Ethnopharmacology, 48(1): 25-32.

[13] Salim, N., Abdelwaheb, C., Rabah, C. and Ahcene, B., 2009. Chemical composition of *Opuntia ficus-indica* (L.) fruit. African Journal of Biotechnology, 8(8): 1623-1624.

[14] Shapiro, K . and Gong, W.C., 2002, Natural products used for diabetes. Journal American Pharmacists Association, 42(2): 217-26.

[15] Shoeb, M., 2006. Anticancer agents from medicinal plants. Bangladesh Pharmacological Society, 1(2): 35-41.

[16] Sreekanth, D., Arunasree , M.K., Roy, K.R., Reddy, T.C., Reddy, G.V. and Reddanna, P., 2007. Betanin a betacyanin pigment purified from fruits of *Opuntia ficus-indica* induces apoptosis in human chronic myeloid leukemia Cell line-K562. Phytomedicine, 14: 739-746.

[17] Tavakoli , J., Miar, S., Zadehzare, M.M. and Akbari, H., 2012. Evaluation of Effectiveness of Herbal Medication in Cancer Care: A Review Study. Iranian Journal of Cancer Prevention, 5(3): 144-156.

Journal of Developmental Biology
Vol. 11, No. 2, Spring 2019

Evaluation of cytotoxic effect of aqueous extract of *Nopal* fruit on liver cancer cell line (HepG2)

Rajabi Moghaddam M.[1], Ezzatzadeh E.[1*], Mikaeili Agah E.[2]

[1] Department of Chemistry, Ardabil Branch, Islamic Azad University, Ardabil, Iran
[2] Department of Biology, Ardabil Branch, Islamic Azad University, Ardabil, Iran

[*] Email: dr.ezzatzadeh@yahoo.com

Received: 7 November 2018 Accepted: 17 March 2019

Abstract

The medicinal plants in cancer treatment are very important. Nopal fruit (*Opuntia ficus-indica*) because of its phenolic compounds and antioxidant properties are important in cytotoxicity studies. The aim of this study was to investigate the inhibitory effect of nopal aqueous extract on the growth of hepatocellular carcinoma cell line (HepG2) and compare the effect of this extract on normal mouse fibroblast cell line (L929) as a control. After extraction by maceration and treatment of cells with various concentrations of the extract for 24 and 48 hours, the toxic effect of the extract on cell morphology and viability was investigated by inverted microscope and MTT (3-4, 5 dimethylthiazole 2-yl 5,2-diphenyl tetrazolium), respectively. Data analysis was done by PrismDemo and one-way ANOVA test at a significant level ($P<0.05$). The results showed that the extract had no significant effect on morphology and growth ($P>0.05$) of normal cells and the death rate was 15% at the highest dose after 48 hours, However, it caused morphological changes and a significant growth-inhibiting ($P<0.05$) in cancer cells after 48 hours and IC_{50} was 0.44 mg /ml after 48 hours for cancer cells.
Therefore, the aqueous extract of Nopal fruit has the inhibitory effect on the growth of liver cancer cells and no cytotoxicity of normal cells. So, it can be used to prevent cancer or as a supplement in chemotherapy. Moreover, due to the fact that the extract was total, it is recommended to investigate the effect of the active substances of the fruit.

Keywords: Nopal, MTT Assay, Liver Cancer, Extract.