دو فصلنامه
بیوتکنولوژی و میکروبیولوژی کاربردی
سال دوم، شماره ۳ و ۴، پاییز و زمستان ۱۳۹۲

بررسی اثر سمیت سلولی عصاره الکلی گیاه *Vicia venulosa* Boiss. بر رده سلول سرطانی رحم (Hela)

عباسعلی دهپور جویباری *

استادیار، گروه زیست شناسی دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قائمشهر، قائمشهر، ایران

چکیده

مقدمه: سرطان بعد از بیماری‌های قلبی و عروقی دومین علت اصلی مرگ است. گیاهان سلامتی و نیروی حیاتی انسان را حفظ می کنند و بیشتر آنها توانایی کنترل سلول‌های سرطانی را دارند. در این تحقیق، اثر عصاره گیاه *Vicia venulosa* Boiss. را روی سلول‌های سرطانی Hela را مورد مطالعه قرار دادیم.

روش: رده سلولی سرطانی Hela در محیط کشت مایع RPMI 1640 که حاوی سرم آلبومین گاوی FBS و آنتی بیوتیک بودکشت داده شد. سلول‌ها در مجاورت غلظت‌های مختلف (۱۰mg/mL و ۷/۵، ۵ ، ۲/۵ ، ۱/۲۵ ، ۰/۶۲۵ ، ۰/۳۱۲ ، ۰/۱۵۶) عصاره هیدروالکلی گیاه *Vicia venulosa* برای ۷۲ قرار گرفتند و میزان اثر کشندگی سلولی با استفاده از آزمون MTT بررسی شد.

نتایج: نتایج به دست آمده نشان داد که غلظت‌های مختلف عصاره هیدروالکلی گیاه *Vicia venulosa* می‌تواند مانع رشد سلول‌های سرطانی گردد. در غلظت‌های بالا(۲,۵ و ۵و ۷,۵ و ۱۰)تفاوت معنی‌داری با گروه شاهد نشان می‌دهد.

نتیجه‌گیری کلی: نتایج نشان دهنده این است که عصاره هیدرو الکلی گیاه *Vicia venulosa* *می‌تواند مانع رشد سلول‌های سرطانی گردد.*

واژه‌های کلیدی: سمیت سلولی، رده سلولی Hela، گیاه *Vicia venulosa*

مقدمه

سرطان بعد از بیماری‌های قلبی و عروقی دومین علت اصلی مرگ است(Turgay, 2005). سرطان یک اصطلاح کلی و کاربردی برای مجموعه‌ای از بیماری‌های بد خیم است که ممکن است قسمت‌های مختلف بدن را تحت تاثیر قرار بدهد (Tyler, 1994). سرطان رشد غیرعادی سلول در بدن است که می‌تواند منجر به مرگ فرد شود. سرطان اثر متقابل عوامل ژنتیکی و محیطی است (Kathiresan, et al., 2006). در سال بیشتر از ٦ میلیون نفر در جهان از بیماری سرطان می‌میرند و بیشتر از ۲۲ میلیون نفر در

* مسئول مکاتبات: dehpour @ gmail.com

جهان مبتلا به سرطان هستند (Pinar, 1998) علت اصلی سرطان جهش است، جهش و تغییرات در DNA رشد طبیعی سلول، بلوغ و مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده (آپوپتوز) را مختل می‌کند. آپوپتوز یک فرآیند فیزیولوژیکی برای کشتن سلول‌ها است، اختلال در مرگ سلولی کنترل شده می‌تواند به انواع بیماری‌ها از جمله سرطان، بیماری خود ایمنی، و اختلالات تجزیه شدن سلول‌های سالم منجر شود (Kim BJ., et al., 2009). فعالیت ضدسرطانی گیاهان به علت وجود آنتی اکسیدان‌ها و ترکیبات دارویی در آنها می‌باشد. گیا هان دارویی ارزان و در دسترس هستند و هیچ گونه مسمومیتی در بدن ایجاد نمی‌کنند. (Pandey and Madhuri, 2003 & Somkuwar, 2006). داروهای گیاهی نقش مهمی در پیشگیری ودر مان سرطان دارند (Larkin, 1983 & Saxe, 1987). مواد گیاهی مورد استفاده در طب سنتی از گذشته دور همواره مورد توجه بوده است و در حال حاضر نیز با توجه به اثرات جانبی و ضررهای مختلف مواد مصنوعی، استفاده از مواد طبیعی جایگاه خاص خود را دارا می‌باشد. گیاهان دارویی را به صورت‌های مختلفی در درمان بیماری‌ها برای تنظیم سیستم ایمنی و یا عوارض ناشی از بیماری‌ها و همچنین اثرات ضد توموری و یا ضدمیکروبی به کار برده‌اند. نحوه پاسخ بدن به ناهنجاری‌های مختلف به نحوه و توانایی پاسخ سیستم ایمنی بدن وابسته است و درنتیجه عوامل مؤثر بر روی سیستم ایمنی می‌تواند تعیین کننده نتیجه و برایند بیماری باشد، از سوی دیگر راهکارهای درمانی و داروهای شیمیایی مختلفی برای درمان تومورها استفاده می‌شوند که با مشکلات مشخص و اثرات جانبی بسیاری همراهند، از این رو نیاز به استفاده از مواد طبیعی با اثرات جانبی کمتر و عملکرد مؤثر ضروری می‌نماید .جنس ماشک *Vicia* spp. جزء گیاهان علوفه ای تیره گیاهان پروانه آسا می‌باشد. قریب ۱۵۰ گونه از این گیاهان را تا بحال شناسایی کرده اند که بیشتر آنها متعلق به نواحی مدیترانه ای می‌باشند. تحقیقات نشان می‌دهند که گیاه *Vicia* دارای اثرات آنتی‌اکسیدانی می‌باشد می‌تواند رادیکال-های آزاد را پاکسازی نماید(Ebrahimzadeh M.A, 2009). ترکیباتی مانند آنتوسیانین (Anthocyans)، تانن‌ها (Tannins) و اسیدهای فنولی (Phenolic acids) در این گیاه وجود دارند که ویژگی‌های آنتی اکسیدانی دارند.با توجه به اینکه در مورد اثرات ضدسرطانی گونه*Vicia venulosa* Boiss. تاکنون تحقیقی به عمل نیامده، برآن شدیم تا اثر عصاره این گیاه روی سلول‌های سرطانی Hela را مورد مطالعه قرار دهیم.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری گیاه

گیاه مورد نظر از منطقه گدوک در اواخر ماه اردیبهشت، سرشاخه‌های گلدار گیاه جمع‌آوری گردید،سپس از این گیاه نمونه های هرباریومی تهیه گردیده و توسط فلورهای موجود توسط دکتر بهمن اسلامی (استاد سیستماتیک گیاهی دانشگاه آزاد اسلامی واحد قائمشهر) نام گیاه *Vicia venulosa* *تعیین گردید و با شماره ۳۲۰ و ۳۲۱ در هرباریوم دانشگاه آزاد اسلامی واحد قائمشهر نگهداری می‌شود.*

عصاره‌گیری

سرشاخه‌های گیاه خشک شده در سایه توسط آسیاب برقی به صورت پودر درآورده شده و به همراه حلال (اتانول ۸۰٪) در یک ظرف در بسته یک دوره ۷۲ ساعته همراه با تحریک مکرر به منظور حل شدن ماده حل شونده در دمای اتاق نگهداری شد. مخلوط حاصل کدر بود. سپس مواد جامد مربوط پرس شده و مایعات ترکیب شده به وسیله فیلتراسیون و یا ظرف به ظرف کردن جدا شد. حلال اتانول با استفاده از روتاری و با روش تقطیر در خلاء خارج گردید. عصاره خشک به دست آمده به عنوان عصاره خالص در نظر گرفته شد و غلظت‌های مختلف از آن تهیه شد.

تهیه غلظت‌های مختلف از عصاره گیاهی

عصاره خشک گیاه *Vicia venulosa* توسط ترازوی حساس دیجیتالی توزین گردید. آنگاه در هر ۱۰۰ میکرولیتر DMSO به صورت محلول در آورده شد. غلظت های به کار رفته در این تحقیق شامل (0/156, 0/312, 0/625, 1/25, 2/5, 5, 7/5, 10) mg/ml بودند. میزان DMSO در محلول نهایی موجود در چاهک‌های کشت سلول کمتر از ۱٪ محاسبه گردید.

رده سلولی و محیط کشت

سلول‌های مورد استفاده در این تحقیق، رده سلول‌های سرطانی دهانه رحم Hela با کد بانک سلولی NCBI C115 بوده که از بخش بانک سلولی انستیتو پاستور ایران خریداری شد. سلول‌ها در محیط کشت RPMI 1640 (خریداری شده از شرکت سیگما) کشت داده شد. محیط کشت حاوی ۱۰٪ سرم جنین گار غیرفعال شده (FBS)، پنی‌سیلین (۱۰۰ واحد در هر میلی‌لیتر) و استرپتومایسین (۱۰۰ میکرو گرم به ازای هر میلی‌لیتر) بود. رده‌های سلولی موردنظر در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد و در اتمسفر حاوی ۵٪ CO2 و ۹۵٪ رطوبت نگهداری گردید.

بررسی سمیت سلولی مواد با استفاده از آزمون MTT

مختلف در محیط کشت RPMI 1640 که حاوی پنی‌سیلین (IU/ ML100)، استرپتومایسین (IU/ ML100)، گلوتامین (mm012) و ۱۰٪ سرم جنین‌گاوی (FBS) بود در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و در اتمسفر حاوی ۵٪ CO_2 انکوبه شدند. سلول‌ها در فلاسک‌های T شکل شروع به رشد می‌کردند. بعد از گذشت سه روز و پوشیده شدن بستر فلاسک از سلول، لایه سلول چسبنده به کف فلاسک به روش آنزیمی و با استفاده از تریپسین- ورسن جدا می‌شود و پس از انتقال به لوله آزمایش استریل به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۱۲۰۰ سانتریفیوژ می‌شد. سپس سلول‌ها در محیط کشت تازه با کمک پیپت پاستور دوباره معلق از آن سوسپانسیون با استفاده از سمپلر ۸ کاناله ۱۰۰ میکرو لیتر درون چاهک های پلیت ۹۶ خانه‌ای با کف صاف (ویژه کشت سلولی) ریخته می‌شد. یک ستون از چاهک ها بدون سلول و به عنوان Blank و فقط حاوی محیط کشت نگهداشته می‌شد. یک ستون دیگر حاوی محیط‌کشت و سلول‌های سالم (لنفوسیت و منوسیت) و ستون‌های دیگر حاوی محیط‌کشت و سلول‌های رده سلولی در نظر گرفته شد. یکی از این ستون‌ها که حاوی محیط‌کشت و سلول و فاقد عصاره بودند به عنوان شاهد (کنترل) در نظر گرفته شدند و

یک ستون دیگر هم حاوی محیط کشت و سلول و غلظت به کار رفته DMSO (کنترل منفی) بود تا اثر سمیت آن برروی سلول‌ها بررسی شود. پلیت‌ها به مدت ٢٤ ساعت درون انکوباتور انکوبه می‌شدند تا سلول‌ها از استرس ناشی از تریپسینه شدن به حال عادی باز گردند. پس از این زمان، غلظت‌های مناسب از عصاره موردنظر تهیه گشته و ۱۰۰ میکرو لیتر از هر غلظت به صورت ستونی به چاهک‌های پلیت اضافه شد (به این ترتیب غلظت نهایی ترکیب مورد مطالعه در چاهک‌ها نصف می‌گشت. بنابراین غلظت‌ها به صورت ۲ برابر تهیه شد تا بعد از اضافه شدن به چاهک به غلظت نهایی موردنظر می‌رسید). سپس سلول‌ها به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه و در اتمسفر ۵۰٪ CO2 در انکوباتور قرار داده شدند. پس از گذشت ۷۲ ساعت به هر چاهک ۲۰ میکرو لیتر از محلول MTT (5mg/ml) اضافه می‌گشت. پلیت‌ها به مدت ۳ تا ٤ ساعت انکوبه می‌شد و سپس باقیمانده خارج و به هر چاهک ۱۰۰ میکرو لیتر DMSO اضافه می‌شد تا فورمازان حاصل حل گردد. پس از ۱۰ دقیقه و تکان دادن پلیت‌ها با استفاده از تکان دهنده پلیت، جذب نوری فورمازان در ۵۷۰ نانومتر با استفاده از خوانشگر پلیت خوانده می‌شد. چاهک‌های حاوی سلول و بدون عصاره به عنوان چگالی نوری (OD) شاهد (کنترل) و چگالی نوری چاهک‌های بدون سلول و تنها محیط RPMI 1640 به همراه سرم جنین گاوی به عنوان Blank در نظر گرفته شد. درصد حیات سلولی با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید:

$$\%OD = \frac{OD \text{ چاهک‌های تحت تأثیر عصاره} - OD \text{ بلانک}}{OD \text{ کنترل} - OD \text{ بلانک}} \times 100$$

نتایج

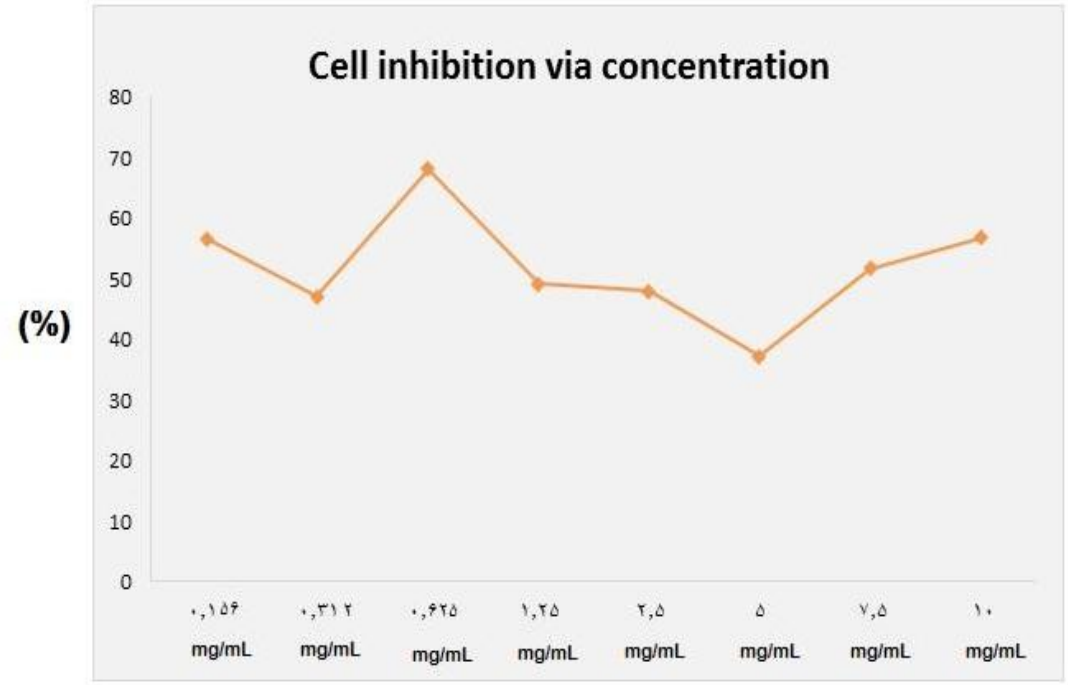
با استفاده از میزان جذب‌های خوانده شده در رده سلول‌های سرطانی Hela میزان درصد زنده ماندن سلول‌ها (Viability %) پس از مواجهه با عصاره اتانلی گیاه *Vicia venulosa* و اتمام تست *MTT* تعیین گردید،که در جدول شماره ۱ نشان داده شد. در نمودار ۱ اثر سمیت سلولی عصاره اتانولی گیاه *Vicia venulosa* را در غلظت‌های مختلف نشان می‌دهد. نتایج تحقیق حاضرنشان داد که در رده سلولیHela، عصاره اتانولی *Vicia venulosa* در غلظت‌های 0/156, 0/312, 0/625, 1/25, 2/5, 5, 7/5, 10 (mg/mL) بعد از ۷۲ ساعت، رشد سلول‌ها را به طور معنی‌داری ($P\leq0.05$) نسبت به گروه کنترل کاهش داده است. عصاره اتانولی *Vicia venulosa* در غلظت‌های مختلف، درصد مهار رشد سلولی را افزایش داده است. بالاترین درصد مهار رشد در غلظت 0/625 mg/ml به میزان ۷۰ ٪ بوده است.

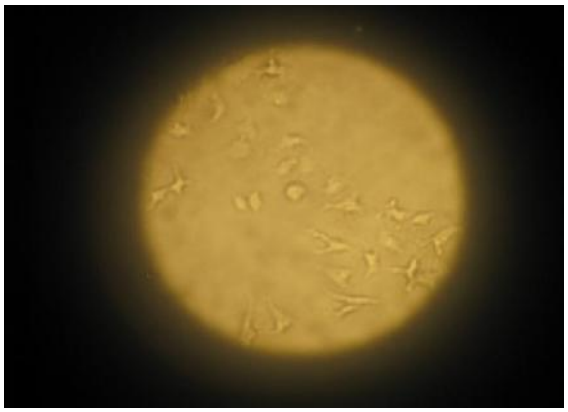
در تصویر شماره –۱: سلول‌های سرطانی Hela در محیط‌کشت RPMI1640 نشان داده می‌شود که سلول‌ها از نظر مرفولوژی حالت نرمال را نشان می‌دهند و در تصویر شماره–۲: اثر عصاره اتانولی گیاه مورد نظر در غلظت ۰/٦۲۵ mg/ml بر روی رده سلولهای سرطانی Hela را نشان می‌دهد. میزان IC_{50} نیز با توجه به نمودار شماره –۱، 0/156 mg/ml تعیین می‌گردد. بنابراین نتایج حاصل از این آزمایشات نشان می‌دهد که عصاره اتانلی گیاه مورد نظر در غلظت‌های پایین دارای اثرات مهاری در رشد سلول‌های سرطانی رحم Hela می‌باشد.

جدول – ۱: اثر غلظت‌های مختلف عصاره اتانولی گیاه *Vicia venullosa* برروی میزان جذب نوری سلولهای سرطانی *Hela*

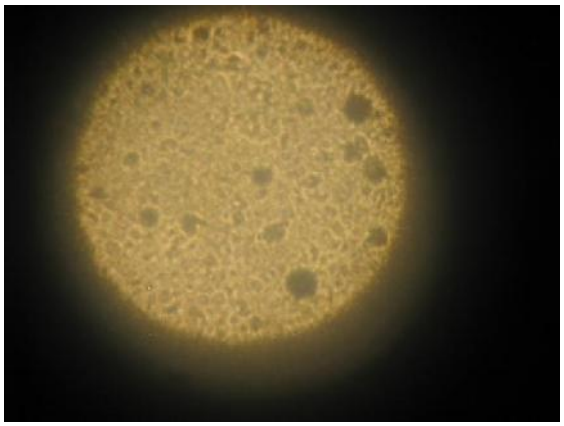
concent	OD1(%)	OD2(%)	OD3(%)	mean	stdev	Sem
control	0.572	0.555	0.633	0.586667	0.03349	0.023681
lanf	0.189	0.263	0.179	0.210333	0.037464	0.026491
DMSO	0.186	0.414	0.547	0.382333	0.149069	0.105408
0.16(mg/mL)	0.237	0.435	0.411	0.361	0.088227	0.062386
0.31(mg/mL)	0.355	0.423	0.534	0.437333	0.073776	0.052167
0.63(mg/mL)	0.221	0.174	0.525	0.306667	0.155573	0.110007
1.25(mg/mL)	0.388	0.404	0.467	0.419667	0.034101	0.024113
2.5(mg/mL)	0.48	0.379	0.448	0.435667	0.042145	0.029801
5(mg/mL)	0.559	0.528	0.367	0.484667	0.08416	0.05951
7.5(mg/mL)	0.445	0.402	0.311	0.386	0.055863	0.039501
10(mg/mL)	0.432	0.354	0.255	0.347	0.072429	0.051215

نمودار ۱– اثر سمیت سلولی عصاره گیاه *Vicia venullosa* در *غلظت‌های مختلف* بر درصد زنده مانی رده سلول‌های سرطانی Hela با استفاده از آزمون MTT.





تصویر-۱ :گروه کنترل، سلول‌های سرطانی *Hela* در محیط کشت *RPMI 1640 x10*



تصویر -۲: تأثیر عصاره گیاه *Vicia venullosa* با غلظت ۰/٦۲۵ mg/ml بر سلول‌های سرطانی Hela در محیط کشت x10 RPMI 1640

بحث

اثرات ضد سرطانی ترکیبات و عصاره های گیاهی از سال‌ها پیش مورد توجه قرار گرفته است. ترکیبات گیاهی از جمله مواد فنلی و فلاونوئیدی دارای خواص آنتی‌اکسیدانی بوده و می‌توانند با ایجاد سمیت سلولی از رشد و گسترش سلول‌های سرطانی جلوگیری کنند.(Galati G., & Brien P., 2004) در تحقیق حاضر از عصاره هیدروالکلی گیاه *Vicia venulosa* در غلظت‌های 0/156, 0/312, 0/625, (1/25, 2/5, 5, 7/5, 10 mg/mL) استفاده شد تا بر اثر بر رده سلول های سرطانی Hela میزان اثر سمیت سلولی عصاره فوق و تأثیر آن بر رشد سلول‌های سرطانی مورد بررسی قرار دهیم. در گذشته اثرات آنتی اکسیدانی گیاهان جنس *Vicia* توسط محققان مورد بررسی قرار گرفته است (Zhang, 2001)، همچنین رحیمی فرد و همکارانش (۲۰۱۰) اثرات سمیت سلولی اسانس و عصاره تعدادی از گیاهان دارویی را روی خط سلولی Hela مورد بررسی قرار دادند و نتیجه گرفتند که این گیاهان از رشد سلول‌های سرطانی جلوگیری می‌کند. همچنین تحقیقات مختلفی نیز در ارتباط با اثرات گوناگون گیاهان جنس *Vicia* spp. انجام گرفته که تحقیق ما در ادامه این نتایج انجام گرفته است. جمال الدین و همکارانش (۲۰۰٤) ترکیبات آنتی اکسیدانی متنوعی

چون آپی ژنین ، کوئرستین و کامفرول را از *Vicia sativa* جدا کردند و اثرات ضد التهابی و ضددردی عصاره الکلی این گیاه را گزارش کردند. موون و همکارانش (۲۰۰۶) نشان دادند که بعضی ترکیبات موجود در *Vicia faba* مانند دیادزین و جنیتسئین می‌توانند از متابولیسم اکسیداتیو جلوگیری کنند. ابراهیم زاده و همکاران (۲۰۰۹) طی بررسی ویژگی‌های آنتی اکسیدانی گیاه *Vicia canescence* در شرایط برون تنی نشان دادند که این گیاه دارای خواص آنتی اکسیدانی می‌باشد. اما در آزمایشات پیشین، اثرات ضدسرطانی گونه *Vicia venulosa* مورد بررسی قرار نگرفته بود. نتایج بدست آمده در این مطالعه نشان می‌دهد که عصاره گیاه *Vicia venulosa* در غلظت‌های گوناگون موجب کاهش رشد سلول‌های سرطانی شده و این اثر سمیت سلولی در غلظت‌های مختلف متفاوت بوده است.

References:

1- Ebrahimzadeh M.A , Nabavi S.M., Nabavi S.F., Eslami B.2009, Antioxidant activity of *Vicia* canescence. Pharmacologyonline 3: 688-694.
2- Galati G, Brien P, 2004, Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: significance for their chemo preventive and anticancer properties, free radical biology&medicine,; 17(3): 287-303.
3- Gamal-Eldeen, A. M., Kawashty,S. A., Ibrahim, L. F. Shabana, M. M. El-Negoumy S. I., 2004, Evaluation of antioxidant, anti-inflammatory, and antinociceptive properties of aerial parts of *Vicia sativa* and its flavonoids. Journal of Natural Remedies, 4(1): 81 – 96.
4- Kathiresan K., Boopathy N.S., Kavitha S. 2006,Costal vegetation- An underexplored source of anticancer drugs. Nat. Prod. Rad. 52: 115-119.
5- Kim, B.J., Lee, K.T., Moon, T.G., Kang, P., Lee, J.K., Kim, J.J., Rhee, J.C., 2009, How do we interpret an elevated carbohydrate antigen 19-9 level in asymptomatic subjects? Digestive and Liver Disease. 41(5); 364-369.
6- Larkin, T .1983, “Herbs Are Often More Toxic Than Magical”, FDA Consum, 17,4-11.
7- Moon Y.J., Wang X., Morris M.E., 2006., Dietary flavonoids: effects on xenobiotic and carcinogen metabolism. Toxicol In Vitro., 20: 187-210.
8- Pandey;G. and Madhuri S. 2006, Autochthonous herbal products in the treatment of cancer. Phytomedica. 7: 99-104.
9- Pinar R. 1998,To investigate knowledge of Turkish people about cancer. Cancer agenda, , 2, 66-73.
10- Rahimifard, N. Hajimehdipoor, H. Hedayati, M.H. Bagheri, O. Pishehvar, H. Ajani, Y. 2010, Islamic Azad University Food and Drug Control Laboratories [FDCLs], MOH and ME Department of Microbiology Pharmaceutical Sciences Branch J. Med. Plants; 9 (35): 88-92.
11- Saxe, T.G. 1987, Toxicity of medicinal herbal preparations. Am Fam Physician; 35:135–42.
12- Somkuwar A.P. 2003, Studies on anticancer effects of Ocimum sanctum and Withania somnifera on experimentally induced cancer in mice. Ph.D. thesis, J.N.K.V.V., Jabalpur, M.P.
13- Turgay S. Sar D. 2005,Turkistan, Premethod, 436-441.
14- Tyler, V.,1994, “Herbs of Choice: The Therapeutic Use Of Phytomedicinals”, New York, Haworth Press, 24-26.
15- Zhang X, Zhang L, Dong F, Gao J, Galbraith DW, Song CP. 2001, Hydrogen peroxide is involved in abscisic acid-induced stomatal closure in Vicia faba. Plant Physiol. 126(4):1438-48.