Applied Biology
Online ISSN: 2538-3434
Homepage: http://sjoapb.journal.qom-iau.ac.ir

Research article

Anticancer effect of digitalis nervosa hydroalcoholic extract on cervical cancer cell line (Hela)[1]

Nazila Ahmadzadeh MSc., Department of Biology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran. nazila.4a2z@gmail.com
Nstran Asghari Moghadam Assistant Professor, Department of Biology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran. moghadam_na91@yahoo.com
Zahra Keshtmand Assistant Professor, Department of Biology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran **(Corresponding author).** zkeshtmand2001@gmail.com

Abstract

Objective: Today, with the high prevalence of cancer, the need for drugs with fewer side effects and better therapeutic effects has been noticed by researchers, so that a large percentage of anti-cancer compounds are prepared from natural sources. The purpose of this study is to investigate the anticancer effects of digitalis nervosa hydroalcoholic extract on uterine cancer cell line (Hela).

Materials and methods: In this experimental study, the hydroalcoholic extract of the marigold plant was prepared. Then, Hela cancer cell line was treated with different concentrations of the extract (3.125, 6.25, 12.5, 25, 50 and 100 µg/ml) for 24 hours and the cytotoxicity of the extract was evaluated by MTT method. Finally, the expression level of Bax, Bcl2, P53 and CDH1 genes at 50% lethality concentration was investigated by Time-Real PCR method. Data were analyzed using SPSS software and one-way variance test.

Findings: According to the results of the MTT test, the hydroalcoholic extract of foxglove has a dose-dependent cytotoxic effect against the cell line, and the concentration of 50% lethality was determined to be 24.67 micrograms per milliliter. Also, at the concentration (24.67 µg/ml), the expression of apoptotic genes Bax, CDH1 and P53 increased and the expression of Bcl2 gene decreased compared to the reference gene.

1. **Received:** 2022/04/02 ; **Received in revised form:** 2022/05/05 ; **Accepted:** 2022/06/07 ; **Published online:** 2022/06/22

Cite this article: Ahmadzadeh, N., Asghari Moghadam, N. & Keshtmand, Z. (2022). Anticancer effect of digitalis nervosa hydroalcoholic extract on cervical cancer cell line (Hela). *Applied Biology*, 12(46), 21-36.

© the authors

Publisher: Qom Islamic Azad University

Conclusion: Thimble flower plant extract has cytotoxicity and apoptosis induction effect on Hela cancer cells.

Keywords: Foxglove, Apoptosis, Survival, MTT, Hela cell line, Hydroalcoholic extract, Cell line, Cervical cancer.

پیولوژی کاربردی
شاپا الکترونیکی: ۲۵۳۸-۳۴۳۴
Homepage: http://sjoapb.journal.qom-iau.ac.ir

مقاله پژوهشی

اثر ضدسرطانی عصاره هیدروالکلی گیاه گل انگشتانه (*Digitalis nervosa*) بر رده سلولی سرطان دهانه رحم (Hela)[1]

نازیلا احمدزاده | کارشناسی ارشد، گروه زیست‌شناسی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران. nazila.4a2z@gmail.com
نسترن اصغری مقدم | استادیار، گروه زیست‌شناسی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران. moghadam_na91@yahoo.com
زهرا کشتمند | استادیار، گروه زیست‌شناسی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران (**نویسنده مسئول**). zkeshtmand2001@gmail.com

چکیده

هدف: امروزه با شیوع زیاد سرطان، نیاز به داروهایی با عوارض جانبی کمتر و اثرات درمانی بهتر مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته است، به طوری که درصد زیادی از ترکیبات ضد سرطانی، از منابع طبیعی تهیه می‌شوند. هدف پژوهش حاضر بررسی اثرات ضدسرطانی عصاره هیدوالکلی گیاه گل انگشتانه (*Digitalis nervosa*) بر رده سلول سرطان رحم (Hela) می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، عصاره هیدروالکلی گیاه گل انگشتانه تهیه گردید. سپس، رده سلولی سرطانی Hela با غلظت‌های مختلف عصاره (۳/۱۲۵، ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکرگرم بر میلی‌لیتر) به مدت ۲۴ ساعت تیمار شد و سمیّت سلولی عصاره با روش MTT ارزیابی گردید. در نهایت، میزان بیان ژن‌های Bax، Bcl2، P53 و CDH1 در غلظت ۵۰ درصد کشندگی با روش PCR Time-Real مورد بررسی قرار گرفت. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS و آزمون واریانس یک‌طرفه، تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: با توجه به نتایج تست MTT عصاره هیدروالکلی گل انگشتانه دارای اثر سمیّت سلولی وابسته به دوز علیه رده سلولی می‌باشد و غلظت ۵۰ درصد کشندگی۲۴/۶۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر تعیین شد. همچنین در غلظت (۲۴/۶۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر) میزان بیان ژن‌های آپوپتوزی Bax، CDH1 و P53 افزایش یافته و میزان بیان ژن Bcl2 نسبت به ژن رفرنس کاهش نشان داد.

---

۱. **تاریخ دریافت:** ۱۴۰۱/۰۱/۱۲؛ **تاریخ بازنگری:** ۱۴۰۱/۰۲/۱۵؛ **تاریخ پذیرش:** ۱۴۰۱/۰۳/۱۷؛ **تاریخ انتشار:** ۱۴۰۱/۰۴/۰۱
استناد: احمدزاده، نازیلا؛ اصغری مقدم، نسترن؛ کشتمند، زهرا (۱۴۰۱). اثر ضدسرطانی عصاره هیدروالکلی گیاه گل انگشتانه (*Digitalis nervosa*) بر رده سلولی سرطان دهانه رحم (Hela). *پیولوژی کاربردی*، ۱۲(۴۶)، ۲۱-۳۶.
© نویسندگان **ناشر:** دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم

نتیجه‌گیری: عصاره گیاه گل انگشتانه دارای اثر سمیت سلولی و القاء آپوپتوز بر سلول‌های سرطانی Hela است.

کلیدواژه‌ها: گل انگشتانه، آپوپتوز، زنده مانی، MTT، رده سلولی Hela، عصاره هیدروالکلی، رده سلولی، سرطان دهانه رحم.

۱. مقدمه

سرطان گردن رحم پس از سرطان سینه، شایع‌ترین سرطان در زنان است. این سرطان بر اثر ابتلاء به ویروس پاپیلومای انسانی ایجاد و از طریق تماس جنسی با فرد مبتلاء، منتقل می‌شود (۱،۲). از آنجایی که بسیاری از داروهای شیمیایی دارای عوارض جانبی مختلف هستند و باعث اختلالات گوارشی و آسیب‌های اندام‌های مختلف می‌شوند (۳)، دانشمندان به دنبال یافتن داروهایی هستند که عوارض جانبی کمتری نسبت به داروهای شیمیایی داشته باشند، در این راستا گیاهان دارویی مورد توجه بسیار قرار گرفته‌اند. گیاهان دارویی به علت دارا بودن ترکیبات موثر با خاصیت‌های آنتی اکسیدانی یا همراه با ترکیب دارویی خاص، عوارض جانبی کمتری نسبت به داروهای شیمیایی دارند (۳،۴). بسیاری از گیاهان حاوی عواملی برای جلوگیری از سرطان هستند که می‌توانند اثرات خود را در مراحل مختلف شروع و رشد سلول‌های سرطانی، اعمال کنند. هدف اصلی در پیشگیری از سرطان توسط مواد طبیعی یا شیمیایی کُند کردن و یا مهار فرآیند سرطان‌زایی می‌باشد. این نگرش به طور هدفمند روی مسیرهای داخل سلولی غیرطبیعی که موجب عملکرد غیرطبیعی سلولی شده‌اند، متمرکز می‌باشد (۴).

القاء مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی، یکی از رویکردهای جذاب در درمان سرطان به‌شمار می‌رود. بنابراین، بیشتر مطالعات سال‌های اخیر، در جهت یافتن داروهای ضد سرطانی می‌باشند که بتواند آپوپتوز را در سلول‌های سرطانی القاء کند تا بدون ایجاد التهاب، سلول سرطانی فاگوسیته شده و در نهایت از بین رود (۵). مسیر مرگ سلولی می‌تواند شامل فعال‌سازی رویدادهای پروآپوپتوتیک در سلول باشد که نفوذپذیری غشاء اندامک میتوکندری توسط پروتئین bax و bak شروع شده و موجب آزادسازی سیتوکروم c از بین دو غشاء میتوکندری و نهایتاً فعال شدن کاسپاز ۹ و سپس کاسپاز ۳ می‌شود. علاوه‌بر این، پروتئین‌های bax و bcl2 با قرار گرفتن در سطح شبکه آندوپلاسمی میتوکندری و هسته، از کنار هم قرار گرفتن پروتئین‌های bax و bak جلوگیری کرده و فعالیت ضد آپوپتوزی نشان می‌دهند (۶).

با وجود درمان‌های شیمیایی فراوانی که برای سرطان وجود دارد، استفاده ار داروهای طبیعی با هزینه کمتر و از طرفی بازدهی بالاتر می‌تواند راهکار مناسبی برای نجات بیماران سرطانی باشد (۷). خاصیت ضدسرطانی و برخی دیگر از خواص عصاره‌های گیاهی از چندین سال قبل شناخته شده است و بازگشت مجدد فرآورده‌های طبیعی همچون گیاهان دارویی می‌تواند رویکرد مثبتی در کنترل و درمان طیف وسیعی از بیماری‌ها از جمله سرطان باشد (۸).

بررسی‌های اخیر نشان می‌دهد که امروزه بیش از شصت درصد از ترکیبات ضدسرطانی که برای درمان بیماران سرطانی کاربرد دارند، از منابع گیاهی، دریایی و میکروارگانیسم‌ها بدست می‌آید و گرایش عمومی جامعه به استفاده از داروها، درمان‌های گیاهی و به طور کلی فرآورده‌های طبیعی رو به افزایش بوده، به طوری که داروهای گیاهی سهم بزرگی از فرآورده‌های دارویی تجاری ساخته شده را به خود اختصاص داده‌اند (۹). گیاهان از زمان‌های بسیار قدیم برای درمان بیماری‌های گوناگون انسان مورد استفاده بوده‌اند (۱۰).

در سراسر جهان تلاش‌های زیادی برای کشف ترکیبات گوناگون زیستی غنی خوراکی و گیاهان دارویی به منظور شناسایی و معرفی ترکیبات ضدسرطان‌زایی گیاهی می‌شود. گیاهان حاوی مواد شیمیایی مهمی هستند که می‌توانند به عنوان یک درمان بالقوه برای بیماری‌های مختلف از جمله سرطان استفاده شوند، این مواد زیست فعال وابسته به گروه‌های گوناگون ترکیب‌های شیمیایی متفاوت مانند فنل‌ها، رنگدانه‌ها، آلیل سولفیدها، گلوکوزینولات‌ها، تانین‌ها، آنتوسیانین‌ها، فلاونوئیدها، استرول‌های گیاهی، بازدارنده‌های پروتئاز و استروژن‌های گیاهی هستند. بسیاری از این مواد بخشی از خواص ضدسرطان‌زایی خود را از راه فعال‌سازی سیستم ایمنی، تاثیر بر مسیر آپوپتوزی و یا حفاظت در مقابل بیماری‌های قلبی عروقی اعمال می‌کنند (۱۱).

گیاه گل انگشتانه از منابع مهم ترکیبات دارویی گلیکوزیدهای قلبی مانند دیگوکسین، دیژیتوکسین می‌باشد که در نارسایی‌هایی احتقانی قلب کاربرد درمانی دارند، دارای چندین گونه با ارزش است و تنها گونه بومی ایران گونه *(Digitalis nervosa)* است. تاکنون بیش از ۲۰۰ ترکیب که از ترکیبات مهم گلیکوزیدی بوده در گیاهان مختلف شناسایی‌شده است، اما مهم‌ترین آنها مانند دیگوکسین، دیژیتوکسین و انوع ژیتالیس‌ها و ژیتوکسین بیشتر در گونه‌های گل انگشتانه تولید می‌شوند (۱۲).

از آنجایی که سرطان یکی از مهم‌ترین عوامل مرگ‌ومیر در سرتاسر جهان است و هر ساله در دنیا ۱۰ میلیون نفر به سرطان مبتلاء می‌شوند که بیش از نیمی از آن‌ها می‌میرند، از دیرباز دستیابی به روش‌های مؤثر و قطعی درمان سرطان یکی از مهم‌ترین دغدغه‌های محققین بوده است. با توجه به مزایای عصاره هیدروالکلی گیاهان و تاثیر درمانی آن‌ها، هدف پژوهش حاضر، بررسی تاثیر عصاره هیدروالکلی گیاه گل انگشتانه بر درصد زنده‌مانی و بیان ژن‌های آپوپتوزی CDH1، P53، Bcl2 و Bax در رده سلول‌های سرطان دهانه رحم (Hela) می‌باشد.

۲. مواد و روش‌ها

۲-۱. تهیه عصاره هیدروالکلی گیاه گل انگشتانه

گیاه گل انگشتانه (با شماره هرباریوم D52) از بانک گیاهی مرکز ذخایر زیستی ایران تهیه شد. برای تهیه عصاره، گیاه را ابتدا در جریان هوا قرار داده، سپس در سایه کاملاً خشک و با آسیاب پودر گردید. از پودر تهیه شده برای عصاره‌گیری به روش سوکسله استفاده شد. بدین ترتیب که ۵۰ گرم از پودر گیاه گل انگشتانه به ۵۰۰ میلی لیتر حلال اتانول اضافه گردید. عصاره‌گیری به مدت ۱۲ ساعت صورت گرفت. پودر جامد بدست آمده توسط آب مقطر دو بار تقطیر به حجم رسانیده شد و عصاره تهیه شده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید (۱۳).

۲-۲. تهیه رده سلولی Hela

رده سلولی سرطان دهانه رحم(Hela) از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیست ایران تهیه شد.

۲-۳. بررسی اثر عصاره گیاه گل انگشتانه بر درصد زنده‌مانی رده سلولی Hela

سلول‌های Hela در محیط کشت RPMI ۱۶۴۰ حاوی ۱۰% سرم جنین گاوی (FBS) و ۱% آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین- پنی‌سیلین کشت داده شد و در انکوباتور با دمای ۳۷°C و ۵% CO2 انکوبه شدند. پس از تکثیر سلول‌های Hela، محیط کشت سلول‌ها به آرامی بیرون ریخته و با PBS شسته شد. برای جداسازی سلول‌ها از سطح فلاسک، تریپسین اضافه شد. پس از جداسازی سلول‌ها، مقداری محیط کشت با FBS برای خنثی کردن اثر تریپسین اضافه شد و پس از سانتریفیوژ (۱۲۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه) محیط فوقانی دور ریخته شد و محیط جدید اضافه شد. ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون حاصل حاوی 10^5 سلول به هر کدام از چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه اضافه شد. سلول‌ها در مجاورت غلظت‌های مختلف (۳/۱۲۵، ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکرگرم بر میلی لیتر) عصاره هیدروالکلی گیاه قرار گرفتند. همچنین کشت یک‌سری از سلول‌ها با تمامی شرایط، بدون حضور عصاره به عنوان کنترل در فاصله زمانی ۲۴ انجام شد. پس از ۲۴ ساعت از اضافه کردن عصاره به سلول‌ها، به هر چاهک ۲۰ میکرولیتر از محلول ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر MTT اضافه شد. پلیت‌ها به مدت ۴ ساعت انکوبه شدند و پس از طی زمان لازم، محیط کشت حاوی MTT به دقت خارج شد و به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر DMSO (مرک، آلمان) اضافه گردید تا فورمازان حاصل حل گردد. پس از ۱۰ دقیقه و تکان دادن پلیت‌ها با استفاده از تکان‌دهنده پلیت، جذب نوری در ۵۷۰ نانومتر توسط دستگاه خوانشگر الایزا (eknika Oraganon reader ELISA، هلند) اندازه‌گیری شد (۱۴).

درصد زنده‌مانی رده سلولی Hela تیمار شده با عصاره هیدروالکلی گیاه گل انگشتانه با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد:

$$\text{درصد زنده‌مانی} = \frac{\text{میانگین جذب نوری سلول‌های تیمار}}{\text{میانگین جذب کنترل منفی}} \times 100$$

در نهایت غلظتی که سبب مهار رشد سلولی تا میزان ۵۰ درصد می‌شود، به‌عنوان IC50 در نظر گرفته شد (۱۵).

۲-٤. ارزیابی بیان ژن‌ها با روش Real time

بعد از گذشت ۲۴ساعت، RNA رده سلولی Hela کنترل و تیمار شده با غلظت IC50 عصاره هیدروالکلی گیاه با استفاده از کیت Bioflux استخراج و جهت تأیید کمیّت و کیفیت RNA استخراج شده، از دستگاه اسپکتروفتومتری نانودراپ استفاده گردید. در این روش میزان یک میکرولیتر از RNA استخراج شده در طول موج‌های ۲۶۰/۲۸۰ و ۲۶۰/۲۳۰ بررسی شد. سنتز cDNA با استفاده از کیت Fermentase طبق پروتکل موجود انجام گردید. واکنش‌های Real-time PCR در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر به‌صورت تکرار سه‌تایی صورت گرفت. در هر واکنش ۱۰ میکرولیتر SYBR-Green PCR Master Mix، یک میکرولیتر (۱۵۰ نانومولار) از پرایمرها (جدول ۱)، ۱ میکرولیتر cDNA و مابقی آب مقطر ۲ بار تقطیر اضافه شد تا به حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر رسید. برنامه زمانی- گرمایی دستگاه در سه مرحله شامل: مرحله اول که منجر به واسرشت شدن مولکول‌های cDNA و فعال شدن آنزیم پلیمراز می‌شود، در ۹۵ درجه سانتی‌گراد، به مدت ۱۰ دقیقه و مرحله دوم ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه و در نهایت، ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه برای ۴۰ چرخه متوالی انجام شد. به‌منظور بررسی بیان ژن‌ها از پرایمرهای اختصاصی استفاده گردید (جدول ۱). با استفاده از روش ΔΔCT داده‌های حاصل از Real time PCR آنالیز شدند (۱۶).

جدول ۱ -توالی پرایمر مورد استفاده در ریل تایم

Gene	Primer sequence
P53	Forward:5'CAGCCAAGTCTGTGACTTGCACGTAC -3′ Revers: 5'- CTATGTCGAAAAGTGTTTCTGTCATC -3'
CDH1	Forward: 5’- GCAGAACTGTCCCTGTCCCAG -3 Revers: 5’- GAACAGCACGTACACAGCCCT -3’
Bcl2	Forward: 5'- ATTGGGAAGTTTCAAATCAGC-3′ Revers: 5'- CAGTCTACTTCCTCTGTGATGTTG-3'

Gene	Primer sequence
Bax	Forward: 5'- GAGCTGCAGAGGATGATTGC-3′ Revers: 5'- AAGTTGCCGTCAGAAAACATG-3'
b-actin	Forward: 5’- TCCTCCTGAGCGCAAGTAC-3’ Revers: 5’- CCTGCTTGCTGATCCACATCT-3’

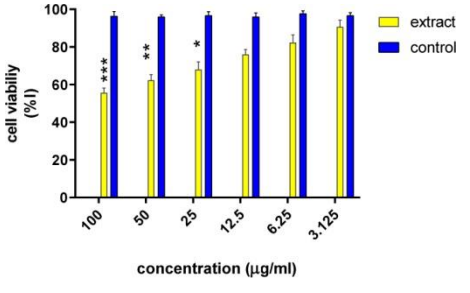
۲-۵. آنالیز آماری

به منظور تجزیه و تحلیل نتایج از نرم‌افزار SPSS 2، روش آماری آنالیز واریانس یک‌طرفه و تست توکی استفاده گردید. اطلاعات به صورت میانگین ± انحراف معیار نمایش و P<۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

۳. نتایج

۳-۱. بررسی درصد زیستی رده سلولی Hela تحت تاثیر عصاره هیدروالکلی گیاه گل انگشتانه

بررسی درصد زیستی رده سلولی Hela تحت تاثیر غلظت‌های مختلف عصاره هیدروالکلی گیاه با غلظت‌های مختلف ۳/۱۲۵، ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ میکروگرم بر میکرولیتر از عصاره هیدروالکلی گیاه با استفاده از تست MTT طی مدت ۲۴ ساعت انجام شد. نتایج حاصل از MTT نشان داد بیشترین تاثیر مهار رشد سلول‌های سرطانی مربوط به غلظت ۱۰۰میکروگرم بر میکرولیتر (P<۰/۰۰۱) و کمترین مربوط به ۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر بوده که از لحاظ آماری معنی‌دار بودند (P<۰/۰۵). غلظت ۵۰ درصد کشندگی عصاره گیاه ۲۴/۶۷ میکروگرم بر میکرولیتر تعیین شد.



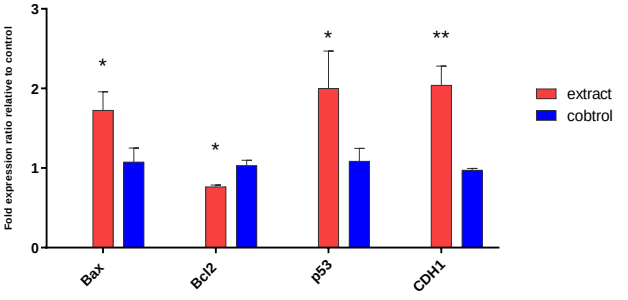
نمودار ۱- مقایسه غلظت‌های مختلف عصاره هیدروالکلی گیاه گل انگشتانه µ بر درصد زنده‌مانی سلول‌های سرطانی Hela پس از ۲٤ ساعت با روش رنگ‌سنجی MTT

نتایج براساس میانگین ± انحراف معیار: *: P < ۰/۰۵۰ در مقایسه با گروه کنترل

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

۳-۲. بررسی بیان ژن‌های آپوپتوزی

در این مطالعه جهت ارزیابی بیان ژن‌های CDH1، Bax، P53، Bcl2 و ß-actin در غلظت ۵۰ درصد کشندگی (IC50) در سلول‌های تیمار شده با عصاره هیدروالکلی گیاه، از روش Real Time PCR استفاده شد. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که بیان ژن‌های مورد بررسی در این تحقیق در گروه دریافت‌کننده عصاره گیاه در مقایسه با گروه کنترل، تغییراتی را نشان داده است. همچنین بیان ژن‌های P53، Bax و CDH1 در گروه‌های تیمار شده با عصاره هیدروالکلی گیاه غلظت (۲۴/۶۷ میکروگرم بر میکرولیتر) در مقایسه با ژن رفرنس کاهش داشته، در حالی‌که بیان ژن Bcl2 افزایش معناداری را نشان داد.



نمودار۲- مقایسه بیان ژن‌های P53، CDH1، Bax، Bcl2 و b-actin در سلول‌های تیمار شده با غلظت ۵۰ درصد کشندگی عصاره هیدروالکلی گیاه گل انگشتانه (۲٤/٦۷ میکروگرم بر میکرولیتر)

نتایج براساس میانگین ± انحراف معیار:

*: P < ۰/۰۵۰ در مقایسه با گروه کنترل **: P<۰/۰۱ در مقایسه با گروه کنترل

٤. بحث

گیاهان دارویی با سابقه طولانی در ایران، در درمان بیماری‌های مختلف استفاده می‌شوند. انسان متمدن امروزی با توجه به پیشرفت علم و تولید داروها و مواد شیمیایی به‌دلیل عوارض جانبی کمتر و بهره اقتصادی بیشتر و تمایل به استفاده از فرآورده‌های طبیعی در درمان بیماری‌ها، دوباره در دامن طبیعت به جستجوی گیاهان دارویی و سنّتی بازگشته است (۱۷).

تحقیقات مختلف نشان داده است که برخی از گیاهان دارویی دارای خواص ضد سرطانی هستند. هم‌اکنون فرآورده‌های متعددی با منشاء گیاهی به‌عنوان مهارکننده تکثیر سلولی در اشکال دارویی مختلف در بازار موجود است. از طرف دیگر، افزایش تعداد مبتلایان به سرطان در سطح

جهان، سرطان را به‌عنوان یک معضل بهداشتی در سطح جهانی مطرح نموده و مبارزه با آن را جزء اولویت‌های بهداشتی درمانی قرار داده و تحقیقات گسترده‌ای جهت دستیابی به داروهای ضد سرطان از منابع گیاهی صورت گرفته است (۱۸).

در این پژوهش تاثیر عصاره هیدروالکلی گیاه بومی گل انگشتان بر قدرت زنده‌مانی و بیان ژن‌های P53، Bax، Bcl2 و CDH1 در رده سلول دهانه رحم (Hela) بررسی شد. همچنین غلظت ۵۰ درصدکشندگی برای عصاره گیاه ۲۴/۶۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر در ۲۴ ساعت تعیین شد. نتایج بررسی‌های حاصل از آزمون MTT نشان داد که عصاره هیدروالکلی گیاه می‌توانند به صورت وابسته به غلظت، منجر به کاهش قدرت زنده‌مانی سلول‌ها شوند. موضوع دیگری که در این پژوهش مورد بررسی قرار گرفت، بیان برخی ژن‌های آپوپتوزی P53، Bax، Bcl2 و CDH1 در سلول‌های سرطانی رده Hela تیمار شده با عصاره گیاه بود و بیان ژن‌ها در مقایسه با گروه کنترل تغییراتی را نشان داد.

قائد امینی و همکاران با بررسی اثر عصاره گیاه مورینگا اولیفرا بر سرطان ملانوما نشان دادند که حجم توده توسط دوزهای مختلف عصاره در دو هفته، کاهش معنی‌داری نشان داد. نتایج نشان‌دهنده تاثیر مثبت مواد آنتی اکسیدانی موجود در برگ مورینگا الیفرا در کاهش زنده‌مانی سلول‌های سرطانی و حجم تومور در موش می‌باشد (۷).

قاضی و تقی در تحقیقی نشان دادند که اثرات ضدسرطانی عصاره گیاه *P.alkekengi* و ویتکسین علیه سرطان پستان، از طریق القاء مسیر اتوفاژی، باعث درمان سرطان می‌شود (۱۹).

ناصری و همکاران در پژوهشی با عنوان بررسی اثر عصاره متانولی برگ گیاه کاکوتی کوهی (*Ziziphora L.tenuior*) بر سلول‌های Hela با تست MTT، اثر سمّیت عصاره را به صورت وابسته به دوز و زمان، بر رده سلول سرطانی گزارش دادند (۲۰).

بلوچی و همکاران با بررسی اثرات عصاره هیدروالکلی مورینگا بر سرطان روده بزرگ دریافتند که عصاره *مورینگا* با فلاونوئیدهای مختلف، به عنوان یک منبع گیاهی مفید در درمان سرطان است (۲۱).

اعظمی و همکاران در تحقیقی اثرات ضدسرطانی و ایمونومدولاتوری شیره انجیر **بر** پنج رده سلولی سرطانی شامل رده سلولی سرطان مثانه (Fen)، رده سلولی لوسمی میلوئیدی (K562)، سرطان سرویکس (Hela)، لوسمی لنفوئیدی (Jurkat) و لنفوم سلول‌های B (Raji) را مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد که شیره انجیر دارای اثرات سیتوتوکسیک بر رده‌های سلولی سرطانی مورد مطالعه می‌باشد (۴).

همچنین سید علیپور و همکاران گزارش کردند که عصاره اتانولی برگ گیاه پسته وحشی دارای

اثر مهاری بر رده سلولی Hela و MCF-7 است (۲۲).

جوادی و همکاران نیز در پژوهشی اثرات ضدسرطانی عصاره هیدروالکلی گل انگشتانه (Digitalis nevrosa) بر رده سلولی سرطان پستان MCF-7 را گزارش دادند. در این تحقیق اثر عصاره هیدروالکلی گل انگشتانه بر میزان بقای سلولی و بیان ژن‌های P53، Bax، Bcl2 و CDH1 در سلول‌های سرطانی پستان رده MDA-7 نشان داده شد (۱۵).

طباطبایی و همکاران در پژوهشی تأثیر عصاره هیدروالکلی اندام‌های هوایی گل میمونی شیاردار بر رده سلولی MCF-7 و ارزیابی بیان ژن‌های Bax و KAI1 را مورد ارزیابی قرار دادند. نتایج این مطالعه نشان داد که عصاره هیدروالکلی اندام‌های هوایی گل میمونی شیاردار دارای اثرات سیتوتوکسیک بر سلول‌های سرطانی پستان است و در این راستا می‌تواند سبب القای آپوپتوز وابسته به ژن Bax در سلول‌های سرطانی پستان در محیط کشت سلولی گردد (۲۳).

رضاییان قراگزلو در پژوهشی اثرات ضد سرطانی عصاره‌های آبی و گیاهی ریشه شیرین‌بیان بر رده سلولی سرطان سرطان (HepG2) را نشان دادند. در این پژوهش سمّیت سلولی عصاره‌های مورد مطالعه به صورت وابسته به دوز بوده و بیان ژن‌های Bax و Bcl2 در سلول‌های سرطانی تیمار با عصاره الکلی شیرین‌بیان، نسبت به گروه کنترل تغییرات معناداری را نشان داد (۲۴).

پناهی کوخدان و همکاران در پژوهشی گزارش دادند که عصاره هیدروالکلی سنبله‌ای کرکدار و فراکشن الکالوئیدی به صورت وابسته به دوز، تکثیر سلول‌های سرطانی کلورکتال HT-29 را متوقف کرده و سلول‌ها را وارد فاز آپوپتوتیک می‌کند(۲۵).

نتایج بررسی اثر عصاره اتانولی برگ و گل *گیاه بومادران* بر بقای سه رده سلول سرطانی Hela، CAOV، MCF-7 بیانگر سمّیت انتخابی عصاره گیاه بومادران بر سلول‌های سرطانی سه رده مختلف بوده است(۲۶).

با توجه به نتایج حاصل از مطالعات مختلف، بررسی تاثیر عصاره هیدروالکلی گیاه بر رده سلولی سرطانی نشان داد که عصاره گیاه می‌تواند با آسیب به DNA و مرگ سلولی، رشد سلول‌های سرطانی را را مهار کند. مطالعات نشان داده است که اکثر محققان به دنبال یافتن ترکیبات ضدسرطانی که اثرات خود را از طریق آپوپتوز نشان می‌دهند، می‌باشند. همچنین عصاره هیدروالکلی گیاه می‌تواند در رده‌های سلولی سرطانی، آپوپتوز را القاء کنند. مسیر مرگ سلولی می‌تواند شامل فعال‌سازی رویدادهای پروآپوپتوتیك اندامك میتوکندری در سلول باشد که با آزادسازی سیتوکروم c از آن آغاز

می‌شود و در افزایش بیان مولکول پروتئینی کاسپاز و القاء مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی نقش دارند(۲۷).

مطالعات نشان داده است ترکیبات گیاهی با خاصیت ضد سرطانی بر زنجیره تنفسی میتوکندری اثرگذار می‌باشد که باعث آزاد شدن فاکتورهای القاءکننده آپوپتوزیس می‌گردد. این فاکتورها ممکن است باعث قطعه قطعه شدن DNA در هسته سلول شود. افزایش تولید آنزیم‌های پروتئازی نظیر کاسپاز ۳،۸ و ۹ منجر به تغییرات مختلفی در سلول به خصوص در متابولیسم سلول می‌گردد. در واقع آنزیم‌های پروتئازی وظایف مهمی را در مراحل اولیه آپوپتوز ایفا می‌کنند (۲۴،۲۷).

احتمالاً در تحقیق حاضر نیز سمّیت با عصاره گل انگشتانه باعث تحریك فعالیت آنزیم‌های پروتئازی و افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن شده و از طریق فعال کردن کاسپازها و تاثیر بر بیان ژن‌های آپوپتوزی باعث آسیب شدید به سلول می‌شوند.

۵. نتیجه‌گیری

گیاهان دارویی می‌توانند یکی از پایه‌های اصلی کنترل و درمان سرطان باشند و به نظر می‌رسد معرفی داروهای مورد استفاده در طب سنّتی به ویژه گیاهان دارویی سرآغاز مناسبی برای تدوین پروژه‌های تحقیقاتی جهت دستیابی به داروهای نوین باشد. در این پژوهش اثر عصاره هیدروالکلی گیاه گل انگشتانه بر میزان بقای سلول‌ها و همچنین بیان برخی ژن‌ها در رده سلول سرطان دهانه رحم (Hela) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که عصاره هیدروالکلی گیاه گل انگشتانه به صورت وابسته به غلظت، زیست‌پذیری سلول‌ها را کاهش داده، همچنین نتایج تغییرات بیان ژن‌های Bcl2, Bax CDH1 وP53 در غلظت IC50 نشان داد که عصاره هیدروالکلی گیاه، بیان ژن آپوپتوزی را تحت تاثیر قرار داده و دارای اثر ضدسرطانی بوده که می‌تواند باعث مهار رشد این سلول شود. بنابراین، با توجه به بومی بودن این‌گونه گیاه، سازگاری آنها با شرایط اقلیمی مناطق مختلف ایران، پرورش آسان و کم هزینه، وجود انواع متعدد فلاونوئیدهای گیاهی در آن، انجام مطالعات بیشتر روی خواص ضدسرطانی این گیاه جهت استفاده و یا به همراه داروهای شیمیایی در پروسه درمان، پیشنهاد می‌شوند.

٦. تقدیر و تشکر

پژوهش حاضر مستخرج از پایان‌نامه کارشناسی ارشد با کد:
۱۰۱۲۹۰۰۶۷۴۶۰۴۲۹۱۳۹۹۱۶۲۲۹۷۱۶۵ می‌باشد که با حمایت دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی اجرا شده است.

References

1. Cohen PA, Jhingran A, Oaknin A &Denny L. Cervical cancer. *The Lancet*. 2019; 393(10167): 169-182.
2. Zhang Z, Zhang D, Xiao BB, Zhang R, Bai HH, Dong HY & et al. Primary study on the relationship between high-risk HPV infection and vaginal cervical microbiota. *Zhonghua fu Chan ke za zhi*. 2018; 53(7): 471-480.
3. Abdalan S, Baghbani-Arani F & Sadat Shandiz SA. Evaluation of Anticancer Effect of Aqueous and Hydroalcoholic Extracts of *Quercusin Fectoria* Leaf against Colon Cancer HT29 Cell Line. *Journal of Arak University Medcine Science*. 2018; 21(4): 48-57.
4. Shandiz SAS, Farasati S, Saeedi B, Baghbani-Arani F, Akbari Asl E, Keshavarz-Pakseresht B & et al. Up regulation of KAI1 gene expression and apoptosis effect of imatinib mesylate in gastric adenocarcinoma (AGS) cell line. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*. 2016; 6(2): 120-125.
5. Vafaeinezhad Z, Kazemi Z, Mirmoeini M, Piroti H, Sadeghian E, Mohammad Ali-Vajari M & et al. Trends in cervical cancer incidence in Iran according to national cancer registry. *Journal of Mazandaran University of Medical Sciences*. 2018; 28(161): 108-114. [in persian]
6. Shirjang S, Mansoori B, Asghari S, Duijf PH, Mohammadi A, Gjerstorff M & Baradaran B. MicroRNAs in cancer cell death pathways: Apoptosis and necroptosis. *Free Radical Biology and Medicine.* 2019*;*139: 1-15.
7. Ghaed Amini N, Fazilati M, Habib-Allahi S, Nazem HA & Hejazi SH. Evaluation of the Effect of *Moringa Olifera* Hydroalcoholic Extract in a Model of B16F10- Induced Mouse Melanoma Cancer. *Experimental animal Biology*. 2022; 10(3): 99-111.
8. Aboeepoor S, Dehghani Ashkezari M, Aboee-Mehrizi F, Haghiralsadat BF & Nikoonahad Lotfabadi N. Designing and Characterizing Nano-carriers Containing *Nepeta Persica* Extract and Their Effect on Bone Cancer. *Internal Medicine Today.* 2020*;* 26 (2): 142-155. [in persian]
9. Sofalian O, Zare N, Latifi S, Hasanpour Reyhani H & Motallebinia S. Evaluation of anticancer effect of *Mentha longifolia* and *Artemisia persica* hydro -alcoholic extracts against human gastric cancer cells (AGS).*Genetic Engineering and Biosafety Journal.* 2021*;* 9(1): 1-10.
10. Badgujar SB, Patel VV, Bandivdekar AH & Mahajan RT. Traditional Uses, Phytochemistry and Pharmacology of Ficus Carica: A Review. *Pharmaceutical Biology*. 2014; 52(11): 1487-1503.
11. Al-Sheddi ES, Farshori NN, Al-Oqail MM, Al-Massarani SM, Saquib Q, Wahab R & et al. Anticancer potential of green synthesized silver nanoparticles using extract of *Nepeta deflersiana* against human cervical cancer cells (Hela). *Bioinorganic Chemistry and Applications*. 2018. **DOI:** 10.1155/2018/9390784
12. Maroufi A, Salimi V & Majdi M. 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*. 2017; 25(1): 97-110.

13. Chegini S, Tafvizi F & Noorbazargan H. Effect of Valeriana Sysimberifolia Extract on VEGF Expression in A549 Cell Line. *Journal of Babol University of Medical Sciences*. 2020; 22(1): 222-228. [in persian]
14. Khatami M & Pourseyedi S. *Phoenix dactylifera (date palm)* pit aqueous extract mediated novel route for synthesis high stable silver nanoparticles with high antifungal and antibacterial activity. *IET nanobiotechnology*. 2015; 9(4): 184-190.
15. Javadi F, Asgharei Moghaadm N & Keshtmand Z. Anti-cancer effects of hydroalcoholic extract of *Digitalis nervosa* in breast cancer (MCF7) cell line. *Plant and biothenology of Iran journal.* 2022; 11(1): 21-31. [in persian]
16. Keshtmand Z, Akbaribazm M, Bagheri Y & Oliaei R. 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*. 2021; 53(1): e13908.
17. Mousavi SM, Montazeri A, Mohagheghi MA, Jarrahi AM, Harirchi I, Najafi M & et al. Breast Cancer in Iran: An Epidemiological Review. *Breast Journal*. 2007; 13(4): 383-391.
18. Azami H, Malek-Hosseini S, Mojahed Taghi M, Zareinejad M & Amirghofran Z. Antitumor Activity and Immunomodulatory Effects of *Ficus carica* Latex. *Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences.* 2021; 28(12): 3288-3299. [in persian]
19. Ghazy E & Taghi HS. The autophagy-inducing mechanisms of vitexin, cinobufacini, and physalis alkekengi hydroalcoholic extract against breast cancer in vitro and in vivo. *Journal of gastrointestinal cancer*. 2021: 1-5.
20. Nasiri Tarzejani E & Nasri S. Cytotoxicity of methanol extracts of *Ziziphora tenuior.L* on Hela cell line by MTT assay. *New Cellular and Molecular Biotechnology Journa*. 2020; 10(38): 69-82. [in persian]
21. Balouchi A, Fazilati M, Habibollahi S, Nazem H & Hejazi S. The effect of hydroalcoholic extract of *Moringa oleifera* leaves in a mouse model of colon cancer induced by CACO2 cell line. *Journal of jiroft university of medical sciences*. 2021; 8(1): 574-585. [in persian]
22. Seyedalipour B, Pourakbar E & Taravati A. The Cytotoxic Effect of Ethanolic Extract of Pistacia Khinjuk Leaf on Hela and MCF-7 Cancerous Cell Lines. *The Journal of Rafsanjan University of Medical Sciences.* 2016; 14(11): 939- 952. [in persian]
23. Tabatabaee M, Ahmadi R & Kassaee M. The Cytotoxic Effects of Hydroalcoholic Extract of Aerial Parts of Scrophularia striata on MCF-7 Cell Line and Evaluation of BAX and KAI1 Genes Expression. *Qom University of Medical Sciences Journal*. 2018; 12(9): 38-46. [in persian]
24. Rezaiyan Gharagozlu N, Sadat Shandiz SA & Baghbani-Arani F. Anti-cancer effects of aqueous and alcoholic licorice root extracts on human hepatocarcinoma (HepG2) cell line. *Medical Journal of Tabriz University of Medical Sciences.* 2018; 40(2): 40-49. [in persian]

25. Panahi Kokhdan E, Sadeghi H, Ghafoori H, Sadeghi H, Danaei N, Salaminia S & et al. Apoptotic Effect of the Stachys pilifera Bent Plant Extracts on Colorectal Cancer Cell Line (HT- 29). *Armaghane danesh Journal.* 2019; 24(1): 17-30. [in persian]
26. Khosravi F, Moshtaghian J & Zarkesh SH.The effect of ethanolic extract of Achilleawilhelmsii on the survival of three cancer cell lines in vitro culture. *Journal of Cell & Tissue*. 2021; 11(4): 302-311.
27. Behboodi S, Baghbani-Arani F, Abdalan S & Sadat Shandiz SA. Green engineered biomolecule-capped silver nanoparticles fabricated from *Cichorium intybus* extract: in vitro assessment on apoptosis properties toward human breast cancer (MCF-7) cells. *Biological trace element research*. 2019; 187(2): 392-402.