بررسی اثر سمیت سلولی عصاره گیاه کما (*Ferula gummosa*) بر روی رده سلول سرطانی MCF7

بهمن اسلامی جدیدی، عباسعلی دهپوری، فرخنده نعمتی*، بشری رضایی

دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قائمشهر، گروه زیست‌شناسی، مرکز تحقیقات سلولی ـ مولکولی، قائمشهر، ایران

مسئول مکاتبات: farkhondnemati@gmail.com

تاریخ دریافت: ۹۱/۸/۱۵ تاریخ پذیرش:۹۲/۳/۱۱

چکیده

سرطان پستان دومین سرطان شایع در زنان می‌باشد. سرطان پستان یک مشکل اپیدمیولوژیک جهانی است و درمان‌های امروزی آن اغلب چندان مؤثر نبوده و با اثرات جانبی نا مطلوب همراه هستند. بنابراین تلاش برای تهیه داروهای مؤثرتر با سمیت کمتر ضروری می‌باشد. کما یا باریجه با نام علمی *Ferula gummosa* دارای خواص ضدسرطانی، ضد اسپاسم، ضدتشنج، مقوی معده، ترمیم‌کننده زخم‌های سطحی، شیر افزا، ضدعفونی کننده و ملین می‌باشد. با این حال تأثیرات آنتی توموری آن بر روی رده سلولی پستان انجام نشده است. لذا در این مطالعه اثر سمیت سلولی عصاره اتانولی آن مورد بررسی قرار گرفته است. برای بررسی اثرات مهاری عصاره اتانولی *F. gummosa* بر روی رشد سلولی از رده سلولی MCF7 استفاده شد که در محیط RPMI حاوی سرم جنین گاو و آنتی‌بیوتیک کشت داده شدند. سپس سلول‌ها با رقت‌های مختلف عصاره اتانولی *F. gummosa* (۰/۱۵۶، ۰/۳۱۲، ۰/۶۲۵، ۱/۲۵، ۲/۵، ۵، ۷/۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) به مدت ۷۲ ساعت تیمار شدند و میزان زنده بودن سلول‌ها با روش MTT تعیین گردید. نتایج نشان می‌دهد عصاره اتانولی گیاه *F. gummosa* اثر سمیت سلولی معنا داری بر روی رده سلولی MCF7 در غلظت‌های ۰/۶۲۵ mg/ml، ۱/۲۵، ۲/۵، ۵، ۷/۵ و۱۰ بعد از ۷۲ ساعت در مقابل گروه کنترل داشته و IC50 برای ۱/۷۶۵ mg/ml عصاره‌ی *F. gummosa* اندازه‌گیری شده است. نتایج پیشنهاد می‌کند که عصاره اتانولی *F. gummosa* دارای اثر مهاری بر روی رشد سلولی MCF7 است.

کلمات کلیدی: سمیت سلولی، عصاره اتانولی، *Ferula gummosa* ، رده سلولی MCF7

مقدمه

سرطان پستان شایع‌ترین سرطان در زنان ۴۰ تا ٤٤ ساله می‌باشد. این سرطان مسئول ۳۳ درصد تمام سرطان‌های زنان و ۲۰ درصد مرگ ناشی از سرطان می‌باشد. شیوع سرطان سینه در کشورهای در حال توسعه در حال افزایش است و در بسیاری از نقاط دنیا به صورت شایع‌ترین بیماری بدخیم در بین زنان در آمده است. به طوری که آمار جهانی نشانگر ابتلای سالانه ۱/۵ میلیون نفر در سراسر جهان بوده و میزان مرگ و میر ناشی از آن را سالانه ۵۰۲۰۰۰ نفر گزارش کرده‌اند. سرطان پستان در ایران کمتر از نقاط دیگر آسیا بوده در حالی که در طی دهه‌ی اخیر شیوع این سرطان در زنان ایرانی رشد بالایی داشته است که نگران‌کننده می‌باشد. علاوه بر آن در زنان ایرانی حد اکثر سن ابتلا به سرطان پستان حدود یک دهه کمتر از زنان در کشورهای پیشرفته می‌باشد. سن و جنس مهم‌ترین متغیرهای دخیل در بروز سرطان سینه هستند. امروزه مشخص شده است که نرخ مرگ و میر در مردان به دلیل تشخیص دیرتر بیماری در مراحل پیشرفته‌تر، بالاتر از زنان است [۸].

داروهای گیاهی در تمام مناطق در حال توسعه به طور گسترده استفاده می‌شوند. بر خلاف استفاده زیاد، اطلاعات کمی در مورد سلامت و کارایی درمان‌های گیاهی وجود دارد.نشان داده شده است که برخی از داروهای گیاهی فعالیت ضد سرطانی دارند. کمبود شواهد علمی در ارتباط

با مسیرهای فعالیت گیاهان دارویی استفاده بالینی آنها را کاهش می‌دهند [۲، ٤]. کما یا باریجه با نام علمی *Ferula gummosa* متعلق به خانواده Apiaceae می‌باشد. این گیاه از گیاهان مهم مرتعی، دارویی و صنعتی می‌باشد که در مناطق کوهستانی و ییلاقی ایران بویژه البرز مرکزی می‌روید. بیشترین میزان بهره‌برداری از این گیاه در استان‌های سمنان، خراسان و تهران انجام می‌شود. از اثرات دارویی آن می‌توان به اثرات ضد اسپاسم، اکسپکتورانت و کارمیناتیو نام برد. خواص درمانی آن شامل اثرات نیروبخش، ضد تشنج، دفع درد معده، مقوی معده و ترمیم کننده زخم‌های سطحی می‌باشد. همچنین اثرات شیر افزا، ضدعفونی کننده، مقوی رحم و ملین آن گزارش شده است. باریجه در طب سنتی ایران به صورت خوراکی به عنوان مقوی معده، ضد نزله و ضد تشنج معرفی شده است [۷]. MCF7 رده سلولی سرطان پستان انسان است که اولین بار در سال ۱۹۷۰ از بافت سرطانی بدخیم پستان یک زن ٦۹ ساله قفقازی که سرطان پستان در وی متاستاز کرده بود جدا شد [۵]. از آن زمان به بعد از این رده سلولی به عنوان مدل مناسب برای مطالعه سرطان استفاده می‌شود. بر طبق مطالعات انجام شده، گونه‌های مختلف *Ferula* اثرات ضدسرطانی دارند. همچنین ترکیبات ضدسرطانی مؤثری از *F. gummosa* جداسازی شده‌اند که از جمله می‌توان به کومارین‌ها، فنول‌ها و فلاونوییدها اشاره کرد که این ترکیبات از جمله متابولیت-های ثانویه موجود در گیاهان هستند که به علت ساختار پیچیده و فعالیت فیزیولوژیکی با ارزش توجه بسیاری را به خود جلب کرده‌اند [٦]. بنابراین، این گیاه داوطلب مناسبی برای بررسی اثرات ضدتوموری و جداسازی ترکیبات مؤثره می‌باشد. از آنجایی که هیچ گونه گزارشی در رابطه با تأثیر ضدسرطانی عصاره اتانولی *F. gummosa* بر روی رده سلولی سرطان پستان (MCF7) انجام نشد، بر آن شدیم تا در مطالعه حاضر فعالیت سمیت سلولی عصاره اتانولی *Ferula gummosa* را بر روی رده سلولی MCF7 مورد بررسی قرار دهیم.

مواد و روش کار

جمع‌آوری گیاه: گیاه کما یا باریجه در اواخر اردیبهشت ۱۳۹۱ از منطقه کجور از توابع شهرستان نوشهر تهیه و جمع آوری شد. بخش‌های گیاه در سایه در مجاورت هوا خشک شده و سپس پودر شدند و برای تهیه عصاره استفاده شده است.

استخراج عصاره اتانولی: جهت استخراج عصاره اتانولی از اتانول ۷۰ درجه و از روش سوکسله استفاده شد. حلال اتانول با استفاده از روتاری و با روش تقطیر در خلا خارج گردید. این عصاره به عنوان عصاره خالص در نظر گرفته شد و از آن غلظت‌های مختلف تهیه گردید.

جداسازی سلول‌های خونی: برای جداسازی سلول‌های خونی ابتدا ۲ سی‌سی فایکول به درون لوله فالکون ۱۵ سی-سی منتقل می‌کنیم. سپس ۳ سی‌سی از خون محیطی گرفته شده را قطره قطره و به آرامی به فایکول درون فالکون اضافه می‌کنیم و با دور ۱۵۰۰، به مدت ۲۰ دقیقه سانتریوفوژ می‌نماییم. سپس لایه ابری‌شکل از سلول‌های تک هسته‌ای (لنفوسیت و مونوسیت) را که بین دو لایه سلول‌های خونی در پایین و پلاسما در بالا تشکیل شده است را جدا و به درون فالکونی جدید منتقل می‌نماییم. از آنجایی که فایکول سمی است، توسط RPMI حجم لوله فالکون را به ۷ سی-سی می‌رسانیم و مجددا با دور ۱۵۰۰، به مدت ۷ دقیقه ساتریوفوژ می‌نماییم تا سلول‌های خونی جدا و ته نشین گردند. سپس سلول‌ها را به تعداد مناسب در محیط کشت RPMI رسوسپاند می‌کنیم.

رده سلولی: رده سلولی مورد استفاده در این تحقیق از بانک سلولی انستیتو پاستور تهران، ایران خریداری شد. سپس سلول‌ها در محیط کشت مایع RPMI1640 که

همراه با۱۰ درصد سرم جنین گاو و ۱۰۰ U/ml پنی‌سیلسن و ۱۰۰ mg/ml استرپتومایسین بود، در دمای ۳۷ °c و در اتمسفر حاوی ۵ درصد CO_2 و ۹۵ درصد رطوبت و در فلاسک‌های استریل کشت داده شدند.

آزمون MTT: برای اندازه‌گیری اثرات سمیت سلولی عصاره اتانولی گیاه *F. gummosa* از آزمون MTT استفاده شد [٦]. در این روش ملح ۳- (٤ و ٥- دی متیل تیازول ۲- ایل)- ۲ و ٥- دی فنیل تترازولیوم بروماید و یا به اختصار MTT که زرد رنگ است، توسط آنزیم‌های دهیدروژناز میتوکندری سلول‌های فعال به ترکیب غیر محلول و ارغوانی فورمازان تبدیل می‌شود. جذب نوری این ترکیب پس از حل شدن در DMSO، به کمک دستگاه الیزا و در طول موج معین قابل اندازه‌گیری است.

بررسی سمیت سلولی عصاره اتانولی *Ferula gummosa* با استفاده از آزمون MTT: سلول‌ها در پلیت‌های ۹٦ خانه به تعداد ۱۰۰۰۰ سلول در هر چاهک و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد همراه با ٥ درصد CO_2 و ۹٥ درصد رطوبت برای ۲٤ ساعت کشت داده شدند. سپس سلول‌ها با غلظت‌های مختلف از *Ferula gummosa*، شامل ۰/۱٥٦ mg/ml، ۰/۳۱۲، ۰/٦۲٥، ۱/۲٥، ۲/٥، ٥، ۷/٥ و ۱۰ به مدت ۷۲ ساعت تیمار شدند. پس از این مدت به هر چاهک ۲۰ میکرولیتر محلول MTT (٥ mg/ml) اضافه گشت. سپس پلیت‌ها به مدت ٤ ساعت در دمای ۳۷ °c و ٥ درصد CO_2 و ۹٥ درصد رطوبت انکوبه شدند. بعد از گذشت ٤ ساعت پلیت‌ها از انکوباتور خارج گشته، محتویات رویی آنها دور ریخته شده، به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر از محلول DMSO اضافه شد تا فورمازان حاصل حل گردد. پلیت‌ها به مدت ۱۰ دقیقه بر روی دستگاه تکان دهنده قرار داده شده و سپس جذب نوری فورمازان در ٤۹۲ نانومتر با استفاده از دستگاه خوانشگر پلیت خوانده شد. درصد حیات سلولی با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید.

$$\%OD = \frac{OD\text{ بلانک} - OD\text{چاهک های تحت تاثیر عصاره}}{OD\text{کنترل} - OD\text{بلانک}} \times 100$$

در فرمول فوق OD بلانک، چگالی نوری چاهک‌های بدون سلول و تنها حاوی DMSO است و OD کنترل چگالی چاهک‌های حاوی سلول است که فاقد ترکیبات مورد آزمایش می‌باشد. غلظتی از ترکیب مورد بررسی که درصد حیات سلولی را به نصف کاهش می‌دهد به عنوان IC50 در نظر گرفته شد [۸].

آنالیز آماری: نتایج به صورت میانگین ± خطای معیار بیان شده‌اند. اختلاف بین مقادیر بدست آمده از آزمایش‌ها با استفاده از Student□s t test بررسی شد. در شرایطی که مقدار $p\leq 0.05$ بود، اختلاف میانگین‌ها معنادار در نظر گرفته شد. میزان IC50 از طریق رگرسیون خطی محاسبه و کلیه کارهای آماری با نرم‌افزار Exel انجام شد.

نتایج

سمیت سلولی عصاره اتانولی *Ferula gummosa* بر روی رده سلولی MCF7: نتایج سمیت سلولی غلظت‌های مختلف عصاره اتانولی *F. gummosa* بر روی رده سلولی MCF7 به صورت جدول در جدول ۱ و به صورت گراف در نمودار ۱ نشان داده شده است. لازم به ذکر است که اثر هر غلظت از عصاره بر روی رده سلولی MCF7 در سه آزمایش مستقل از یکدیگر تحت بررسی قرار گرفت، از این رو اعداد درج شده در جدول، میانگین درصد پاسخ‌های بدست آمده در مهار رشد سلول برای سه بار تکرار مستقل می‌باشد (Mean ± SEM).

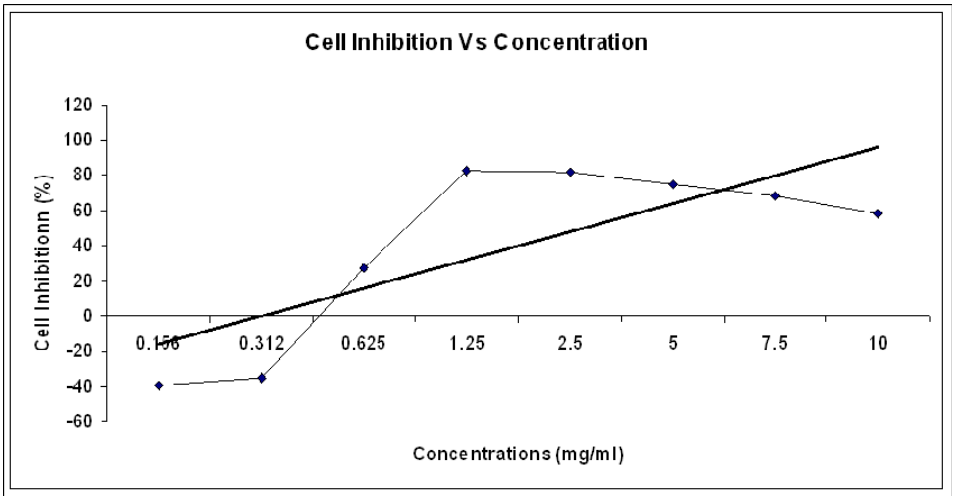
جدول ۱ـ اثر غلظت‌های مختلف عصاره *Ferula gummosa* (ستون اول از چپ) بر روی میزان جذب نوری سلول‌های MCF7 (ستون دوم از چپ) بر اساس روش MTT در مقایسه با گروه کنترل

غلظت عصاره *Ferula gummosa*	Absorbance	inhibition ٪	IC50 mg/ml
0.156	0.291625±0.032323	-39.0531	
0.312	0.275341±0.011287	-34.7104	
0.625	0.152381±0.008875	27.26982	
1.25	0.046333±0.007956**	82.22	1.765
2.5	0.045065±0.004186*	82.08106	
5	0.058±0.001041*	75.31361	
7.5	0.07±0.006227	68.62834	
10	0.091964±0.003716*	58.64409	
Control	0.216613±0.033343		

هر عدد بیانگر میانگین به دست آمده بعلاوه منهای خطای معیار مربوط به سه آزمایش مستقل می‌باشد. $P\leq0.05$* و $P\leq0.02$ **در مقابل گروه کنترل. میزان درصد مهار رشد (ستون سوم از چپ). میزان IC50 (ستون چهارم از چپ). IC50 غلظتی از عصاره است که موجب جلوگیری از رشد سلول‌ها به میزان ۵۰٪ می‌گردد.

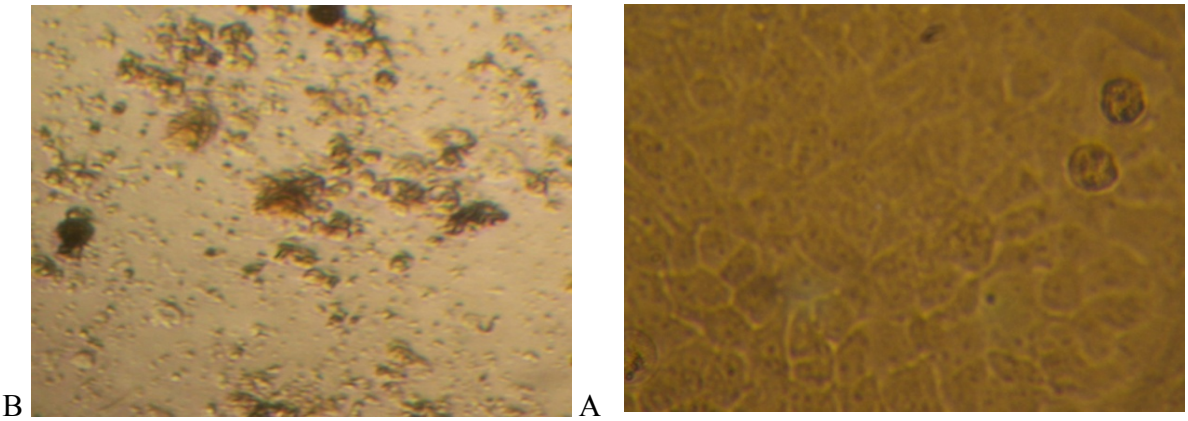
نتایج نشان می‌دهد بعد از ۷۲ ساعت تیمار با غلظت‌های مختلف *F. gummosa*، گیاه مذکور توانست در غلظت-های ۰/٦۲۵، ۱/۲۵، ۲/۵، ۵، ۷/۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر رشد سلول‌ها را به طور معناداری نسبت به گروه کنترل کاهش دهد (جدول ۱). اگرچه عصاره *F. gummosa* در غلظت‌های پایین (۰/۱۵٦ mg/ml و ۰/۳۱۲) تأثیر معناداری بر روی مهار رشد سلول‌ها نداشت اما با افزایش غلظت عصاره سمیت سلولی افزایش می‌یابد (جدول ۱) .

IC50 بدست آمده برای عصاره *F. gummosa*، ۱/۷٦۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بوده است. محاسبه IC50 با کمک اندازه‌گیری رشد سلولی بر اساس MTT انجام گرفت. IC50غلظتی از عصاره است که موجب جلوگیری از رشد سلول‌ها به میزان ۵۰ درصد می‌گردد. اثر سمیت سلولی عصاره *F. gummosa* وابسته به غلظت بوده و با افزایش غلظت عصاره میزان رشد در سلول‌ها افزایش می‌یابد (نمودار ۱).



نمودار ۱ـ ضریب سمیت سلولی عصاره *Ferula gummosa* بر روی سلول‌های MCF7 به وسیله آزمون MTT. با افزایش غلظت عصاره میزان مهار رشد در سلول‌ها افزایش می‌یابد.

رشد سلول‌های MCF7 بعد از ۷۲ ساعت تیمار با عصاره *F. gummosa* (۱/۲۵ mg/ml) (شکل ۱A) در مقابل گروه کنترل (بدون تیمار با عصاره *F. gummosa*) (شکل ۱ B) مهار شد. کاهش تعداد سلول و ظاهر حباب‌مانند غشاء سلول‌ها نشان دهنده وقوع آپوپتوز در این سلول‌ها می‌باشد.



شکل ۱ـ (A) سلول‌های MCF7 در گروه کنترل (بدون تیمار با عصاره *F. gummosa*) (B) سلول‌های MCF7 بعد از ۷۲ ساعت تیمار با عصاره *F. gummosa* (۱/۲۵ mg/ml). سلول‌ها در پلیت‌های ۹۶ خانه به مدت ۲٤ ساعت کشت داده شدند. سپس به مدت ۷۲ ساعت با غلظت‌های مختلف عصاره *F. gummosa* تیمار شدند. میزان مهار رشد به وسیله آزمون MTT سنجیده شد.

بحث

در مطالعه حاضر فعالیت سمیت سلولی عصاره خالص *F. gummosa* بر روی رده سلولی سرطانی پستان (MCF7) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان می‌دهد که عصاره اتانولی *F. gummosa* در غلظت‌های ۰/٦۲۵ mg/ml، ۱/۲۵، ۲/۵، ۵، ۷/۵ و ۱۰ بعد از ۷۲ ساعت رشد سلول‌ها را به طور معناداری نسبت به گروه کنترل کاهش داده است (جدول ۱). همچنین مشخص شده است که عصاره اتانولی *F. gummosa* به طور وابسته به غلظت باعث مهار رشد این سلول‌ها به ترتیب غلظت‌های مذکور به میزان ۲۷/۲٦٪، ۸۲/۲۲٪، ۸۲/۰۸٪، ۷۵/۳۱٪، ٦۸/٦۲٪ و ۵۸/٦٤٪ شده است، به طوری که با افزایش غلظت درصد مهار رشد افزایش یافته است (نمودار ۱). همچنین این عصاره باعث از بین رفتن سلول‌های سالم (لنفوسیت و مونوسیت خون) به میزان ۵۹/۲۸٪ شده است. بر اساس اطلاعات موجود این اولین باری است که اثر عصاره اتانولی *F. gummosa* بر روی رده سلولی MCF7 مورد بررسی قرار می‌گیرد.

بسیاری از گیاهان دارای خاصیت فارماکولوژیک و بیوشیمیایی شامل خاصیت آنتی‌اکسیدانی و ضد التهاب بوده که به نظر می‌رسد در فعالیت‌های ضد بدخیمی و ضد جهش‌زایی سلولی دخالت دارند. با توجه به این که پیشرفت تومور ارتباط بسیار نزدیکی با التهاب و استرس اکسیداتیو دارد ترکیبی که خواص ضد التهابی یا آنتی اکسیدانی داشته باشد می‌تواند یک عامل ضد بدخیمی سلولی باشد [۹]. همچنین ترکیبات ضدسرطانی مؤثری از *F. gummosa* جداسازی شده‌اند که از جمله می‌توان به کومارین‌ها، فنول‌ها و فلاونوییدها اشاره کرد که از جمله متابولیت‌های ثانویه موجود در این گیاه می‌باشد [۱].

حاجی مهدی‌پور و همکاران در سال ۲۰۱۲ نشان دادند که کومارین‌ها، فلاونوییدها و فنیل‌پروپانویید موجود در عصاره‌های *F. persica* و *F. hezalalezarica* خاصیت ضد التهابی، ضد ویروسی و ضدسرطانی بر روی رده سلول‌های سرطانی MCF7، A549، HepG2 و HT29 دارد.

در بررسی دیگر توسط نبوی و همکاران در سال ۲۰۱۱ اثبات شد که فنول‌ها و فلاونوییدهای موجود در عصاره *Ferula foetida* اثر ضدسرطانی بر روی رده سلولی سرطانی MCF7 دارد.

ابراهیم‌زاده و همکاران در سال ۲۰۱۱ نشان دادند که فعالیت آنتی همولیتیک Ferula gummosa به علت وجود فنول‌ها و فلاونوییدهای موجود در این گیاه می‌باشد.

نتیجه‌گیری

بنابر این نتایج حاصل از این تحقیق نشان از اثرات مهار رشد عصاره اتانولی گیاه باریجه با نام علمی *Ferula gummosa* بر روی سلول‌های سرطان پستان (MCF7) دارد که این نتایج موید این مطلب است که این گیاه می‌تواند به عنوان یک گیاه دارویی، گزینه قابل تامل به منظور درمان مؤثر و حتی در جلوگیری از پیشرفت رشد سلول‌های سرطانی در محیط In vivo مورد توجه قرار بگیرد. بنا بر این این تحقیق پیش درآمدی بر مطالعه اثرات ضد سرطانی این گیاه بومی بوده و نیاز به مطالعات بیشتری بر رده‌های سلولی مختلف مرتبط با سرطان سرویکس و سایر سرطان‌ها در محیط In vitro دارد تا با اطمینان در مورد کاربرد آن درمحیط In vivo بحث کرد. پیشنهاد می‌شود غلظت‌های مورد مطالعه در این پژوهش و سایر غلظت‌ها بر تومورهای مشخصی بر حیوانات آزمایشگاهی مورد استفاده قرار بگیرد تا در صورت امکان بتوان آن را به صورت یک روش درمانی روتین و مؤثر استفاده کرد.

منابع

1- Alva, A., M. Grandez, A. Madinaveitia, G. de la Fuente, J. Gavin (2004), Three new norditerpenoid alkaloids from *Consolida orientalis*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 52(5): 530-534.

2- Cassileth, B.R., G. Deng (1995), Alternative and complementary medicine. *Cancer Oncologist*, 9: 80-89.

3- Chang, S., L. Byung (2005), DNA methylation of strogen receptor α gene phthalates. *Journal of Toxicology and Environmental Health,* 68: 1995-2003.

4- Eisenberg, D.M., R.C. Kessler, C. Foster, F.E. Norlock, D.R. Calkins, T.L. Delbanco (1993), Unconventional medicine in the United States: Prevalence, costs, and patterns of use. *New England Journal of Medicine*, 328: 246-252.

5- Freshly, R. (1987), Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique. Alan R. Liss Inc, New York, pp.117.

6- Mosmann, T. (1983), Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay. *Journal of Immunology Methods*, 65: 55-63.

7- Mozaffarian, V. (2003), A dictionary of Iranian plant names. 3rd ed. Farhange Moaser, Tehran, pp: 228-9.

8- O'Hara, M., D. Kiefer, K. Farrell, K. Kemper (1998), A review of 12 commonly used medicinal herbs. *Archives of Family Medicine*, 7(7): 523-536.

9- Shukla, Y., M. Singh (2007), Cancer preventive properties of ginger: A brief review. *Food Chemistry Toxicollogy*, 45: 683-690.