مقاله پژوهشی

بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدسرطانی عصاره میوه درخت ارس (*Juniperus polycarpos*) بر روی سلول سرطانی پستان MCF7

سهیلا معینی[۱]، احسان کریمی[۱*]، احسان اسکوئیان [۲]

۱- گروه زیست‌شناسی، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران

۲- گروه تحقیقات و توسعه، خوشه صنعتی زیست فناور آرکا، مشهد، ایران

*مسئول مکاتبات: ehsankarimi@mshdiau.ac.ir

DOI: 10.22034/ascij.2023.1954620.1373

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۲/۱۸ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۱/۳۱

چکیده

گیاه ارس (*Juniperus polycarpos*) دارای ترکیبات طبیعی زیست فعالی است که برای تولید داروهای ضد التهابی و ضد سرطانی استفاده می‌شود. هدف این مطالعه بررسی خواص آنتی اکسیدانی و ضدسرطانی عصاره میوه درخت ارس بر روی سلول سرطانی پستان MCF7 می‌باشد. برای این منظور،جهت عصاره‌گیری، میوه درخت ارس به مدت ۷ روز خشک و سپس به آن ترکیب متانول و HCL اضافه و با همزن مغناطیسی هم‌زده و پس از قرارگیری در دستگاه تقطیر از طریق کاغذ واتمن فیلتر شد. جهت ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره میوه درخت ارس از روش DPPH استفاده و میزان جذب رادیکال‌های آزاد در طول موج ۵۱۷ نانومتر خوانده شد. جهت تعیین مقدار IC50 از ویتامین C به عنوان یک آنتی‌اکسیدان استاندارد استفاده شد. سلول سرطانی پستان MCF7 کشت و اثر سایتوتوکسیسیتی عصاره بعد از ۴۸ ساعت به روش MTT assay محاسبه شد. برای تعیین سمیت عصاره از مدل موشی Balb/c استفاده و بعد از تیمار با دوزهای (۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) خون‌گیری جهت بررسی تغییر تعداد سلول‌های خونی و جداسازی بافت‌های کبد، کلیه، روده، طحال جهت تغییرات مورفولوژیکی و بافت‌شناسی انجام شد. درصد مهارکنندگی آنتی‌اکسیدان عصاره میوه درخت ارس در غلظت ۳۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر، به ترتیب با دو روش DPPH و FRAP ۲/۲۵ ± ۵۹/۴۷ و ۲/۰۹±۶۳/۱۹ درصد بوده و این مقادیر از میزان استاندارد بکاررفته یعنی ویتامین C کمتر بود. ۶۶/۹ میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصاره میوه توانست ۵۰ درصد از رشد سلول‌های سرطانی پستان را در طی مدت زمان ۴۸ ساعت مهار کند. آنالیز سلول‌های خونی و بافتی تغییرات معنی‌داری را در تعداد سلول‌های خونی و تغییرات مورفولوژیکی بافتی نشان نداد. یافته‌ها، اثر سایتوتوکسیسیتی عصاره برروی سلول‌های سرطان پستان را نشان داد. از طرفی عصاره باعث مسمومیت در مدل موشی نشده و برروی بافت‌های حیوان و سلول‌های خونی تاثیر معنی‌داری نداشته است.

کلمات کلیدی: سلول سرطانی پستان MCF7، گیاه ارس، *Juniperus polycarpos*، آنتی‌اکسیدان، ضدسرطان، عصاره‌گیری.

مقدمه

گیاهان دارویی، پایه و اساس اولیه درمان را برای ۷۰ تا ۹۵ درصد جمعیت جهان در حال توسعه، تشکیل داده است (۲۴). از زمان آغاز تمدن، بشریت از گیاهان برای برآورده ساختن نیازهای ضروری زندگی خود استفاده کرده است. امروزه، داروهای گیاهی مورد استفاده در درمان‌های سنتی، نقش مهمی در نظام

بهداشتی و سلامت پیدا کرده است (۱۵). استفاده از گیاهان دارویی به علت اثرات جانبی داروهای مصنوعی، نبود درمان‌های دارویی جدید برای مقاومت میکروبی، هزینه بالای دارو و ناتوانی بسیاری از کشورهای در حال توسعه برای خرید داروهای پیشرفته توسعه یافته است (۲۵). گیاهان قادر به تولید و سنتز گروه‌های مختلفی از ترکیبات آلی هستند که این ترکیبات آلی به دو گروه عمده متابولیت‌های اولیه و ثانویه تقسیم می‌شوند. متابولیت‌های اولیه مستقیماً در رشد و متابولیسم درگیر هستند و شامل کربوهیدرات‌ها، لیپیدها، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک می‌باشند (۸).

متابولیت‌های ثانویه واسطه‌های متابولیکی یا محصولاتی هستند که برای رشد و حیات گیاهان ضروری نیستند، بلکه برای تعامل گیاهان با محیط اطراف آن‌ها مورد نیاز بوده و در پاسخ به استرس تولید می‌شوند (۲۶). خواص آنتی‌بیوتیکی، ضد قارچی و ضد ویروسی این متابولیت‌ها، **از** گیاه در برابر عوامل بیماری زا محافظت می‌کند (۱۴). متابولیت‌های ثانویه گیاهی منابع غنی از ترکیبات فعال زیستی هستند که در صنعت داروسازی، افزودنی‌های خوراکی، طعم‌دهنده‌ها و سایر مواد صنعتی مورد استفاده قرار می‌گیرند (۱۲). ترکیبات طبیعی زیست فعال برای تولید داروهای ضدالتهابی و ضد سرطانی ارزان‌تر، ایمن‌تر و مؤثرتر می‌باشد (۱۹).

در میان چنین ترکیبات شیمیایی طبیعی، اسانس‌ها، ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی جز آنتی‌اکسیدان‌های مفید، ضد تومور و ضد سرطان هستند (۷).

این ترکیبات دارای چندین ویژگی دارویی هستند که می‌توانند از ایجاد آسیب ناشی از عدم تعادل در سیستم پرواکسیدان آنتی‌اکسیدان جلوگیری کرده و از طریق کاسپاز، P53 و سایر ژن‌های درگیر آپوپتوز را القا و خواص ضدسرطانی از خود نشان دهند (۲۸، ۲۹).

Juniperus polycarpos معروف به ارس ایرانی، گونه‌ای از ارس است که بومی غرب آسیا، شمال آمریکا و شمال آفریقا می‌باشد (۱).

گونه اصلی و گونه‌های دیگر آن در ایران از گرگان تا ارسباران، در ارتفاعات گدوک، هزارجریب، کندوان و پل‌زنگوله و در گیلان در ایسپیلی ییلاق و در آذربایجان در قره‌داغ دیده می‌شود (۲).

زیرگونه‌ی *J. polycarpos excelsa* یک گیاه دارویی است که به طور سنتی برای درمان انواع بیماری‌ها در حیوانات و انسان مانند آسم و گوش‌درد استفاده می‌شود (۱۳).

در طی سال‌های اخیر محققین زیادی خواص آنتی‌اکسیدانی و سمیت سلولی برگ‌های ارس را مورد بررسی قرار داده‌اند. در یک مطالعه برگ هر دو جنس نر و ماده این گیاه از مناطق مختلف کشور جمع‌آوری و سپس عصاره متانولی از برگ و میوه این گونه‌ها تهیه شد. فعالیت آنتی‌اکسیدانی هر عصاره را با دو روش تیوسیانات فریک و اسید تیوباربیتوریک اندازه‌گیری و مشخص شد عصاره های متانولی برگ در دو جنس نر و ماده دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی می‌باشد (۱۳، ۲۲).

در مطالعه‌ای دیگر سمیت سلولی گیاه ارس بر روی رده‌های مختلف سلول‌های سرطانی دهانه رحم بررسی و نشان داده شد که عصاره‌های هیدروالکلی گیاه ارس دارای سمیت بر سلول‌های سرطانی دهانه رحم است به طوری که در غلظت ۲۰ میکروگرم بر میلی لیتر، از دوکسوروبیسین داروی استاندارد در همان غلظت موثرتر می‌باشد (۱۶).

سرطان پستان یک مشکل بزرگ سلامت عمومی در سراسر جهان به شمار می‌رود. سرطان پستان حاصل رشد بیش از حد توده‌های سلول اپیتلیال مجاری یا

لبول‌های بافت پستان در زنان و در موارد نادر در مردان است (۹).

سرطان پستان در بین زنان ایرانی بعد از سرطان پوست، شایع‌ترین نوع سرطان است (۲۳). امروزه روش‌های متعددی جهت درمان تومورها به کار گرفته می‌شوند، اما این روش‌ها باتوجه به عوارض جانبی دارای مشکلات متعددی هستند. براین اساس، اخیرا کاربرد گیاهان دارویی به ویژه داروهایی که خواص ضدتوموری و ضدسرطانی دارند، مورد توجه قرار گرفته است (۲۰).

در این میان، گیاه ارس به دلیل داشتن خواص منحصر به فرد خود توجه زیادی را جلب کرده است. در این مطالعه خواص آنتی‌اکسیدانی و ضد سرطانی عصاره میوه درخت ارس *Juniperus polycarpos* مورد بررسی قرار گرفته است (۱۱).

مواد و روش‌ها

آماده‌سازی عصاره: روش رفلاکس برای عصاره‌گیری مورد استفاده قرار گرفت (۱۰).

میوه درخت ارس جمع‌آوری و در سایه به مدت ۷ روز خشک شد. یک گرم از پودر حاصل از میوه به ارلن ۱۰۰ میلی‌لیتری منتقل و سپس ٤٠ میلی‌لیتر متانول و ۱۰ میلی‌لیتر از محلول ٦ میلی‌مولاری HCL اضافه شد. مخلوط بدست‌آمده با همزن مغناطیسی هم‌زده و در دستگاه تقطیر به مدت ۲ ساعت در دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شد و سپس از طریق کاغذ واتمن شماره یک فیلتر شد. در پایان عصاره تولیدشده با استفاده از یک تبخیرکننده چرخشی در شرایط خلاء خشک و تا زمان انجام آزمایش در یخچال ٤ درجه نگهداری شد.

اندازه‌گیری فنل کل: اندازه‌گیری مقدار فنل کل موجود در عصاره گیاه با اندکی تغییرات به روش کریمی و همکاران انجام شد (۱۸).

در این آزمایش از گالیک اسید به عنوان استاندارد استفاده شد. در ابتدا به ۰/۵ میلی‌لیتر از هر عصاره میزان ۲/۵ میلی‌لیتر فولین اضافه و سپس ۲ میلی‌لیتر از بیکربنات سدیم ۷/۵ درصد (Na2CO3) اضافه شد. در این مرحله برای نمونه شاهد از متانول خالص به جای عصاره استفاده شد. در ادامه پس از ورتکس، مخلوط به مدت ۹۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری و سپس میزان جذب توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۷٦٥ نانومتر خوانده شد.

اندازگیری ترکیبات فلاونوئیدی: مقدار فلاونوئید کل در عصاره با روش کلرید آلومینیوم تعیین شد (٦).

به ۰/۵ میلی‌لیتر از هر عصاره (۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)، ۱/۵ میلی‌لیتر متانول، ۱۰۰ مایکرولیتر از محلول آلومینیوم کلرید ۱۰ درصد در اتانول، ۱۰۰ میکرولیتر از استات پتاسیم ۱ مولار و ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه شد. جذب مخلوط ۳۰ دقیقه پس از نگهداری در دمای اتاق، در طول موج ۵۱۰ نانومتر خوانده شد. از گالیک اسید به عنوان استاندارد برای رسم منحنی کالیبراسیون استفاده شد. میزان فلاونوئید بر اساس مقدار میلی‌گرم گالیک اسید در گرم عصاره تعیین شد. آزمایش‌ها سه بار تکرار و میانگین آن‌ها گزارش شد.

بررسی اثر آنتی‌اکسیدانی عصاره میوه درخت ارس (بررسی قابلیت حذف رادیکال DPPH): جهت ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره میوه درخت ارس از روش تعیین سنجش حذف رادیکال آزاد DPPH بر اساس روش کریمی و همکاران استفاده شد (۱۷).

ابتدا ۲ میلی‌لیتر از عصاره گیاه در غلظت‌های مختلف (۱-۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) انتخاب و سپس ۲ میلی‌لیتر از محلول ۰/۱۵ میلی‌مولار DPPH که در اتانول ۹۵٪ حل شده بود به آن اضافه و به مدت ۳ دقیقه ورتکس شد. سپس برای ۳۰ دقیقه در تاریکی

نگهداری و جذب آن در ۵۱۷ نانومتر خوانده شد. در این تست از ویتامین C به عنوان یک آنتی‌اکسیدان استاندارد استفاده گردید. به منظور تعیین مقدار IC50 IC50 (دوز موردنیاز جهت مهار ۵۰ درصد فعالیت آنتی‌اکسیدانتی است)، تست در غلظت مختلف از عصاره میوه درخت ارس و استاندارد انجام شد. هر آزمایش با سه بار تکرار و به منظور انجام محاسبات از مقادیر میانگین استفاده شد. درصد فعالیت آنتی-اکسیدانی با رابطه زیر ارزیابی شد:

(درصد مهار رادیکالDPPH) = (AControl – ASample/AControl)× ۱۰۰

AControl: جذب محلول شاهد) شامل محلول ۰/۱ میلی مولار DPPH و اتانول ۹۶٪)

ASample: جذب محلول حاوی عصاره میوه درخت ارس

اندازه‌گیری توان آنتی‌اکسیدانی احیاء آهن (FRAP): برای اندازه‌گیری توان آنتی‌اکسیدانی احیاء آهن از روش بنزی و استرین استفاده شد (۵). در یک لوله آزمایش به ۲۰ مایکرولیتر عصاره (با غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) یا محلول استاندارد آبی سولفات آهن (غلظت ۰/۱۸۵ تا ۰/۳۷ میکرومول)، ۱ میلی‌لیتر از محلول کاری اضافه و مخلوط شد. مخلوط فوق ۵ دقیقه در دمای محیط قرار داده شد. دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۹۳ نانومتر توسط محلول کاری بلانک و سپس جذب نوری نمونه‌ها خوانده شد. فعالیت احیاکنندگی نمونه‌های عصاره با استفاده از منحنی استاندارد بر حسب میکرومول آهن در میلی‌گرم وزن خشک عصاره محاسبه شد.

کشت سلولی: لاین سلول سرطان پستان (MCF7) از انستیتو پاستور ایران خریداری شد. پس از دفریز کردن ویال، سلول‌ها در محیط کشت DMEM حاوی ۱۰ درصد سرم گاوی (FBS) در فلاسک‌های ۲۵ سانتیمتر مربع در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد با CO_2 ۵ درصد کشت داده شد. پس از پرشدن حدود ۸۰ درصد فلاسک به آن ۱ میلی‌لیتر تریپسین ۱۰ درصد اضافه و به مدت ۱ دقیقه در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد گذاشته شد. جهت کندکردن عملکرد تریپسین، ۲ میلی‌لیتر از محلول DMEM حاوی FBS ۱۰ درصد به فلاسک اضافه شد و سپس سلول‌ها از فلاسک به فالکون ۵۰ میلی‌لیتر جهت سانتریفیوژ انتقال داده شدند. پس از سانتریفیوژ محلول رویی خارج و پک سلولی توسط لام نئوبار شمارش شد.

تست سمیت سلولی (MTT): به منظور بررسی اثر سمیت عصاره میوه درخت ارس، تعداد ۵۰۰۰ سلول سرطان پستان (MCF7) به هر چاهک پلیت ۹۶ خانه انتقال و به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شد. سلول‌ها در غلظت‌های مختلف عصاره میوه (۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم/میلی‌لیتر) به مدت ۴۸ ساعت تحت تیمار قرار گرفتند. پس از طی این زمان، محلول یک میلی‌گرم/میلی‌لیتر از پودر MTT در محیط کشت DMEM به هر چاهک اضافه شد و مجدداً پلیت‌ها انکوبه گردید. پس از گذشت ۴ ساعت از انکوباسیون محلول رویی از هر چاهک خارج و ۱۰۰ میکرولیتر DMSO اضافه و جذب چاهک‌ها توسط اسپکتروفتومتر در ۵۷۰ نانومتر خوانده شد. در انتها، میزان زنده‌ماندن سلول‌ها با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید:

درصد توان زیستی = ۱۰۰× (میانگین جذب نوری خانه‌های کنترل/ میانگین جذب نوری خانه‌های هر غلظت)

سنجش سمیت (مدل حیوانی): برای تعیین سمیت عصاره میوه ارس از موش به عنوان مدل حیوانی استفاده شد. ۲۴ موش ماده نژاد Balb/c (سن چهار هفتگی) از آزمایشگاه مرکز تحقیقات دامی موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی (مشهد، ایران) خریداری شد. موش‌های تهیه‌شده به مدت یک هفته

با محیط آزمایشگاه سازگار و سپس به طور تصادفی به ٤ گروه سه‌تایی: M1 (شاهد)، M2 (۲۵ میلی-گرم/کیلوگرم)، M3 (۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) و M4 (۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) تقسیم شدند. ٤٨ ساعت پس از درمان نهایی (روز ۲۸)، خون‌گیری از گوشه چشم موش‌ها جهت آنالیز با دستگاه آنالایزر خودکار خون (Hitachi 902، ژاپن) انجام شد. بافت‌های کبد، کلیه، روده، طحال جداسازی و در فرمالین ۱۰ درصد به مدت ٤٨ ساعت تثبیت شدند.

رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین برای بررسی مورفولوژیکی و بافت‌شناسی تمام بافت‌ها استفاده شد.

نتایج

تعیین مقدار ترکیبات فنولی و فلاونوئیدهای کل: نتایج بررسی مقدار کل ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی عصاره میوه درخت ارس در جدول ۱ نشان داده شده است. نتایج کلی آزمایش نشان داد میوه درخت ارس دارای مقادیر بالایی از ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی می‌باشد که مقدار آن‌ها به ترتیب ٤/٣٦ ± ۱۰۹/۵ و ۳/۱۵ ± ۷۱/۵ میلی‌گرم در گرم عصاره می‌باشد.

بررسی سمیت سلولی القاءشده بر سلول‌های MCF7: در این مطالعه سمیت سلولی القاءشده بر رده سلولی سرطان پستان (MCF7) در تیمار با عصاره میوه درخت ارس بررسی شد. نتایج به دست آمده اثرات مهاری قابل توجه عصاره بر رشد سلول‌های سرطانی پستان را نشان داد. ٦٦/٩ میکروگرم بر میلی-لیتر از عصاره میوه توانست ۵۰ درصد از رشد سلول-های سرطانی پستان را در طی مدت زمان ٤٨ ساعت مهار کند (نمودار ۱). یافته‌های حاصل از آزمون MTT نشان داد که زیستایی سلول‌ها بسته به هر دو عامل غلظت تغییر می‌کند.

هیستوپاتولوژی اندام‌های موش: نتایج هیستوپاتولوژی اندام‌های کبد، کلیه، طحال و ژژنوم موش‌های گروه کنترل و دریافت‌کننده غلظت‌های مختلف عصاره میوه درخت ارس در شکل ۱ نشان داده شده است. نتایج میکروسکوپی حاصل از گروه کنترل و ۳ گروه دریافت‌کننده غلظت‌های مختلف عصاره میوه درخت ارس نشان می‌دهد که در هیچ غلظتی عصاره میوه درخت ارس خاصیت توکسیستی نداشته و در تمامی گروه‌های دریافت‌کننده غلظت‌های مختلف عصاره میوه درخت ارس مشابه گروه کنترل می‌باشد.

آنالیز خون: نتایج آزمایش CBC بر روی موش‌های دریافت‌کننده غلظت‌های مختلف عصاره میوه درخت ارس (M2: ۲۵ میلی‌گرم/کیلوگرم وزن بدن، M3: ۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم وزن بدن، M4:۱۰۰ میلی-گرم/کیلوگرم وزن بدن) در قیاس با گروه کنترل (M1)، تغییرات معناداری در تعداد سلول‌های خونی سفید و قرمز، لنفوسیت‌ها، منوسیت و نوتروفیل‌ها مشاهده نشد (جدول ۳).

سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانی: فعالیت آنتی‌اکسیدان عصاره میوه درخت ارس با دو روش دی فنیل پیکریل (DPPH) و توان آنتی‌اکسیدانی احیاء آهن (FRAP) اندازه‌گیری گردید. نتایج نشان داد درصد مهارکنندگی آنتی‌اکسیدان عصاره میوه درخت ارس در غلظت۳۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر، به ترتیب با دو روش DPPH و FRAP ۲/۲۵ ± ۵۹/٤٧ و ۲/۰۹ ± ٦٣/١٩ درصد بوده است هرچند این مقادیر از میزان استانداردهٔ بکاررفته یعنی ویتامین C کمتر بود (جدول۲). نتایج آنالیز واریانس نشان داد که فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره قسمت‌های مختلف گیاه تأثیر معنی‌داری بر مهار رادیکال‌های آزاد داشت.

جدول ۱- میزان فنل و فلاونوئید کل برحسب میلی‌گرم در گرم عصاره میوه درخت ارس

نام دارو	فنل کل [۱]	فلاونوئید [۲]
عصاره میوه درخت ارس	۱۰۹/۵ ٤±/۳٦	۷۱/۵ ۳±/۱۵

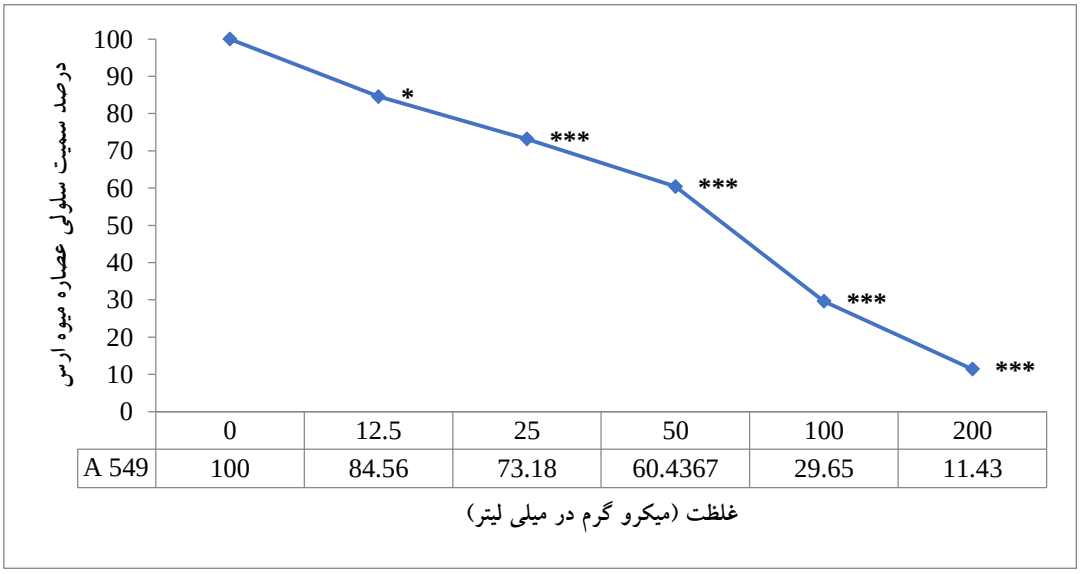
۱- میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم پودر خشک عصاره، ۲- میلی‌گرم روتین بر گرم پودر خشک عصاره

جدول ۲- مقایسه درصد مهارکنندگی آنتی‌اکسیدان در غلظت ۳۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر

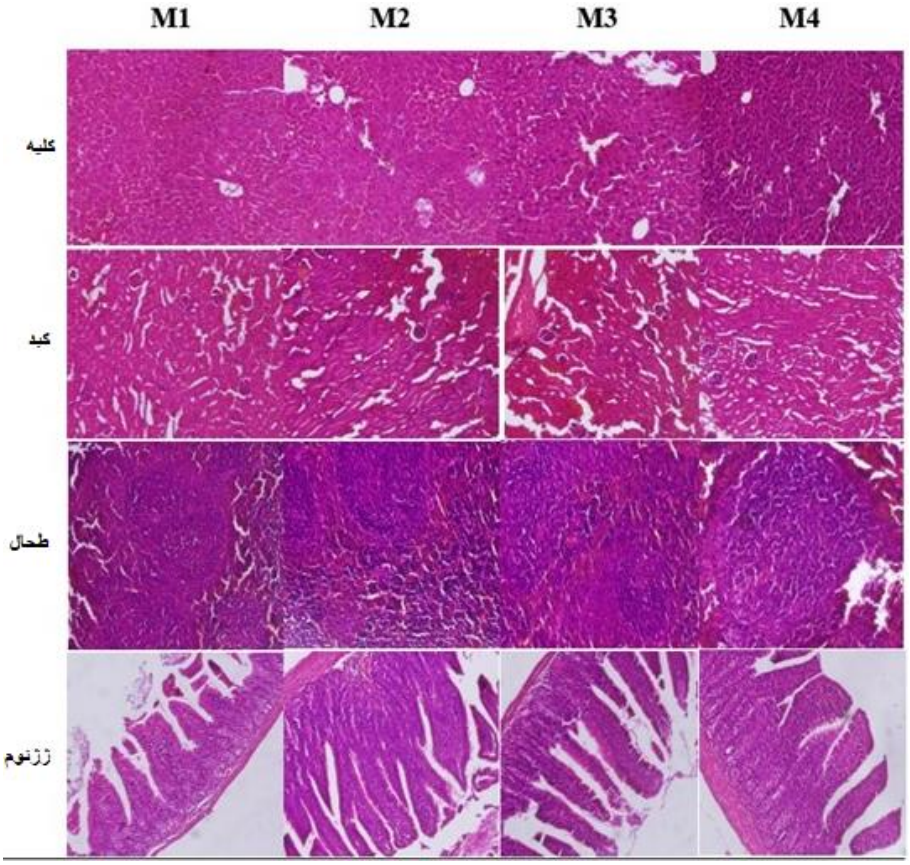
	درصد مهار کنندگی آنتی‌اکسیدان (%)	
	FRAP	DPPH
عصاره میوه درخت ارس	٦۳/۱۹ ± ۲/۰۹	۵۹/٤۷ ± ۲/۲۵
ویتامین C	۸۸/٦۵ ± ۳/۵	۹۰/۳۰ ± ۱/۹

جدول ۳- تجزیه و تحلیل پارامترهای خون در طول آزمایش دریافت تیمارهای مختلف

Group	RBC ($۱۰^{۶}$/µl)	WBC ($۱۰^{۳}$/µl)	Lymph (%)	Mno (%)	NEU (%)
M۱	۷/۳٦	۵/٤	٦۳	۲	۳۳
M۲	۷/٦٦	۵/۳	٦۲	۲	۳٤
M۳	۷/۳۱	۵/۹	۵٦	٤	۳۷
M٤	۷/٤۸	٤/۹	٦۱	۳	۳۵



نمودار ۱- تست سمیت سلولی عصاره میوه درخت ارس برروی رده سلولی سرطان پستان (MCF7)



شکل ۲- تغییرات هیستوپاتولوژیک در روده، کبد، کلیه و طحال موش‌های دریافت‌کننده غلظت‌های مختلف عصاره میوه درخت ارس. M1 : کنترل، M2: ۲۵ میلی‌گرم/کیلوگرم وزن بدن، M3 : ۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم وزن بدن، M4:۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم وزن بدن

بحث

مطالعات متعددی در مورد خواص دارویی گیاهان و عصاره آن‌ها انجام شده است. بر اساس تحقیقات انجام‌شده بر روی گیاهان دارویی مشخص‌شده است که عصاره‌های گیاهی به دلیل دارابودن متابولیت‌های ثانویه دارای اثرات بیولوژیکی مختلف آنتی‌اکسیدانی، ضدسرطانی، ضدباکتریایی و اثرات زیستی دیگر می-باشند (۲۷). در این مطالعه خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدسرطانی عصاره میوه درخت ارس بر روی سلول-های سرطان پستان (MCF7) و اثرات توکسیستی آن بر روی موش ماده نژاد Balb/c مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد عصاره میوه ارس دارای مقادیر بالایی از ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی می‌باشد. نتایج ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره میوه درخت ارس با دو روش DPPH و FRAP نشان داد، فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره میوه گیاه تأثیر معنی‌داری بر مهار رادیکال‌های آزاد دارد. بررسی سمیت سلولی القاءشده بر رده سلولی سرطان پستان MCF7 اثرات مهاری قابل‌توجه عصاره بر رشد سلول‌های سرطانی پستان را نشان داد. هم‌چنین بررسی هیستوپاتولوژی اندام‌های موش و نتایج آنالیز خون نشان می‌دهد که در هیچ غلظتی عصاره میوه درخت ارس خاصیت توکسیستی از خود نشان نداده و باعث آسیب بافتی نمی‌شود.

مرید و همکارانش در سال ۲۰۱۹، خصوصیات فیتوشیمیایی، آنتی‌اکسیدانی و فعالیت سیتوتوکسیک *Juniperus oxycedrus* بر روی دو لاین سلول سرطان پستان (MCF-7 and MDA-MB-468) را در شرایط

in vitro مورد بررسی قرار دادند. در این تحقیق، آزمون‌های مختلف ارزیابی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی به دو روش DPPH و FRAP انجام و مشخص شد عصاره متانولی استخراج‌شده اثرات سمیت سلولی قوی برروی دو رده سلولی سرطان پستان (MDA-MB-468 و MCF-7) دارد بدون اینکه هیچگونه سمیتی نسبت به سلول‌های عادی (PBMC) داشته باشد (٤). یافته‌های ما با یافته‌های حاصل از این مطالعه هم‌خوانی دارد.

در مطالعه‌ای دیگر Grosh و همکارانش، اثر مهاری رشد فلاونوییدها و دی‌ترپن‌ها استخراج‌شده از برگ گیاه *Juniperus phoenicea* برروی سلول‌های سرطانی پروستات را بررسی و به اثرات قابل توجه سایتوکسیستی آن پی‌بردند. آن‌ها دریافتند این ترکیب میزان بالایی از انتخاب سمیت سلولی را نسبت به سلول‌های سرطانی پروستات (PC3) دارد در حالی که هیچ‌گونه شواهدی از سمیت سلول طبیعی پروستات مشاهده نشد (۳).

مائوریا و همکارانش در سال ۲۰۱۸، اثرات سیتوتوکسیک *Juniperus communis* و گونه‌های وحشی *Juniperus* را بر روی رده سلول‌های SiHa (سرطان دهانه رحم)، A549 (سرطان ریه) و سلول-های A431 (سرطان پوست) مورد بررسی قرار دادند و فعالیت سیتوتوکسیتی بالایی را مشاهده نمودند (۲۱).

درویش و همکارانش، اثر ضدسرطانی و پتانسیل درمانی وین‌کریستین با عصاره حاصل از اندام هوایی *Juniperus excelsa* را بر روی رده‌های سلولی لوسمی لنفوبلاستیک حاد مورد مطالعه قرار دادند. در این مطالعه عصاره اندام‌های هوایی *Juniperus excelsa* سمیت سلولی قوی نسبت به سلول‌های سرطانی Nalm-6 و Reh نشان داد. افزایش پتانسیل درمانی وین‌کریستین به همراه عصاره *Juniperus excelsa* در مقایسه با وین‌کریستین به تنهایی در سلول‌های Nalm-6 و Reh مشاهده شد. عصاره *Juniperus excelsa* به همراه درمان با وین‌کریستین بیان ژن Bcl-2 را کاهش و بیان ژن‌های Bax و کاسپاز-۳ را افزایش داد (۱۱).

نتیجه‌گیری

با توجه به یافته‌های بدست‌آمده از مطالعه حاضر و مطالعات انجام‌شده دیگر در شرایط in-vitro و in-vivo می‌توان به این نتیجه رسید که عصاره میوه درخت ارس (*Juniperus polycarpos*) دارای خواص ضدسرطانی و آنتی‌اکسیدانی می‌باشد و با توجه به اینکه این گیاه بومی ایران است می‌توان از آن در ساخت داروی ضدسرطان که مقرون به‌صرفه و موثر است استفاده نمود.

منابع

1. Adams R.P. 2004. Juniperus deltoides, a new species, and nomenclatural notes on Juniperus polycarpos and J. turcomanica (Cupressaceae). *Phytologia*, 86(2):49-53.

2. Ahani H., Jalilvand H., Hosseini Nasr S.M., Soltani Kouhbanani H., Ghazi M.R., Mohammadzadeh H. 2013. Reproduction of juniper (Juniperus polycarpos) in Khorasan Razavi, Iran. *Forest Science and Practice*, 15(3):231-237.

3. Al Groshi A., Jasim H.A., Evans A.R., Ismail F.M., Dempster N.M., Nahar L., Sarker S.D. 2019. Growth inhibitory activity of biflavonoids and diterpenoids from the leaves of the Libyan Juniperus phoenicea against human cancer cells. *Phytotherapy Research*, 33(8):2075-2082.

4. Ben Mrid R., Bouchmaa N., Bouargalne Y., Ramdan B., Karrouchi K., Kabach I., El Karbane M., Idir A., Zyad A., Nhiri M. 2019. Phytochemical characterization, antioxidant and in vitro cytotoxic activity evaluation of Juniperus oxycedrus Subsp.

cell cultures. *Enzyme and Microbial Technology*, 17(8):674-684.

13. Emami S.A., Abedindo B.F., Hassanzadeh-Khayyat M. 2011. Antioxidant activity of the essential oils of different parts of Juniperus excelsa M. Bieb. subsp. excelsa and J. excelsa M. Bieb. subsp. polycarpos (K. Koch) Takhtajan (Cupressaceae). *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 10(4):799-808.

14. Figueiredo A.C., Barroso J.G., Pedro L.G., Scheffer J.J. 2008. Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. *Flavour and Fragrance Journal*, 23(4):213-226.

15. Gurib-Fakim A. 2006. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine*, 27(1):1-93.

16. Jalill R.D.A. 2018. Chemical analysis and anticancer effects of Juniperus polycarpos and oak gall plants extracts. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 11(6):2372-2387.

17. Javanshir A., Karimi E., Homayouni T.M. 2020. Investigation of Antioxidant and Antibacterial Potential of Ricinus communis L. Nano-emulsion. *Jundishapur Scientific Medical Journal*, 19(1):1-9.

18. Karimi E., Oskoueian E., Hendra R., Jaafar H.Z. 2010. Evaluation of Crocus sativus L. stigma phenolic and flavonoid compounds and its antioxidant activity. *Molecules*, 15(9):6244-6256.

19. Karimi N., Behbahani M., Dini G., Razmjou A. 2018. Enhancing the secondary metabolite and anticancer activity of Echinacea purpurea callus extracts by treatment with biosynthesized ZnO nanoparticles. *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*, 9(4):045009.

20. Le D.H., Commandeur U., Steinmetz N.F. 2019. Presentation and delivery of tumor necrosis factor-related apoptosis-

oxycedrus needles and berries. *Molecules*, 24(3):502-513

5. Benzie I.F., Strain J.J. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1):70-76.

6. Chang C.C., Yang M.H., Wen H.M., Chern J.C. 2002. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis*, 10(3):178-182.

7. Chavan J.J., Gaikwad N.B., Umdale S.D., Kshirsagar P.R., Bhat K.V., Yadav S.R. 2014. Efficiency of direct and indirect shoot organogenesis, molecular profiling, secondary metabolite production and antioxidant activity of micropropagated Ceropegia santapaui. *Plant Growth Regulation*, 72(1):1-15.

8. Coruzzi G., Bush D.R. 2001. Nitrogen and carbon nutrient and metabolite signaling in plants. *Plant Physiology*, 125(1):61-64.

9. Cowin P., Rowlands T.M., Hatsell S.J. 2005. Cadherins and catenins in breast cancer. *Current Opinion in Cell Biology*, 17(5):499-508.

10. Crozier A., Lean M.E., McDonald M.S., Black C. 1997. Quantitative analysis of the flavonoid content of commercial tomatoes, onions, lettuce, and celery. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(3):590-595.

11. Darvishi M., Esmaeili S., Dehghan-Nayeri N., Mashati P., Gharehbaghian A. 2017. Anticancer effect and enhancement of therapeutic potential of Vincristine by extract from aerial parts of Juniperus excelsa on pre-B acute lymphoblastic leukemia cell lines. *Journal of Applied Biomedicine*, *15*(3):219-226.

12. Dörnenburg H., Knorr D. 1995. Strategies for the improvement of secondary metabolite production in plant

25. Van Wyk B.E., Wink M. 2018. Medicinal plants of the world. CABI. Second edition – Wallingford. pp: 28.

26. Verpoorte R., Memelink J. 2002. Engineering secondary metabolite production in plants. *Current Opinion in Biotechnology*, 13(2):181-187.

27. Verpoorte R., Kim H.K., Choi, Y.H. 2006. Plants as source for medicines: *New perspectives*. *Frontis*, 47(3):261-273.

28. You B.J., Lee M.H., Tien N., Lee M.S., Hsieh H.C., Tseng L.H., Chung Y.L., Lee H.Z. 2013. A novel approach to enhancing ganoderic acid production by Ganoderma lucidum using apoptosis induction. *PloS One*, 8(1):e53616.

29. You B.J., Tien N., Lee M.H., Bao B.Y., Wu Y.S., Hu T.C., Lee H.Z. 2017. Induction of apoptosis and ganoderic acid biosynthesis by cAMP signaling in Ganoderma lucidum. *Scientific Reports*, 7(1):1-13.

inducing ligand via elongated plant viral nanoparticle enhances antitumor efficacy. *ACS Nano*, 13(2):2501-2510.

21. Maurya A.K., Devi R., Kumar A., Koundal R., Thakur S., Sharma A., Kumar, D., Kumar R., Padwad Y.S., Chand G., Singh B. 2018. Chemical composition, cytotoxic and antibacterial activities of essential oils of cultivated clones of Juniperus communis and wild Juniperus species. *Chemistry and Biodiversity*, 15(9):180-188.

22. Moein M.R., Ghasemi Y., Moein S., Nejati M. 2010. Analysis of antimicrobial, antifungal and antioxidant activities of Juniperus excelsa M. B subsp. Polycarpos (K. Koch) Takhtajan essential oil. *Pharmacognosy Research*, 2(3):128-134

23. Mousavi S.M., Montazeri A., Mohagheghi M.A., Jarrahi A.M., Harirchi I., Najafi M., Ebrahimi M. 2007. Breast cancer in Iran: an epidemiological review. *The Breast Journal*, 13(4):383-391.

24. Petrovska B.B. 2012. Historical review of medicinal plants' usage. *Pharmacognosy Reviews*, 6(11):1-7

Evaluation of Antioxidant and Anticancer Properties of *Juniperus polycarpos* Fruit Extract on MCF7 Breast Cancer Cell

Soheila Moeini [1], Ehsan Karimi[1*], Ehsan Oskoueian[2]

1-Department of Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran
2- Department of Research and Development, Arka Industrial Cluster, Mashhad, Iran

Abstract

Juniperus polycarpos contains natural bioactive compounds that are used to produce anti-inflammatory and anti-cancer drugs. For extraction, juniper berries were dried for 7 days, then methanol and HCL were added, stirred with a magnetic stirrer, and filtered through Whatman paper after distillation. To evaluate the antioxidant activity of juniper fruit extract, the DPPH method was used, and the adsorption rate of free radicals at 517 nm was read. Vitamin c was used as a standard antioxidant to determine the IC50 value of the extract. MCF7 breast cancer cells were cultured, and the cytotoxic effect of the extract was calculated after 48 hours by MTT assay. To determine the toxicity of the extract, the Balb/c mouse model was used. After treatment with doses of 25, 50, and 100 mg/kg, blood samples were taken to evaluate blood cell count changes. Isolation of the liver, kidney, intestine, and spleen tissues for morphological changes and Histology was performed. The antioxidant inhibitory percentage of juniper fruit extract at a 300 µg/ml concentration with DPPH and FRAP methods was 59.47 ± 2.25 and 63.19 ± 2.09%, respectively, and these values were lower than the standard amount of vitamin C used. 66.9 µg/ml of fruit extract was able to inhibit 50% of the growth of breast cancer cells within 48 hours. Blood and tissue cell analysis did not show significant changes in blood cell count and tissue morphological changes. The results showed the cytotoxic effect of the extract on breast cancer cells. On the other hand, the extract did not cause poisoning in the mouse model and did not significantly affect animal tissues and blood cells.

Keywords: MCF7, Breast Cancer Cell, *Juniperus polycarpos*, Antioxidant, Anticancer, Extraction.