

بررسی اثر عصاره‌ی منتخبی از مخروطیان بومی ایران بر رده‌ی سلولی سرطان پستان انسان (MCF-7) به روش فلوسایتومتری

دکتر علیرضا عندلیب^۱، دکتر عباس جعفریان دهکردی^۲، راحله شکوهی شورمستی^۳، شیرین عبدالله کوهپایه اصفهانی^۳

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: چرخه‌ی سلولی طی چهار مرحله‌ی عمده صورت می‌گیرد. همانندسازی DNA طی مرحله‌ی سنتز انجام می‌شود و سلول‌ها پس از عبور از مرحله‌ی موقتی GAP2، فرایند پیچیده‌ی میتوز (M) را شروع می‌کنند. سلول‌های سرطانی در محیط کشت به صورت نامحدود وارد چرخه‌ی سلولی می‌شوند. در محیط کشت آزمایشگاهی می‌توان میزان جمعیت سلولی در مراحل مختلف چرخه‌ی سلولی را تحت تأثیر هر نوع ماده‌ی سنجش نمود.

روش‌ها: عصاره‌ی تهیه شده از تعدادی گیاهان مخروطیان بومی ایران به نام‌های ۱- Juniperus polycarpus (برگ سرشاخه‌ی نر)، ۲- Juniperus excelsa (سرشاخه‌ی برگ‌دار)، ۳- Juniperus excelsa (میوه)، ۴- Juniperus Foetidissima (برگ نر)، ۵- Juniperus Foetidissima (برگ ماده)، ۶- Juniperus depressa (میوه)، ۷- Juniperus depressa (برگ نر)، ۸- Juniperus communis (برگ ماده) و ۹- Juniperus communis (برگ نر) به رقت‌های متفاوت بر محیط کشت رده‌ی سلولی سرطان سینه MCF-7 آزمایش گردید. جمعیت سلولی در فازهای مختلف چرخه‌ی سلولی پس از گذشت ۴۸ ساعت با دستگاه فلوسایتومتری و نرم‌افزار Cylchred و CellQuest اندازه‌گیری و آنالیز شد. از پروپیدیوم آیودید (Propidium iodide) برای رنگ‌آمیزی مقدار DNA هسته‌ی سلولی به عنوان شاخص وجود سلول‌ها در فازهای مختلف چرخه‌ی سلولی استفاده گردید.

یافته‌ها: سلول‌های MCF-7 در چاهک کشت بدون تیمار عصاره‌ی گیاهی، ۴۵/۸۶ درصد در فاز G0/G1، ۴۷/۵۲ درصد در فاز سنتز و ۶/۶۲ درصد در فاز G2/M قرار داشتند. همین مقادیر تحت تأثیر داروی شاهد مثبت Taxol، در مراحل G0/G1، سنتز و G2/M به ترتیب برابر با ۱۷/۳۱، ۴۰/۱۸ و ۴۲/۵۱ درصد بود. مقایسه‌ی مقادیر به دست آمده، توقف چرخه‌ی سلولی و نگهداری سلول‌ها در فاز G2/M را برای داروی Taxol نشان داد. بررسی عصاره‌های تحت آزمایش مشخص نمود که بیشترین اثر را عصاره‌ی میوه‌ی Juniperus excelsa داشت و قدرت سنتز رده‌ی سلولی MCF-7 را از ۴۶/۸۱ به ۲۱/۹۷ درصد تقلیل داد. همچنین، همین عصاره توانست ۲۳/۱۱ درصد جمعیت سلولی را در فاز G2/M بلوکه کند که از لحاظ آماری حدود سه برابر میزان شاهد منفی بود.

نتیجه‌گیری: نتایج تحقیق حاضر نشان داد که مواد بیولوژیک موجود در گیاهان مخروطی ایران ترکیباتی را در مسیر فیزیولوژی رشد و نمو ایجاد می‌کند که می‌تواند اثرات قابل ملاحظه‌ای بر چرخه‌ی رشد سلول‌های سرطانی سینه بگذارد. ارزیابی و خالص‌سازی نوع ترکیب مؤثر در عصاره‌های گیاهی از ضروریات فعالیت علمی در زمینه‌ی کشف داروی ضد سرطان است.

واژگان کلیدی: MCF-7، مخروطیان بومی ایران، عصاره، فلوسایتومتری، چرخه سلولی

ارجاع: عندلیب علیرضا، عباس جعفریان دهکردی، راحله شکوهی شورمستی، شیرین عبدالله کوهپایه اصفهانی. بررسی اثر عصاره‌ی منتخبی از مخروطیان بومی

ایران بر رده‌ی سلولی سرطان پستان انسان (MCF-7) به روش فلوسایتومتری. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۴؛ ۳۳ (۳۶۰): ۲۰۱۲-۲۰۰۴

مقدمه

یک عامل بر روی یک رده‌ی سلولی بدون درگیری تمامی اعضا و بافت‌های موجود زنده و ارزیابی اختصاصی فقط یک نوع اثر، امتیاز ویژه‌ای دارد. به طور کلی کشت سلول‌های بافت جانوری روشی تحقیقاتی می‌باشد که در آن اجزای کوچکی از بدن جدا و در محیطی مجزا و غنی که سلول‌ها توانایی رشد در آن را داشته باشند، پاساژ داده

تکنولوژی کشت سلولی به عنوان یکی از مهم‌ترین روش‌های مطالعه‌ی آزمایشگاهی، در فهم پایه‌های بیولوژی سلولی و مولکولی نقش مهمی دارد و به صورت روزافزونی در گسترش علوم پایه و بالینی کاربرد دارد. کشت سلولی در علوم پزشکی جهت سنجش اثر

۱- استاد، گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۲- استاد، گروه فارماکولوژی، دانشکده‌ی داروسازی و علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۳- کارشناس ارشد، گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

اثر منتخبی از عصاره‌ی بعضی از گیاهان مخروطی بومی ایران بر چرخه ی سلولی رده‌ی سلولی سرطان سینه (MCF-7) انجام گردید.

روش‌ها

رده‌ی سلولی MCF-7 به صورت لاین سلولی نامیرای سرطان سینه‌ی انسانی است که از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران خریداری شد و در محیط کشت سلولی Roswell Park Memorial Institute-1640 (RPMI-1640) کشت و پاساژ داده شد. کشت سلولی به صورت معمول در آزمایشگاه کشت سلولی دانشکده‌ی داروسازی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان انجام گردید.

جمع‌آوری، شناسایی و نگهداری گیاهان: حدود یک کیلوگرم از اندام‌های مختلف گیاه شامل سرشاخه‌ی برگ‌دار و میوه‌ی گیاهان مورد نظر از زیستگاه طبیعی آن‌ها در استان گلستان و آذربایجان جمع‌آوری و در هوای آزاد و سایه (دور از نور آفتاب) خشک گردید. عصاره‌ی تام گیاهی از مخروطیان بومی ایران از گونه‌ی *Juniperus (J)*، شامل ۱- *Juniperus polycarpus* (برگ سرشاخه‌ی نر)، ۲- *Juniperus excels* (سرشاخه‌ی برگ‌دار)، ۳- *Juniperus excels* (میوه)، ۴- *Juniperus foetidissima* (برگ نر)، ۵- *Juniperus foetidissima* (برگ ماده)، ۶- *Juniperus depressa* (میوه)، ۷- *Juniperus depressa* (برگ نر)، ۸- *Juniperus communis* (برگ ماده) و *Juniperus communis* (برگ نر) به کار گرفته شد.

فلوسایتومتري: فلوسایتومتري دستگاهی است که توانایی تعیین مشخصات سطح سلولی و یا داخل سلولی را به شرط انجام رنگ‌آمیزی مناسب نمونه‌ها دارد. سلول‌ها به شکل سوسپانسیون برای دستگاه قابل خوانش می‌باشد و رنگ‌آمیزی سلول‌ها باید با رنگ‌های فلورنس ویژه که دارای نور بازتابی قابل شناسایی با استفاده از شناساگرهای حساس سیستم هستند، صورت گیرد. دستگاه فلوسایتومتري دارای یک منبع نوری اغلب لیزری و سیستم جمع‌آوری نور یا اپتیک، سیستم الکترونیک کامپیوتری و نرم‌افزار جهت جمع‌آوری داده‌ها و پردازش آن‌ها می‌باشد.

با این سیستم میزان اندازه‌ی سلول، شکل و ساختار درون سلول، مولکول‌های پروتئین یا قندی و یا هرچه که بتواند به آنتی‌بادی و یا رنگ فلورسانس متصل شود و نیز مقدار و تعداد اجزای سلولی از جمله DNA هسته‌ی سلول را می‌توان اندازه‌گیری نمود. رنگ‌آمیزی پروپیدیوم آبی‌دیده استفاده شده جهت رنگ‌آمیزی DNA هسته‌ی سلول‌ها و سوسپانسیون سلولی حاصل، با استفاده از دستگاه فلوسایتومتر خوانش گردید. نرم‌افزار CellQuest برای ایجاد داده‌ها و هیستوگرام و نرم‌افزار Cylchred جهت آنالیز هیستوگرام استفاده شد.

می‌شوند. این اجزا شامل توده‌ای از یک نوع رده‌ی سلولی در محیط کشت سلولی (Cell culture) می‌باشد (۱-۲).

چرخه‌ی سلولی به چهار مرحله‌ی عمده تقسیم‌بندی می‌گردد. در سلول‌های سوماتیک کروموزوم‌ها طی مرحله‌ی سنتز (S) همانندسازی می‌شوند. پس از عبور از مرحله‌ی G1، سلول فرایند پیچیده‌ی میتوز (M) را شروع می‌کند. در طی میتوز، چرخه‌ی سلولی وارد مرحله‌ی G2 شده، دوباره این مراحل تکرار می‌شود. سلول‌هایی که وارد مرحله‌ی سنتز نمی‌شوند، اما دارای فیزیولوژی سالمی هستند را در اصطلاح، مستقر در فاز G0 می‌دانند.

سلول‌هایی که در مرحله‌ی پیش‌میتوزی قرار دارند، می‌توانند از چرخه خارج شده، برای روزها، هفته‌ها یا در بعضی موارد (به طور مثال سلول‌های عصبی و سلول‌های عدسی چشم) برای تمامی طول عمر ارگانسیم بدون تقسیم باقی بمانند. اغلب سلول‌های پیش‌میتوزی در مهره‌داران می‌توانند در مرحله‌ی G1 از چرخه‌ی سلولی خارج و وارد مرحله‌ای به نام G0 (Gap-0) شوند (۳). سلول‌های سرطانی که موفق به رشد در محیط کشت سلولی شوند و به هر دلیل به صورت Transformed درآمده باشند، با گذشت زمان به صورت سلول‌های با عمر نامحدود (Infinite cell line) در می‌آیند. چنین سلول‌هایی، سلول‌های تغییر یافته و نئوپلاستیک هستند که اغلب اصطلاح نامیرا (Immortal) به آن‌ها اطلاق می‌گردد (۴، ۱).

گروه‌های تحقیقاتی متعددی در سطح جهان اثر مواد مختلف شیمیایی- گیاهی و سنتتیک را بر روی چرخه‌ی سلولی سلول‌های سرطانی بررسی می‌کنند. این‌گونه سنجش‌ها جزء روش‌های معمول تحقیقاتی جهت ارزیابی سلول‌ها و نیز مواد مؤثر بر آن‌ها درآمده است که ذکر حتی تعدادی از آن‌ها در اینجا بدیهی نمی‌نماید. Yan و همکاران اثر عصاره‌ی آبی *Aconitum Cormichaeli*، *Phytolacca acinosa*، *Rhizoma bolbostemmatis* و *Gekko swinhonis* را بر روی سلول‌های Bel-7402، با هدف سنجش اثرات ضد سرطانی آن‌ها مورد سنجش قرار دادند (۵). علاوه بر این، کارهای مشابهی مانند پژوهش Cochrane و همکاران جهت بررسی اثرات ضد سرطانی عصاره‌ی گیاهی *Annona glabra* بر روی رده‌ی سلولی لوسمی (CEM/VLB) انجام گردید و نتایج نشان دهنده‌ی اثرات مثبت آن در توقف فاز G0/G1 چرخه‌ی سلول‌های سرطانی بود (۶). تحقیق Wang و همکاران اثرات عصاره‌ی *Norsolorinic acid* از *Aspergillus nidulans* را بر روی رده‌ی سلولی MCF-7 آدنوکارسینوم سینه گزارش نمود. نتایج حاکی از اثرات ضدپرولیفراسیون سلولی به صورت القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی بود (۷). بنابراین، در راستای مطالعات صورت گرفته و قابل انجام در منطقه‌ی ما، طراحی

شاهد، نشانگر تجمع سلول‌ها در فاز G2/M بود؛ به گونه‌ای که ۴۲/۵۱ درصد سلول‌ها در فاز G2/M تجمع یافت و در مقابل ۱۷/۳۱ درصد در فاز G0/G1 باقی ماند که الگوی اثر Taxol در چرخه‌ی سلولی MCF-7، ۴۸ ساعت پس از تیمار به خوبی قابل مشاهده است. بنابراین، با توجه به مقایسه‌ی الگوی سلول‌های تیمار شده با Taxol و سلول‌های شاهد، چگونگی اثر دارو در این شرایط به صورت تجمع ۷ برابری در فاز G2/M نشان داده شد. به عبارت دیگر، سلول‌ها در فاز G2/M بلوکه شدند و مسیر ورود آن‌ها به فاز G0/G1 مسدود شد. طبق همین الگو، اثر عصاره‌ی برگ J. Polycarpus باعث تغییر الگوی توانایی پرولیفراسیون سلولی گردید؛ به گونه‌ای که حدود ۳ برابر جمعیت سلولی نسبت به شاهد در فاز G2/M توقف کرد و با قدرت مشابهی همچون Taxol، از ورود سلول‌های MCF-7 از فاز G2/M به فاز G0/G1 ممانعت نمود. وجود سلول‌ها در فاز G0/G1 از ۴۵/۸۶ درصد شاهد به ۹/۵۶ درصد تحت تأثیر J. Polycarpus کاهش داشت (جدول ۱).

چنانچه در جدول ۱ مشاهده می‌گردد، تفاوت معنی‌داری در درصد سلول‌های فاز G2/M برای گروه شاهد منفی و عصاره‌ی J. Polycarpus وجود نداشت، اما این عصاره باعث گردید که درصد بیشتری از سلول‌ها از فاز G0/G1 خارج شده، وارد فاز سنتز گردند و به عبارت دیگر، اجزای موجود در این عصاره توانست قدرت سنتز سلولی را افزایش دهد؛ به گونه‌ای که سلول‌ها از ۴۷/۵۲ درصد در گروه شاهد منفی به ۷۲/۳۹ درصد افزایش یافت (شکل‌های ۱ و ۲). اثر عصاره‌ی گیاهی میوه‌ی J. Excelsa بر پرولیفراسیون رده‌ی سلولی MCF-7 طی فازهای چرخه‌ی سلولی در مقایسه با گروه شاهد منفی، نشان دهنده‌ی تجمع ۶ برابری جمعیت سلولی در فاز G2/M بود که این اثر با الگوی اثر Taxol در توقف و تجمع سلول‌ها در فاز G2/M مشابهت داشت. همین الگو مشخص نمود که سنتز تا حد ۲۴/۱۷ درصد،

حاصل داده‌ها به صورت درصد وجود هسته‌های سلول‌ها در فاز سنتز، G0/G1 و G2/M (میتوز) در جمعیت سلولی ثبت گردید. علاوه بر این، هیستوگرام‌های حاصل از آنالیز داده‌ها ارایه شد که نمونه‌هایی از آن‌ها در ادامه آمده است.

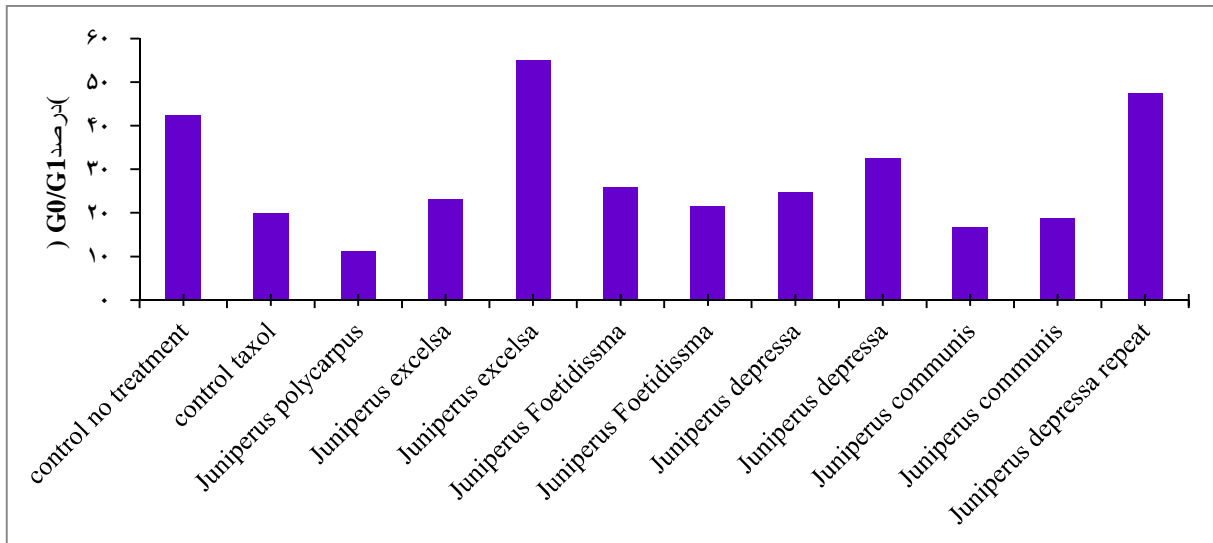
رنگ‌آمیزی سلول‌های MCF-7: کیت پروپیدیوم آیویدید Sigma chemical (DNA con3, propidium Iodide) از شرکت (آلمان) خریداری گردید. پروپیدیوم آیویدید می‌تواند هسته‌ی سلول‌ها را رنگ‌آمیزی کند؛ به گونه‌ای که این رنگ‌آمیزی با استفاده از شناساگرهای دستگاه فلوسایتومتری قابل خوانش باشد. هسته‌های سلولی رنگ‌آمیزی شده از مسیر شناساگرهای الکترونیک دستگاه فلوسایتومتری عبور داده می‌شوند. در این مرحله علاوه بر شمارش هسته‌های عبور یافته، قطر هسته‌های سلولی نیز اندازه‌گیری می‌شوند و پس از عبور ۱۰^۴ سلول از مقابل شناساگرهای دستگاه، اطلاعات جمعیت سلولی عبور یافته به صورت آماری با استفاده از نرم‌افزارهای Cylchred و CellQuest آنالیز می‌گردد. هسته‌ها بر حسب اندازه در روی محور X با صورت ۲n کروموزوم برای فاز G0/G1، ۴n کروموزوم برای فاز میتوز و اندازه‌های بینابینی برای فاز سنتز محاسبه آماری می‌شود و تجزیه و تحلیل حاصل شده به صورت درصد جمعیت سلولی در هر کدام از فازهای چرخه‌ی سلولی تعیین گردید. جمعیت آماری حاصل از خوانش ده هزار سلول همراه با هیستوگرام در فایل‌های اطلاعاتی ضبط و سپس مورد تجزیه و تحلیل و مقایسه قرار می‌گیرد (۸-۱۱). عصاره‌گیری و تهیه‌ی نمونه‌ی خشک طبق روش‌های استاندارد و مرسوم در دانشکده‌ی داروسازی انجام گرفت.

یافته‌ها

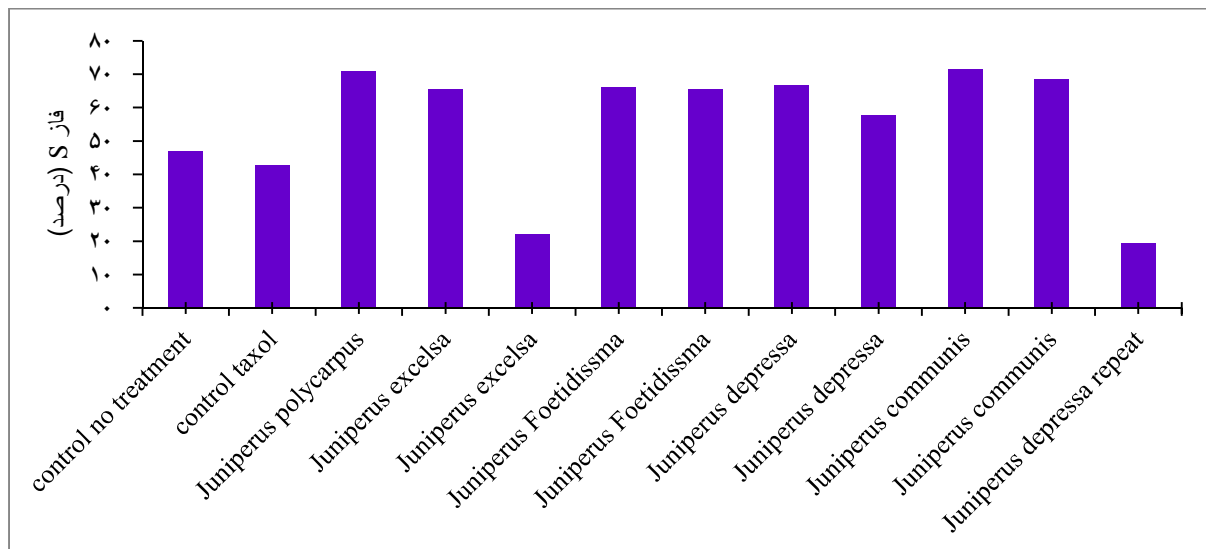
بر اساس داده‌های جدول ۱، قدرت پرولیفراسیون سلولی MCF-7 تحت تأثیر ۱۰ میکرولیتر بر میلی‌لیتر (غلظت 1x) در مقایسه با چاهک

جدول ۱. تیمار سلول‌های رده‌ی MCF-7 با غلظت 1x به مقدار ۱۰ میکرولیتر بر میلی‌لیتر از عصاره‌های گیاهان مخروطی ایران

مراحل چرخه‌ی سلولی			عصاره‌های گیاهی
G2/M (درصد)	سنتز (درصد)	G0/G1 (درصد)	
۶/۶۲	۴۷/۵۲	۴۵/۸۶	گروه شاهد بدون تیمار
۴۲/۵۱	۴۰/۱۸	۱۷/۳۱	شاهد مثبت با Taxol
۲۱/۵۴	۶۸/۹۰	۹/۵۶	برگ سرشاخه‌ی نر Juniperus polycarpus
۷/۳۷	۷۲/۳۹	۲۰/۲۴	سرشاخه‌ی برگ‌دار Juniperus excels
۳۵/۶۹	۲۴/۱۷	۴۰/۱۴	میوه Juniperus excels
۶/۱۲	۷۱/۴۶	۲۲/۴۲	برگ نر Juniperus Foetidissima
۸/۷۷	۷۳/۳۱	۱۷/۹۲	برگ ماده Juniperus Foetidissima
۵/۶۲	۷۸/۴۹	۱۵/۸۹	میوه Juniperus depressa
۵/۳۵	۷۸/۱۸	۱۶/۴۷	برگ نر Juniperus depressa
۸/۳۱	۷۳/۱۳	۱۸/۵۶	برگ ماده Juniperus communis
۶/۴۸	۷۲/۳۸	۲۱/۱۴	برگ نر Juniperus communis
۷/۴۰	۷۰/۸۴	۲۱/۷۶	تکرار برگ نر Juniperus depressa



شکل ۱. اثر عصاره‌های گیاهی با غلظت ۱X در فاز G0/G1 چرخه سلولی رده‌ی MCF-7 سرطان سینه پس از ۴۸ ساعت



شکل ۲. اثر عصاره‌های گیاهی با غلظت ۱X در فاز S چرخه سلولی رده‌ی MCF-7 سرطان سینه پس از ۴۸ ساعت

تأثیر برگ سرشاخه‌ی ماده‌ی *J. Foetidissima* بر چرخه‌ی سلولی رده‌ی MCF-7 سرطان سینه در مقایسه با الگوی شاهد منفی، نشان دهنده‌ی عدم تغییر نسبی در جمعیت سلولی موجود در فاز G2/M بود. علاوه بر این، حرکت سلول‌ها و تحریک سستز سلولی از فاز G0/G1 به فاز سستز، ۷۳/۳۱-نسبت به ۴۷/۵۲ درصد بود و این الگو نشانگر عدم تفاوت در الگوی تحریک چرخه‌ی سلولی بین برگ سرشاخه‌ی نر و برگ سرشاخه‌ی ماده عصاره‌ی گیاه *J. Foetidissima* می‌باشد، اما اثر توقف کنندگی فازهای چرخه‌ی سلولی در این گیاه مشاهده نشد (جدول ۱).

جدول ۱ نشانگر اثر عصاره‌ی گیاهی میوه‌ی *J. Depressa* بر روند پرولیفراسیون سلولی رده‌ی MCF-7 سرطان سینه است؛ به گونه‌ای که

بدون این که تغییر معنی‌داری در فاز G0/G1 ایجاد کند، کاهش نشان داد و بیشتر جمعیت سلولی از فاز سستز به فاز G2/M حرکت پیدا کرد و در فاز G2/M انباشتگی مشاهده شد (جدول ۱).

الگوی تأثیر عصاره‌ی برگ نر *J. Foetidissima* بر چرخه‌ی سلولی MCF-7 در شرایط آزمایش و در مقایسه با الگوی شاهد منفی نشان دهنده‌ی عدم تغییر در فاز G2/M بود، اما همین مقایسه بیانگر حرکت جمعیت سلولی از فاز G0/G1 به فاز سستز (۷۱/۴۶ درصد) می‌باشد (جدول ۱). این یافته حاکی از توانایی تأثیر عصاره‌ی *J. Foetidissima* بر سستز سلول‌های رده‌ی MCF-7 سرطان سینه بود (شکل‌های ۱ و ۲).

پرولیفراسیون سلولی رده‌ی MCF-7 سرطان سینه نیز شبیه اثر عصاره‌ی برگ سرشاخه‌ی ماده‌ی آن بود و تفاوت معنی‌داری میان این دو عصاره وجود نداشت. تکرار اثر عصاره‌ی سرشاخه‌ی برگ نر گیاه *J. Depressa* به عنوان الگوی شاهد و تکرارپذیری آزمایش‌ها در چاهک مستقل انجام گرفت که تفاوت معنی‌داری با مقادیر جمعیت سلولی عصاره‌ی برگ نر *J. communis* مشاهده نشد و این امر بیانگر صحت آزمایش‌ها در چاهک‌های مختلف کشت سلولی می‌باشد.

بر اساس داده‌های جدول ۲، مقادیر عصاره‌های گیاهی مورد مصرف (۰/۱X) ۱۰ میکرولیتر بر میلی‌لیتر بود، اما اثرات اعمال شده بر چرخه‌ی سلولی رده‌ی MCF-7 تا حدودی مشابه غلظت به کار رفته در ۱X مندرج در جدول ۱ می‌باشد و اغلب تفاوت‌های جمعیت سلولی در هر فاز چرخه‌ی سلولی، بیشتر از ۱۰ درصد در هر دو رقت به کار رفته نمی‌باشد. با این حال مشخص گردید که عصاره‌ی میوه *J. Excelsa* قدرت سنتز رده‌ی MCF-7 را از ۴۶/۸۱ درصد در الگوی شاهد به ۲۱/۹۷ درصد تقلیل داد و نیز همین عصاره توانست ۲۳/۱۱ درصد جمعیت سلولی را در فاز G2/M بلوکه کند که از لحاظ آماری حدود ۳ برابر میزان الگوی شاهد منفی بود.

شکل‌های ۱ و ۲ به عنوان نماینده‌ی تأثیر غلظتی از عصاره‌های مختلف در تغییر تجمع سلولی فاز سنتز و G0/G1 نشان داده شده است و کاهش توانایی سنتز در شکل ۲ (بیشتر از ۵۰ درصد) به خوبی نمایانگر تأثیر عصاره بر سنتز DNA سلول‌های MCF-7 می‌باشد. علاوه بر این، شکل ۳ هیستوگرام حاصل از نمونه‌ی سلول‌های تحت آزمایش در مراحل مختلف چرخه‌ی سلولی را نشان می‌دهد.

تغییری در جمعیت سلولی فاز G2/M در مقایسه با الگوی شاهد منفی مشاهده نگردید. علاوه بر این، حرکت جمعیت سلولی از فاز G0/G1 به فاز سنتز و افزایش جمعیت سلولی در فاز سنتز در مقایسه با الگوی شاهد منفی مشاهده شد. بنابراین، این عصاره نیز توانایی متوقف نمودن پرولیفراسیون سلولی را ندارد (شکل‌های ۱ و ۲).

یافته‌های جدول ۱ نشان دهنده‌ی تأثیر عصاره‌ی برگ سرشاخه‌ی گیاه نر *J. Depressa* بر پرولیفراسیون سلولی رده‌ی MCF-7 سرطان سینه می‌باشد. در این تجربه، تغییری در جمعیت سلولی موجود در فاز G2/M نسبت به الگوی شاهد منفی و نیز با عصاره‌ی میوه همین گیاه ایجاد نشد. علاوه بر این، ترکیبات موجود در عصاره‌ی برگ سرشاخه‌ی نر این گیاه توانست شیفت جمعیت سلولی را در G0/G1 ایجاد کند و به فاز سنتز سلولی روانه سازد که مقادیر جمعیت سلولی نسبت به الگوی شاهد منفی (۴۷/۵۲ درصد)، ۷۸/۱۸ درصد افزایش داشت. بنابراین، ترکیبات این عصاره توانست به پرولیفراسیون سلولی رده‌ی MCF-7 در جهت افزایش سنتز کمک نماید.

ویژگی‌های اثر عصاره‌ی برگ سرشاخه‌ی ماده‌ی *J. Communis* بر پرولیفراسیون سلولی رده‌ی MCF-7 سرطان سینه، نشانگر عدم تغییر جمعیت سلولی در فاز G2/M نسبت به الگوی شاهد منفی می‌باشد. همچنین، حرکت جمعیت سلولی از فاز G0/G1 به فاز سنتز تا حد ۷۳/۱۳ درصد مشاهده شد که این یافته نمایانگر تأثیر بر تحریک پرولیفراسیون رده‌ی سلولی MCF-7 و افزایش جمعیت سلولی در فاز سنتز بود (جدول ۱).

تأثیر عصاره‌ی سرشاخه‌ی برگ گیاه نر *J. Communis* بر

جدول ۲. تیمار سلول‌های رده‌ی MCF-7 با غلظت ۰/۱X به مقدار ۱۰ میکرولیتر بر میلی‌لیتر از عصاره‌های گیاهان مخروطی ایران

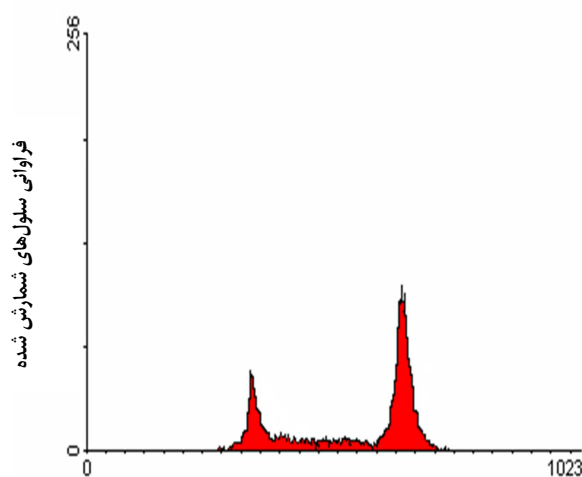
مراحل چرخه‌ی سلولی			عصاره‌های گیاهی
G2M (درصد)	S (درصد)	G0/G1 (درصد)	
۱۰/۸۱	۴۶/۸۱	۴۲/۳۸	شاهد بدون تیمار
۳۷/۵۸	۴۲/۶۳	۱۹/۷۹	شاهد مثبت با Taxol
۱۷/۷۴	۷۱/۰۲	۱۱/۲۴	برگ سرشاخه‌ی نر <i>Juniperus polycarpus</i>
۱۱/۳۷	۶۵/۴۶	۲۳/۱۷	سرشاخه‌ی برگ‌دار <i>Juniperus excelsa</i>
۲۳/۱۱	۲۱/۹۷	۵۴/۹۲	میوه <i>Juniperus excelsa</i>
۸/۱۸	۶۶/۰۴	۲۵/۷۸	برگ نر <i>Juniperus Foetidissima</i>
۰۰/۱۳	۶۵/۴۳	۲۱/۵۷	برگ ماده <i>Juniperus Foetidissima</i>
۸/۸۴	۶۶/۵۶	۲۴/۶۰	میوه <i>Juniperus depressa</i>
۹/۸۳	۵۷/۶۱	۳۲/۵۶	برگ نر <i>Juniperus depressa</i>
۱۱/۸۵	۷۱/۴۷	۱۶/۶۸	برگ ماده <i>Juniperus communis</i>
۱۲/۷۲	۶۸/۵۶	۱۸/۷۲	برگ نر <i>Juniperus communis</i>
۳۳/۳۲	۱۹/۲۷	۴۷/۴۱	تکرار میوه <i>Juniperus depressa</i>

تحقیق Yan و همکاران نشان داد که عصاره‌های مورد استفاده دارای اثرات توکسیک در غلظت‌های بالا هستند و در غلظت‌های کاهش یافته قدرت توقف پرولیفراسیون سلولی را دارند. علاوه بر این، در مطالعه‌ی آنان عوامل دیگری از سلول‌های Bel-7402 مانند قدرت رشد و تکثیر، تمایز و میزان آپوپتوز تحت تأثیر عصاره‌های مورد آزمایش بررسی گردید (۵) که از این لحاظ با تحقیق حاضر دارای وجوه متفاوتی می‌باشد؛ چرا که در تحقیق حاضر فقط به بررسی مقادیر جمعیت سلولی در فازهای چرخه‌ی سلولی و سنجش با فلوسایتومتری پرداخته شد.

کشت سلول‌های سرطانی و سنجش مؤثر بودن دارو یا عصاره‌ی گیاهی نه تنها از لحاظ چرخه‌ی سلولی مورد بررسی قرار می‌گیرد، بلکه آزمون‌های متعدد دیگری نیز در سلول‌ها و یا تحت تأثیر مواد متفاوت ارزیابی می‌شود. در مطالعه‌ی Yan و همکاران، میزان آلبومین و آلفا۲-میکروگلوبولین حاصل از رشد سلول‌های هیپاتوسلولار کارسینومای Bel-7402 تحت اثر غلظت‌های متفاوت عصاره‌ها انجام گردید (۵) که از این لحاظ می‌توان رده‌های سلول‌های سرطانی تحت آزمایش را برای کارهای مشابه فرآورده‌های متابولیک بررسی نمود. تحقیق حاضر به دلیل این که هم به صورت کار مقدماتی بود و هم به دنبال غربالگری عصاره انجام گرفت، فاقد بررسی متابولیک‌های سلولی بود. بنابراین، می‌توان برای فعالیت‌های دیگر، هم سلول‌های سرطانی متعددی را کاندید بررسی نمود و هم به جنبه‌ی متابولیت‌ها و جنبه‌های دیگر بیولوژی سلولی پرداخت.

در تحقیق Andalib و همکاران اثر سیتوکین‌های IGF-2، IFN γ (Interferon- γ)، IFN α ، (Insulin-like growth factor-2) TNF α ، (Transforming growth factor-beta 2) TGF β 2، (Tumor necrosis factor- α) IL-6، (Interleukin-6) IL-1b بر چرخه‌ی سلولی سلول‌های سرطانی ملانوما بررسی گردید (۱۲). در مطالعه‌ی آنان مشخص شد که سیتوکین‌های مورد مطالعه با این که به صورت نوترکیب تهیه شده‌اند، اما اثر آن‌ها در غلظت‌های متفاوت بر چرخه‌ی سلولی سلول‌های سرطانی مورد مطالعه به صورت متمایزی تفاوت دارد. برای مثال اثر IL-6 و TGF β 2 در کاهش توانایی سلولی در مرحله‌ی سنتز DNA نشان داده شد. علاوه بر این، در نظر گرفتن سایر ویژگی‌های بیولوژیک مواد مؤثر بر سلول‌های تحت آزمایش از ضروریات روش علمی به حوادث زیستی سلولی به غیر از بررسی چرخه‌ی سلولی می‌باشد.

همان‌گونه که در مقدمه اشاره گردید، همواره تحقیقات زیادی در زمینه‌ی بررسی اثر عصاره‌ها و مواد شیمیایی یا سنتتیک بر روی انواع مختلفی از سلول‌های سرطانی انجام شده است؛ به طور مثال اثر ضد سرطانی عصاره‌های الکلی گیاه *Annona glabra* که یک گیاه خودرو



تجمع سلول‌ها در فازهای مختلف چرخه‌ی سلولی G0/G1-S- G2/M

شکل ۳. تجمع سلول‌های سرطانی رده‌ی MCF-7 در فازهای مختلف چرخه‌ی سلولی

فراوانی سلول‌ها با استفاده از نرم‌افزار Cylchred و پس از تجزیه و تحلیل داده‌ها با نرم‌افزار CellQuest حاصل از فلوسایتومتری، انجام گردید.

تعداد 1×10^5 سلول قرار داده شد و تا رشد Subconfluent کامل گردید و سپس عصاره‌ی گیاهی با غلظت ۱X به مقدار ۱۰ میکرولیتر بر میلی‌لیتر به محیط کشت RPMI اضافه شد. پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد، سلول‌ها جمع‌آوری و حاصل هر چاهک در یک لوله‌ی آزمایش مستقل با پروپیدیوم آبیودید رنگ‌آمیزی گردید. طبق دستورالعمل کیت و با استفاده از دستگاه فلوسایتومتری، در هر خوانش 10^4 سلول مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. درصد سلول‌ها در هر کدام از فازهای چرخه‌ی سلولی تحت تأثیر عصاره‌ی گیاهی ۴۸ ساعت پس از تیمار در جداول ۱ و ۲ نشان داده شده است.

بحث

به دلیل این که عصاره‌های مصرف شده در بررسی حاضر به گیاهان مخروطی ناحیه‌ی شمال ایران اختصاص دارد و همه‌ی مراحل عصاره‌گیری و تعیین غلظت در بوم و ناحیه‌ی مورد تحقیق انجام گرفت، بنابراین چنین مطالعه‌ای ویژه می‌باشد و فقط می‌توان به صورت کلی تأثیر عصاره‌های مختلف گیاهی و یا غیر گیاهی را که بر سلول‌های سرطانی تأثیر داشته‌اند، مقایسه نمود. به لحاظ رده‌ی سلولی مورد نظر (MCF-7)، از آنجایی که تحقیقات مشابه بر روی سلول‌های متفاوت با منشأ سرطان‌های مختلف انجام شده است، مقایسه‌ی چنین مطالعاتی می‌تواند با رده‌های سلول‌های سرطانی دیگر نیز انجام گیرد.

سلول‌های رده‌ی H661 سرطان ریه‌ی انسان را در فاز سنتز چرخه‌ی سلولی متوقف می‌نماید (۱۵). Fishbein و همکاران نیز در مطالعه‌ی خود اثر عصاره‌ی Asian ginseng را بر پرولیفراسیون رده‌ی سلولی HCT-116 سرطان کولورکتال بررسی کردند و نشان دادند که سلول‌ها در فاز G1 چرخه‌ی سلولی متوقف می‌گردند و عصاره‌ی مذکور به عنوان آدجوانت‌تراپی در درمان سرطان‌های کولورکتال معرفی گردید (۱۶). تحقیق Xiao و همکاران اثر عصاره‌ی گیاه Nispex را بر روی پرولیفراسیون سلول‌های سرطان انسان گزارش نمود (۱۷). نتایج مطالعه‌ی Gridling و همکاران، گزارش اثر دو گیاه Guatemala Pluchea odorata و Phlebodium را منتشر کرد. تحقیقات آن‌ها نشان داد که این عصاره‌ها می‌توانند سلول‌های رده‌ی HL-60 و MCF-7 را در فاز G2/M متوقف نمایند. علاوه بر این، در بررسی جامع آن‌ها سایر فاکتورهای سلولی مانند آنزیم‌های مؤثر در چرخه‌ی سلولی مثل سیکلین‌ها و مراحل کنترل سلولی و پروتئین‌های مؤثر در چرخه‌ی سلولی نیز بررسی گردید (۱۸).

در تحقیقات پیشرفته‌ای که امروزه انجام می‌گیرد، پس از یافتن اثر ضد سرطانی یک ترکیب خاص، بررسی ترکیب ویژه‌ی واجد ماده‌ی مؤثر ضروری به نظر می‌رسد و چنین فعالیتی می‌تواند مرحله‌ی بعدی بر مبنای اطلاعات حاصل در بررسی باشد. چنانچه در تحقیق Wang و همکاران، علاوه بر اثرات ضد پرولیفراسیون سلولی اسید Norsolorinic حاصل از قارچ *Aspergillus nidulans* بر رده‌ی سلولی MCF-7 سرطان سینه، تأثیر آن بر چرخه‌ی سلولی، میزان توانایی مرگ برنامه‌ریزی شده‌ی سلولی و گیرنده‌های القای مرگ سلولی نیز مورد بررسی قرار گرفت (۷). از لحاظ اثر عصاره‌ی قارچی مذکور بر سلول‌های رده‌ی MCF-7 در جنبه‌ی سنجش پرولیفراسیون سلولی، مطالعه‌ی Wang و همکاران با پروژه حاضر وجوه مشترکی داشت، اما از نظر تعیین دقیق‌تر و تخلیص عصاره‌ی مورد نظر و نیز بررسی جنبه‌های دیگر بیولوژیک سلول‌های MCF-7، انجام تحقیقات پیشرفته‌تر ضروری می‌باشد. همچنین، لازم است در مطالعات بعدی، گسترش مرزهای تحقیقاتی در این زمینه مد نظر قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل طرح پژوهشی شماره‌ی ۸۰۰۱۶ مصوب معاونت محترم پژوهشی و فناوری دانشگاه علوم پزشکی اصفهان می‌باشد. بدین وسیله از حمایت‌های این معاونت سپاسگزار می‌گردم.

در مناطق گرمسیری آمریکا و آسیا است، بر روی رده‌های سلولی لوسمی انسان (CEM/NLB) بررسی گردید (۶). نتایج نشان داد که عصاره‌ها در یک روند وابسته به غلظت، توانایی ایجاد مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده را دارند. بنابراین، ویژگی ضد پرولیفراسیون سلولی آن‌ها در فاز G0/G1 چرخه‌ی سلول به صورت توقف سلولی در این مرحله گزارش شد. در بررسی حاضر اثر عصاره‌ی میوه‌ی J. Excels در کاهش درصد سلول‌های مرحله‌ی سنتز به خوبی نشان داده شد (شکل‌های ۱ و ۲ و جداول ۱ و ۲).

در مواردی که ترکیبات گیاهی به صورت عصاره و مرکب از کلیه‌ی مواد متشکله‌ی بافت گیاهی در زمان استحصال حاصل شده است، تأثیر آن به صورت کلی قابل بیان می‌باشد و ممکن است جهت پی‌گیری و مشخص نمودن ترکیب مؤثر در مواد ایجاد شده، تحقیقات بیشتری جهت آنالیز و شناسایی انجام شود و احتمال این امر نیز وجود دارد که ماده‌ی مؤثر مورد شناسایی در سیر تکامل بیولوژیک گیاه، در سایر اندام‌ها نیز ظاهر شود و یا موارد مشابه در گیاهان دیگری نیز وجود داشته باشد. به همین دلیل، منبع مورد آزمایش مانند عصاره‌ی میوه‌ی J. Excels به عنوان ماده‌ی ضد پرولیفراسیون سلولی رده‌ی MCF-7 بیان می‌گردد (شکل ۲). همان‌گونه که Cochrane و همکاران عصاره‌ی الکلی دانه‌ی *Annona glabra* را به عنوان منبع مواد متشکله‌ی داروی ضد سرطان لوسمی معرفی نمودند (۶)، این موضوع می‌تواند یک یافته‌ی قابل تعمیم برای سایر تحقیقات مشابه نیز باشد.

در مطالعه‌ی نوروزی و یزدان‌پرست، اثر عصاره‌ی *Dendrostellera lessertii* بر فعالیت پرولیفراسیون سلولی سلول‌های سرطانی چندین رده‌ی سلولی گزارش گردید. آنالیز فلوسایتومتری حاصل از تحقیقات آنان نشان داد که فاز G1 چرخه‌ی سلولی تحت تأثیر عصاره‌ی خالص جدا شده متوقف می‌شود (۱۳). نتایج تحقیق Mathur و همکاران اثر ضد سرطانی عصاره‌ی *Calotropis procera* را بر روی رده‌ی سلولی Hep2 نشان داد. بررسی فلوسایتومتری سلول‌ها در بررسی آنان حاکی از آن بود که عصاره‌ی مذکور، سلول‌ها را در فاز سنتز متوقف می‌کند و مانع ورود به فاز G2/M می‌شود (۱۴). بنابراین، با این که سلول‌ها و عصاره‌ی مورد استفاده در مطالعه‌ی آن‌ها با تحقیق حاضر متفاوت می‌باشد، اما روش بررسی چرخه‌ی سلولی با استفاده از فلوسایتومتری می‌تواند در زمینه‌ی تعمیق و گسترش نتایج حاصل تا حصول تهیه‌ی عصاره‌ی مؤثر به عنوان داروی کاربردی استفاده گردد.

Wu و همکاران به این نتیجه رسیدند که عصاره‌ی SCEPP-5،

References

1. Castell JV, Gomez-Lechon MJ. In vitro methods in pharmaceutical research. New York, NY: Academic Press; 1996. p. 1-15, 33-55.
2. Freshney RI. Animal cell culture: A practical

- approach. 2nd ed. Oxford, UK: IRL press; 1994. p. 263-300.
3. Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J. *Molecular cell biology*. 5th ed. New York, NY: WH Freeman and Company; 2004. p. 883-96.
 4. Davis J. *Basic cell culture: A practical approach*. Oxford, UK: Oxford University Press; 1994. p. 57-22.
 5. Yan ZC, Chen D, Wu XZ, Xie GR, Ba Y, Yan Z. Effects of aqueous extracts of *Aconitum carmichaeli*, *Rhizoma bolbostemmatidis*, *Phytolacca acinosa*, *Panax notoginseng* and *Gekko swinhonis* Guenther on Bel-7402 cells. *World J Gastroenterol* 2007; 13(19): 2743-6.
 6. Cochrane CB, Nair PK, Melnick SJ, Resek AP, Ramachandran C. Anticancer effects of *Annona glabra* plant extracts in human leukemia cell lines. *Anticancer Res* 2008; 28(2A): 965-71.
 7. Wang CC, Chiang YM, Kuo PL, Chang JK, Hsu YL. Norsolorinic acid from *Aspergillus nidulans* inhibits the proliferation of human breast adenocarcinoma MCF-7 cells via Fas-mediated pathway. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2008; 102(6): 491-7.
 8. Wang CZ, Xie JT, Fishbein A, Aung HH, He H, Mehendale SR, et al. Antiproliferative effects of different plant parts of *Panax notoginseng* on SW480 human colorectal cancer cells. *Phytother Res* 2009; 23(1): 6-13.
 9. Bowen IH, Lewis JR. Rutaceous constituents. Part 10: A phytochemical and antitumour survey of Malayan rutaceous plants. *Planta Med* 1978; 34(2): 129-34.
 10. Bhakuni DS, Bittner M, Marticorena C, Silva M, Weldt E, Hoeneisen M. Screening of Chilean plants for anticancer activity. I. *Lloydia* 1976; 39(4): 225-43.
 11. Handa SS, Kinghorn AD, Cordell GA, Farnsworth NR. Plant anticancer agents XXXV. Constituents of *Soulamea soulameoides*. *J Nat Prod* 1983; 46(3): 359-64.
 12. Andalib AR, Lawry J, Burns BJ, Murray AK, Herlyn M, Rees RC. Cytokine and growth factor modulation of cell cycle events in human melanoma cell lines. *Med J I.R.* Iran 1998 12 (3): 249-57.
 13. Nowrouzi A, Yazdanparast R. G1 phase arrest and apoptosis induction in human thyroid cancer cell line Thr.C1.PI33 by 3-hydrogenkwadaphnin isolated from *Dendrostellera lessertii*. *Iran Biomed J* 2007; 11(4): 215-21.
 14. Mathur R, Gupta SK, Mathur SR, Velpandian T. Anti-tumor studies with extracts of *Calotropis procera* (Ait.) R.Br. root employing Hep2 cells and their possible mechanism of action. *Indian J Exp Biol* 2009; 47(5): 343-8.
 15. Wu SJ, Chang SP, Lin DL, Wang SS, Hou FF, Ng LT. Supercritical carbon dioxide extract of *Physalis peruviana* induced cell cycle arrest and apoptosis in human lung cancer H661 cells. *Food Chem Toxicol* 2009; 47(6): 1132-8.
 16. Fishbein AB, Wang CZ, Li XL, Mehendale SR, Sun S, Aung HH, et al. Asian ginseng enhances the anti-proliferative effect of 5-fluorouracil on human colorectal cancer: comparison between white and red ginseng. *Arch Pharm Res* 2009; 32(4): 505-13.
 17. Xiao YJ, Chen YZ, Chen BH. [Selective effect of nispex in inhibiting human cancer cell proliferation and inducing cell apoptosis]. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi* 2009; 29(2): 148-52.
 18. Gridling M, Stark N, Madlener S, Lackner A, Popescu R, Benedek B, et al. In vitro anti-cancer activity of two ethno-pharmacological healing plants from Guatemala *Pluchea odorata* and *Phlebodium decumanum*. *Int J Oncol* 2009; 34(4): 1117-28.

The Effect of Persian Juniperus Excelsa Extracts on Cell-Cycle Phases of MCF-7 Breast Cancer Cell Line

Alireza Andalib PhD¹, Abbas Jafarian-Dehkordi PhD², Raheleh Shokouhi-Shourmasti MSc³, Shirin Abdolah-Kohpayeh-Esfahani MSc³

Original Article

Abstract

Background: The cell cycle includes four stages in which, DNA content become double during synthesis process; then, the mitosis happens after GAP2 phases, and Gap1 starts again. Cancer cells are immortal and their cell cycle phases go on repeatedly in tissue culture media. It was proposed that adding several plant extracts in cell culture media has modulation effect in cell cycle phases.

Methods: The following plant extracts were derived from native Persian Juniperus spp. from north and north-west of Iran and were used with different concentration: 1- Juniperus polycarpus leaves, 2- Juniperus excels branches, 3- Juniperus excels fruits, 4- Juniperus foetidissima leaves, 5- Juniperus foetidissima leaves, 6- Juniperus depressa fruits, 7- Juniperus depressa leaves, 8- Juniperus communis and 9- Juniperus communis leaves. The breast cancer cell line, MCF-7, was cultured in media and the plant extracts were added in tissue culture wells; after incubation time; the cells were harvested and treated with Propidium Iodide according to standard protocol. The stained nucleus/DNA contents were measured via flow cytometry and using CellQuest and Cylchred softwares for analyzing.

Findings: Different patterns of cell cycle phases were obtained after treating with the extract concentrations; for instance, 45.86% of untreated control cells were in G0/G1 phase, 47.52% in synthesis phase and 6.62% in G2/M phase. Treating with taxol (a drug that is mitotic inhibitor), as positive control, tended to 17.31% in G0/G1 phase, 40.18% in synthesis phase and 42.51% in G2/M phase. The most effective extract was from J. Excelsa fruit that reduced the synthesis phase to 21.97% and blocked 23.11% of cell population in G2/M phase. Statistical analysis showed a significant inhibitory effect for the J. Excelsa fruit extract in MCF-7 cell line (P = 0.0001).

Conclusion: The Persian junipers excelsa extracts are effective on tumor cells proliferation which could be used for screening the anticancer agents.

Keywords: MCF-7, Persian Juniperus excels, Plant extracts, Flow cytometry, Cell cycle

Citation: Andalib A, Jafarian-Dehkordi A, Shokouhi-Shourmasti R, Abdolah-Kohpayeh-Esfahani Sh. **The Effect of Persian Juniperus Excelsa Extracts on Cell-Cycle Phases of MCF-7 Breast Cancer Cell Line.** J Isfahan Med Sch 2015; 33(360): 2004-12

1- Professor, Department of Immunology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

2- Professor, Department of Pharmacology, School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

3- Department of Immunology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

Corresponding Author: Alireza Andalib PhD, Email: andalib@med.mui.ac.ir