DOI: 10.22122/jims.v39i636.14126 Published by Vesnu Publications

مجله دانشکده پزشکی اصفهان سال سی و نهم/شماره‌ی ۶۳۶/هفته‌ی چهارم مهر ۱۴۰۰

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۲/۱۵ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۵/۲۱ تاریخ چاپ: ۱۴۰۰/۷/۲۸

اثرات سمیت سلولی و القای آپوپتوز توسط عصاره‌های گیاه Allium Giganteum بر رده‌های سلولی MCF-7 و HeLa

فاطمه حسین‌زاده[۱]، مسعود صادقی دینانی[۲]، علی جهانیان نجف‌آبادی[۳]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: در این مطالعه، اثرات سایتوتوکسیک عصاره‌های مختلف گیاه Allium giganteum بر روی رده‌های سلولی MCF-7 و HeLa به منظور دست‌یابی به ترکیبات جدید واجد اثرات ضد سرطان بررسی گردید.

روش‌ها: گل‌های گیاه با روش عصاره‌گیری ۴ مرحله‌ای با حلال‌هایی با قطبیت متفاوت، عصاره‌گیری، و سپس، سمیت سلولی عصاره‌ها پس از تیمار ۴۸ ساعته‌ی سلول‌ها با غلظت‌های ۱۰، ۲۰ و ۵۰ میکروگرم/میلی‌لیتر از هر کدام از عصاره‌ها، به روش MTT بررسی شد. همچنین، مکانیسم مرگ سلولی القا شده روی سلول‌های MCF-7 به روش فلوسایتومتری، با رنگ‌آمیزی Annexin/PI تعیین شد.

یافته‌ها: آزمون MTT عصاره‌های دی‌کلرومتانی، کلروفرم- متانولی (۹:۱) و بوتانولی در غلظت ۵۰ میکروگرم/میلی‌لیتر روی سلول‌های MCF-7 و در غلظت‌های ۲۰ و ۵۰ میکروگرم/میلی‌لیتر بر روی سلول‌های HeLa سمیت سلولی معنی‌داری نسبت به گروه شاهد نشان داد ($P < ۰/۰۵۰$). عصاره‌ی آبی، هیچ گونه اثر سمیت معنی‌داری نسبت به گروه شاهد نشان نداد. نتایج واکاوی فلوسایتومتری، القای آپوپتوز توسط هر سه عصاره‌ی موثر فوق را نشان داد.

نتیجه‌گیری: عصاره‌های دی‌کلرومتانی، کلروفرم- متانولی (۹:۱) و بوتانولی این گیاه، واجد اثرات سایتوتوکسیک روی سلول‌های سرطانی مورد بررسی بودند و اثرات القای آپوپتوز قابل توجهی (تا ۲۶ درصد) روی سلول‌های MCF-7 القا کردند. با توجه به نتایج مطلوب حاصل از این مطالعه، استخراج و شناسایی ترکیبات موجود در این عصاره‌ها به ویژه استروئید ساپونین‌های موجود در آن‌ها، حایز اهمیت است.

واژگان کلیدی: Allium؛ آپوپتوز؛ ماده‌ی سیتوتوکسیک؛ سلول‌های Michigan cancer foundation-7؛ سلول‌های HeLa

ارجاع: حسین‌زاده فاطمه، صادقی دینانی مسعود، جهانیان نجف‌آبادی علی. **اثرات سمیت سلولی و القای آپوپتوز توسط عصاره‌های گیاه Allium Giganteum بر رده‌های سلولی MCF-7 و HeLa**. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۴۰۰؛ ۳۹ (۶۳۶): ۵۸۳-۵۷۸.

مقدمه

سرطان، یکی از بزرگ ترین مشکلات مرتبط با سلامتی است و بر اساس گزارش‌های GLOBCAN، انتظار می‌رود مرگ و میر سالانه در اثر سرطان در سال ۲۰۴۰ در جهان به ۱۶ میلیون نفر برسد (۲-۱). همچنین، بر اساس گزارش های اخیر وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی، در ایران سومین عامل مرگ و میر پس از بیماری های قلبی- عروقی و تصادفات، سرطان است. این بیماری توسط جهش‌های ژنتیکی در DNA که باعث تغییر شکل یک سلول طبیعی و ایجاد سلول‌های غیر طبیعی که قابلیت تکثیر سریع و تهاجم به سایر اندام‌ها را دارند، اتفاق می‌افتد (۳).

روش های متعددی از جمله جراحی، پرتودرمانی و شیمی درمانی در درمان سرطان مورد استفاده قرار می گیرند (۴). با این وجود، مقاومت سلول های سرطانی به بعضی داروها یکی از مشکلات عمده شیمی درمانی است (۵). پژوهش های اخیر، نشان داده است که استفاده از داروهای گیاهی برای درمان سرطان می تواند عوارض جانبی ایجاد شده توسط این درمان ها را کمتر کند (۶). گیاهان دارویی نظیر پدوفیل (Podophyllum peltatum)، سرخدار (Taxus brevifolia) و گل پریوش (Catharanthus roseus) به ترتیب دارای ترکیبات فعالی مانند پدوفیلوتوکسین (اتوپوزاید و تنیپوزاید)، تاکسان‌ها (پاکلی تاکسول

۱- دکتری عمومی داروسازی، دانشکده‌ی داروسازی و علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۲- دانشیار، گروه فارماکوگنوزی، دانشکده‌ی داروسازی و علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، ایران

۳- دانشیار، گروه بیوتکنولوژی دارویی، دانشکده‌ی داروسازی و علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

نویسنده‌ی مسؤول: علی جهانیان نجف‌آبادی: دانشیار، گروه بیوتکنولوژی دارویی، دانشکده‌ی داروسازی و علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
Email: jahanian@pharm.mui.ac.ir

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 Unported License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

و دوسه تاکسول) و آلکالوئیدهای Vinca (وین کریستین و وین بلاستین) هستند که در درمان انواع مختلف سرطان استفاده می شوند (۸-۷).

گیاهان جنس آلیوم از خانواده ی Amarillydaceae هستند که از زمان باستان به عنوان سبزی خوراکی و چاشنی غذا و همچنین، در طب سنتی به عنوان داروی گیاهی برای درمان انواع مختلف بیماری‌ها مورد استفاده قرار گرفته‌اند. مطالعات نشان داده است که مصرف آلیوم‌ها می تواند در برابر برخی بیماری‌ها نظیر سرطان، چربی خون بالا، دیابت نوع ۲، فشار خون بالا، بیماری‌های قلبی- عروقی، کاتاراکت و عفونت های میکروبی و ویروسی اثر درمانی و محافظت کننده داشته باشد (۱۰-۹). آلیوم‌ها، دارای ترکیبات دارویی گیاهی مانند فلاونوئیدها، ترکیبات ارگانوسولفوره و استروئید ساپونین ها با اثرات دارویی گوناگون هستند که به عنوان منبع ترکیبات مهار کننده‌ی تومور حایز اهمیت می‌باشند. مصرف آلیوم‌ها، می‌تواند خطر ابتلا به سرطان هایی مانند معده، روده، مری و پستان را کاهش دهد. همچنین، ساپونین‌های جدا شده از گیاهان جنس Allium از جمله ترکیبات سایتوتوکسیک ارزشمند می‌باشند و اثر مهار کنندگی رشد رده‌های سلولی سرطانی انسان مانند PC12، 3T3-L1، SF-268، NCI-H460، Michigan cancer foundation-7 (MCF-7)، HEP G2، HeLa و رده ی سلولی سرطانی کلورکتال انسان در مورد این ترکیبات به اثبات رسیده است (۶-۵).

گیاه A. giganteum (والک بلند) با نام محلی کوریا از گیاهان بومی کشورمان است که در استان خراسان رضوی، شهرستان کاشمر، بخش کوه سرخ به صورت خود رو وجود دارد و از آن به عنوان چاشنی غذایی و سبزی خوراکی استفاده می شود. با توجه به اهمیت سرطان به عنوان یکی از مهم ترین عوامل مرگ و میر در اغلب کشورها و همچنین، اهمیت گیاهان جنس آلیوم به عنوان گیاهان دارای اثرات دارویی گوناگون و از جمله اثرات سایتوتوکسیک، این مطالعه برای اولین بار به بررسی وجود اثرات سایتوتوکسیک در عصاره های مختلف گیاه A. giganteum پرداخته است.

روش‌ها

آماده‌سازی عصاره‌ها: پنج کیلوگرم از گل‌های گیاه A. giganteum (با نام محلی کوریا) در اردیبهشت ماه از منطقه ی «کوه سرخ» شهرستان کاشمر در استان خراسان رضوی جمع آوری گردید و پس از شناسایی توسط گیاه‌شناس و خشک نمودن در سایه، آسیاب شد و عصاره‌گیری پودر به دست آمده (۸۳۵ گرم) با استفاده از روش ماسراسیون و به صورت ۴ مرحله‌ای، به ترتیب با استفاده از حلال‌های هگزان، دی‌کلرومتان، کلروفرم- متانول (۹:۱) و متانول صورت گرفت و هر مرحله‌ی عصاره‌گیری ۳ بار با حلال‌های پیش‌گفته تکرار شد. عصاره‌ی متانولی حاصل، پس از خشک شدن توسط دستگاه روتاری، به کمک حلال‌های آب و بوتانول دکانته گردید.

عصاره‌های دی‌کلرومتانی، کلروفرم- متانولی، بوتانولی و آبی تهیه شده با استفاده از دستگاه روتاری عاری از حلال گردید و توسط دستگاه فریز دراير به طور کامل خشک شد. برای بررسی و مقایسه‌ی ترکیبات موجود در عصاره‌ها، از روش کروماتوگرافی لایه‌ی نازک (Thin layer chromatography یا TLC) با بخش متحرک کلروفرم- متانول (۷۰:۳۰) و معرف سریوم سولفات استفاده شد. سپس، ۵ میلی‌گرم از هر کدام از عصاره‌های دی‌کلرومتانی، کلروفرم- متانولی، بوتانولی و آبی در ۳۵۰ میکرولیتر Dimethyl Sulfoxide (DMSO) و ۴/۶۵ میلی‌لیتر آب حل شد و استوک اولیه با غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم/میلی‌لیتر به دست آمد. آن گاه، غلظت‌های ۱۰، ۲۰ و ۵۰ میکروگرم/میلی‌لیتر برای هر ۴ عصاره آماده گردید.

کشت سلول و بررسی سمیت سلولی: در این مطالعه، با توجه به این که هدف ارزیابی اولیه‌ی اثرات سیتوتوکسیک عصاره‌های گیاه A. giganteum بود، جهت بررسی سمیت سلولی از رده‌های سلولی حاصل از دو سرطان متفاوت شامل MCF-7 (سرطان پستان) و HeLa (سرطان دهانه ی رحم) استفاده شد. به این منظور، ابتدا محیط کشت کامل شامل Roswell Park Memorial Institute-1640 (RPMI-1640)، ۱۰ درصد Fetal bovine serum (FBS) و ۱۰۰ میکرولیتر آنتی بیوتیک (پنی سیلین و استرپتومایسین) آماده شد و سلول‌ها با تراکم ۴×۱۰^{۴} در میلی‌لیتر به محیط کشت اضافه گردید و سپس، ۱۸۰ میکرولیتر از سوسپانسیون هر سلول به داخل چاهک های پلیت ۹۶ خانه اضافه شد.

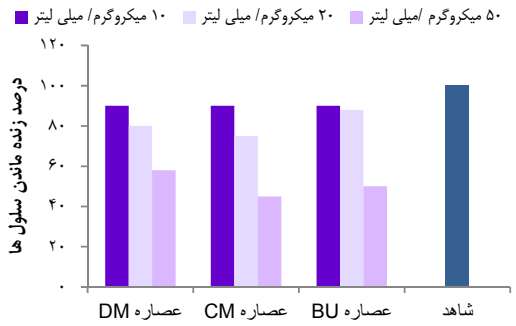
آن گاه، پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت داخل انکوباتور با دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و ۹۵ درصد رطوبت و ۵ درصد CO_2 برای رشد و اتصال سلول‌ها قرار گرفتند. سپس، ۲۰ میکرولیتر از هر کدام از غلظت‌های مختلف عصاره‌های مورد نظر به چاهک‌های پلیت اضافه شد و محیط کشت بدون عصاره (واجد بیشترین غلظت حلال DMSO) به عنوان شاهد منفی در نظر گرفته شد و بعد از گذشت ۴۸ ساعت به هر چاهک پلیت، ۲۰ میکرولیتر 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) (با غلظت ۰/۵ میلی گرم/میلی‌لیتر) اضافه شد و به مدت ۳ ساعت دیگر داخل انکوباتور قرار گرفتند. سپس، به منظور انحلال کریستال های فورمازان ایجاد شده ۱۵۰ میکرولیتر DMSO جایگزین محیط رویی هر چاهک شد و جذب در طول موج ۵۷۰ نانومتر خوانده شد و درصد سلول‌های زنده نسبت به نمونه‌ی شاهد محاسبه شد. هر مرحله برای عصاره‌ها با غلظت‌های مورد نظر حداقل ۳ بار تکرار شد.

بررسی مکانیسم مرگ سلولی با روش فلوسایتومتری: به منظور بررسی مکانیسم مرگ سلولی ناشی از تیمار با عصاره ی مورد نظر، تعداد ۵×۱۰^{۵} سلول MCF-7 در هر چاهک یک پلیت ۶ خانه و در محیط کشت RPMI حاوی ۱۰ درصد FBS کشت داده شد. پلیت ها به مدت ۲۴ ساعت در شرایط کشت سلول انکوبه گردید. سپس، سلول‌ها با کمترین غلظت مهار کنندگی (IC50) عصاره‌های واجد اثر سمیت سلولی تیمار گردید. پس از ۲۴ ساعت، سلول‌ها جمع‌آوری شد و در دمای ۴ درجه‌ی سانتی گراد و شتاب g ۲۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. سپس، سلول‌ها در بافر PBS وارد و دوباره در شرایط پیش گفته سانتریفیوژ شدند. پس از مرحله‌ی شستشو، سلول‌ها در ۱۰۰ میکرولیتر محلول برچسب‌گذاری Annexin/PI معلق شد و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۲۵–۱۵ درجه ی سانتی گراد و تاریکی انکوبه گردید. سپس، ۵۰۰ میکرولیتر بافر انکوباسیون به سلول‌ها افزوده شد و به روش فلوسایتومتری ارزیابی گردید.

واکاوی آماری: نتایج به دست آمده از ۳ مرحله تکرار آزمایش، به صورت میانگین ± انحراف معیار ثبت و گزارش شد. نتایج نهایی به کمک نرم‌افزار Graphpad Prism 9 و با استفاده ازآزمون آماری One-way ANOVA و در سطح معنی‌داری $P < ۰/۰۵۰$ مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها

نتایج حاصل از آزمون MTT بعد از تیمار ۴۸ ساعته‌ی سلول‌های MCF-7 با فراکسیون‌های دی‌کلرومتانی، کلروفرم- متانولی (۹:۱)، بوتانولی و آبی گیاه A. giganteum در غلظت‌های ۱۰ و ۲۰ میکروگرم/میلی‌لیتر اگر چه اثرات سمی بر روی این رده‌ی سلولی نشان دادند، اما اثرات مشاهده شده در مقایسه با نمونه‌ی شاهد معنی‌دار نبود ($P < ۰/۰۵۰$). بررسی اثر سمیت سلولی غلظت ۵۰ میکروگرم/میلی‌لیتر عصاره‌های دی‌کلرومتانی، کلروفرم- متانولی (۹:۱) و بوتانولی گیاه، اثر سمیت قابل توجهی ($P < ۰/۰۵۰$) بر روی این رده‌ی سلولی در مقایسه با گروه شاهد نشان داد. هیچ کدام از سه غلظت عصاره‌ی آبی، اثر سمیت قابل توجهی بر روی این رده‌ی سلولی از خود نشان ندادند (شکل ۱). در بررسی اثر سمیت سلولی عصاره‌های پیش‌گفته بر روی رده‌ی سلولی HeLa در غلظت ۱۰ میکروگرم/میلی‌لیتر، اگر چه اثرات کشندگی سلول مشاهده گردید، اما این اثرات از نظر آماری تفاوت معنی داری با گروه شاهد نداشتند. عصاره‌های دی‌لرومتانی، کلروفرم- متانولی (۹:۱) و بوتانولی گیاه در هر دو غلظت ۲۰ و ۵۰ میکروگرم، اثرات کشندگی سلولی معنی داری ($P < ۰/۰۵۰$) در مقایسه با گروه شاهد از خود نشان دادند. عصاره ی آبی در هیچ یک از غلظت‌های مورد مطالعه بر روی رده‌ی سلولی HeLa از خود اثر سلول‌کشی معنی‌داری نشان نداد (شکل ۲).



شکل ۱. ارزیابی تأثیر عصاره‌های مختلف گیاه A. giganteum در مهار رشد رده‌ی سلولی Michigan cancer foundation-7 (MCF-7) با روش MTT. سلول‌ها با غلظت‌های ۱۰، ۲۰ و ۵۰ میکروگرم/میلی‌لیتر از عصاره‌های مختلف تیمار شدند. پس از ۴۸ ساعت، درصد زنده ماندن سلول‌ها بررسی گردید. هر آزمایش، سه بار تکرار و نتایج بر اساس میانگین ± انحراف معیار سلول‌های زنده گزارش گردید و با مقادیر حاصل از گروه شاهد مقایسه شد.

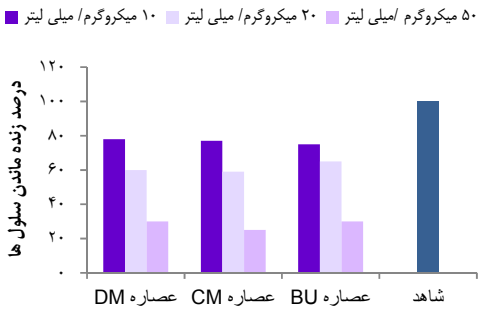
*** بیانگر $P < ۰/۰۵۰$**

DM: عصاره‌ی دی‌کلرومتانی، CM: عصاره‌ی کلروفرم- متانولی (۹:۱)

BU: عصاره‌ی بوتانولی، AQ: عصاره‌ی آبی

بر اساس نتایج حاصل، IC50 برای رده‌ی سلولی MCF-7 در عصاره‌ی دی‌کلرومتان ۶۵/۷۵ میکروگرم/میلی‌لیتر، در عصاره‌ی کلروفرم- متانولی (۹:۱) ۴۴/۵۶ میکروگرم/میلی‌لیتر و در عصاره‌ی بوتانولی ۵۸/۴۴ میکروگرم/میلی‌لیتر محاسبه شد. در خصوص سلول‌های HeLa، IC50 برای عصاره‌ی دی‌کلرومتانی برابر با ۳۱/۵۵ میکروگرم/میلی‌لیتر، عصاره‌ی کلروفرم- متانولی (۹:۱) ۲۸ میکروگرم/میلی‌لیتر و عصاره‌ی بوتانولی ۳۳/۳۶ میکروگرم/میلی‌لیتر محاسبه شد. IC50 عصاره‌ی آبی گیاه A. giganteum برای دو رده‌ی سلولی MCF-7 و HeLa با توجه به عدم تعیین غلظت لازم برای کشتن ۵۰ درصد از سلول‌ها قابل محاسبه‌ی دقیق نبود و به صورت تئوری با آزمون رگرسیون به ترتیب برابر با ۸۰۹/۸۱ و ۱۳۹/۰۹ میکروگرم/میلی‌لیتر محاسبه گردید.

نتایج واکاوی فلوسایتومتری در شکل ۳ آمده است. همان‌طور که در این شکل مشاهده می‌شود، در مقایسه با گروه شاهد، بیشترین میزان بروز آپوپتوز (Early + Late) در سلول های تیمار شده با IC50 از عصاره‌ی دی‌کلرومتانی ایجاد شده است که برابر با حدود ۲۶ درصد از سلول ها را شامل می‌شود. همچنین، تیمار ۲۴ ساعته با عصاره‌ی کلروفرم- متانولی، باعث القای آپوپتوز در حدود ۱۲ درصد از سلول ها و تیمار با IC50 از عصاره‌ی بوتانولی، باعث القای حدود ۶ درصد آپوپتوز در سلول های MCF-7 شده است. عصاره‌ی آبی در مقایسه با سلول های شاهد، فاقد اثر القا کننده‌ی آپوپتوز بود که ممکن است به زمان یا غلظت بیشتری جهت تیمار نیاز بوده باشد. مرگ ناشی از نکروز در تمامی تیمارها، کمتر از ۰/۵ درصد و به طور تقریبی برابر با نمونه‌ی شاهد بود.

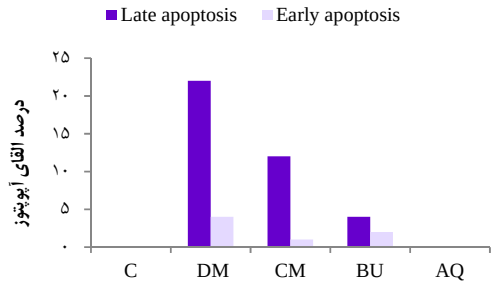


شکل ۲. ارزیابی تأثیر عصاره‌های مختلف گیاه A. giganteum در مهار رشد رده‌ی سلولی HeLa با روش MTT. سلول‌ها با غلظت‌های ۱۰، ۲۰ و ۵۰ میکروگرم/میلی‌لیتر از عصاره‌های مختلف تیمار شدند. پس از ۴۸ ساعت، درصد زنده ماندن سلول‌ها بررسی گردید. هر آزمایش، سه بار تکرار و نتایج بر اساس میانگین ± انحراف معیار سلول‌های زنده گزارش گردید و با مقادیر حاصل از گروه شاهد مقایسه شد.

*** بیانگر P < ۰/۰۵۰**

DM: عصاره‌ی دی‌کلرومتانی، CM: عصاره‌ی کلروفرم- متانولی (۹:۱)

BU: عصاره‌ی بوتانولی، AQ: عصاره‌ی آبی



شکل ۳. بررسی اثر القا کننده‌ی آپوپتوز توسط عصاره‌های مختلف گیاه A. giganteum بر روی رده‌ی سلولی Michigan cancer foundation-7 (MCF-7). سلول‌ها پس از ۲۴ ساعت تیمار با غلظت‌های IC50 از هر کدام از عصاره‌ها مورد رنگ‌آمیزی Annexin V/PI و واکاوی فلوسایتومتری قرار گرفتند.

C: شاهد، T DM: عصاره‌ی دی‌کلرومتانی، CM: عصاره‌ی کلروفرم- متانولی (۹:۱)

BU: عصاره‌ی بوتانولی، AQ: عصاره‌ی آبی

بحث

هدف از انجام این مطالعه، تعیین اثرات سایتوتوکسیک گیاه A. giganteum بر روی رده‌های سلولی مشتق از سرطان پستان و دهانه‌ی رحم به عنوان مرحله‌ی اولیه در تعیین اثربخشی احتمالی ضد سرطان این عصاره‌ها بود. همچنین، مکانسیم القای مرگ سلولی توسط این عصاره‌ها در مطالعه‌ی حاضر، بررسی گردید. مطالعات مختلف نشان می‌دهند که مصرف سیر و پیاز خطر سارکوم و کارسینوما را در بافت‌ها و ارگان‌های مختلف مانند معده، روده‌ی بزرگ، مری، پروستات، مثانه، کبد، ریه، پستان، پوست و مغز کاهش می دهد (۱۱). نتایج مشابهی در ارتباط با خاصیت ضد سرطانی آلیوم ها بر روی دو رده‌ی سلولی MCF-7 و HeLa گزارش شده است که نتایج به دست آمده از گیاه A. giganteum با نتایج این مطالعات هم‌خوانی دارد.

به عنوان مثال، در مطالعه‌ی خزائی و همکاران، اثرات سایتوتوکسیک عصاره‌ی متانولی گیاه Allium atroviolaceum در سلول‌های سرطانی MDA-MB-231، MCF-7، HeLa و HepG2 به ترتیب مقدار IC50 برابر با ۱۱۴/۰، ۸۸/۰، ۸۹/۷ و ۷۰/۰ میکروگرم/میلی‌لیتر نشان داده شده است (۵). در مطالعه‌ی دیگری که به تازگی بر روی عصاره‌ی بوتانولی گیاه A. affine Ledeb صورت گرفته است، اثرات سایتوتوکسیک آن در سلول های سرطانی پستان (MCF-7 و MDA-MB-231) به ترتیب با مقادیر IC50 ۳/۰۵ ± ۴۵/۳۳، ۰/۸۱ ± ۴۰/۱۳ و سلول سرطانی تخمدان (OVCAR-3) با مقدار IC50 ۰/۹۴ ± ۷/۱۳ میکروگرم/میلی‌لیتر نشان داده شده است (۱۲).

نتایج مطالعه‌ی حاضر، مقادیر IC50 در محدوده‌ی ۶۶-۴۵ میکروگرم/میلی‌لیتر از عصاره‌های دی‌کلرومتانی، کلروفرم- متانولی (۹:۱) و بوتانولی برای سلول MCF-7 و مقادیر ۳۲-۲۸ میکروگرم/میلی‌لیتر از سه عصاره‌ی پیش‌گفته بر روی سلول های HeLa نشان داد. در مقایسه با اثر عصاره ی متانولی گیاه Allium atroviolaceum بر رده‌های سلولی MCF-7 (۸۸ میکروگرم/میلی‌لیتر) و HeLa (۸۹/۷ میکروگرم/میلی‌لیتر) (۵)، اثر سمیت سلولی عصاره‌ی کلروفرم- متانولی (۹:۱) مشاهده شده در مطالعه‌ی حاضر با مقادیر IC50 برابر با ۴۴/۵۶ و ۲۸ میکروگرم/میلی‌لیتر، به ترتیب بر روی سلول‌های MCF-7 و HeLa، اثر سمیت سلولی قوی‌تری بوده است که علاوه بر تفاوت در ترکیبات مؤثره‌ی دو جنس از گیاه، به ترکیب حلال مورد استفاده در عصاره‌گیری باز می‌گردد.

در مقایسه با اثر عصاره‌ی بوتانولی گیاه A. affine Ledeb بر روی رده‌ی سلولی MCF-7 (IC50 برابر با ۴۵/۳۳ میکروگرم/میلی‌لیتر) (۱۲)، عصاره‌ی بوتانولی به دست آمده در مطالعه‌ی حاضر، اثر کشندگی سلول ضعیف‌تری (IC50 برابر با ۵۸/۴۴ میکروگرم/میلی‌لیتر) از خود نشان داد که نشان دهنده‌ی احتمال وجود ترکیبات متفاوت در دو جنس گیاه می‌باشد. نتایج واکاوی فلوسایتومتری به دست آمده از این مطالعه، حاکی از آن است که عصاره‌های دی‌کلرومتانی، کلروفرم- متانولی (۹:۱) و بوتانولی گیاه A. giganteum آپوپتوز را در سلول‌های سرطانی MCF-7 القا کرده‌اند. القای آپوپتوز توسط ترکیبات ساپونینی موجود در گیاهان مختلف در تحقیقات متعددی نشان داده شده است. به عنوان مثال، در یک مطالعه با غلظت‌های مختلف ساپونین‌های ریزوم

Paris polyphylla var . yunnanensis به مدت ۴۸ ساعت، نتایج مطالعه، القای آپوپتوز را در سلول‌های MCF-7 نشان داده است (۱۳).

در مطالعه‌ی Yu و همکاران، القای آپوپتوز توسط ساپونین‌های مشتق شده از Allium chinense در دو رده‌ی سلولی B16 ملانوما و 4T1 سرطان پستان مشاهده شده است (۶). در مطالعه‌ی حاضر نیز نتایج بررسی سلول های MCF-7 تیمار شده با غلظت های IC50 از عصاره‌های مختلف در مقایسه با گروه شاهد، نشان دهنده‌ی القای آپوپتوز توسط عصاره‌های دی‌کلرومتانی، کلروفرم- متانولی (۹:۱) و بوتانولی و عدم القای آپوپتوز توسط عصاره ی آبی بود. همچنین، بیشترین میزان القای آپوپتوز توسط عصاره‌ی دی‌کلرومتانی (۲۶ درصد) صورت گرفت.

از آن جایی که آزمون MTT پس از تیمار ۴۸ ساعته‌ی سلول‌ها توسط عصاره‌ها انجام شده است، به نظر می‌رسد برای بررسی اثر القای آپوپتوز در رده های سلولی مورد مطالعه نیز بهتر است زمان تیمار با عصاره ها، تا ۴۸ ساعت افزایش یابد. مطالعات فیتوشیمیایی انجام شده بر روی گیاه A. giganteum نشان می‌دهند که این گیاه، اغلب حاوی ترکیبات استروئید ساپونینی بر مبنای آلیوجنین، دیوسجنین، بتا کلروجنین، یوکاجنین، گانتوجنین، آجیجنین، نئوجیجنین، کاراتاویجنین و لوویجنین است (۱۵-۱۴).

نتیجه‌گیری

به نظر می‌رسد که اثرات سایتوتوکسیک مشاهده شده در این مطالعه، می تواند ناشی از وجود این ترکیبات در عصاره های مختلف گیاه A. giganteum باشد. از این رو، با توجه به نتایج مطلوب حاصل از این مطالعه، استخراج و شناسایی ترکیبات موجود در فراکسیون‌های مختلف گیاه مورد نظر به ویژه استروئید ساپونین‌های موجود در آن‌ها و بررسی اثرات سایتوتوکسیک ترکیبات خالص شده ی نهایی حایز اهمیت است و می‌تواند منجر به شناسایی ترکیبات مؤثر دارویی موجود در این گیاه و انجام مطالعات تکمیلی در مورد آن‌ها شود.

تشکر و قدردانی

این مقاله، برگرفته از پایان‌نامه‌ی دکتری عمومی داروسازی خانم فاطمه حسین‌زاده به شماره‌ی طرح پژوهشی ۳۹۵۹۲۷ است که منابع مالی آن، توسط معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان تأمین شده است.

References

1. Ferlay J, Ervik M, Lam F, Colombet M, Mery L, Pineros M, et al. Global Cancer Observatory: Cancer Tomorrow. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2019.
2. Shafiee F, Enteshari R, Rabbani MJ, Jahanian-Najafabadi A. In-vivo evaluation of DT386-BR2, a promising anticancer fusion protein, in mice model. J Isfahan Med Sch 2017; 35(433): 655-61. [In Persian].
3. Kooti W, Servatyari K, Behzadifar M, Asadi-Samani M, Sadeghi F, Nouri B, et al. Effective medicinal plant in cancer treatment, part 2: Review study. J Evid Based Complementary Altern Med 2017; 22(4): 982-95.
4. Brunner LS, Smeltzer SCOC, Bare BG, Hinkle JL, Cheever KH. Brunner and Suddarth's textbook of medical-surgical nursing. Philadelphia. PA: Lippincott Williams and Wilkins; 2010.
5. Khazaei S, Esa NM, Ramachandran V, Hamid RA, Pandurangan AK, Etemad A, et al. In vitro antiproliferative and apoptosis inducing effect of allium atroviolaceum bulb extract on breast, cervical, and liver cancer cells. Front Pharmacol 2017; 8: 5.
6. Yu Z, Zhang T, Zhou F, Xiao X, Ding X, He H, et al. Anticancer activity of saponins from allium chinense against the B16 melanoma and 4T1 breast carcinoma cell. Evid Based Complement Alternat Med 2015; 2015: 725023.
7. Alam F, Najum Us SQ, Waheed A. Cytotoxic activity of extracts and crude saponins from Zanthoxylum armatum DC. against human breast (MCF-7, MDA-MB-468) and colorectal (Caco-2) cancer cell lines. BMC Complement Altern Med 2017; 17(1): 368.
8. Safarzadeh E, Sandoghchian SS, Baradaran B. Herbal medicine as inducers of apoptosis in cancer treatment. Adv Pharm Bull 2014; 4(Suppl 1): 421-7.
9. Zolfaghari B, Sadeghi M, Troiano R, Lanzotti V. Vavilosides A1/A2-B1/B2, new furostane glycosides from the bulbs of Allium vavilovii with cytotoxic activity. Bioorg Med Chem 2013; 21(7): 1905-10.
10. Zolfaghari B, Sadeghi M, Troiano R, Lanzotti V. 3,4-Seco-spirostane sapogenins with cytotoxic activity from Allium umbilicatum boiss. Phytochemistry Letters 2015; 12: 291-5.
11. Pareek S, Sagar NA, Sharma S, Kumar V. Onion (Allium cepa L.) In: Yahia EM, editor. Fruit and vegetable phytochemicals: Chemistry and human health. 2nd ed. Hoboken, NJ: John Wiley and Sons; 2018.p. 1145-62.
12. Kazemi M, Zolfaghari B, Keyvanlo Shahrestanaki M, Sadeghi Dinani M. Cytotoxic effects of allium affine ledeb butanolic fraction on breast and ovary cancer cell lines. J Med Plants 2017; 16(64): 83-90. [In Persian].
13. Lu C, Li C, Wu D, Lu J, Tu F, Wang L. Induction of apoptosis by Rhizoma Paridis saponins in MCF-7 human breast cancer cells. Afr J Pharmacy Pharmacol 2011; 5(8): 1086-91.
14. Sobolewska D, Michalska K, Podolak I, Grabowska K. Steroidal saponins from the genus Allium. Phytochem Rev 2016; 15: 1-35.
15. Sashida Y, Kawashima K, Mimaki Y. Novel polyhydroxylated steroidal saponins from allium giganteum. Chem Pharmaceutical Bull 1991; 39(3): 698-703.

DOI: *10.22122/jims.v39i636.14126* *Published by Vesnu Publications*

Journal of Isfahan Medical School **Vol. 39, No. 636, 4th Week, October 2021**

Received: 05.05.2021 Accepted: 12.08.2021 Published: 26.10.2021

The Cytotoxic and Pro-Apoptotic Effects of Various Extracts of Allium Giganteum on MCF-7 and Hela Cell Lines

Fatemeh Hosseinzadeh[1], Masoud Sadeghi-Dinani[2], Ali Jahanian-Najafabadi[3]

Original Article

Abstract

Background: Here, the cytotoxicity of various Allium giganteum extracts was evaluated on MCF-7 and HeLa cell lines, to introduce novel anti-cancer agents from natural resources,

Methods: Flowers of the plant were subjected to extraction in a four steps method, and the extracts were evaluated for their cytotoxicity on MCF-7 and HeLa cell lines. MTT assay was performed 48 hours. Following treatment of the cells with 10, 20, and 50 µg/ml of different extracts. The mechanism of the induced cell death was assessed by flow cytometry following Annexin/PI staining of the treated cells.

Findings: The MTT results showed significant toxicity of dichloromethane, chloroform-methanol (9:1), and butanolic extracts at 50 µg/ml on MCF-7, and at 20 and 50 µg/ml on HeLa cells compared to control ($P < 0.05$). No significant cytotoxicity and apoptosis induction was observed following treatment with aquatic extract. The flow cytometric analysis results indicated apoptosis induction by all the three extracts on MCF-7 cells.

Conclusion: The dichloromethane, chloroform-methanol (9:1), and butanolic extracts of Allium giganteum showed cytotoxic effects on the cancer cells, and up to 26% apoptosis of MCF-7 cells. Due to the desirable results of this study, extraction and identification of constituents of the extracts, especially steroidal saponin constituents, could be valuable.

Keywords: Allium; Apoptosis; Cytotoxic agent; MCF-7 cells; HeLa cells

Citation: Hosseinzadeh F, Masoud Sadeghi-Dinani M, Jahanian-Najafabadi A. **The Cytotoxic and Pro-Apoptotic Effects of Various Extracts of Allium Giganteum on MCF-7 and Hela Cell Lines.** J Isfahan Med Sch 2021; 39(636): 578-83.

1- Pharm D, School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
2- Associate Professor, Department of Pharmacognosy, School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
3- Associate Professor, Department of Pharmaceutical Biotechnology, School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
Corresponding Author: Ali Jahanian-Najafabadi, Associate Professor, Department of Pharmaceutical Biotechnology, School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran; Email: jahanian@pharm.mui.ac.ir