مجله علمی ـ پژوهشی زیست‌شناسی جانوری تجربی
سال چهارم، شماره دوم، پیاپی چهاردهم، پاییز ۱۳۹۴ (۶-۱)

بررسی اثر سمیت سلولی عصاره برگ گیاه آویشن کوهی بر روی سلول‌های سرطانی ریه انسان

شهلا روزبهانی[۱]، فاطمه علی‌پورفرد[۲*]
۱. استادیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان
۲. کارشناسی ارشد گروه زیست‌شناسی دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد فلاورجان
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۲/۲۸ – تاریخ تصویب: ۱۳۹۴/۸/۲۵)

چکیده

گیاه آویشن کوهی *T. kotschyanus* Boiss & Hohen در طب سنتی به عنوان ضد التهاب، ضداسپاسم و اختلالات گوارشی مورد استفاده قرار می‌گیرد. هدف از این مطالعه، بررسی اثرات سمیت سلولی عصاره اتانولی برگ گیاه آویشن کوهی بر روی رده سلولی A-549 بود. مواد و روش‌ها: برگ گیاه آویشن کوهی از استان لرستان شهرستان سلسله، در بهار ۱۳۹۳جمع‌آوری شد. برگ گیاه به مدت سه روز در دمای اتاق، خشک و عصاره اتانولی از آن تهیه شد. پس از تهیه عصاره اثر غلظت‌های (µg / ml ۵۰۰، ۲۰۰، ۱۰۰، ۵۰، ۲۵) از عصاره برگ گیاه آویشن کوهی بر رده سلولی A-549 به مدت ۷۲ ساعت مورد بررسی قرار گرفت. اثر سمیت سلولی عصاره برگ گیاه آویشن کوهی بر ضد سلول‌های سرطانی A-549 توسط روش MTT ارزیابی شد. برای آنالیز از نرم‌افزار SPSS-18 استفاده شد. نتایج حاصل نشان داد که عصاره اتانولی برگ گیاه آویشن کوهی دارای اثرات سیتوتوکسیک بر رده سلولی A-549 است. بحث: نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که عصاره اتانولی برگ گیاه آویشن کوهی به علت وجود ترکیبات فنولی اثر مهاری روی رده سلولی A-549 دارد.

واژه‌های کلیدی: آویشن کوهی، سرطان ریه، A-549.

Cytotoxic effect of extract leaves of *T. kotschyanus* Boiss. & Hohen on Human Lang Cell

Shahla Roozbahani[1], Fatemeh Alipourfard[2*]
1. Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of science, Science and Research Branch, Islamic Azad University Falavarjan Branch, Isfahan, Iran
2. Master of Science, Department of Biology, Islamic Azad University Falavarjan Branch, Isfahan, Iran
(Received: May 18, 2015 - Accepted: Nov. 16, 2015)

Abstract

Cytotoxic effect of extract leaves of *T. kotschyanus* Boiss. & Hohen on Human Lung Cell, was used in traditional medicine such as anti-inflammation, antispasmodic and gastro-intestinal. The aim of this study was to survey the cytotoxic effects of ethanolic extract of *Thymus kotschyanus* leave on A-549 cell line. *T. kotschyanus* was collected on spring 2014 from Selseleh regions of Lorestan province and leaved plant for 3 days at room temperature. Dried herd powder was extract by ethanol extract 25, 50, 100, 20, 500 µg/ml concentration were prepared. on the cells were evaluated for 72 hours. Cytotoxic effects of extract leveas against cancer cell was measured and statical analdsed by using SPSS. Results showed that, the of extracts leaves ethanol *T. kotschyanus* has cytotoxic effects on A-549 cell lien. The finding suggested that the effect of extractic leawes extract may be as a result of existence of phenolic compounds, especially flavonoids has an inhibitory effect on the A-549 cell line.

Keywords: *T. kotschyanus*, Lung Cancer, A-549, Cytotoxic.

* نویسندهٔ مسئول: E-mail: hamidaylin@yahoo.com

مقدمه

یک تومور، از پارانشیمی از سلول‌های تکثیر شونده و استرومایی از بافت پیوندی و عروق خونی تشکیل شده است. تومورهای سرطانی را به سه دسته تقسیم می‌کنند:

کارسینوم که از بافت اپیتلیال منشاء می‌گیرد، سارکوم که در آن تومور از بافت مزانشیال ایجاد می‌شود و بدخیمی‌های سلول خون ساز و لنفوئید که لوسمی‌ها و لنفوم‌ها را شامل می‌شوند. هر کدام از این گروه‌ها بسته به مکان و درجه بدخیمی به گروه‌های کوچک‌تر تقسیم می‌شوند (Corner & Bauiley, 2011).

کارسینومای برونکوژنتیک، دومین سرطان شناخته شده در بین زنان و مردان است که حدود ۰/۱۳ کل سرطان‌ها را شامل می‌شود (Gemal *et al*., 2002). سرطان ریه، نوعی بیماری است که مشخصه اصلی آن رشد کنترل نشده سلول در بافت ریه است. اگر این بیماری درمان نشود رشد سلولی می‌تواند در یک فرایند به‌نام متاستاز به بیرون از ریه گسترش پیدا کند و به بافت‌های اطراف اعضای بدن برسد. (Volgestein & Kenneth, 2002) چهار نوع اصلی برای سرطان ریه معرفی شده است:

۱. کارسینوم سلول اپیدرموئید: یک ضایعه در قسمت مرکزی راه هوایی که ممکن است در همراهی ینومونیت پس از انسداد دیده شود و به عنوان تظاهر بالینی اصلی کارسینوم سلول سنگفرشی به شمار می‌رود. این تومورها به دلیل سرعت آهسته رشد آن‌ها دارای کم‌ترین احتمال در متاستاز هستند.

۲. آدنوکارسینوما: به طور شایع در قسمت محیطی ریه یافت می‌شود و دارای قابلیت بالایی از نظر ایجاد متاستاز است.

۳. کارسینوم سلول کوچک: بیشتر در نواحی پروکسیمال ریه یافت می‌شود. این تومور به سرعت متاستاز داده و بیشتر بیماران در زمان تشخیص بیماری دچار متاستاز شده‌اند.

۴. کارسینوم سلول بزرگ ریه: به‌طور شایع به صورت یک ضایعه تظاهر یافته می‌باشد و ممکن است در همراهی با پنومونیت ریه مشاهده شود (Horn *et al*., 2012).

دلیل اصلی سرطان ریه جهش در بیان پروتئین می‌باشد یکی از مهم‌ترین این پروتئین‌ها، پروپروتئین‌های فعال است که عملکرد اصلی آن‌ها پردازش و فعال کردن پروتئین‌های وپپتیدهای متعدد می‌باشد. از آن‌جایی‌که این پروپروتئین‌های فعال در زمان و مکان مناسب برای حفظ هموستاز مناسب هستند، در کنترل فرایندهای سلامتی و بیماری به صورت فیزیکی دخالت دارند (Demidyuk *et al*., 2013).

ژن سرکوب‌کننده تومور یکی دیگر از پروتئین‌های دخیل در سرطان ریه است که به دزوکسی نوکلئیک اسید متصل می‌شود و باعث مهار رشد سلول و مسدود کردن و ورود به فاز سیکل سلولی می‌شود و از آسیب به دزوکسی نوکلئیک اسید جلوگیری می‌کند جهش در این پروتئین باعث بیان بالای آن و در نتیجه رشد بی‌رویه سلول و آسیب به دزوکسی نوکلئیک اسید سلولی و ورود به چرخه سلولی و سرطانی شدن سلول شود. تقریباً ۷۰ درصد سرطان ریه بر اثر جهش در بیان این پروتئین است (Ahrenat & Buta, 2003).

روش‌های درمانی متفاوتی برای سرطان ریه وجود دارد که می‌توان به جراحی، شیمی‌درمانی، رادیوتراپی و داروهای ضدسرطان اشاره کرد (Landis *et al*., 2000). یکی از بزرگ‌ترین محدودیت‌های داروهای ضدسرطان مقاومت سلول‌های سرطانی نسبت به دارو است که می‌تواند ناشی از مقاومت ذاتی نسبت به دارو باشد و به گونه‌ای عمل کند که سلول‌های مقاوم از بین سلول‌های هتروژن انتخاب شوند. در نتیجه با افزایش سلول‌های مقاوم، روند درمان مشکل‌تر می‌شود. امروزه استفاده از گیاهان دارویی به علت عوارض

جانبی کم‌تر نسبت به داروهای شیمیایی مورد توجه قرار گرفته‌اند (Sakark & Deshmuk, 2011). گیاه آویشن کوهی با نام علمی *T. Kotschyanus* از تیره Labiate است (Navaie, 2011).

تحقیقات انجام گرفته نشان دادکه اسانس فنولی برگ گیاه آویشن کوهی دارای خواص ضدباکتریایی است (Goudarzi *et al*., 2005).

تحقیقات انجام گرفته توسط Sharififar *et al*. (2011) بر اساس فعالیت آنتی‌اکسیدانی فراکشن‌های عصاره اتانولی برگ گیاه آویشن کوهی صورت گرفت مقدار Ic_{50}=۲/۱۶$\mu g/ml$ را گزارش کرد که دلیل اصلی بر وجود متابولیت‌های ثانویه در این گیاه است.

Mastelic *et al*. (2008) با بررسی‌های فتوشیمیایی میزان اسانس فنولی موجود در اندام هوایی گیاه آویشن کوهی به ویژه برگ این گیاه را به دست آوردند. همچنین خاصیت ضدعفونی، ضدقارچی و آنتی‌اکسیدانی این گیاه را ثابت کردند.

سرشاخه‌های گلدار این گیاه سرشار از ترکیبات فنولی به‌ویژه تیمول و کارواکرول است (Ghasemi, 2009).

بر اساس تحقیقات انجام شده توسط کرامتی مشخص شد که ترکیب فنولی تیمول به صورت وابسته به دوز دارای اثر آنتی‌اکسیدانی بر روی سلول‌های سرطانی پروستات است. مکانیسم اثر این ترکیب فنولی از یک سو به علت کاهش استرس اکسیداتیو و از سوی دیگر به علت مهار آنزیم‌های سیکلواکسیژناز است. با توجه به مطالعات صورت گرفته مشخص شده که اولاً مطالعه‌ای روی برگ گیاه مورد بررسی به عمل نیامده، ثانیاً اثرات عصاره الک شدهٔ برگ این گیاه روی رده سلولی سرطان ریه نیز انجام نشده و لذا از آنجایی که تاکنون تحقیق مشابهی از گونه *T. kotschyanus* در ایران بر روی رده سلولی سرطانی ریه انجام نشده‌است، لذا ما اثر عصاره الک شدهٔ این گیاه به منظور مهار رشد سلول‌های مورد نظر را مورد مطالعه قرار دادیم.

مواد و روش‌ها

این مطالعه از نوع تجربی (آزمایشگاهی) است. گیاه آویشن کوهی در اوایل خردادماه سال ۱۳۹۳ در ۵۰ کیلومتری استان لرستان روستای کاکارضا شهرستان سلسله جمع‌آوری و توسط کارشناس گیاه‌شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان تایید شد. پس از نمونه‌گیری، برگ‌های آویشن کوهی به مدت سه روز در سایه خشک شده و توسط آسیاب به صورت پودر ریزی درآمد. پودر به دست آمده تا زمان استفاده در فریزر با دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. در مرحله بعد ۲۰ گرم از برگ خشک شده به روش ماسراسیون و با حلال اتانول ۸۰ درصد عصاره‌گیری و عمل عصاره‌گیری سه بار و به فاصله زمانی ۴۸ ساعت با دستگاه شیکر انجام شد. پس از آن عصاره را با عبور از کاغذ صافی و قرار دادن در پلیت در سایه و در دمای اتاق کاملاً خشک شد و درون یخچال به دور از گرما و نور نگه‌داری شد تا زمان انجام کشت سلولی فرا برسد.

کشت سلولی

رده سلولی مورد استفاده در این تحقیق A-549 است. سلول سرطانی مربوط به ریه انسان از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی ایران خریداری شد و در پاساژهای سلولی بین ۲۶ تا ۳۱ در محیط کشت DMEM با ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (FBS) و ۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر Hams f_{12} و L- گوتامین با غلظت ۲ میلی‌مولار و ۱ درصد آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین- استرپتومایسین که در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با رطوبت کافی و میزان ۵ درصد دی‌اکسیدکربن بود، استفاده شد. برای انجام تست‌های مختلف و زمانی که سلول‌ها حداقل به ۷۰ درصد رشد سلولی رسید توسط تریپسین- اتیلن دی‌آمین تترااسیتک اسید (EDTA) از ته فلاسک جدا و سپس در دور 1500 rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. رسوب سلولی در یک سی‌سی محیط

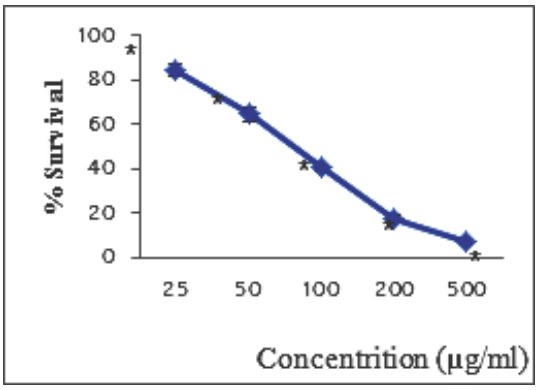
کشت به حالت سوسپانسیون تهیه شد و درصد زنده بودن سلول‌های موجود در سوسپانسیون سلولی با مخلوط شدن نسبت مساوی از تریپان بلو با استفاده از لام هموسایتومترو و بررسی با میکروسکوپ نوری تعیین شد. در بررسی اثر سمیت سلولی عصاره برگ آویشن کوهی بر روی رده سلولی A-549 از روش MTT استفاده شد. روش MTT یک تست متابولیک رقابت میتوکندریایی است و بر اساس شکسته شدن نمک تترازولیوم توسط آنزیم سوکسینات دهیدروژناز میتوکندریایی سلول‌های زنده به کریستال‌های ارغوانی نامحلول در آب فورامازن تبدیل می‌شود (Sarvanan *et al*., 2003). در ادامه سوسپانسیون سلولی با غلظت $۲×۱۰^{۴}$ سلول در میلی‌لیتر تهیه و در میکرو پلیت‌های ۹۶ خانه به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد. سپس غلظت‌های (۵۰۰μg/ml، ۲۰۰، ۱۰۰، ۵۰، ۲۵) از عصاره اضافه شد. دوکسوروبیسین به عنوان کنترل مثبت استفاده شد و کنترل منفی سوسپانسیون سلولی فاقد عصاره در نظر گرفته شد. میکروپلیت‌ها به مدت ۷۲ ساعت در شرایط یکسان انکوبه شدند. سپس غلظت‌های ۲۰μl (۵μg/ml) محلول MTT به هر چاهک اضافه شد و به مدت سه ساعت انکوبه شد. محیط رویی را با ۱۵۰μl DMSO (دی متیل سولفوکساید) جایگزین نموده و کریستال‌های فورامازون را حل نموده و سپس توسط دستگاه الایزا (Stat fex. 2100) در طول موج۵۴۰ نانومتر مورد سنجش قرار داده شد (Mosaddegh *et al*., 2006).

تحلیل آماری

از نتایج حاصل از این بررسی با استفاده از نرم‌افزار SPSS-18 و به کارگیری آزمون‌های آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون ANOVA مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

نمودار ۱، اثر سیتوتوکسیک عصاره اتانولی برگ گیاه آویشن کوهی را بر روی رده سلولی A-549 نشان می‌دهد. درصد بقای سلول‌ها با استفاده از روش MIT به دست آمد. جذب توسط دستگاه الایزا در طول موج ۵۴۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

درصد بقای گروه کنترل، ۱۰۰ در نظر گرفته شد (N=۱۲) و (∗=p<۰/۰۵).



نمودار ۱. اثر سیتوتوکسیک عصاره اتانولی گیاه *T. Kotschyanus* در طی ۷۲ ساعت بر رده سلولی A-549

نتایج

از نتایج حاصل از متد MTT بر سلول‌های سرطانی که در مجاورت ۵ غلظت مختلف (۵۰۰ μg/ml، ۲۰۰، ۱۰۰، ۵۰، ۲۵) عصاره‌های اتانولی برگ آویشن کوهی قرار گرفته بودند، مشخص شد که سلول‌های سرطانی توان زیستی خود را از دست داده‌اند، به طوری که در غلظت‌های (۵۰۰ μg/ml، ۲۰۰، ۱۰۰) کاهش رشد داشته است، اما در کل، اختلاف با گروه کنترل معنی‌دار نبود (نمودار ۱).

بحث و نتیجه‌گیری

گیاه *T. Kotschyanus* Boiss. 8 Hohen یکی از گیاهان دارویی است که در طب سنتی استفاده‌های فراوانی داشته است (Gemzadeh, 2006). تاکنون تحقیقی در زمینه بررسی اثر سمیت سلولی این گیاه بر روی سلول‌های سرطانی صورت نگرفته است.

در این تحقیق پس از بررسی اثرات سیتوتوکسیک این گیاه بر رده A-549، به این نتیجه رسیدیم که عصاره اتانولی در غلظت انجام ۱۰۰، ۲۰۰ و ۵۰۰

میکروگرم بر میلی‌لیتر دارای بیشترین اثر سایتوتوکسیک بر روی رده سلولی در طی زمان ۷۲ ساعت بوده است. به طوری که با افزایش غلظت عصاره‌های اتانولی رشد سلول‌های سرطانی کاهش چشمگیری داشته است. از طرفی دیگر به علت استخراج ترکیبات فنولی و بالاخص فلاونونوییدها که حلال اختصاصی آن اتانول و متانول است، عصاره اتانولی اثر مهاری بر روی رده سلولی A-549 نشان داده است. از آنجا که ترپن‌ها در گروه هیدروکربن‌های غیر قطبی قرار دارند و اکثراً در گیاهان به عنوان جزء اصلی چربی‌های ضروری هستند، بنابراین در الکل‌ها بهتر از آب حل می‌شوند، در نتیجه دلیل افزایش فعالیت سیتوتوکسیک عصاره اتانولی به علت وجود ترپن‌ها بوده است (Chirions *et al*., 2007). شکرزاده و همکاران در سال ۲۰۱۳ نشان داده‌اند که عصاره هیدروالکلی برگ گیاه*Lagenaria sicerazia* (گیاه کدو قلیایی) به دلیل دارا بودن ویتامین C، بتاکاروتن، ویتامین‌های گروه B، پکتین، سایونین، کوکوربیتاسیون B، فلاونوئیدها، تانن‌ها، استروئیدهایی مثل فوکوسترول و کامپسرول، فنول، گلیکوزید، اثر سمیت سلولی بر روی رده‌های سلول‌های سرطانی Hep-2، MCF-7 و A-549 داشته است (Sharma *et al*., 2011).

بنا بر گزارش‌های اعلام شده، گیاه آویشن کوهی دارای ترکیبات فنولی تیمول و کاروکراول است. تیمول یکی از سمی‌ترین ترکیبات شیمیایی موجود در اندام هوایی برگ گیاه آویشن کوهی است. مکانیسم اثر این ترکیب فنولی از یک‌سو به علت کاهش استرس اسکیداتیو و از سوی دیگر به علت مهار آنزیم‌های سیکلواکسیژناز است که باعث تهاجم سلولی و سرکوب پاسخ‌های دفاعی شده است. ترکیب فنولی تیمول دارای اثر مهاری بر فعالیت آنزیم سیکواکسیژناز می‌باشد (Mehrain, 2000). براساس مطالعات صورت گرفته توسط گودرزی و همکاران در سال ۲۰۰۶ خاصیت ضدعفونی، ضدقارچی، آنتی‌اکسیدانی عصاره آویشن کوهی اثبات شد. با توجه به گستردگی تحقیقات انجام شده بر روی ترکیب فنولی تیمول و اثبات خاصیت آنتی‌اکسیدانی آن می‌توان یکی از دلایل اصلی اثر سیتوتوکسیک این گیاه را به علت وجود ترکیبات فنولی از جمله تیمول دانست. لذا ما پیشنهاد می‌نماییم که علاوه بر این نوع عصاره (اتانولی) اثرات عصاره‌های هیدروالکی، متانولی، اتیل استونی و ...) بر روی رده‌های سلولی سرطانی نیز مورد بررسی قرار گیرند و همچنین مواد مؤثر اعضای مختلف این گیاه (برگ، گل و میوه) را جداسازی و سپس اثرات آنها بر مهار رشد رده‌های سلولی سرطانی مختلف نیز ارزیابی شود و در پایان مکانیسم‌های مختلف مهار رشد را مورد بررسی قرار دهیم.

سپاسگزاری

نتایج این مطالعه حاصل پایان‌نامه کارشناسی ارشد فیزیولوژی جانوری در دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان می‌باشد. بدین وسیله نویسنده مسئول از کارشناس آزمایشگاه کشت سلولی دانشگاه آزاد فلاورجان سپاسگزاری می‌نماید.

REFERENCES

Ahrent, SA.; Buta, M. (2003). “mutaion and surviral in stage I non-small cell cancer: result of a prosoective study”. I Nat 1 cancer Inst.; 95(13): P. 53. 961-10.

Corner, J.; Bailey, C. (2001). “Cancer-nursing: Careincontext”. Blackwell. London. 3-46.

Demidyuk, V.; Shubin, AV.; Kurinov, AM.; Gasno, VEV. (2013). “Alteration in Gene Expression of proprotein convertases in Human Lung cancer Have Limited Number of scenarios”. Plosone. 8(2): 5515.

Gemal, A.; Bray, F.; Feraly, J.; Forman, D. (2011). “Global cancer statistics”.

Cancer Journal for clinicians. 61(2): 69-90.

Ghasmi, M. (2003). “Thyme and savory”. Research institute of forests and rangelands. Tehran. Iran. 2003.

Horn, Papw.; Johnson, HD. (2012). “Harrison’s of Internal Medicine”. MCGraw-Hill professional. illustrated.

Kramati, K. (2005). “Effect of hydroalcohlic of thyme prostate cancer resulting from the injection of NMBA in the wistarrat”. 35(3).

Landis, S.; Bolden, T.; Wang, P. (1999). “Cancer statistics”. *Ca-A- Cancer Journal for Clinicians*. 49(1): 8-31.

Mehrain-Ghomi, F. (2010). “Androgen receptor requires jundas a coactivator to switch on an oxidative strees generaton pathway in prostate cancer cells”. 70: pp.4560-68.

Navaie, S. (2011). “Phytochemical study Thymus kotschyanus Boiss 8 Honen and check improve irritable bowel”. Professional doctoral thesis. Islamic Azad University Tehran.

Sakar, A.; Dshmukh, V. (2011). “Ethno Pharmacological review of traditional medicinal plants for anti-cancer activity”. 3(4): pp.298-430.

Sharma, G.; Tyagi, N.; Hooda, V. (2012). “Phytochemical and parmacological profile of lagenaria siceraria”. *International Research Journal of Pharmacy*, 3: pp.1-4.

Velgestein, B.; Kenneth, W. (2002). “The genetic basic of human cancer”. Mc Graw hill professional. Illustrate. 2(4): pp.203-208.