

## Comparison Inhibitory Effects of Methanolic Extract of *Citrullus Colocynthis* Fruit and Volatile Oils of *Citrus medica* Peels on Hela Cell Line

R. Monajemi<sup>1\*</sup>, N. Naghsh<sup>2</sup>,  
M. Kameli<sup>3</sup>

1, 2, 3. Department of biology, Falavarjan Branch,  
Islamic Azad University, Esfahan, Iran  
(Received: Feb. 23, 2013; Accepted: Jul. 6, 2013)

## بررسی مقایسه‌ای اثر عصاره متانولی هندوانه ابوجهل و اسانس فرار پوست بالنگ بر مهار رشد رده سلول‌های سرطانی هلا در شرایط *invitro*

رامش منجمی<sup>۱\*</sup>، نوشین نقش<sup>۲</sup>، مژگان کاملی<sup>۳</sup>

۱ و ۲ و ۳. دانشگاه آزاد اسلامی، واحد فلاورجان، گروه زیست‌شناسی، اصفهان، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۱۲/۰۵، تاریخ تصویب: ۱۳۹۲/۰۴/۱۵)

### ABSTRACT

Cervical cancer is the most common gynecologic cancer and the second most common cancer in women worldwide. Herbal preparations are used to treat cancer for centuries. The aim of this study was investigate the cytotoxic effects of the methanol extract of *Citrullus Colocynthis* and volatile oils of Iranian *C. medica* on Hela cell line. After preparation extract and volatile oils, different concentrations of volatile oils of *C. medica* (0.25-10  $\mu\text{g} / \text{ml}$ ) and extract of *Citrullus Colocynthis* (100-1000  $\mu\text{g} / \text{ml}$ ) were added to Hela cultured cells and incubated for 72 hours. Cell survival was evaluated using MTT-based cytotoxicity assay. The results showed that methanolic extract of *Citrullus Colocynthis* had not significant cytotoxic effect on Hela cells but Volatile oils of *Citrus medica* had significant cytotoxic effect on this cells and it's most compounds was limonene , linalool , linalool acetate and beta - pinene. The findings showed that volatile oils of *C. medica* had more cytotoxic effect than the *Citrullus Colocynthis* extract, limonene and linalool of the volatile oil causes this effects.

**Keywords:** *Citrullus Colocynthis*, *Citrus medica*, cytotoxic, Hela.

### چکیده

سرطان دهانه رحم شایع‌ترین سرطان دستگاه تناسلی زنان و دومین سرطان شایع زنان در دنیاست. با توجه به اینکه ترکیبات گیاهی قرن‌هاست که برای درمان سرطان استفاده می‌شوند. هدف از این مطالعه بررسی اثرات سمیت سلولی عصاره متانولی میوه هندوانه ابوجهل و اسانس فرار پوست بالنگ بر روی رده سلولی هلا<sup>۱</sup> بود. پس از تهیه عصاره و اسانس هر دو میوه اثر غلظت‌های مختلف ۱۰۰-۱۰۰۰  $\mu\text{g} / \text{ml}$  عصاره متانولی هندوانه ابوجهل و غلظت‌های ۱۰-۲۵  $\mu\text{g} / \text{ml}$  اسانس پوست بالنگ بر رده سلولی هلا به مدت ۷۲ ساعت مورد بررسی قرار گرفت. اثر سمیت سلولی توسط روش رنگ سنجی نمک تترازولیوم<sup>۲</sup> ارزیابی شد. جذب نوری توسط دستگاه الیزا در طول موج ۵۴۰ nm اندازه‌گیری شد. نتایج حاصل نشان داد که عصاره متانولی میوه هندوانه ابوجهل اثر سمیت سلولی قابل توجهی بر سلول‌های هلا نداشته در حالی که اسانس فرار پوست بالنگ منجر به مهار رشد رده سلولی هلا شده است. یافته‌های این پژوهش نشان داد که اسانس بالنگ دارای اثرات سمیت سلولی قوی تری نسبت به عصاره ابوجهل می‌باشد. اسانس بالنگ از طریق ترکیباتی نظیر لیمونن و لینالول اثرات سمیت سلولی خود را نشان داده است.

**واژه های کلیدی:** هندوانه ابوجهل، اسانس بالنگ، سمیت سلولی، سلول هلا.

1. Hela
2. MTT

## مقدمه

سرطان دهانه رحم شایع‌ترین سرطان دستگاه تناسلی زنان و دومین سرطان شایع زنان در دنیاست. در کشورهای در حال توسعه، مرگ در اثر سرطان دهانه رحم رایج‌ترین مرگ ناشی از سرطان محسوب می‌شود (Vaisy, 2013). ترکیبات گیاهی قرن‌هاست که برای درمان سرطان استفاده می‌شوند. بررسی‌ها نشان می‌دهد که گیاهان زیادی برای درمان سرطان استفاده می‌شده است. آزمایشاتی که بر روی گیاهانی که در طب سنتی برای درمان سرطان مورد استفاده قرار می‌گیرند، انجام شده است حاکی از وجود ترکیبات ضد سرطانی در این گیاهان است (Sadiq Butt, 2014). فراورده‌های طبیعی که دارای فعالیت ضد توموری می‌باشند، گستره وسیعی از مکانیسم‌ها را شامل می‌شوند. بعضی از این ترکیبات مانند کلشی‌سین، وین کریستین و پودوفیلوتوکسین مهارکننده‌های میتوزی هستند که به پروتئین‌های توبولی دوک میتوز متصل می‌شوند (Kidwia, 2002). از این رو امروزه گیاهان دارویی منابع طبیعی ارزشمندی محسوب می‌شوند که مورد توجه کشورهای پیشرفته جهان قرار گرفته و به عنوان مواد اولیه جهت تبدیل به داروهای بی‌خطر برای انسان تلقی می‌شوند؛ در این زمینه ایران یکی از غنی‌ترین منابع گیاهان دارویی جهان به شمار می‌رود که دارای تنوع بالای شرایط زیستگاهی برای انواع گیاهان می‌باشد (Azimzadeh, 2009). هندوانه ابوجهل با نام علمی *Citrullus Colocynthis* دارای میوه‌ای کروی به رنگ زرد به بزرگی یک نارنج کوچک، پوشیده از یک پوست نسبتاً نازک ولی سخت و دارای میان بر سفید رنگ و اسفنجی است. منشاء اولیه گیاه هندوانه ابوجهل مجمع‌الجزایر واقع در نواحی جنوبی کشور بوتان بوده است و در مناطق مختلف کویری و بایر ایران پراکندگی دارد و در بین تپه‌های ماسه‌ای پرورش می‌یابد (Hedge, 2005). میوه محرک کبدی قوی و مسهل و دافع آب می‌باشد و به عنوان

یک مسهل قوی به کار می‌رود. در بند آوردن قاعدگی زنان در حالات شدید مؤثر بوده و در درمان یرقان، کرامپ‌های روده‌ای، دردهای عصبی نیز کاربردهایی داشته است (Wasfi, 1994). این گیاه بومی ایران بوده و در نواحی جنوبی کشور و مناطقی همچون جنوب استان خراسان یافت می‌شود. میوه این گیاه دارای گلوکوزید قابل تبلوری با طعم بسیار تلخ به نام کولوستین<sup>۱</sup>. میوه این گیاه علاوه بر موارد مذکور دارای سیتروولین<sup>۲</sup>، ماده روغنی، مواد صمغی و املاح مختلف است (Delazar, 2006). کولوستین و کولوستنتین موجود در گیاه جهت بیماری‌های متعددی منجمله آسیب‌ها، سرطان، هپاتیت، لوسمی و تومورها استفاده شده است (Wasfi, 1994). عصاره تام هندوانه ابوجهل بر سلول‌های سرطان خنجره مؤثر می‌باشد (Tavakkol Afshari, 2005). بالنگ (ترنج) با نام علمی *Citrus medica* از گروه مرکبات است. بخش رنگی خارجی پوست مرکبات دارای ترکیبات مختلفی از جمله اسانس فرار هستند. این بخش دارای ترپن‌ها، سزکویی ترپن‌های آلیفاتیک و مشتقات اکسیژنه، ترپن‌های دو حلقه‌ای، اجزا غیرترپنی آلیفاتیک، هیدروکربن‌های آروماتیک و استرهای حاوی نیتروژن می‌باشد (Hajiakhondi, 1992)، ژرانیول و سایر مونوترپن‌های موجود در اسانس مرکبات و گیاهان دارای خاصیت ضدسرطانی هستند. در سلول‌های سرطان روده انسان (CaCo-2) تجویز ۴۰۰ میکرومول ژرانیول منجر به مهار ۷۰٪ رشد سلول‌ها می‌شود این ماده باعث ۵۰٪ کاهش فعالیت اورنیتین دکربوکسیلاز، آنزیم کلیدی بیوسنتز پلی‌آمین‌ها که در افزایش رشد سرطان مؤثر است، می‌شود. مشاهدات نشان می‌دهند که متابولیسم پلی‌آمین‌ها هدف اصلی اثر ضدسرطانی ژرانیول است (Carnesecchi, 2001).

1. Colocynthin  
2. Citrulline

سلول‌ها در فاز لگاریتمی رشد قرار گرفتند. جهت بررسی اثر خاصیت سمیت سلولی گیاهان مورد نظر از آزمون نمک تترازولیوم<sup>۲</sup> استفاده شد (Shahoon 2011). به این منظور سوسپانسیون سلولی حاوی  $3 \times 10^4$  سلول درون چاهک‌های میکروپلیت ۹۶ تایی ریخته شد و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور با شرایط ذکر شده انکوبه شد. در ادامه  $20 \mu\text{l}$  از غلظت‌های مختلف عصاره متانولی هندوانه ابوجهل ( $100$  تا  $1000 \mu\text{g/ml}$ ) (برای رقیق‌سازی از بافر فسفات استفاده شد) و اسانس پوست بالنگ ( $0.25$  تا  $10 \mu\text{g/ml}$ ) و در گروه کنترل، محیط کشت به چاهک‌ها اضافه شد و بعد از گذشت ۷۲ ساعت  $20 \mu\text{l}$  MTT به هر چاهک اضافه گشت و به مدت ۳ ساعت انکوباسیون انجام شد.  $180 \mu\text{l}$  از محیط قدیمی حاوی MTT با  $150 \mu\text{l}$  DMSO (دی‌متیل سولفوکساید) جهت حل شدن کریستال‌های فورامازون تعویض شد و جذب نوری در طول موج  $540 \text{nm}$  به وسیله دستگاه الیزا ریدر (Statefax-آمریکا) خوانده شد.

هر غلظتی از نمونه در ۳ آزمایش مجزا تکرار شده است و در هر بار آزمایش از ۳ تکرار استفاده شده است. میزان رشد در نمونه‌های شاهد منفی  $100$  درصد در نظر گرفته شد و دوکسوروبیسین به عنوان شاهد مثبت استفاده شده است. در صد بقا توسط فرمول زیر محاسبه شد:

= درصد بقا

جذب‌نوری گروه کنترل / جذب‌نوری گروه تیمار  $\times 100$

نتایج بدست آمده به کمک رایانه بررسی شد و با استفاده از نرم‌افزار Jandel SIGMASTAT<sup>TM</sup> (Software, San Raphael, CA) و آزمون ANOVA و متعاقباً Tukey test آنالیز آماری آنها

هدف از این مطالعه بررسی اثرات سمیت سلولی عصاره متانولی میوه هندوانه ابوجهل و اسانس فرار پوست بالنگ بر روی رده سلولی هلا بود.

## مواد و روش‌ها

اسانس فرار پوست بالنگ به روش تقطیر با آب بدست آمد و توسط دستگاه گاز کروماتوگرافی جرمی<sup>۱</sup> ترکیبات آن شناسایی شد. عصاره‌گیری میوه گیاه هندوانه ابوجهل توسط حلال‌های مختلف انجام شد و به دلیل حل شدن بهتر این عصاره در الکل، متانول (۸۰٪ مورد استفاده قرار گرفت Tavakkol (Afshari, 2005).

عصاره‌گیری به روش سوکسله انجام شد.  $50$  گرم پودر بدست آمده از آسیاب میوه کامل هندوانه ابوجهل با  $400$  سی سی اتانل  $80\%$  مخلوط شده و در دستگاه سوکسیله قرار گرفت. این عمل در حدود  $24$  ساعت به طول انجامید، بعد از عصاره‌گیری عمل حذف حلال با استفاده از پمپ خلاء در فشار کم انجام شد و عصاره در انکوباتور  $47$  درجه کاملاً خشک شد.

به منظور بررسی اثر سایتوتوکسیک عصاره متانولی میوه هندوانه ابوجهل و اسانس فرار پوست بالنگ، رده سلولی هلا (سرطان دهانه رحم) به صورت فلاسک از انستیتوپاستور ایران تهیه گردید، غلظت‌های مختلف این عصاره و اسانس بر رده سلولی هلا اثر داده شد و درصد بقا سلول‌ها بعد از  $72$  ساعت مورد سنجش قرار گرفت. سلول‌ها در محیط کشت RPMI-1640 غنی‌شده با  $10$  درصد سرم جنین گاوی (FBS:Fetal Bovine Serum)، و آنتی‌بیوتیک‌های استرپتومایسین ( $50 \mu\text{g/ml}$ ) و پنی‌سیلین ( $50 \text{IU/ml}$ )، در انکوباتور با شرایط  $\text{CO}_2$   $5$  درصد، دمای  $37$  درجه سانتیگراد و رطوبت  $95$  درصد کشت داده شد. پس از  $5$  تا  $6$  بار پاساژ

انجام شد.

مختلف از ترکیبات مورد بررسی قرار گرفته است. دوکسوروبیسین به عنوان شاهد مثبت استفاده شده است. نتایج بدست آمده در نمودارهای ۱ و ۲ قابل مشاهده است.

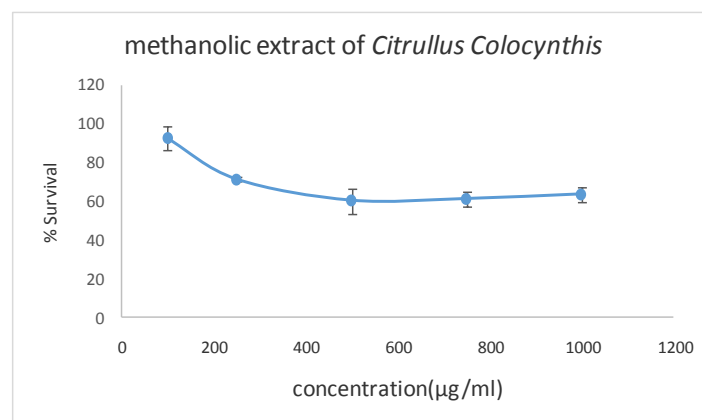
## نتایج

از ۱۰۰ گرم پوست بالنگ ۰/۴ سی‌سی اسانس بدست آمد. نتایج حاصل از استخراج ترکیبات پوست بالنگ در جدول ۱ قابل مشاهده است. از عصاره‌گیری ۵۰ گرم پودر میوه هندوانه ابوجهل، ۴/۰۸ گرم عصاره خشک بدست آمد.

نسبت ترکیبات فوق توسط دستگاه GC/MS مشخص شده و ۹۹/۷٪ ترکیبات شناسایی شده است. در این آزمایش میزان مهار رشد رده سلولی سرطانی هلا به وسیله عصاره میوه هندوانه ابوجهل و اسانس پوست بالنگ مورد بررسی قرار گرفت. میزان رشد در نمونه‌های شاهد منفی ۱۰۰٪ در نظر گرفته شده و میزان رشد سلول‌ها در مجاورت غلظت‌های

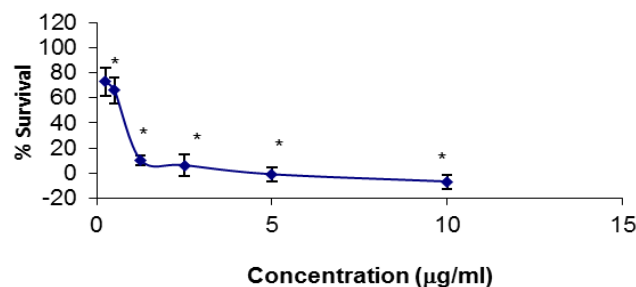
**جدول ۱.** در صد ترکیبات موجود در اسانس فرار پوست

بالنگ	
ترکیب	در صد
$\alpha$ -Pinene	2
$\beta$ -Pinene	2.3
Myrcene	0.2
Limonene	68.9
$\gamma$ -Terpinene	0.4
Linalool	22.5
$\alpha$ -Terpineol	0.5
Linalool acetate	4.2
Neryl acetate	0.1
Geranyl acetate	0.4



**نمودار ۱.** میانگین در صد بقا سلول‌های هلا در حضور غلظت‌های مختلف عصاره متانولی هندوانه ابوجهل

## C. medica



**نمودار ۲.** میانگین در صد بقا سلول‌های هلا در حضور غلظت‌های مختلف اسانس فرار پوست بالنگ (\* =  $P < 0.05$ )

## بحث و نتیجه‌گیری

در این مطالعه به بررسی اثرات سمیت سلولی عصاره متانولی میوه هندوانه ابوجهل و اسانس فرار پوست بالنگ بر رده سلول‌های هلا پرداخته و بر طبق نتایج بدست آمده عصاره متانولی میوه هندوانه ابوجهل اثر سمیت سلولی قابل ملاحظه‌ای نداشته ولی اسانس فرار پوست بالنگ تأثیر قابل توجهی بر مرگ سلول‌های سرطانی داشته است. گیاهان از قدیم‌الایام برای درمان سرطان مورد استفاده قرار می‌گرفته. ترکیباتی نظیر وین بلاستین، وین کریستین هنوز نیز مورد استفاده قرار می‌گیرند. این ترکیبات باعث کریستاله شدن پروتئین‌های میکروتوبولی در سلول‌های توموری می‌شوند. جالب اینجاست که دودمان‌های سلولی آدنوکارسینوما ریبه وروده انسان که نسبت به درمان‌های دارویی مقاومت نشان می‌دهند به درمان با هاریگتونین (ترکیبی که از ریشه نوعی درخت چینی بدست می‌آید) حساس است، حتی بروز مقاومت دارویی که در استفاده از داروهای شیمیایی یکی از معضلات درمان سرطان است در بسیاری از ترکیبات گیاهی دیده نمی‌شود (Alexandrova, 2000). یکی از پژوهش‌های مهم امروز دنیا، بررسی اثرات ضد سرطانی گیاهان و امکان تهیه داروهای مؤثر از آنها برای درمان بیماری سرطان می‌باشد که در ابعاد بسیار وسیع در حال انجام می‌باشد (Rajandeep, 2011).

عصاره حنظل یا هندوانه ابوجهل آنتی بیوتیک مقتدری بر ضد برخی میکروب‌ها می‌باشد، از جمله بر ضد سالمونلا تایفوزا، کوراینه باکتریوم دیفتری، اشیریشیا کولی و استافیلوکوکوس اورئوس مؤثر است و برای مبارزه با سالمونلا پاراتایفی بسیار مؤثر می‌باشد. کولوسنتین موجود در گیاه جهت بیماری‌های متعددی منجمله آسیت‌ها، سرطان، هپاتیت، لوسمی و تومورها استفاده شده (Tavakkol Afshari, 2005).

عصاره متانولی میوه کامل هندوانه ابوجهل در دوزهای ۱۰۰ تا ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر اثر سمیت سلولی بارز و معنی داری بر سلول‌های هلا نداشته که با توجه به منحنی درصد بقا سلولی، می‌توان دریافت که در این سلول‌ها با افزایش دوز نیز کاهش قابل ملاحظه‌ای در تعداد سلول‌ها مشاهده نمی‌شود. به نظر می‌رسد با توجه به وجود ترکیبات مختلف در بخش‌های مختلف پوسته، هسته و پالپ میوه، این رده سلولی نسبت به این ترکیبات مقاوم بوده و این ترکیبات باعث مرگ سلول و تغییرات مرفولوژیکی در آنها نشده است.

با توجه به نتایج بدست آمده، بیشترین ترکیبات موجود در اسانس فرار پوست بالنگ لیمونن (۶۸/۹٪) لینالول (۲۲/۵٪) و لینالول استات (۴/۲٪) است. میزان IC50 بالنگ برابر با ۱ میکروگرم در میلی‌لیتر بوده است که نشانگر خاصیت سمیت سلولی قوی این اسانس است. لیمونن یکی از فراوانترین مونوترپن‌های موجود در اسانس فرار پوست مرکبات است که اثرات شیمیایی ضد توموری بر علیه تومورهای چوندگان و انسان دارد (Moufida, 2003). همچنین مشتقات جدا شده از مونوترپن‌های طبیعی نظیر لیمونن خاصیت ضد تومور قوی‌ای بر ضد سلول‌های سرطانی پروستات از خود نشان داده‌اند (Fábio, 2014). لیمونن و ترپن‌هایی نظیر آلفا و بتا پینن با مهار رگ‌زایی و القا آپوپتوز از طریق مهار فاکتور رشد اندوتلیال رگی<sup>۱</sup> و تنظیم چرخه رشد سلولی با تعدیل فعالیت پروتئین‌های سیکلین E و سیکلین<sup>۲</sup> وابسته به پروتئین کیناز CDK4 و CDK6 اثر ضد سرطانی خود را القا می‌کنند (Sadiq Butt, 2014).

این نتایج می‌تواند گام اولیه‌ای در بررسی و شناسایی ترکیبات ضد سرطانی باشد. بهر حال

1. Vascular endothelial growth factor (VEGF)

2. Cyclin E and cyclin

با توجه به نتایج بدست آمده از تحقیق حاضر

### سیاسگزاری

بدین وسیله از کارشناسان آزمایشگاه تحقیقاتی دانشگاه فلاورجان برای همکاری در انجام این پروژه تشکر و قدردانی می‌شود. این مطالعه حاصل طرح تحقیقاتی شماره ۷۳/۴۵۲۴۰۸ دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان می‌باشد.

مطالعات نشان می‌دهند که ترکیبات گیاهی و مشتقات آنها می‌تواند بخشی از پروتکل‌های استاندارد درمان سرطان بحساب آیند و سلاح مؤثری برای پیشگیری و درمان سرطان باشند. با توجه به تنوع و گستره زیاد گیاهان محققان راه درازی برای تحقیق و تفحص در این باره پیش رو دارند.

### REFERENCES

- Alexandrova R, Velcheva M, Varadinova T (2000) Phytoproducts and cancer. *Exp Pathol Parasitol*, 4: 15-25.
- Azimzadeh M (2009) Genetic assessment of Iranian *Bunium persicum* Boiss using ITS. Tehran: University of Tehran, 81 p.
- Carnesecchi S, Schnieder J, Ceraline B, Duranton F, Gosse N, Seiler N, Raul F (2001) Geraniol, a component of plant essential oils, inhibits growth and polyamine biosynthesis in human colon cancer cells. *J Pharm Exp Ther*, 298: 197-200.
- Delazar A, Gibbons S, Kosari AR, Nazemiyeh H, Modarresi M, Nahar L, Sarker SD (2006) Flavone C-glycosides and cucurbitacin glycosides from *Citrullus colocynthis*, *DARU*, 14 109-114.
- Fábio Vandresena, Hugo Falzirollia, Sabrina A (2014) Almeida Batistaa, Ana Paula B. da Silva-Giardinia, Diogo N. de Oliveirab, Rodrigo R. Catharinob, Ana Lúcia T.G. Ruizc, João E. de Carvalhoc, Mary Ann Foglioc, Cleuza Conceição da Silva. Novel R-(+)-limonene-based thiosemicarbazones and their antitumor activity against human tumor cell lines. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 79(22):110-116.
- Hajiakhondi A, Baligh N. (1992) *Practical Guide to Medicinal Plants*. Publishing Center of Islamic Azad University. Tehran. 1992 P: 214-18.
- Hedge IC, Akhane H, Freitag H, Kothe-Heinrich G, Podlech D, Rilke S, Uotila P, Rechinger KH (2005) *Flora Iranica*, no. 123 pp:5.
- Kidwia M, Venkataramanan R, Mohan R, Sapra P (2002) Cancer chemotherapy and heterocyclic compounds. *Curr Med Chem*, 9 (12): 1209-28.
- Moufida S, Marzouk B (2002) Biochemical characterization of blood orange, sweet orange, lemon, bergamot and bitter orange. *Phytochem*, 62(8): 1283-9.
- Rajandeep K, Jagpreet S, Gagandeep S, Harpreet K (2011) Anticancer plants. *J. Nat. Prod. Plant Resour*, 1(4): 131-136.
- Sadiq Butt M, Naz A, Tauseef Sultan M, Qayyum MMN (2013) Anti-oncogenic perspectives of spices/herbs. *EXCLI Journal*, 12: 1043-1065.
- Shahoon H, Hamedi R, Golgonia P, Yadegari Z (2011) Evaluation of Nano silver particles' cytotoxicity on L929 fibroblast cells by MTT assay: an in vitro Study. *J Res Dent Sci*, 8(2): 53-59.
- Tavakkol Afshari J, Rakhshandeh H, Zamani AR, Mahdavi Shahri N, et al. (2005) Cytotoxicity effects of *Citrullus colocynthis* on Hep2 and L929 cell lines. *Hakim*, 8(2); 47-54.
- Vaisy A, Lotfinejad Sh, Zhian F (2013) Risk Factors for Cervical Cancer among Women Referred to Health Services Centers of Tehran University of Medical Sciences. *Journal of Ardabil University of Medical Science*, 13(3): 332- 341.

Wasfi IA (1994) Some Pharmacological  
Studies on *Citrullus colocynthis*.

Journal of Herbs, Spices & Medicinal  
Plants, 2(2), pages 65-79.