

Anticancer property of ethanolic extract of *Urginea maritima* root on Hela cancer cells in cell culture

SimaNasri^{1*}, GholamReza Amin²,
Sedghi Azad Zahra³, Borbor Masomeh⁴,
Shahmohammadi Freshteh⁵

1. Associate Professor, Department of Biology, Payame Noor University, Tehran, Iran
 2. Professor, Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
 3. M. A., Department of Biology, Payame Noor University, Tehran, Iran
 4. M.A., Department of Biology, Payame Noor University, Tehran, Iran
 5. Instructor, Department of Biology, Payame Noor University, Tehran, Iran
- (Received: Jun. 24, 2019 - Accepted: Aug. 6, 2019)

خاصیت ضدسرطانی عصاره اتانولی ریشه عنصل بر سلول‌های سرطانی هلا در محیط کشت

سیمانصری^{۱*}، غلامرضا امین^۲، زهرا صدقی آزاد^۳،
معصومه بوربور^۴، فرشته شامحمدی^۵

۱. دانشیار گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران
 ۲. استاد گروه فارماکونوزی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
 ۳. کارشناس ارشد، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران
 ۴. کارشناس ارشد، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران
 ۵. مربی، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران
- (تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۴/۳ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۵/۱۵)

Abstract

Cancer is an important health and hygienic issue in the world. The usage of medicinal plants as a natural source of cancer treatment is considered because of the lack of toxicity of these plants, in most cases on normal cells. The aim of this study was to investigate the effect of ethanolic extract of *Urginea maritima* root on Hela cancer cells compared to Hek normal cells. After root drying, extraction was done by Soxhlet method. Then, Hela and Hek cells were cultured at concentrations of 1000, 200, 150, 100, 50, 10, 1 and 0.1 µg/ml of ethanolic extract of *Urginea maritima* root at 24, 48, 72 hours and their viability was determined by MTT test. Ethanolic extract of *Urginea maritima* root decreased the viability of Hela cells at different doses and hours ($P < 0.05$) but it didn't effect on Hek cells viability. Discussion: Due to existence of flavonoids and glycosides in the *Urginea maritima* root, the reduction of Hela cells viability can be attributed to these compounds.

Keywords: ethanolic extract of *Urginea maritima* root, Hela cancer cell, Hek cell, MTT.

چکیده

سرطان یک مسئله مهم بهداشتی و سلامتی در جهان است. سرطان کردن رحم یکی از موارد اصلی مرگ و میر ناشی از سرطان در جهان در بین زنان می باشد. استفاده از گیاهان دارویی به عنوان منبع طبیعی درمانی در درمان سرطان به دلیل عدم سمیت این گیاهان بر سلول‌های طبیعی در بسیاری از موارد، مورد توجه است. پژوهش حاضر به بررسی اثر عصاره اتانولی ریشه عنصل بر سلول‌های سرطانی هلا در مقایسه با سلول‌های طبیعی هک پرداخته است. پس از خشک کردن ریشه، عصاره گیری از آن به روش سوکسله صورت گرفت. سپس، سلول‌های هلا و هک با غلظت‌های ۱۰۰۰؛ ۲۰۰؛ ۱۵۰؛ ۱۰۰؛ ۵۰؛ ۱۰؛ ۱؛ ۰/۱ میکروگرم در میلی لیتر عصاره اتانولی ریشه عنصل در زمانهای ۲۴، ۴۸، ۷۲ ساعت کشت داده شدند و با تست MTT میزان زنده‌مانی آنها مشخص شد. عصاره اتانولی ریشه عنصل سبب کاهش زنده‌مانی سلول‌های هلا در دوزها و زمانهای مختلف شد ($P < 0.05$). اما بر زنده‌مانی سلول‌های هک تأثیری نداشت. بحث: با توجه به وجود فلاونوئیدها و گلیکوزیدهای موجود در ریشه عنصل، کاهش زنده‌مانی سلول‌های سرطانی هلا را می توان به این ترکیبات نسبت داد.

واژه‌های کلیدی: سلول سرطانی هلا، سلول هک، عصاره اتانولی ریشه عنصل، MTT.

مقدمه

سرطان عامل دوم مرگ‌ومیر بعد از بیماری‌های قلبی - عروقی است (Kooti, 2017). سرطان دهانه رحم چهارمین سرطان شایع زنان در جهان است (Vu, 2018). همچنین یکی از موارد اصلی مرگ‌ومیر ناشی از سرطان در جهان می‌باشد. به دلیل افزایش شیوع این سرطان درمان‌های چندگانه مورد توجه می‌باشد. پاسخ اولیه به شیمی درمانی و جراحی عموماً مثبت است، اما بیماران عموماً از عود و برگشت تومور شکایت دارند (Jun-Xiao, 2018). مهمترین مسئله در درمان سرطان تخریب سلول‌های سرطانی در حضور سلول‌های طبیعی، بدون آسیب به سلول‌های طبیعی است. به همین دلیل استفاده از منابع طبیعی مانند گیاهان برای درمان سرطان ضروری است (Rafieian-Kopaei, 2015). عنصل از گیاهان تیره آلاله بوده و به نام‌های علمی *Scilla maritima* یا *Urginea maritima* نامیده می‌شود (Zargari, 2011).

عنصل یا پیاز دشتی (پیاز موش یا اسقبل) گیاه چندساله، پیاز دار با پیازی درشت به قطر ۱۵-۵ سانتی متر، تخم‌مرغی پهن است (Mozaffarian, 2012). پیاز مرکب از فلس‌هایی است که فلس‌های خارجی آن غیرقابل استفاده و فقط بخش وسطی آن مصرف دارویی دارد. طعم آنها تند و تلخ است (Zargari, 2011).

پزشکان قدیم یونان و مصر کاملاً پیاز عنصل را می‌شناخته‌اند (Evans, 2002). عصاره متانولی گیاه در تقویت‌مو و در درمان چربی و شوره مزمن سر مؤثر است. پیاز گیاه درمان محلی قدیمی برای سرطان و تومورها است (Duke, 2007). پیاز مسهل، خلط‌آور، قی‌آور، مدر، ضدسرفه، تحریک‌کننده پوست (قرمزی و تاول) و مقوی قلب است (Akbarzadeh Pasha, 2012).

مواد و روش‌ها

عصاره گیری

جمع‌آوری عنصل از خوزستان صورت گرفت و توسط

بخش هرباریوم مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع شناسایی شد. سپس اندام‌های گیاهی به‌طور کامل از هم تفکیک شدند. نمونه‌های جمع‌آوری شده شست‌وشو داده شده و بعد از حذف کامل آب، قسمت‌های مختلف در اتاق گرم در حدود ۳۰ درجه سانتی‌گراد، تاریکی و با تهویه مناسب خشک شدند. عصاره‌گیری به روش سوکسوله انجام شد سپس عصاره با استفاده از دستگاه تقطیر در خلأ دوار (Rotary Evaporate) تغلیظ شده و در پلیت‌های استریل دربسته و درون یخچال به دور از گرما و نور نگهداری شد تا زمان انجام آزمایش‌های کشت سلولی فرا برسد (Niazi, 2017).

کشت سلول

سلول‌های هلا (NCBI code 115) و هک (NCBI code 630) از انستیتو پاستور ایران خریداری شد و در فلاسک‌های کشت سلولی 25 cm^2 از پاساژهای سلولی در محیط کشت RPMI برای سلول‌های سرطانی هلا و محیط DMEM برای سلول‌های HEK با ۱۰ درصد سرم جنین گاوی و آنتی‌بیوتیک (۱٪ پنی‌سیلین - استرپتومایسین) در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و رطوبت کافی و میزان ۵ درصد دی‌اکسیدکربن استفاده شد. پس از پر شدن بستر فلاسک از سلول‌ها به میزان ۷۰٪، با استفاده از تریپسین-EDTA سلول‌ها از بستر جدا شده و شمارش آنها با لام نتوبار و رنگ‌آمیزی تریپان بلو انجام شد. به هر چاهک پلیت‌های ۹۶ خانه کشت تعداد $5 \times 10^3 \text{ cell/well}$ افزوده شد. پس از ۲۴ ساعت مایع رویی خالی شده و عصاره به آن اضافه شد. غلظت‌های مختلف عصاره حین اضافه‌کردن به میکروپلیت ساخته شدند. در هر پلیت یک ردیف چهارتایی غلظت صفر اسانس به‌عنوان کنترل منفی و محیط کشت خالی بدون سلول به‌عنوان بلنک قرار داده شد. به‌علاوه، یک ردیف چهارتایی نیز کلشی سین به‌عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد (Nasri, 2018).

تست MTT

برای بررسی زنده بودن سلول‌ها از تست MTT استفاده شد. به این منظور پس از انکوباسیون سلول‌های هلا و هک با غلظت‌های ۱۰۰۰، ۲۰۰، ۱۵۰، ۱۰۰، ۵۰، ۱۰، ۱، ۰/۱ میکروگرم در میلی‌لیتر عصاره اتانولی عنصل کشت داده شدند. انتخاب غلظت‌ها بر پایه پژوهش‌های پیشین و میزان IC_{50} به دست آمده روی سلول‌های سرطانی هلا بود. طول مدت زمان تیمار سلولی با ماده مداخله شامل ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بوده است. برای انجام تست MTT، 5mg/ml از پودر MTT توسط محلول PBS رقیق شد و سپس با فیلتر استریل شد، ۲۰ میکرولیتر از آن به پلیت‌ها اضافه گردید و در انکوباتور CO_2 دار قرار داده شدند. پس از گذشت ۴ ساعت، پلیت‌ها از انکوباتور خارج شده، محیط حاوی MTT خارج گردیده و به هر خانه مقدار ۲۰۰ میکرولیتر DMSO اضافه شد. بعد از حدود ۱۰ دقیقه توسط دستگاه Elisa Reader در طول موج ۶۳۰ نانومتر خوانده شد و OD (جذب نوری) به دست آمد (Shams, 2017). برای اطمینان از صحت داده‌ها آزمایش در چهار نوبت تکرار گردید و میانگین گرفته شد. درصد سلول‌های زنده به روش زیر محاسبه گردید:

$$= \text{درصد مهار سلول‌ها} = \frac{100 \times (\text{OD سلول‌های کنترل} - \text{OD سلول‌های})}{\text{OD سلول‌های کنترل}}$$

مجاور شده با ترکیب سیتوتوکسیک) - (۱)

درصد مهار سلول‌ها - ۱۰۰ = درصد سلول‌های زنده

آنالیز آماری

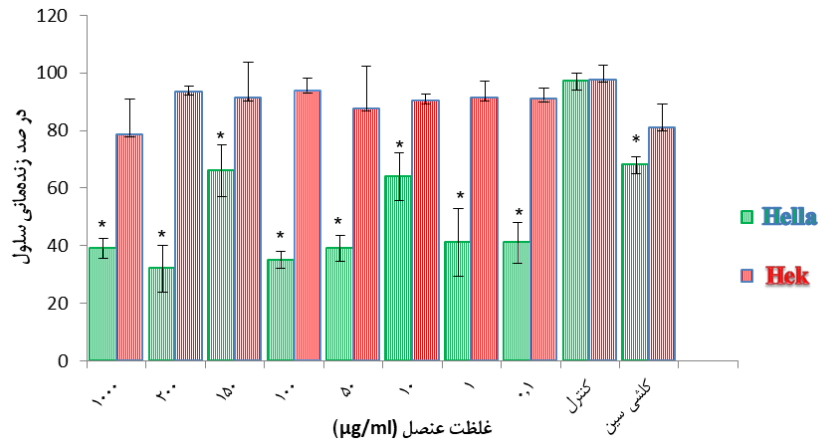
داده‌های حاصل از زنده‌مانی سلول‌ها بر اساس $\text{mean} \pm \text{S.D}$ محاسبه شد و برای تأیید اختلاف بین گروه‌های تست و گروه کنترل از آزمون آماری آنوای یک طرفه و برای رسم نمودارها و محاسبه IC_{50} و همچنین آزمون آماری از نرم‌افزار Excel استفاده شد. سطح معنی‌داری $p \leq 0.05$ در نظر گرفته شد.

نتایج

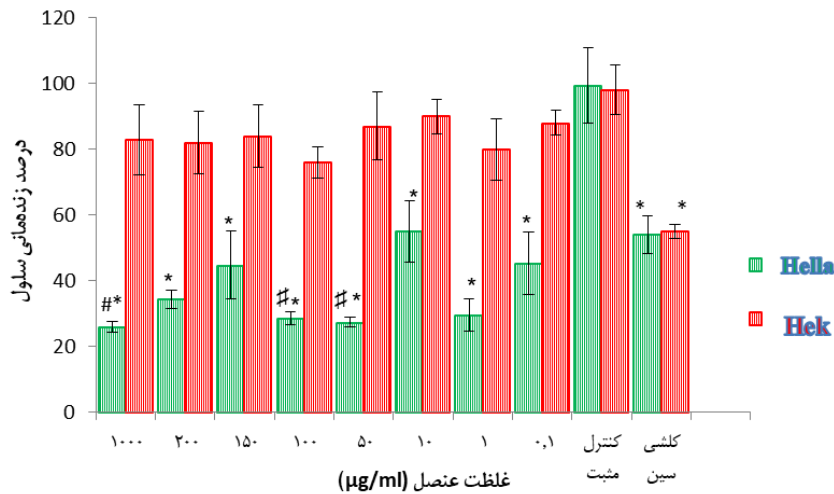
بررسی تأثیر عصاره اتانولی ریشه عنصل در مدت ۲۴ ساعت بر سلول‌های هلا در مقایسه با سلول‌های هک
بررسی تأثیر عصاره اتانولی عنصل در مدت ۲۴ ساعت در مقایسه با گروه کنترل نشان می‌دهد که عصاره عنصل درصد زنده‌مانی سلول‌های هلا را در تمام دوزها کاهش داده است ($p < 0.05$). در مقایسه با گروه دریافت‌کننده کلشی سین نیز تفاوت معنی‌دار با هیچ کدام از گروه‌ها وجود نداشته است عصاره عنصل تأثیر معنی‌داری بر زنده‌مانی سلول‌های هک نداشت (نمودار ۱).

بررسی تأثیر عصاره اتانولی ریشه عنصل در مدت ۴۸ ساعت بر سلول‌های هلا در مقایسه با سلول‌های هک
بررسی تأثیر عصاره اتانولی عنصل در مدت ۴۸ ساعت در مقایسه با گروه کنترل نشان می‌دهد که عصاره عنصل درصد زنده‌مانی سلول‌های هلا را در تمام دوزها کاهش داده است ($p < 0.05$). در مقایسه با گروه دریافت‌کننده کلشی سین نیز تفاوت معنی‌دار با دو گروه ($50 \mu\text{g/ml}$)، ۱۰۰ و ۱۰۰۰ وجود دارد. عصاره عنصل تأثیر معنی‌داری بر زنده‌مانی سلول‌های هک نداشت. گروه کلشی سین تفاوت معنی‌دار با گروه کنترل نشان داد ($p < 0.05$) (نمودار ۲).

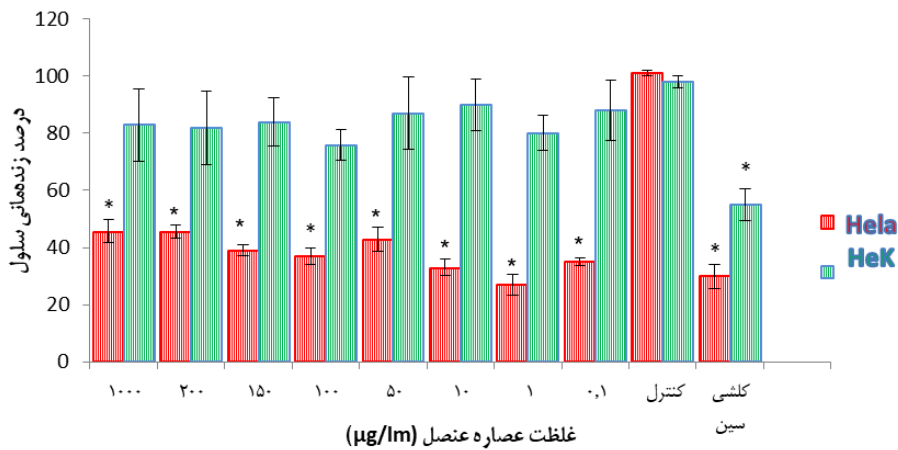
بررسی تأثیر عصاره اتانولی ریشه عنصل در مدت ۷۲ ساعت بر سلول‌های هلا در مقایسه با سلول‌های هک
بررسی تأثیر عصاره اتانولی عنصل در مدت ۷۲ ساعت در مقایسه با گروه کنترل نشان می‌دهد که عصاره عنصل درصد زنده‌مانی سلول‌های هلا را در تمام دوزها کاهش داده است ($p < 0.05$). در مقایسه با گروه دریافت‌کننده کلشی سین تفاوت معنی‌داری با گروه‌های دریافت‌کننده عصاره وجود ندارد. عصاره عنصل تأثیر معنی‌داری بر زنده‌مانی سلول‌های هک نداشت. گروه کلشی سین تفاوت معنی‌دار با گروه کنترل نشان داد ($p < 0.05$) (نمودار ۳).



نمودار ۱. درصد زنده‌مانی سلول‌های Hela و Hek پس از ۲۴ ساعت مجاورت با مقادیر مختلف عصاره اتانولی عنصل علامت * بیانگر $p < 0.05$ نسبت به گروه کنترل می‌باشد.



نمودار ۲. درصد زنده‌مانی سلول‌های Hela و Hek پس از ۴۸ ساعت مجاورت با مقادیر مختلف عصاره اتانولی عنصل علامت * بیانگر $p < 0.05$ نسبت به گروه کنترل می‌باشد. علامت # بیانگر $p < 0.05$ نسبت به گروه کلشی سین می‌باشد.



نمودار ۳. درصد زنده‌مانی سلول‌های Hela و Hek پس از ۷۲ ساعت مجاورت با مقادیر مختلف عصاره اتانولی عنصل علامت * بیانگر $p < 0.05$ نسبت به گروه کنترل می‌باشد.

در آن یافت می‌شود. مقادیر جزئی آنتوسیانین‌ها نیز وجود دارد (Duke, 2007). فلاونونوئیدها از سرطان جلوگیری می‌کنند که توسط مکانیزم‌های متفاوتی این اثر را دارند از جمله توقف سیکل سلولی، آپوپتوز و عمل آنتی‌اکسیدانتی. کوئرسیتین از آنتی‌اکسیدانت‌های قوی است. به علاوه، کوئرسیتین یک اثر پرو-آپوپتوتیک مستقیم در سلول‌های توموری دارد و می‌تواند رشد چند رده سلول سرطانی انسان را در فازهای متفاوت سیکل سلولی مهار کند ولی تقریباً فاقد هر نوع اثر آسیب‌رسان بر سلول‌های سالم است (Gibellini, 2011).

گلیکوزیدهای سیلارن آ و پروسیلاریدین دارای اثر آنتی‌توموری می‌باشند. مشخص شده است که گلیکوزیدها لیگاند پمپ Na^+/K^+ ATPase بوده که به‌عنوان یک داروی محتمل در درمان سرطان می‌باشند. به علاوه، اثرات آنتی‌توموری آنها می‌تواند از طریق فعال کردن پاسخ‌های ایمنی اختصاصی مربوط به تومور باشد (Zanchett Schneider, 2017).

فلاونونوئید دی‌هیدروکوئرسیتین اثر درمانی در سرطان دارد که از طریق فعال‌ساختن اجزای پاسخ‌دهنده آنتی‌اکسیدانت و سم‌زدایی آنزیم‌های فاز ۲، مهار سیتوکروم P450 و سنتز اسیدهای چرب آزاد در مهار کارسینوژنز نقش دارد (Weidmann, 2012). از طرف دیگر، مشخص شده است که دی‌هیدروکوئرسیتین از طریق تأثیر بر سیکل سلولی و تنظیم‌کننده‌های سیکل سلولی سبب پسرقت تومور شود (Razak, 2018).

با توجه به نتایج پژوهش حاضر عصاره اتانولی ریشه عنصل دارای اثر ضدسرطانی قوی بر رده سلولی هلا می‌باشد که احتمالاً به دلیل وجود فلاونونوئیدها و گلیکوزیدهای موجود در آن می‌باشد.

سپاسگزاری

پژوهش حاضر حاصل طرح پژوهشی است که در معاونت پژوهشی دانشگاه پیام نور با شماره ۱۴۳/د/۲۸/۱۰۰۲۴۵ به تاریخ ۹۱/۴/۱۰ تصویب شده است.

بحث و نتیجه‌گیری

بررسی تأثیر عصاره اتانولی عنصل در مقایسه با گروه کنترل نشان می‌دهد که عصاره عنصل درصد زنده‌مانی سلول‌های هلا را در تمام دوزها و در مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت کاهش داده است ($p < 0.05$) (نمودارهای ۱، ۲ و ۳).

عنصل واجد گلوکوسیلارن آ^۱ (سیلارن + رامنوز + ۲ گلوکز)، سیلارن آ^۲ (سیلارن + رامنوز + گلوکز)، پروسیلاریدین آ^۳ (سیلارن + رامنوز)، سیلاریدین آ، سیلیگلاکوزید^۴، سیلیفائوزید^۵، گلوکوسیلیفائوزید^۶، سیلیکوئولوزید^۷، سیلاروزوید^۸، سیلیکریپتوزید^۹ است. فلاونونوئیدهای (دی‌هیدروکوئرسیتین)^{۱۰}، دی‌هیدروکوئرسیتین - ۴^{۱۱} - مونوگلوکوزید^{۱۱}، ایزواوربیتین^{۱۲}، اوربیتین^{۱۳}، کوئرسیتین، اسکوپارین^{۱۴}، تاکسی فولین^{۱۵}، ویتکسین) و استیگما سترویل نیز گزارش شده است. فیتواسترویل و اگزالات کلسیم نیز موجودند (Duke, 2007).

همچنین پلی‌گلیکوزیدهای کامپفرول به همراه C- گلیکوزیدهایی مانند ویتکسین و ایزوویتکسین^{۱۶} در عنصل یافت می‌شود (Evans, 2002).

پیاز عنصل حاوی یک فروکتان مشابه اینولین به نام سینسترین می‌باشد. فروکتان مزبور به‌طور عمده از واحدهای بتا-دی-فروکتوفورانوزیل تشکیل شده است. همچنین بلورهای اگزالات کلسیم، گلوکوالاکتان‌ها نیز

1. Gluco scillaren A
2. Sillaren A
3. Proscillaridin A
4. Scilliglucoside
5. Scilliphaeoside
6. Gluco Scilliphaeoside
7. Scillicoeloside
8. Scillazuroid
9. Sillicryptoside
10. Dihydroquercetin
11. Dihydroquercetin-4' monoglucoside
12. Isoorientin
13. Orientin
14. Scoparin
15. Taxifolin
16. Isovitexin

REFERENCES

- Akbarzadeh Pasha, H. (2012). Clinical culture and herbal medicines. Tehran, Golban Nashr; 182.
- Duke, J. (2007). Herb plants culture. Translated by MohagheghZadeh A., Amozgar Z., Shams Ardekani M.R. Tehran: Rahe Kamal; 946-48.
- Evans, W.C. (2002). Trease and Evans pharmacognosy. Translated by Afsharipour S. Esfahan: Esfahan Univ Med Sci; 254-256
- Gibellini, L.; Pinti, M.; Nasi, M.; Montagna, J.P.; De Biasi, S.; Roat, E. (2011). Quercetin and cancer chemoprevention. Evid Based Complement Alternat Med 2011; 591356.
- Jun-Xiao, Z.; Hong, W.; Chun-Yan, H.; Wei-Qiang, W.; Guang-Hua, C.; Li-Hui, W.; Liu, C. (2018). Anticancer activity of 23,24-dihydrocucurbitacin B against the hela human cervical cell line is due to apoptosis and G2/M cell cycle arrest. Experimental and Therapeutic Medicine; 15(3): 2575-2582.
- Kooti, W.; Servatyari, K.; Behzadifar, M.; Asadi-Samani, M.; Sadeghi, F.; Nouri, B.; Zare Marzouni, H. (2017). Effective medicinal plant in cancer treatment, Part2: Review study. J Evid Based Complementary Altern Med; 22(4): 982-995.
- Mozaffarian, V. (2012). Identification of medicinal and aromatic plants of Iran, Tehran: Farhange Moaser; 636-638.
- Niazi, F.; Shahrokhadi, K.; Tehranipour, M. (2017). The effects of Total extract *Ocimumbasilicum* VEGF gene expression changes in chick embryo choioallantoic membrane angiogenesis. JSSU; 25(8):620-640.
- Rafieian-Kopaei, M.; Nasri, H. (2015). On the occasion of World Cancer Day 2015: The possibility of cancer prevention or treatment with antioxidants: the ongoing cancer prevention researches. Int J Prev Med; 6: 108.
- Razak, S.; Afsar, T.; Ullah, A.; Almajwal, A.; Alkholief, M.; Alshamsan, A.; Jahan, S. (2018). Taxifolin, a natural flavonoid interacts with cell cycle regulators causes cell cycle arrest causes tumor regression by activating Wnt/ β -catenin signaling pathway. BMC cancer; 18: 1043
- Nasri, S. (2017). Cytotoxicity effect of *Huthemia persica* on Hela cancer cells in comparison to Hek. Experimental Animal Biology Journal; 7(1): 81-87.
- Shams, E.; Javani Jouni, F.; Zafari, J.; Monajemi, R.; Abdolmaleki, P. (2017). Effect of static magnetic field on the rate of proliferation and viability in Hela cancer cells and normal fibroblasts. Horizon Med Sci.; 23(1): 7-12.
- Vu, M.; Awolude, O.A.; Chuang, L. (2018). Cervical cancer worldwide. Curr Probl Cancer; 42(5): 457-465.
- Weidmann, A.E. (2012). Dihydroquercetin: More than just an impurity? Eur J Pharmacol; 684(1-3): 19-26
- Zanchett Schneider, N.F.; Cerella, C.; Oliveira Simoes, C.M.; Diederich, M. (2017). Anticancer and immunogenic properties of cardiac glycosides. Molecules; 22(11): 1932
- Zargari, A. (2011). Medicinal plants, Tehran, Tehran University; 4: 658-7.