بررسی اثر سمیت عصاره متانولی تام برگ گیاه لَرگ (*Pterocarya fraxinifolia*) بر رده سلول سرطانی MCF-7

ساناز اعتمادی شالکوهی [۱*]، سید حسن حسنی کومله [۲]
[۱] دانشجوی کارشناسی ارشد رشته بیوتکنولوژی کشاورزی دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه گیلان
[۲] استادیارگروه بیوتکنولوژی دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه گیلان
*نویسنده مسئول: etemadi120@gmail.com

چکیده

زمینه و هدف: به طور کلی فراورده‌های طبیعی بسیاری از گیاهان خواص ضد سرطانی نشان داده‌اند. مطالعات اخیر نشان داد که گیاه لرگ دارای خواص آنتی توموری، ضد باکتری و ضد قارچ می‌باشد. در این تحقیق اثر سمیت سلولی عصاره‌ی متانولی برگ درخت لرگ بر سلول سرطان سینه رده MCF-7 مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش ها: در این مطالعه‌ی تجربی عصاره‌ی تام متانولی برگ گیاه لرگ با روش خیساندن، استخراج شد. سلول های MCF-7 و سلول های نرمال HGF-1 در محیط RPMI 1640 حاوی سرم جنینی گاو و آنتی‌بیوتیک کشت گردیدند. اثر سمیت سلولی غلظت‌های مختلف از عصاره بر سلول‌های MCF-7، با استفاده از آزمون رنگ سنجی MTT تعیین گردید.

یافته ها: میزان بقای سلولی حاصل از تست MTT نشان می دهد که عصاره‌ی تام برگ درخت لرگ بر روی سلول سرطان سینه رده MCF-7 در اکثر غلظت ها دارای اثر سمیت سلولی بوده و بالاترین مهار آن در غلظت‌های ۱۰۰۰ و ۱۲۰۰ میکرو گرم بر میلی لیتر است.

نتیجه گیری: عصاره‌ی متانولی برگ گیاه لرگ دارای اثر مهاری بر سلول‌های سرطان سینه بوده، لذا به نظر می‌رسد با تحقیقات بیشتر در آینده، می‌توان از ترکیبات آن در درمان سرطان استفاده کرد.

کلمات کلیدی: آزمون MTT، سایتوتوکسیک، سرطان سینه، عصاره ی متانولی، گیاه دارویی.

مقدمه

گیاهان از لحاظ تاریخی به دلیل فواید سلامتی و خواص دارویی شان برای درمان بیماری ها مورد استفاده قرار گرفته اند و می‌توانند منابع قوی برای توسعه‌ی انواعی از محصولات دارویی باشند. گزارش سازمان بهداشت جهانی (WHO) بر این تأکید دارد که بیشتر جمعیت جهان برای اهداف درمان وابسته به داروهای سنتی هستند و بسیاری از اعلاج ها نیز در منشاء مرهون از گیاهان دارویی اند (Isbilen *et al*., 2018). سرطان به عنوان شدیدترین سندروم متابولیکی محسوب و تخمین زده می شود که حدود ۷/۶ میلیون مرگ (تقریبا ٪۱۳ از کل مرگ و میر) در سراسر جهان ناشی از آن است و انتظار می رود تا سال ۲۰۳۰ به ۱۳/۱ میلیون نفر افزایش یابد. امروزه علاقه مندی در شناسایی جدیدترین و موثرترین ممانعت کننده های شیمیایی با عوارض جانبی کمتر برای درمان سرطان وجود دارد. گیاهان دارویی به عنوان یکی از منابع با اهمیت و قابل اطمینان برای کشف درمان‌های امید بخش از جمله داروهای شیمیایی پیش‌گیری کننده سرطان است. تقریبا ٪۵۵ از داروهای شیمی درمانی اخیر از گیاهان و بر مبنای طب سنتی بدست آمده اند (Sahu *et al*., 2018). لرگ با نام علمی *Pterocarya fraxinifolia* (Poir) spach یک گیاه بومی در شمال ایران است. جنس "لرگ" (*Pterocarya* Kunth) از خانواده گردو (Juglandaceae)، راسته سداب (Rutales)، زیر رده‌ی بی‌گلبرگ‌ها (Dialypetales) و رده‌ی دو لپه‌ای‌ها (Dicotyledones) است (بتولی و همکاران، ۱۳۹۵). عصاره‌ی برگ درخت لرگ، به دلیل داشتن میزان بالایی از فنول و فلاونوئید، دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی است. همچنین ترکیبات طبیعی اسانس برگ را مونوترپن ها و سزکویی ترپن‌ها تشکیل می‌دهند (Ebrahimzadeh *et al*., 2009). عصاره برگی این گیاه دارای فعالیت ضد میکروبی

IrHC2019

قوی (Fathi *et al.*, 2015) و فعالیت ضد قارچی علیه میکرو ارگانیسم ها است و جوگلن استخراج شده از برگ، دارای فعالیت حفاظتی قوی در برابر پرتو های ماوراء بنفش خورشید است (Ebrahimi and Parvinzadeh Gashti, 2015).

جوگلن، یک ترکیب نفتوکوئینون (5-hydroxy 1,4-naphthoquinone) است که در برگ‌ها و پوست این درخت وجود دارد و دارای فعالیت ضد میکروبی است(Hadjmohammadi and Kamel, 2006) . در مطالعه حاضر اثر سایتوتوکسیک عصاره‌ی الکلی لرگ بر تکثیر سلول‌های سرطان سینه بررسی شد.

مواد و روش ها

آماده سازی و تهیه عصاره گیاه: دراین مطالعه آزمایشگاهی، برگ گیاه لرگ از نواحی جنگلی شهرستان لنگرود واقع در استان گیلان جمع آوری گردید. پس از خشک شدن برگ‌ها در معرض هوا، عصاره‌گیری به روش خیساندن (ماسراسیون) انجام پذیرفت. برای عصاره‌گیری ابتدا ۲۰ گرم از پودر خشک گیاه را داخل بطری های در آبی ریخته و ۴۰۰ سی سی حلال متانول ۱۰۰٪ بر روی آن ریخته شد. به منظور حل شدن بهتر پودر گیاه با حلال، عمل سونیکاسیون به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد و سپس به مدت ۲۴ ساعت در دستگاه شیکر انکوباتور در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد و دور۱۲۰ شیک شد. بعد از گذشت این زمان مخلوط عصاره و الکل از کاغذ صافی فیلتر شد تا مواد جامد از مایع جدا شود و این محلول مایع کم کم در چند نوبت در دستگاه تقطیر در خلاء دوار قرار داده شد. این دستگاه الکل را از محلول عصاره جدا می‌کند و عصاره‌ی تغلیظ شده بعد از خشک شدن، همان عصاره‌ی تام متانولی لرگ بود. این عصاره در ظرف شیشه‌ای دربسته و درون یخچال نگهداری و برای تهیه‌ی غلظت‌های مختلف دارو استفاده شد. به منظور تهیه‌ی رقت‌های ۱۰۰، ۳۰۰، ۵۰۰، ۷۰۰، ۱۰۰۰، ۱۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر آماده شد.

کشت سلول های MCF-7 و HGF-1 :

رده های سلولی مورد بررسی، در محیط RPMI1640 همرا با FBS ۱۰٪، آنتی بیوتیک های پنی سیلین، استرپتومایسین IU/ml ۱۰۰، ال- گلوتامین ۲Mm و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و فشار ۵ درصد دی اکسید کربن در فلاسک های با مساحت $25cm^2$ کشت و پاساژ داده شدند تا سلول ها از لحاظ تعداد و مورفولوژی به حد مطلوب برسند.

پس از پوشیده شدن بستر فلاسک از سلول، لایه‌ی سلولی چسبیده به کف فلاسک توسط تریپسین-EDTA جدا شد و در لوله آزمایش استریل انتقال و به مدت ۵ دقیقه با دور rpm ۳۰۰۰ سانتریفیوژ شد. سلول ها مجددا در محیط کشت تازه معلق و شمارش و ارزیابی حیات سلول ها با استفاده از تست تریپان بلو انجام شد و تعداد 7×10^4 cell/ml در چاهک های پلیت ۹۶ خانه مخصوص کشت سلولی انتقال و به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. سپس عصاره رقیق شد و با غلظت های ۱۰۰، ۳۰۰، ۵۰۰، ۷۰۰، ۱۰۰۰، ۱۲۰۰ میکرو گرم در میلی لیتر به چاهک ها اضافه شد. چاهک های حاوی سلول و بدون عصاره به عنوان شاهد یا گروه کنترل و چاهک های فاقد سلول و حاوی محیط کشت به عنوان Blank در نظر گرفته شد.

بعد از ۲۴ ساعت که پلیت های مذکور در انکوباتور قرار گرفتند، خصوصیات ظاهری سلول ها از نظر میزان گرانولیتی و با استفاده از دوربین دیجیتال ثبت گردید. این آزمایش ۳ بار تکرار شد و در هر آزمایش ۳ تکرار وجود داشت و اعداد بدست آمده، میانگین داده ها در مهار رشد سلول ها برای سه بار تکرار مستقل می باشد.

تست MTT :

میزان حیات سلولی توسط آزمون رنگ سنجی MTT (دی متیل تیازول- دی فنیل تترازولیوم بروماید) تعیین گردید. MTT زرد رنگ به وسیله آنزیم دهیدروژناز سلول های زنده شکسته و احیا می شود و به ترکیب نامحلول فورمازان تبدیل می شود. میزان جذب این ترکیب پس از حل شدن در DMSO در طول موج ۵۷۰ نانومتر قابل اندازه گیری است.

به ازای هر ۱۰۰ میکرولیتر از محیط کشت، ۱۰ میکرولیتر رنگ به هر چاهک از پلیت ۹۶ خانه اضافه شد و به مدت ۴ ساعت انکوبه گردید. بعد محیط رویی سلول ها خالی شد و به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر DMSO اضافه شد. بعد

IrHC2019

از ۱۰ دقیقه جذب نوری در طول موج ۵۷۰ نانومتر توسط دستگاه الایزاریدر قرائت شد. درصد حیات سلول‌های تحت اثر عصاره نسبت به سلول‌هایی که عصاره‌ای دریافت نکرده بودند با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد:

$$\%OD=\frac{OD_{\text{چاهک های تحت تاثیر عصاره}}-OD_{\text{بلانک}}}{OD_{\text{کنترل}}-OD_{\text{بلانک}}}\times 100$$

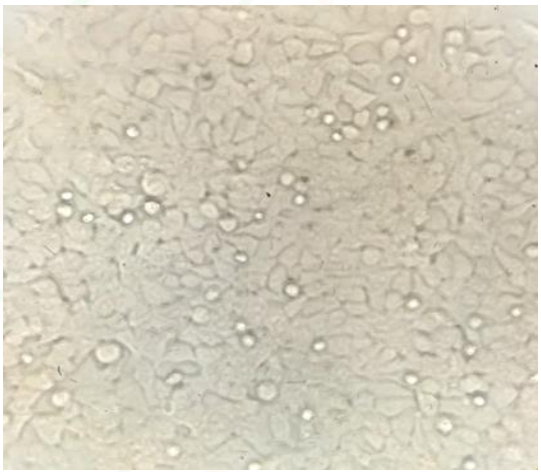
در فرمول فوق OD کنترل، جذب نوری چاهک های حاوی سلول و MTT و فاقد عصاره گیاه است. OD بلانک، جذب نوری چاهک‌های بدون سلول و تنها محیط کشت و MTT و DMSO است.

آنالیز آماری:

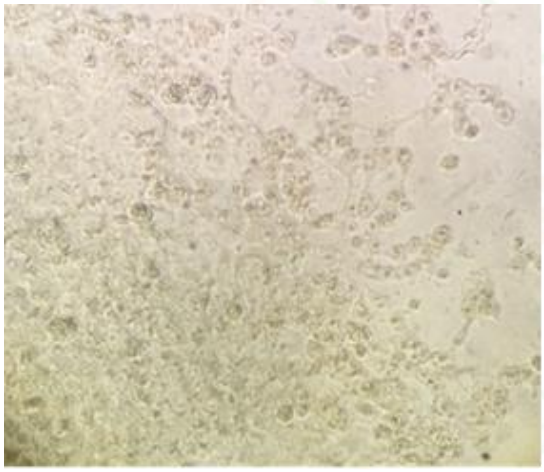
داده ها از طریق نرم افزار SAS آنالیز شدند و میانگین ها تحت آزمون توکی مورد مقایسه قرار گرفتند. مقدار P کم تر از ۰/۰۱ برای تعیین سطح معنی دار بودن در نظر گرفته شد.

نتایج

نتایج مورفولوژی سلول‌های سرطانی نشان می دهد که عصاره‌ی متانولی برگ درخت لرگ باعث ایجاد تغییرات در شکل دیواره‌ی سلولی، کاهش سطح سلولی و مهار رشد سلول‌ها و تغییر چسبندگی سلول‌ها به سطح پلیت و به یکدیگر در مقایسه با سلول‌های فاقد عصاره (کنترل) ایجاد کرده است (شکل های ۱ و ۲)؛ که بیانگر مرگ برنامه ریزی شده‌ی سلول آپاپتوز در سلول‌های سرطانی تیمار شده می باشد. این تغییرات با افزایش غلظت عصاره افزایش یافت.



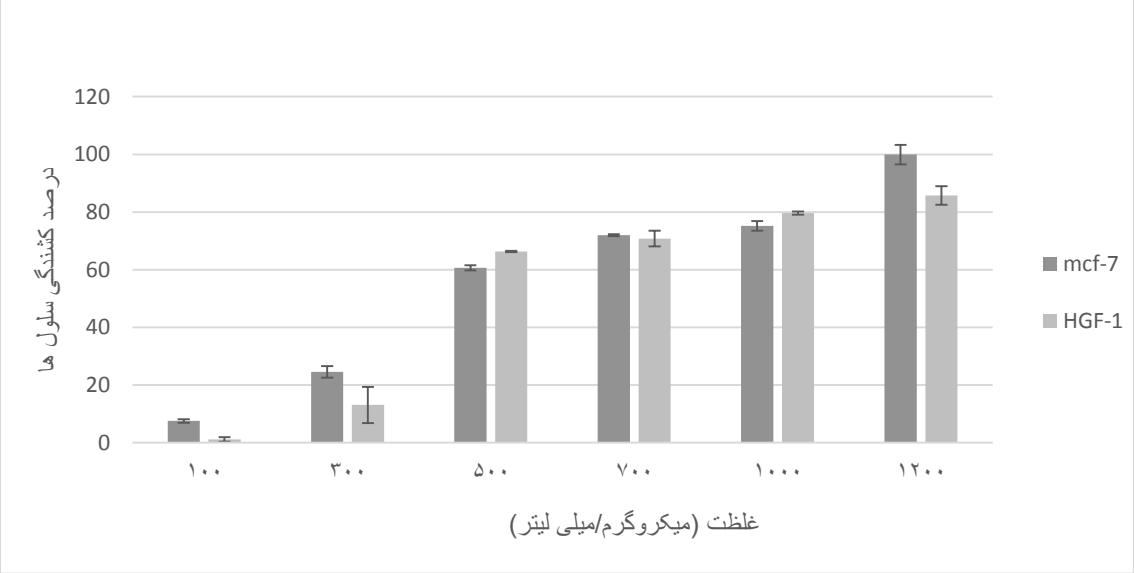
شکل۱- مورفولوژی سلول های سرطانی رده‌ی MCF-7 فاقد عصاره ی گیاه لرگ پس از ۲۴ ساعت



شکل۲- مورفولوژی سلول های سرطانی رده‌ی MCF-7 تحت تاثیر عصاره ی گیاه لرگ پس از ۲۴ ساعت

با بالا بردن غلظت دارو جذب نوری (OD) حاصل از تست MTT کاهش و میزان سمیت سلولی آن در هر دو لاین سالم و سرطانی افزایش می یابد ولی تاثیر آن بر سلول های نرمال (HGF-1) کمتر از سلول‌های سرطان (MCF-7) است. در نمودار ۱ ارتباط غلظت‌های اعمال شده‌ی عصاره‌ی گیاه و درصد کشندگی قابل مشاهده است.

IrHC2019



نمودار شماره ۱- اثر سایتوتوکسیک عصاره ی متانولی گیاه لرگ روی سلول های MCF-7 و HGF-1 بعد از ۲۴ ساعت.

همان‌طور که در نمودار مذکور مشخص است روند کشندگی سلول‌ها با افزایش غلظت عصاره مورد نظر افزایش میابد.

بطوریکه در غلظت ۳۰۰ میکرو گرم بر میلی لیتر پس از ۲۴ ساعت حدود ۲۴ درصد از سلول‌های سرطان کشته شدند و در غلظت ۱۲۰۰ میکرو گرم بر میلی لیتر پس از ۲۴ ساعت، درصد سلول‌های کشته شده‌ی سرطان تقریبا ۹۹ درصد بوده است. این نتایج نشان میدهد میزان کشندگی به غلظت عصاره بستگی دارد. مقدار IC_{50} عصاره برگ درخت لرگ برای رده‌ی سلولی MCF-7 ، از طریق برنامه GraphPad Prism 8، ۴۵۲/۱ میکروگرم بر میلی لیتر محاسبه گردید. براساس جدول شماره ۱، داده های بدست آمده در تمامی سطوح مورد آزمایش تغییرات معنی‌داری نشان داده‌اند. بین تیمارهای مختلف و همچنین اثر متقابل لاین سلولی و تیمارها در سطح $P\leq0.01^{**}$ تفاوت معنی دار داشتند.

جدول۱- جدول تجزیه واریانس اثر غلظت های مختلف عصاره گیاه لرگ بر مهار رشد سلول های MCF-7 و HGF-1

منابع تغییرات(sov)	DF	SS	MS	F-Value
A (لاین های سلولی)	1	54.78859	54.78859	3.19^{ns}
B (تیمارهای عصاره)	6	49506.17200	8251.02867	480.18**
A×B (اثر متقابل لاین در تیمار)	6	410.20602	68.36767	3.98**

ns عدم معنی داری و ** معنی داری در سطح ۰/۰۱ را نشان می دهد .

بحث

توسعه‌ی داروها یک پیشینه‌ی طولانی از جستجو برای ترکیبات طبیعی فعال در گیاهان دارد، که تعداد بسیاری از آنها در طب سنتی برای درمان طیف گسترده‌ای از بیماری‌ها و عفونت‌ها استفاده می شدند. محصولات طبیعی منبع بزرگی برای کشف داروها هستند و بیش از ۶۰٪ داروهایی که در درمان سرطان استفاده میشوند منشاء طبیعی دارند.

اخیرا افزایش شیوع سرطان علاقه را برای یافتن ترکیبات فعال جدید علیه این بیماری ایجاد کرده است (Gallego *et al.*, 2017). نتایج این تحقیق انطباق خوبی با نتایج سایر محققین برای بررسی اثر سمیت عصاره‌ی گیاهان بر سلول‌های سرطانی داشت، عابدی قشلاقی و همکاران (Abedigheshlaghi *et al.*, 2014) عصاره‌ی اتانولی، متانولی، آبی و فراکشن

IrHC2019

ان-بوتانولی گیاه لرگ را به روش سوکسله گرفتند و سپس به منظور ارزیابی اثر سیتوتوکسیک، سلول‌های سرطان خون (K562) با غلظت‌های ۱۲/۵ الی ۴۰۰ µg/ml تیمار شدند و سمیت عصاره‌ی این گیاه از طریق تست MTT ارزیابی شد.

نتایج نشان داد که عصاره‌ی اتانولی بالاترین اثر سمیت و عصاره ی فراکشنی ان_بوتانولی کمترین اثر سمیت را در میان عصاره‌ها داشت. این عصاره‌ها سمیت وابسته به دز را روی سلول‌های سرطانی نشان دادند. و در نهایت نتیجه گرفتند که عصاره‌ی آبی و الکلی برگ‌های این گیاه به عنوان یک کاندید برای مطالعات تکمیلی درمان سرطان خون می توانند بکار روند. در مطالعات گالکو و همکاران (Gallego *et al*., 2017) خاصیت ضد سرطانی عصاره ی متانولی ساقه و برگ گیاه *Coryllus avellana* L. بر روی لاین‌های سلولی سرطان‌های کبد (Hep-G2)، گردن رحم (HeLa) و سینه (MCF-7) مورد بررسی قرار گرفت و به این نتیجه رسیدند که عصاره‌ی متانولی برگ نسبت به ساقه منجر به کاهش بیشتر در زنده مانی تمامی خطوط سلول سرطانی داشت، همچنین تجزیه‌ی عصاره‌ی متانولی برگ منجر به خالص سازی و شناسایی دو ترکیب شد که زنده مانی سلول‌های سرطانی Hep-G2 و HeLa را بیشتر از MCF-7 کاهش دادند. آلام و همکاران (Alam, et al., 2017) در تحقیقی اثر سمیت عصاره‌ی متانولی و ساپونین‌های خام از میوه، پوست درخت و برگ‌های گیاه *Zanthoxylum armatum* DC. بر روی سلول‌های سرطانی روده بزرگ (Caco-2) و سینه (MCF-7, MDA-MB-468) با استفاده از تست MTT بررسی کردند و نتایج دال بر اثر سمیت این عصاره در غلظت‌های ۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر و بالاتر بر سلول‌های سرطانی و اثر بر مکانیزم‌های آپاپتوز در آنها بوده است.

نتیجه گیری

در این مطالعه مشخص گردید عصاره‌ی متانولی برگ گیاه *Pterocarya fraxinifolia* بر روی سلول‌های سرطانی سینه (MCF-7) اثر سمیت داشته و سبب مهار رشد سلول‌های سرطانی می شود به طوریکه بالاترین درصد مهار در غلظت های ۱۰۰۰ و ۱۲۰۰ میکرو گرم برمیلی لیتر مشاهده گردید. این تحقیق مقدمه ای برای رسیدن به کاربرد این گیاه در مهار رشد سلول های سرطانی است و مطالعات و تحقیقات بیشتر برای تائید تاثیرات این گیاه بر سلول‌های سرطانی نیاز است.

منابع

بتولی، ح.، اخباری، م.، یاسا، ن.، خانوی، م. و توکلی، س. ۱۳۹۵. مقایسه ترکیبهای شیمیائی اسانس برگهای درخت *Pterocarya fraxinifolia* (Poir) Spach در مراحل مختلف فنولوژی در منطقه گیلان. فصلنامه اکوفیتوشیمی گیاهان دارویی، ۱۳(۱): ۸۳-۹۴.

Abedigheshlaghi, Z., Monajemi, R. andYahyaabadi. S. 2014. Cytotoxic effect of aqueous and alcoholic extracts of Pterocarya fraxinifolia leaves on K562 cell line.

Alam, F., Saqib, Q.N. and Waheed, A. 2017. 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 complementary and alternative medicine, 17(1): 368.

Ebrahimi, I. and Parvinzadeh Gashti. M. 2015. Extraction of juglone from *Pterocarya fraxinifolia* leaves for dyeing, anti-fungal finishing, and solar UV protection of wool. Coloration Technology, 131(6): 451-457.

Ebrahimzadeh, M., Nabavi, S. and Nabavi. S. 2009. Essential oil Composition and Antioxidant Activity of *Pterocarya fivaxinifolia*. Pakistan Journal of Biological Sciences, 12(13): 957-963.

Fathi, H., Ebrahimzadeh, M.A. and Ahanjan, M. 2015. Comparison of the antimicrobial activity of *Caucasian wingnut* leaf extract (*Pterocarya fraxinifolia*) and Walnut (*Juglans regia* L.) plants. Acta Biologica Indica, 4(1): 67-74.

Gallego, A., Metón, I., Baanante, I.V., Ouazzani, J., Adelin, E., Palazon, J., Bonfill, M. and Moyano, E. 2017. Viability-reducing activity of *Coryllus avellana* L. extracts against human cancer cell lines. Biomedicine and Pharmacotherapy, 89: 565-572.

Hadjmohammadi, M.R. and Kamel, K. 2006. Determination of Juglone (5-hydroxy 1, 4-naphthoquinone) in *Pterocarya fraxinifolia* by RP-HPLC. Iranian Journal of Chemistry and Chemical Engineering, 25(4): 73-76.

Isbilen, O., Rizaner, N. and Volkan, E. 2018. Anti-proliferative and cytotoxic activities of *Allium autumnale* PH Davis (Amaryllidaceae) on human breast cancer cell lines MCF-7 and MDA-MB-231. BMC complementary and alternative medicine, 18(1): 30.

Sahu, N., Meena, S., Shukla, V., Chaturvedi, P., Kumar, B., Datta, D. and Arya, K. 2018. Extraction, fractionation and re-fractionation of *Artemisia nilagirica* for anticancer activity and HPLC-ESI-QTOF-MS/MS determination. Journal of ethnopharmacology, 213: 72-80.

The Cytotoxic Effect of Methanolic Extract of *Pterocarya fraxinifolia* Leaf on MCF-7 Cancer Cell Line

Sanaz Etemadi[1*], Hassan Hassani Kumleh[2]
[1*] M.Sc. Student in Plants Biotechnology, guilan university, rasht
[2]Associate professor, Plants Biotechnology, guilan university, rasht
[*]*Corresponding author: etemadi120@gmail.com*

Abstract

Background and Objectives: In general, natural products of many plants have shown anticancer properties. Recent studies have shown that the floral herb has anti-tumor, anti-bacterial and antifungal properties. In this study, the effect of cytotoxicity of methanolic extract of Pterocarya fraxinifolia Caucasian wingnut leaves on MCF-7 breast cancer cells has been investigated. Materials and Methods: In this laboratory study, whole methanolic extract of Pterocarya fraxinifolia leaves was prepared by using maceration method. MCF-7 cells and normal HGF-1 cells were cultured in RPMI 1640 medium containing embryonic serum and antibiotics. The effect of cytotoxicity of various concentrations of extract on MCF-7 cells was determined using MTT colorimetric assay. Results: The cell survival rate obtained from the MTT assay showed that the whole leaf extract of Pterocarya fraxinifolia leaves on the MCF-7 breast cancer cell has a cytotoxic effect at most concentrations and has the highest inhibitory effect at concentrations of 1000 and 1200 Micrograms per ml. Conclusion: Methanolic extracts of Pterocarya fraxinifolia leaves have an inhibitory effect on breast cancer cells. Therefore, it seems that with further research in the future, its compounds can be used to treat cancer.

***Keywords**:* Breast cancer, Cytotoxicity, Medicinal herb, Methanolic extract, MTTassay.

IrHC2019