مقاله پژوهشی

مجله سلول و بافت (علمی - پژوهشی)
جلد۱۰، شماره ۱، بهار ۱۳۹۸

بررسی اثر ضدسرطان عصاره الکلی به‌لیمو *Lippia citriodora*: مهار متاستاز سلول‌های سرطان تخمدان A2780 از طریق بازیابی بیان E–کادهرین

الهه امینی .Ph.D.[*1] ، محمد نبیونی .Ph.D[1]،جواد بهارآرا .Ph.D[2]،سید بهرام بهزاد .M.Sc[1]، دانیال سیفی .M.Sc[1]، فرزانه سالک .M.Sc[2]

۱- دانشگاه خوارزمی، دانشکده علوم زیستی، گروه سلولی مولکولی، تهران، ایران

۲- دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی، مشهد، ایران

* پست الکترونیک نویسنده مسئول: elaheh.amini@khu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۱/۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۳/۶

چکیده

هدف: هدف از این مطالعه، بررسی پتانسیل پروآپوپتوزی و ضد متاستازی عصاره الکلی برگ به‌لیمو (*Lippia citriodora*) بر سلول‌های سرطان تخمدان A2780 و بررسی بیان E-کادهرین به‌عنوان یکی از مارکرهای مهم در متاستاز است.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش تجربی آزمایشگاهی، رده‌ی سلولی A2780 از بانک سلولی پاستور تهیه و در محیط کشت RPMI1640 دارای FBS، ۱۰ درصد به‌همراه ۱ درصد آنتی بیوتیک در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت شدند. پس از کشت سلول‌ها و تیمار با غلظت‌های مختلف عصاره (۱۰ تا ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) قابلیت حیات سلول‌ها توسط روش MTT، پتانسیل پروآپوپتوزی توسط آزمون اکریدین اورنج/پروپیدیوم ایوداید و کاسپاز ۳ و اثر ضد تهاجمی توسط تست مهاجرت و ارزیابی بیان E-کادهرین اندازه‌گیری شد. سپس از آزمون آماری آنالیز واریانس یک‌طرفه برای تحلیل نتایج کمی استفاده شد.

نتایج: داده‌ها نشان داد عصاره الکلی برگ به‌لیمو به‌صورت وابسته به دوز بقای سلول‌های A2780 را کاهش داد. نتایج آزمون اکریدین اورنج و کاسپاز-۳ نشان داد این عصاره در غلظت میانه مهاری (۱۰۰ میکروگرم) باعث القای آپوپتوز وابسته به کاسپاز در سلول‌های سرطان تخمدان می‌شود. آزمون مهاجرت و RT-PCR نشان داد که این عصاره دارای پتانسیل ضد تهاجمی بوده و با افزایش بیان E –کادهرین از سست شدن اتصالات بین سلول‌های سرطانی جلوگیری می‌کند.

نتیجه گیری: نتایج این پژوهش نشان داد عصاره الکلی برگ به‌لیمو با دارا بودن ظرفیت القای آپوپتوزیس و بازیابی بیان E-کادهرین در سلول‌های سرطانی A2780 قادر به مهار پتانسیل تهاجمی سلول‌های سرطان تخمدان است.

واژگان کلیدی: به‌لیمو، متاستاز، تبدیل اپی‌تلیوم به مزانشیم، E-کادهرین، سرطان تخمدان

مقدمه

سرطان تخمدان پنجمین سرطان شایع و در بین زنان دومین بدخیمی دستگاه تولیدمثلی محسوب می‌شود. این نوع سرطان به‌طور رایج به‌دلیل تجمع فاکتورهای آسیب رسان از جمله عدم تحرک کافی، مصرف الکل، چاقی و افزایش استعمال دخانیات ایجاد می‌شود (۱،۲). درمان سرطان تخمدان با هدف‌های مختلفی مثل پیشگیری، درمان و کنترل صورت می‌گیرد. به‌طور معمول چند راه برای درمان سرطان ازجمله: جراحی، شیمی درمانی، پرتو درمانی، هورمون درمانی، ایمونوتراپی و ژن درمانی وجود دارد. در این میان شیمی درمانی، جراحی و هورمون درمانی روش‌های رایج‌تر درمان سرطان تخمدان هستند. به‌علاوه استفاده توام این روش‌ها بر علیه برخی از سرطان‌ها که به‌طور وسیع در بدن انتشار یافته‌اند، به‌کار گرفته می‌شود (۳). متاستاز یکی از چالش‌های عمده در درمان سرطان تخمدان به‌شمار می‌رود. تبدیل حالت اپیتلیالی به‌حالت مزانشیمی (Epithelial Mesenchymal Transition: EMT) یک فرایند بیولوژیکی در متاستاز است که طی این فرایند سلول‌های اپی‌تلیالی قطبی که در شرایط طبیعی از طریق سطح بازال خود با غشای پایه برهم کنش دارند، دستخوش تغییرات بیوشیمیایی شده و فنوتیپ مزانشیمی شبه فیبروبلاستی پیدا می‌کنند (۴). مطالعات نشان داده است که این تغییرات بیوشیمیایی باعث افزایش ظرفیت مهاجرت، تهاجم، مقاومت بالا به آپوپتوزیس و تا حد زیادی افزایش تولید اجزای ماتریکس خارج سلولی (ECM) می‌شود (۵). شواهد نشان می‌دهد که سرطان‌های با منشا اپی‌تلیالی از جمله سرطان تخمدان با دارا بودن مجموعه کوچکی از سلول‌های بنیادی سرطانی توانایی رشد تومور، متاستاز و مقاومت به درمان دارند (۷، ۶). از بین مهم‌ترین نشانه‌های مولکولی EMT می‌توان به کاهش بیان مارکرهای اپی‌تلیال (E-کادهرین، پلاکوگلوبین و دسموپلاکین)، افزایش بیان مارکرهای مزانشیمی (ویمنتین، N-کادهرین، α-SMA) و افزایش بیان فاکتورهای رونویسی مانند Snail، Slug، Twist، ZEB1(Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 1) ، ZEB2 (Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 2)که می‌توانند به پروموتر E-کادهرین متصل شده و فعالیت رونویسی و بیان E-کادهرین را متوقف کنند، اشاره کرد. مطالعات نشان داده است که از دست دادن و یا کاهش بیانE -کادهرین، اولین و مهم‌ترین مرحله EMT در نظر گرفته می‌شود (۸). دراغلب تومورهای اولیه که خاصیت تهاجم دارند چسبندگی بین سلولی کاهش می‌یابدکه اغلب به‌دلیل از دست رفتن E-کادهرین است. از آن‌جایی‌که بازگشت و وخیم تر شدن بیماری پس از درمان در پی متاستاز یکی از چالش‌های مهم برای بیماران است، بنابراین پیشگیری از روند متاستاز می‌تواند شاخص مهمی در روند درمان بیماران باشد (۹).

گیاهان تولیدکننده تعداد وسیعی متابولیت ثانویه هستند که خواص اغلب این ترکیبات هنوز شناسایی نشده است. به‌علاوه خواص فیزیکی، شیمیایی و زیستی این ترکیبات به میزان زیادی با هم متفاوت است. مطالعات بسیاری ترکیبات طبیعی را به‌عنوان گزینه‌های مناسب در درمان سرطان پیشنهاد کرده‌اند (۱۰). تحقیقات نشان داده است در بین ترکیبات طبیعی، گیاهان دارویی و عصاره آن‌ها نقش مهمی در درمان بسیاری از انواع سرطان‌ها از جمله سرطان تخمدان ایفا می‌کند (۱۱).

Aloysia citrodora گونه‌ای از گیاهان گلدار از خانواده شاهپسند، است. نام رایج آن *lemon verbena* و *lemon beebrush* است. برخی گونه‌های این گیاه (*Candida albicans*) دارای فعالیت ضدقارچی و سیتوتوکسیک هستند (۱۳، ۱۲). تحقیقات نشان داده‌اند که مکمل‌های آنتی اکسیدانتی موجود در عصاره به‌لیمو دارای اثر حفاظتی در برابر استرس اکسیداتیو القا شده توسط بیماری‌ها است (۱۴). تا به‌حال، در مورد خواص ضدسرطان گونه Lippia citrodora به‌عنوان یکی از گونه‌های بومی شاه‌پسند در ایران مطالعه‌ای صورت نگرفته است. با توجه به این‌که کاهش بیان E-کادهرین به‌عنوان یک بیومارکر برای پیش‌بینی سرطان‌های با منشا اپی‌تلیالی در نظر گرفته می‌شود، هدف از تحقیق حاضر بررسی اثر سمیت سلولی عصاره الکلی برگ‌های به‌لیمو (*Lippia citriodora*) بر سلول‌های سرطان تخمدان A2780 مقاوم به سیس پلاتین و بررسی اثر این عصاره بر مهاجرت سلول‌های A2780 و بیان E- کادهرین در این سلول‌ها است.

مواد و روش‌ها

تهیه عصاره الکلی گیاه به‌لیمو: گیاه به‌لیمو پس از تایید هرباریوم دانشکده علوم زیستی دانشگاه خوارزمی، به آزمایشگاه سلولی دانشکده منتقل شد. پس از خشک کردن گیاه در محل تاریک و بدون رطوبت، برگ‌های به‌لیمو جدا و خرد گردید. ۲۰ گرم از پودر برگ گیاه با ۱۰۰ میلی‌لیتر اتانول (Merck, Germany) مخلوط شد و به‌منظور استخراج به‌مدت ۷۲ ساعت بر روی دستگاه شیکر (چرخاننده) قرار گرفت. سپس عصاره به‌دست آمده توسط کاغذ صافی فیلتر شد و جهت تغلیظ و عصاره گیری در دستگاه روتاری (Heidolph, Germany) قرار گرفت (۱۵).

کشت سلول: برای انجام این پژوهش تجربی آزمایشگاهی، سلول‌های A2780 از انستیتو پاستور تهران خریداری شد. سلول‌ها در محیط کشت RPMI 1640 (شرکت ایده زیست، ایران) حاوی ۱۰ درصد FBS و ۱ درصد آنتی بیوتیک (Gibco, USA) کشت داده شدند (۱۶).

بررسی اثر سمیت سلولی: برای بررسی سمیت سلولی غلظت‌های مختلف عصاره الکلی برگ به‌لیمو بر سلول‌های سرطانیA2780 و تعیین دوز میانه مهاری (Inhibitory Concentration: IC50)، از روش رنگ سنجی MTT (Sigma, USA) استفاده شد. برای این منظور سلول‌های A2780، به تعداد ۱۰۰۰۰ سلول در چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه کشت داده شدند و ۲۴ ساعت پس از کشت، توسط غلظت‌های مختلف عصاره الکلی برگ گیاه به‌لیمو (۴۰۰ ،۲۰۰، ۱۰۰،۵۰ ، ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) تیمار شدند. بنابراین یک گروه کنترل و پنج گروه تیماری برای این آزمون در نظر گرفته شد. پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت از تیمار، MTT با غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به سلول‌ها اضافه شد و سلول‌ها به‌مدت ۴ ساعت تحت تیمار با MTT انکوبه شدند. پس از ۴ ساعت جهت حل‌کردن کریستال‌های فورمازان (شاخص سلولهای زنده) به هر چاهک ۸۰ میکرولیتر DMSO (دی متیل سولفوکساید) اضافه شد. سپس جذب نوری در طول موج ۵۷۰ نانومتر با استفاده از دستگاه میکروپلیت اسپکتروفتومتر (BioTech, USA) اندازه‌گیری شد (۱۷). در نهایت درصد سلول‌های زنده از فرمول زیر محاسبه شد:

جذب نوری سلول‌های کنترل/جذب نوری سلول‌های تیمارشده= میزان بقای سلولی×۱۰۰

رنگ آمیزی اکریدین اورنج/پروپیدیوم ایوداید: رنگ‌آمیزی ایداید جهت تشخیص و تمایز سلول‌های زنده، آپوپتوزیس و نکروزیس به‌کار می‌رود. جهت انجام آزمون، ۲۴ ساعت پس از کشت، سلول‌های A2780 با غلظت‌های مختلف عصاره الکلی برگ به‌لیمو به‌مدت ۴۸ ساعت تیمار شدند. سپس سلول‌ها از کف پلیت جدا شده و با ۱۰ میکرولیتر اکریدین اورنج و ۱۰ میکرولیتر پروپودیوم ایداید با غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر(Sigma, USA)تیمار شدند و پس از پیپتاژ در زیر میکروسکوپ فلورسانس(Olympus, Japan) توسط فیلتر آبی آبژکتیو ۴۰ مورد بررسی قرار گرفتند (۱۸).

تست کاسپاز ۳: از این تست به‌منظور تعیین وابستگی آپوپتوزیس از مسیر کاسپاز استفاده می‌شود. برای انجام این تست، بعد از گذشت ۴۸ ساعت از تیمار، سلول‌های A2780 (گروه کنترل و تحت تیمار) تریپسینه شدند و پس از اتمام سانتریفیوژ، از کیت کاسپاز-۳ (abcam 39401, Canada) جهت ارزیابی فعالیت کاسپاز-۳ استفاده گردید. برای این منظور، به هر نمونه ۵۰ میکرولیتر بافر لیزکننده (حاوی HEPES، NaCl، EDTA، CHAPS، Sucrose، DTT، Triton X-10، Glycerol، Protease inhibitor cocktail) موجود در کیت اضافه شد و نمونه‌ها ۱۰ دقیقه روی یخ قرار گرفتند. پس از افزودن ۵۰ µl ازDDT (Dithiothreitol) و 2x buffer و ۵µl N-Acetyl-Asp-Glu-)DEVD-p-NA Val-Asp-p-Nitroanilide: سوبسترای کاسپاز ۳) به هر نمونه و انکوباسیون ۲ ساعته، بر طبق دستورالعمل کیت جذب هر نمونه در طول موج ۴۵۰ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر (Bio Tech, USA) اندازه‌گیری شد (۱۸).

تست مهاجرت: این آزمون برای ارزیابی اثر ضد متاستازی غلظتهای بازدارنده عصاره الکلی برگ به‌لیمو به‌کار گرفته شد. برای بررسی میزان مهاجرت سلول‌های سرطانی A2780 تحت تیمار با غلظت‌های بازدارنده تکثیر

عصاره الکلی برگ به‌لیمو (۲۰۰، ۱۰۰، ۵۰، ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر)، سلول‌ها در تراکم ۱۰۵ سلول در هر چاهک پلیت ۶ خانه کوت شده با ژلاتین کشت داده شدند. پس از تراکم ۸۰ درصدی سلول‌های سرطانی در کف پلیت، توسط نوک پیپت خراشی در کف تمام چاهک‌ها ایجاد شد و پس از آن سلول‌ها به‌مدت ۲۴ ساعت تحت تیمار قرار گرفتند. پس از گذشت این زمان، تحرک و مهاجرت سلول‌ها به‌صورت کیفی توسط عکس‌برداری و مقایسه میزان پر شدن خراش در گروه‌های کنترل و تیمار، در زیر میکروسکوپ معکوس (Olympus, Japan) مورد بررسی قرار گرفت (۱۹).

RT-PCR جهت ارزیابی بیان E- کادهرین: RT-PCR به‌منظور ارزیابی بیان mRNAی E-کادهرین در سلول‌های سرطانی A2780 مورد استفاده قرار گرفت. برای این منظور پس از گذشت ۲۴ ساعت از تیمار، RNA سلول‌ها توسط کیت پارس طوس (A101161, Pars tous biotechnology, Iran) از گروه کنترل و تیمار استخراج شد. در مرحله بعد توسط کیت سنتز cDNA (A101231, Pars tous biotechnology, Iran)، از روی RNA، cDNA سنتز شد و پس از افزودن پرایمرهای E-کادهرین، dNTP، بافر و Taq پلیمراز PCR انجام شد. B2M (Beta-2 microglobulin) نیز به‌عنوان ژن کنترل داخلی (housekeeper genes) به‌منظور نرمالیزاسیون مورد استفاده قرار گرفت (۱۹).

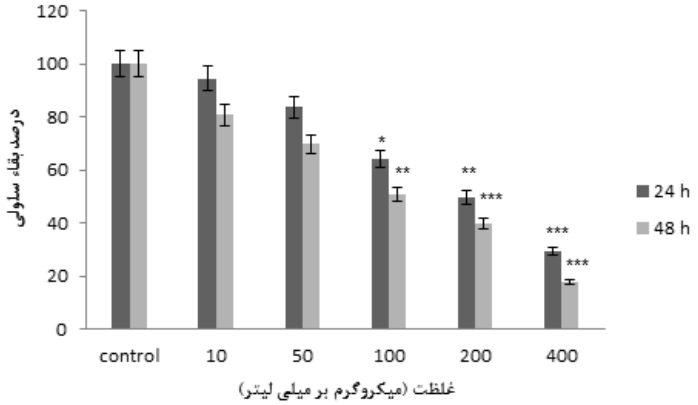
آنالیز آماری

داده‌های آماری در بخش ارزیابی سمیت سلولی و آزمون کاسپاز توسط نرم افزار SPSS شماره ۲۰، آزمون آماری one way ANOVA، تست Tukey در سطح معنی‌داری ($p\leq$۰/۰۵) تجزیه و تحلیل شدند.

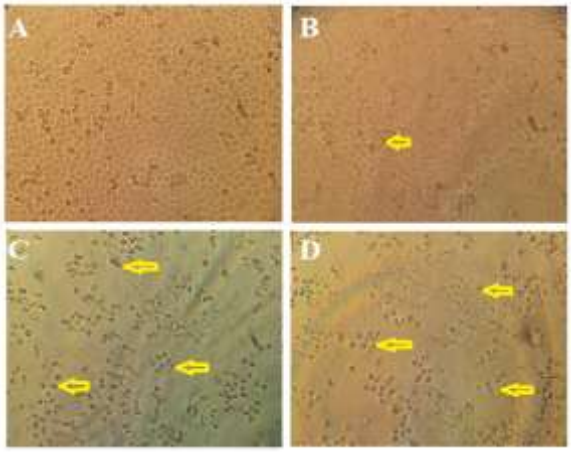
نتایج

اثر عصاره الکلی برگ به‌لیمو بر روی میزان بقای سلولی

یافته‌های آزمون MTT (شکل۱) و ارزیابی مورفولوژیک سلول‌ها توسط میکروسکوپ معکوس (شکل۲) نشان داد که درصد زنده بودن سلول‌های A2780 تحت تیمار با عصاره الکلی برگ به‌لیمو در غلظت‌های ۱۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در مدت زمان ۲۴ ساعت نسبت به گروه کنترل به‌ترتیب ۲۹/۵، ۴۹/۵، ۶۴/۳، ۸۳/۶، ۹۴/۵ درصد در ۴۸ ساعت ۱۷/۷، ۳۹/۹، ۵۰/۷، ۶۹/۸، ۸۰/۷ درصد مشاهده شد. تحلیل آماری نشان داد که عصاره مورد نظر در غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در ۲۴ ساعت با $p<$۰/۰۵*، در ۴۸ ساعت با $p<$۰/۰۱**، در غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در ۲۴ ساعت با $p<$۰/۰۱**، در ۴۸ ساعت با $p<$۰/۰۰۱***، در غلظت ۴۰۰ میکروگرم در بازه زمانی ۲۴ و ۴۸ ساعت با $p<0.001$*** موجب کاهش معنی‌دار بقای سلول‌های سرطانی در مقایسه با گروه کنترل شد. این نتایج نشان داد که اثر کشندگی سلولی عصاره الکلی برگ‌های به‌لیمو در ۲۴ ساعت و ۴۸ ساعت وابسته به دوز و زمان است.



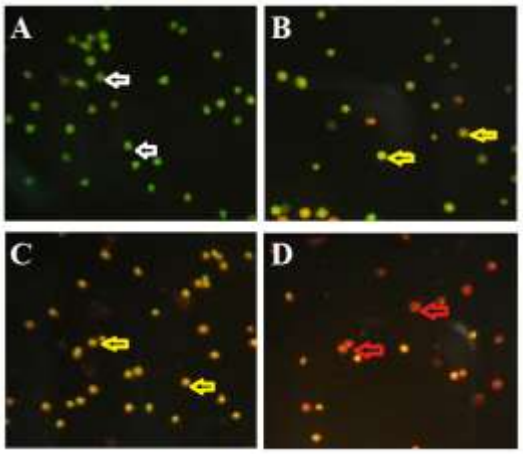
شکل۱: میزان درصد بقای سلول‌ها با استفاده از روش MTT پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت تیمار با عصاره الکلی برگ به‌لیمو. نمودار نشان می‌دهد که درصد بازدارندگی عصاره الکلی برگ‌های به‌لیمو روی سلول‌های سرطان تخمدان A2780 وابسته به دوز و زمان می‌باشد. آزمون آماری SPSS, one way ANOVA***p<0.001, (n=3, Mean ± SD). **p<0.01, *p<0.05



شکل ۲: مقایسه تاثیر غلظت‌های مختلف عصاره الکلی برگ به‌لیمو بر مورفولوژی سلول‌های سرطان تخمدان A2780 بعد از ۲۴ ساعت تیمار (بزرگنمایی: ۲۰۰x). پیکان‌های زرد نشان‌دهنده سلول‌های مرده هستند. A: کنترل، B: تیمار با غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر C: تیمار با غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و D: تیمار با غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر

آزمون اکریدین اورنج/ پروپیدیوم ایوداید

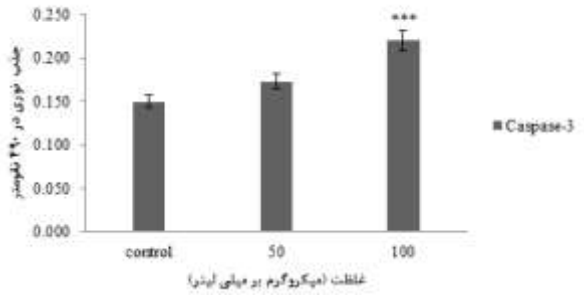
در این آزمون کیفی، سلول‌های زنده به رنگ سبز، سلول‌های آپوپتوزیسی به‌رنگ زرد و نارنجی و سلول‌های نکروزه به‌رنگ قرمز قابل شناسایی هستند. همان‌طور که در شکل ۳ مشاهده می‌شود سلول‌های A2780 گروه کنترل غالبا به‌رنگ سبز مشاهده می‌شوند (پیکان‌های سفید) که نشان‌دهنده زنده بودن سلول‌های سرطانی است. در گروه B , C سلول‌های تیمار شده با غلظت‌های بازدارنده تکثیر عصاره الکلی برگ به‌لیمو (غلظت ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) غالبا به‌رنگ سبز مایل به زرد و زرد مایل به نارنجی (پیکان‌های زرد) مشاهده می‌شوند که نشان‌دهنده اثر القاکننده آپوپتوزیس عصاره برگ به‌لیمو در این غلظت‌ها بر روی سلول‌های سرطان تخمدان است؛ درحالی‌که همان‌طورکه در شکل ۳ بخش D نشان داده شده است عصاره الکلی برگ به‌لیمو در غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، قادر به القای آپوپتوزیس در سلول‌های A2780 نیست و از طریق القای نکروزیس موجب از بین رفتن سلول‌های سرطان تخمدان می‌شود.



شکل۳: اثر پیش برنده آپوپتوزیس غلظت‌های مختلف عصاره الکلی برگ به‌لیمو توسط رنگ‌آمیزی اکریدین اورنج/پروپیدیوم ایوداید (بزرگنمایی: ۴۰۰x). پیکان‌های سفید نشان‌دهنده سلول‌های زنده، پیکان‌های زرد نشان‌دهنده سلول‌های آپوپتوزی و پیکان‌های قرمز نشان‌دهنده سلول‌های نکروزه هستند. A: کنترل، B: تیمار با غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر C: تیمار با غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و D: تیمار با غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر

آزمون کاسپاز ۳

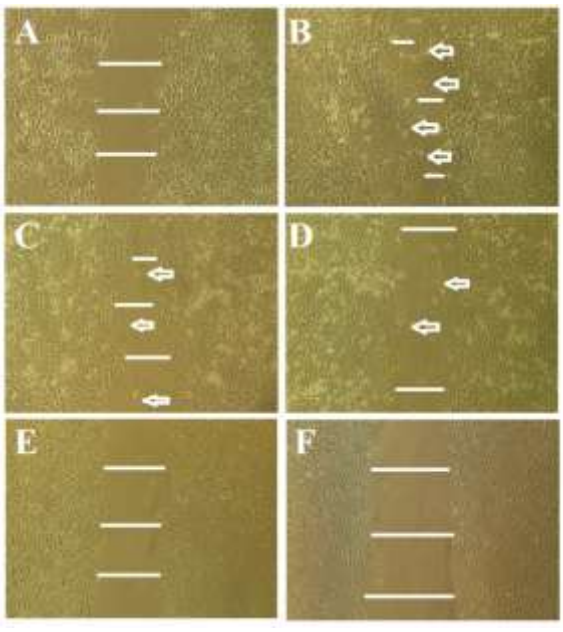
نتایج به‌دست آمده نشان داد تیمار با غلظت میانه مهاری عصاره الکلی برگ به‌لیمو (غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) موجب افزایش بیان کاسپاز ۳ در سلول‌های سرطان تخمدان A2780 می‌شود که موید القای آپوپتوزیس وابسته به کاسپاز در سلول‌های سرطان تخمدان تحت تیمار با غلظت موثره عصاره الکلی برگ به لیمو است (شکل ۴).



شکل ۴: مقایسه فعالیت کاسپاز ۳ گروه کنترل و گروه تحت تیمار با غلظت‌های بازدارنده تکثیر (القاکننده آپوپتوزیس) عصاره الکلی برگ به‌لیمو در سلول‌های سرطان تخمدان A2780. (Mean ± S.E*** p<0.001)

آزمون مهاجرت

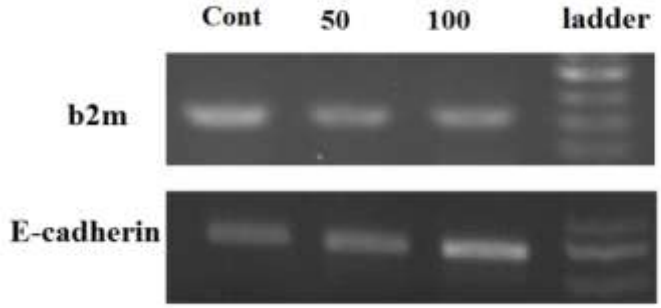
در این تست سلول‌های گروه کنترل (فاقد تیمار) توسط پر کردن ناحیه خراش مهاجرت و تهاجم سریع‌تری در مقایسه با سلول‌های سرطانی تحت تیمار با غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره در مدت زمان ۲۴ ساعت نشان دادند. سلول‌های سرطانی A2780 تحت تیمار با غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر با پر کردن منطقه خراش در مدت ۲۴ ساعت اثر کمی روی مهاجرت سلول‌های سرطانی نشان داد؛ درحالی‌که تصاویر به‌دست آمده نشان داد غلظت‌های ۲۰۰، ۱۰۰، ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره الکلی برگ به‌لیمو باعث کاهش تحرک سلول‌های سرطان تخمدان شد و با افزایش غلظت ماده تیماری میزان مهاجرت به‌طور چشم‌گیری کاهش یافت (شکل۵).



شکل۵: اثر غلظت‌های مختلف عصاره الکلی برگ به‌لیمو بر روی مهاجرت سلول‌های سرطان تخمدان A2780 . (بزرگنمایی: ۱۰۰x).A : سلول‌های A2780 در لحظه ایجاد خراش (ساعت صفر)، B: سلول‌های گروه کنترل پس از ۲۴ ساعت از ایجاد خراش بخش اعظم فضای خراش را پر کرده‌اند (پیکان‌ها سلولهای در حال مهاجرت را نشان می‌دهند) C: پس از ۲۴ ساعت، سلول‌ها در گروه تیمار با غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره الکلی برگ به‌لیمو، در حال پرکردن فضای ایجادشده توسط خراش هستند. D, E, F : پس از ۲۴ ساعت، تیمار با غلظت‌های ۲۰۰، ۱۰۰، ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره الکلی برگ به‌لیمو به‌ترتیب موجب مهار مهاجرت سلول‌های سرطان تخمدان در ناحیه خراش شده‌است.

ارزیابی بیان E-کادهرین

جهت بررسی اثر ضد تهاجمی غلظت‌های بازدارنده عصاره برگ‌های به‌لیمو، سطح بیان E-کادهرین در سلول‌های A2780 فاقد تیمار (کنترل) و تیمارشده با غلظت‌های بازدارنده تکثیر و القا کننده آپوپتوزیس توسط تکنیک RT-PCR مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که با افزایش غلظت تیماری عصاره الکلی برگ‌های به‌لیمو سطح بیان E-کادهرین در سلول‌های A2780 تحت تیمار افزایش یافت (شکل ۶).



شکل ۶: ارزیابی اثر غلظت میانه مهاری (غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و غلظت دارای اثر سمیت پایین (۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) عصاره الکلی برگ به‌لیمو بر بیان E-کادهرین در سلول‌های سرطان تخمدان A2780 توسط تکنیک RT-PCR . همان‌طور که مشاهده می‌کنید افزایش بیان E-کادهرین در سلول‌های A2780 تحت تاثیر غلظت میانه مهاری نشان‌دهنده پتانسیل ضدتهاجمی عصاره الکلی برگ به‌لیمو در غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در سلول‌های سرطان تخمدان است.

بحث

در دهه‌های اخیر افزایش بروز سرطان‌ها، مطالعات و تحقیقات بر روی سرطان و روش‌های نوین درمانی را با دقت مورد ارزیابی قرار داده است (۲۱، ۲۰). با وجود پیشرفت‌های قابل‌توجه در طب مدرن، داروهای به‌دست‌آمده از گیاهان و منابع طبیعی به‌پیشگیری و درمان بسیاری از بیماری‌ها از جمله سرطان کمک شایانی کرده‌اند (۲۲). حدود ۷۵ درصد داروهای ضد سرطان مورد تائید در جهان از گیاهان، عصاره‌های آن‌ها و سایر منابع طبیعی مشتق شده‌اند، این در حالی است که کمتر از ۱۰ درصد گیاهان به‌منظور شناسایی ترکیبات ضد سرطان مورد بررسی قرار گرفته‌اند (۱۱). هدف از انجام این تحقیق آن بود که اثر سیتوتوکسیک و ضد تهاجمی عصاره الکلی برگ به‌لیمو (*Lippia citriodora*) به‌عنوان یکی از گیاهان بومی ایران روی سلول‌های سرطان تخمدان مقاوم به داروی سیس پلاتین بررسی شود. جنس Lippia (شاه پسندیان) شامل حدود ۲۰۰ گونه از گیاهان، بوته‌ها و درختان کوچک است. بیشتر آن‌ها به‌طور سنتی در درمان بیماری‌های تنفسی و دستگاه گوارش به‌کار گرفته شده‌اند (۲۳). مطالعات نشان داده‌اند که بعضی از گونه‌های Lippia دارای خصوصیات ضد مالاریا، ضد ویروسی و فعالیت‌های سایتوتوکسیک هستند (۲۴).

پژوهشگران با استفاده از روش GC-MS حضور ۱۶ تا ۲۰ ترکیب فعال زیستی را درعصاره گیاه به‌لیمو نشان دادندکه بیشترین ترکیبات آن را Geranial (۳۶/۸ درصد)، Neral (۲۸/۳ درصد) و Limonene (۷/۲۷ درصد) به‌خود اختصاص می‌دهد (۲۵). در سال ۲۰۱۲ نشان داده شد که عصاره Aloysia citriodora دارای خواص آنتی اکسیدانتی است که می‌تواند نقش مهمی در تنظیم فعالیت GSH ردوکتاز در لنفوسیت‌ها و گلبول‌های قرمز ایفا کند و از پلاسما در برابر آسیب‌های اکسیداتیو محافظت نماید (۲۶).

در این پژوهش نتایج حاصل از سنجش MTT نشان داد که عصاره الکلی برگ به‌لیمو تکثیر سلولی را در یک الگوی وابسته به دوز در سلول‌هایA2780 مهارمی‌کند. نتایج حاصل از سنجش درصد بقای سلولی نشان داد که غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره الکلی برگ به‌لیمو پس از گذشت ۲۴ ساعت از تیمار، موجب القای

پنجاه درصد مرگ سلولی در این سلول‌ها شد. تصاویر رنگ‌آمیزی اکریدین اورنج/ پروپیدیوم ایوداید ثابت کرد عصاره برگ به‌لیمو در غلظت میانه مهاری القا کننده مرگ سلولی آپوپتوزیس در رده‌ی سلولی A2780 سرطان تخمدان است. ارزیابی میزان فعالیت کاسپاز ۳ در سلول‌های گروه کنترل و تیمار شده با غلظت میانه مهاری عصاره برگ گیاه به‌لیمو نیز مبین این مطلب است که عصاره برگ به‌لیمو از طریق مسیر وابسته به کاسپاز قادر به القای آپوپتوزیس در سلول‌های سرطانی A2780 است.

سلول‌های سرطانی با تنش‌های محیطی، از جمله فقدان اکسیژن و یا مواد مغذی، pH پایین، گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) و واسطه‌های پاسخ التهابی همراه است. چنین فشارهایی می‌تواند سلول‌های توموری دارای قابلیت رشد بالا را انتخاب کند و سبب کسب یک فنوتیپ تهاجمی شود. به‌عنوان مثال، هیپوکسی، فاکتور قابل القای هیپوکسی (HIF) را تثبیت می‌کند که منجر به تغییرات در متابولیسم بی هوازی، رگ زایی، تهاجم، و بقا می‌شود (۲۷). E.-کادهرین یک گلیکوپروتئین درگیر در چسبندگی سلول-سلول است. ازدست رفتن عملکرد E - کادهرین برای تبدیل اپی‌تلیال به مزانشیم ضروری است اماکافی نیست؛ دراین تبدیل، ازآن‌جایی‌که سلول اپیتلیال قادربه تبدیل به سلول‌های اجدادی فنوتیپی مزانشیمی است تهاجم ومتاستاز تومور به‌خوبی رخ می‌دهد و در این راستا ماتریکس خارج سلولی به‌عنوان یک داربست عمل می‌کند (۹).

Melo Jo و همکارانش (۲۸) اثرات سمیت سلولی عصاره‌ی گیاه *Aloysia gracilis* را برروی رده‌های سلولی سرطان دهانه رحم HeLa، ملانوما B-16 و سرطان پستان MCF-7 با تستMTT مورد بررسی قرار دادند. درمطالعه آن‌ها مهم‌ترین ترکیبات فیتوشیمیایی این گیاه تیمول (۴۰ درصد) شناخته شد و مشخص شد که این ترکیب اصلی‌ترین عامل از بین برنده سلول‌های سرطانی است.

Ferraz و همکارانش (۲۹)،اثرات سمیت سلولی عصاره گیاه *Lippia gracilis* را بر روی رده سلولی کبدی Hep-G2 موردمطالعه قرار دادند. نتایج پژوهش آن‌ها نشان داد که عصاره‌ی این گیاه دارای اثر توکسیک بر رده سرطانی Hep-G2 است. مطالعه آن‌ها نشان داد که این عصاره باعث تغییرشکل ظاهری درسلول‌های سرطانی می‌شود و آپوپتوزیس را از مسیرکاسپاز ۳ فعال می‌کند که هم راستا با نتایج به‌دست آمده در این پژوهش نشان‌دهنده اثر عصاره الکلی برگ به‌لیمو بر القای آپوپتوزیس از طریق مسیر وابسته به کاسپاز بر سلول‌های سرطانی A2780 است.

در پژوهش دیگری توسط Mesa-Arango و همکارانش (۳۰)، جهت بررسی اثرات سمیت سلولی عصاره گونه‌ای دیگر از خانواده شاه‌پسند به‌نام Lippia alba بر رده سلولی سرطانی دهانه رحم HeLa، نتایج نشان داد که عصاره این گیاه به‌صورت وابسته به دوز توانایی القای سمیت بالایی بر روی سلول‌های سرطانی دهانه رحم دارد. Mirzaei و همکارانش (۱۵) در تحقیقات خود بر روی سلول‌های کولون رده‌ی HT-29 نشان دادند که عصاره‌ی الکلی گیاه *Aloysia citrodora* با افزایش بیان ژن پرواپوپتوتیک Bax و کاهش بیان ژن ضد آپوپتوزیسی Bcl-2 قادر به‌القای آپوپتوزیس بر سلول‌های سرطان کولون است که هم راستا با نتایج به‌دست آمده در این پژوهش مبین اثر پروآپوپتوزی و ضدسرطانی عصاره برگ به‌لیمو گونه *Lippia citriodora* بر سلول‌های سرطانی تخمدان A2780 است.

داده‌های حاصل از تست مهاجرت با استفاده از ژلاتین به‌عنوان ماتریکس و بستری برای مهاجرت سلول‌ها در این پژوهش نشان داد که عصاره الکلی برگ به‌لیمو در غلظت میانه مهاری باعث مهار مهاجرت سلول‌های سرطانی A2780 روی ماتریکس شده و از این رو دارای اثر آنتی متاستاتیک است. یافته‌های حاصل از ارزیابی بیان E-کادهرین نیز نشان داد که عصاره الکلی برگ به‌لیمو Lippia citriodora با افزایش بیان E-کادهرین قادر به مهار عود سلول‌های سرطانی A2780 و مهار تهاجم این سلول‌ها است. در مورد نقش ضد تهاجمی E-کادهرین و نقش مواد فعال زیستی در این رابطه مطالعات نشان دادهاند که فروارده‌های طبیعی مثل سیلیبینین به‌عنوان یک فلاونوئید از طریق افزایش بیان E-کادهرین

در سلول‌های سرطانی پروستات PCA (Prostate Cancer Antigen 3) توانسته است پتانسیل تحرک و تهاجم سلول‌های سرطانی پروستات را مهار نماید (۳۱). این پژوهش نیز در راستای پژوهش حاضر از نقش موثر فروارده‌های طبیعی در پیشگیری از حالت متاستاتیک سرطان حمایت می‌کند.

نتیجه گیری

در پایان می‌توان با توجه به نتایج حاصل از این پژوهش چنین نتیجه گرفت که عصاره الکلی برگ به‌لیمو دارای خواص ضد سرطانی است و در غلظت‌های مناسب می‌تواند موجب کاهش تکثیر، القای آپوپتوزیس از طریق مسیر وابسته به کاسپاز و مهار متاستاز از طریق افزایش بیان E-کادهرین در سلول‌های سرطانی A2780 شود. با توجه به اثرات سیتوتوکسیک و ضدتهاجمی عصاره برگ به‌لیمو پیشنهاد می‌شود که اثر ضد سرطان مواد موثره موجود در این عصاره در مدل‌های حیوانی نیز مورد ارزیابی قرار گیرد تا فواید بالقوه آن در حالت‌های متاستاتیک در شرایط *in vivo* و بالینی نیز تائید شود.

تشکر و قدردانی

از همکاران گرامی در دانشکده علوم زیستی دانشگاه خوارزمی و پژوهشکده بیولوژی کاربردی که در اجرای پژوهش همکاری داشتند، سپاسگزاریم.

منابع

1. Choi Y, Park J, Han JW, Kim E, et al. Differential cytotoxic potential of silver nanoparticles in human ovarian cancer cells and ovarian cancer stem cells. Int J Mol Sci. 2016; 17 (2077): 1-17.

2. Nakayama K, Nakayama N, Katagiri H, Miyazaki K. Mechanisms of ovarian cancer metastasis: biochemical pathways. Int J Mol Sci. 2012; 13(9): 11705-11717.

leaf extracts of Aloysia Citriodora (Lemon verbena) on Streptococcus mutans and Streptococcus sobrinus. Electron Physician. 2016; 8(12): 3363-3368.

3. Chen WL, Ren Y, Ren J, Erxleben C, et al. Strebloside-Induced Cytotoxicity in Ovarian Cancer Cells Is Mediated through Cardiac Glycoside Signaling Networks. J Nat Prod. 2017; 80(3): 659-669.

4. Lengyel E. Ovarian cancer development and metastasis. Am J Pathol. 2010; 177(3): 1053-1064.

5. Fang D, Chen H, Zhu JY, Wang A, et al. Epithelial-mesenchymal transition of ovarian cancer cells is sustained by Rac1 through simultaneous activation of MEK1/2 and Src signaling pathways. Oncogene. 2017; 36(11): 1546-1558.

6. Deng J, Wang L, Chen H, Hao J, et al. Targeting epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cells for chemoresistant ovarian cancer. Oncotarget. 2016; 7(34): 55771-55788.

7. Telleria CM. Repopulation of ovarian cancer cells after chemotherapy. Cancer Growth Metastasis. 2013; 6(1): 15-21.

8. Bristow RG, Hill RP. Hypoxia and metabolism: hypoxia, DNA repair and genetic instability. Nat Rev Cancer. 2008; 8 (3): 180-192.

9. Gheldof A, Berx G. Cadherins and epithelial-to-mesenchymal transition. Prog Mol Biol Transl Sci. 2013; 116: 317-336.

10. Rajesh E, Sankari LS, Malathi L, Krupaa JR. Naturally occurring products in cancer therapy. J Pharm Bioallied Sci. 2015; 7(Suppl 1): 181-183.

11. Jamalzadeh L, Ghafoori H, Sariri R. Evaluation of anti-proliferative activity of a semi-synthetic derivative of artemisinin-artesunate in MCF-7 human breast cancer cell line. Journal of Cell & Tissue (JCT) 2016; 7(1): 45-57.

12. Lasagni Vitar RM, Reides CG, Ferreira SM, Llesuy SF. The protective effect of Aloysia triphylla aqueous extracts against brain lipid-peroxidation. Food Funct. 2014; 5(3): 557-563.

13. Shafiee F, Moghadamnia A, Shahandeh Z, Sadighian F, et al. Evaluation of the antibacterial effects of aqueous and ethanolic

14. Funes L, Carrera-Quintanar L, Cerdán-Calero M, Ferrer MD, et al. Effect of lemon verbena supplementation on muscular damage markers, proinflammatory cytokines release and neutrophils' oxidative stress in chronic exercise. Eur J Appl Physiol. 2011; 111(4): 695-705.

15. Mirzaie A, Shandiz S, Ataollah S, Noorbazargan H, et al. Evaluation of chemical composition, antioxidant, antibacterial, cytotoxic and apoptotic effects of Aloysia citrodora extract on colon cancer cell line. Tehran University Medical Journal (TUMJ) 2016; 74(3): 168-176.

16. Amini E, Baharara J, Nikdel N, Salek Abdollahi F. cytotoxic and pro-apoptotic effects of honey bee venom and chrysin on human ovarian cancer cells. Asia Pacific Journal of Medical Toxicology (APJMT) 2015; 4(2): 68-73.

17. Sayyad Delshadpour F, Salehzadeh A, Sadat Shandiz SA. Cytotoxicity effect and changes in the expression of caspase-9 gene in breast cancer cell line (MCF-7) treated with the extract of Oscillatoria cyanobacteria. Qom Univ Med Sci J. 2018; 12(1): 26-34

18. Najmuddin S, Romli M, Hamid M, Alitheen N, et al. Anti-cancer effect of Annona muricata Linn leaves crude Extract (AMCE) on breast cancer cell line. BMC Complement Altern Med. 2016; 16(1): 311-317.

19. Lee KS, Shin JS, Nam KS. Cancer chemopreventive effects of starfish polysaccharide in human breast cancer cells. Biotech Bioprocess Eng. 2011; 16(5): 987-991.

20. Biemar F, Foti M. Global progress against cancer-challenges and opportunities. Cancer Biol Med. 2013; 10(4): 183-186.

21. Zugazagoitia J, Guedes C, Ponce S, Ferrer I, et al. Current challenges in cancer treatment. Clin Ther. 2016; 38(7): 1551-1566.

22. Shokri A, Baharara J, Amini E. Evaluation of the antioxidant effect of crocin on neonate Balb/C mouse spermatogonial stem cells. Journal of Cell & Tissue (JCT) 2017; 7(3): 219-229.

23. Portmann E, Nigro MM, Reides CG, Llesuy S, et al. Aqueous extracts of Lippia turbinata and Aloysia citriodora (Verbenaceae): assessment of antioxidant capacity and DNA damage. Int J Toxicol. 2012; 31(2): 192-202.

24. Santos N, Pascon R, Vallim M, Figueiredo C, et al. Cytotoxic and antimicrobial constituents from the essential oil of Lippia alba (Verbenaceae). Medicines 2016; 3(3): 22; 1-9.

25. Shahhoseini H, Ghorbani H, Saleh R. Omidbaigi R, Identification of essential oil content and composition of Lippia citriodora seed. J Plant Prod. 2012; 18(4): 91-96.

26. Carrera- Quintanar L, Funes L, Viudes E, Tur J, et al. Antioxidant effect of lemon verbena extracts in lymphocytes of university students performing aerobic training program. Scand J Med Sci Sports. 2012; 22(4): 454-461.

27. Sullivan LB, Chandel NS. Mitochondrial reactive oxygen species and cancer. Cancer Metab. 2014; 2(17): 1-12.

28. Melo JO, Fachin AL, Rizo WF, Jesus HC, et al. Cytotoxic effects of essential oils from three Lippia gracilis Schauer genotypes on HeLa, B16, and MCF-7 cells and normal human fibroblasts. Genet Mol Res 2014; 13(2): 2691-2697.

29. Ferraz RP, Bomfim DS, Carvalho NC, Soares MB, et al. Cytotoxic effect of leaf essential oil of Lippia gracilis Schauer (Verbenaceae). Phytomedicine. 2013; 20(7): 615-621.

30. Mesa-Arango AC, Montiel-Ramos J, Zapata B, Durán C, et al. Citral and carvone chemotypes from the essential oils of Colombian Lippia alba (Mill.) NE Brown: composition, cytotoxicity and antifungal activity. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009; 104(6): 878-884.

31. Deep G, Gangar S, Agarwal C, Agarwal R. Role of E-cadherin in Anti migratory and anti invasive efficacy of silibinin in prostate cancer cells. Cancer Prev Res. 2011; 4(8): 1222-1233.

Journal of Cell & Tissue (JCT) *Original Article*
Spring 2019; 10(1)

Investigating the anticancer effect of Lippia citriodora leaf alcoholic extract: in suppression of A2780 ovarian cancer cell metastasis via restoration of E-cadherin expression

Amini E, Ph.D.,[1*], Nabiuni M, Ph.D.[2], Baharara J, Ph.D.[1], Behzad SB, M.Sc.[2], Seyfi D, M.Sc.[2], Salek F, M.Sc.[2]

1. Department of Biology, Faculty of Sciences, Mashhad Islamic Azad University, Mashhad, Iran
2. Department of Cellular & Molecular Biology, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran

* Email corresponding author:elaheh.amini@khu.ac.ir

Received:1 Jan.2018 Accepted: 27 May.2018

Abstract

Aim: The purpose of this study is to investigate the pro-apoptotic and anti-metastatic potentials of *Lippia citriodora* alcoholic leaf extract on A2780 ovarian cancer cells and to evaluate the expression of E-cadherin as one of the most important marker in metastasis.

Material and Methods: A2780 ovarian cancer cell line was prepared from Pasteur cell bank and cultured in RPMI1640 medium containing 10% FBS and 1% antibiotic. After cell seeding and treatment with different concentrations of extract (10-400 µg/ml), the cells viability and pro-apoptotic potential were examined by MTT assay and acridine orange/ propodium iodide, respectively. Caspase-3 assay and anti-invasive effect were analyzed by migration assay and assessment of E-cadherin expression, respectively. Then, one way ANOVA test was employed for analysis of quantitative data.

Results: Data indicated that *L. citriodora* alcoholic extract attenuated ovarian cancer cell viability. Acridine orange/ propodium iodide and caspase-3 assays showed that this extract in IC50 concentration (100 µg/ml) induced apoptosis mainly through caspase dependent pathway in the ovarian cancer cells. Migration assay and RT-PCR exhibited that this extract has anti-invasive capability and by up- regulation of E-cadherin prevents the loss of attachment between cancer cells.

Conclusion: The results revealed that *L. citriodora* alcoholic extract has apoptosis inducing capacity and ability of restoration E-cadherin expression in A2780 cancer cells, which it able to suppress invasive potential of ovarian cancer cells.

Keywords: *Lippia citriodora*, metastasis, epithelial mesenchymal transition, E- cadherin, ovarian cancer