

بررسی اثر سیتوتوکسیسیته عصاره تام آبی و الکی موسیر (*Allium ascalonicum*) بر رده سلولی 4T1 سرطان پستان موش و سلول‌های سرطان القا شده توسط DMBA در موش صحرایی و مقایسه آن با داروهای شیمی درمانی تاکسول و کربوپلاتین

احمد همتا ^{Ph.D.*}، سید محمد علی شریعت زاده ^{Ph.D.}، دکتر ملک سلیمانی ^{Ph.D.}، مریم تجلی اردکانی ^{MSc.}

-دانشگاه اراک دانشکده علوم پایه گروه زیست شناسی کدپستی ۳۸۱۵۶-۸-۸۳۴۹

* پست الکترونیک نویسنده مسئول: a-hamta@araku.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۲/۲۸

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۶/۲۶

چکیده

هدف: مطالعه حاضر با هدف بررسی اثر عصاره آبی و الکی موسیر بر سلول‌های سرطان پستان و مقایسه آن با داروهای کربوپلاتین و تاکسول انجام شده است.

مواد و روش‌ها: ابتدا عصاره آبی و الکی موسیر و غلظت‌های متفاوت داروهای تاکسول و کربوپلاتین تهیه شد. سپس با استفاده از روش‌های تریپان بلو و MTT، سیتوتوکسیسیته آن‌ها در غلظت و زمان‌های مختلف بر روی سلول‌های سرطان پستان بررسی گردید و توسط رنگ‌آمیزی فلورسانت هوخست و پروپیدیوم دیدید تغییرات مورفولوژیک و آپوپتوزیس در سلول‌ها بررسی شد. داده‌ها با روش آماری آنالیز واریانس یک طرفه تجزیه و تحلیل و تفاوت میانگین‌ها در سطح $P < 0.05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج: عصاره موسیر در دامنه غلظتی (۰/۱ تا ۰/۵ گرم بر لیتر) اثر مهارکنندگی بر روی سلول‌های سرطانی داشت و تاثیر عصاره الکی بیشتر از عصاره آبی بود. همچنین تاثیر همزمان عصاره با کربوپلاتین، باعث افزایش سیتوتوکسیسیته کربوپلاتین شده در حالی که ترکیب عصاره آبی و تاکسول، باعث کاهش سیتوتوکسیسیته تاکسول شده است.

نتیجه‌گیری: این مطالعه نشان داد که عصاره آبی و الکی موسیر دارای اثر سیتوتوکسیسیته بر روی سلول‌های سرطان پستان موش صحرایی می‌باشد و ترکیب عصاره آبی و الکی با کربوپلاتین و همچنین ترکیب عصاره الکی با تاکسول باعث افزایش سیتوتوکسیسیته این داروها می‌شود. بدین ترتیب این گیاه می‌تواند به‌عنوان یک گیاه دارویی بر علیه سرطان پستان موضوع تحقیقات بیشتر قرار گیرد.

واژگان کلیدی: سیتوتوکسیسیته، عصاره موسیر، سرطان پستان، DMBA، تاکسول، کربوپلاتین

مقدمه

سرطان همواره یکی از مشکلات عمده جوامع انسانی محسوب می‌شود. از بین سرطان‌ها، سرطان پستان شایع‌ترین سرطان در میان زنان می‌باشد (۲ و ۱) و اغلب موارد سرطان‌های پستان منجر به مرگ، از نوع کارسینومای مجرای مهاجم است (۳). عوامل متعددی فرد را در معرض ابتلا به سرطان قرار می‌دهد که از بین آن‌ها می‌توان به تغییرات ژنتیکی، رژیم غذایی، شیردهی و فاکتورهای محیطی اشاره نمود. بالا بودن آمار مبتلایان به این نوع سرطان در کشورمان ضرورت انجام تحقیقات بیشتر برای پی بردن به مکانیسم‌های ایجاد سرطان و ابداع روش‌های درمانی موثرتر را آشکار می‌سازد. سرطان پستان را می‌توان در رت‌ها توسط انواع مختلفی از عوامل نظیر هورمون‌ها، پرتوهای یونیزان و مواد کارسینوژن ایجاد نمود اما یکی از پرکاربردترین روش‌های القا سرطان پستان در رت استفاده از نوعی ماده شیمیایی به نام ۷ و ۱۲ دی متیل بنزانتراسن می‌باشد که یک هیدروکربن آروماتیک چندحلقه‌ای است که به‌وفور در دود تنباکو یافت می‌شود (۴). از طرفی پس از سال‌ها پیشرفت در زمینه بهداشت هنوز انواع سرطان و از جمله سرطان پستان از مشکلات اساسی در اغلب کشورهاست (۵).

در این میان مصرف گسترده داروهای رایج ضدسرطان از قبیل تاکسان و آنتراسیکلین‌ها موجب ایجاد مقاومت‌های درمانی نیز می‌شود به طوری که سایر گزینه‌های درمانی را نیز محدود می‌کنند (۶).

مطالعات نشان می‌دهد که غذاها به‌خصوص غذاهای با منشأ گیاهی، پتانسیل پیشگیری از حدود یک سوم سرطان‌ها را دارند (۷). انسان در طی سالیان متمادی به اثرات مختلف درمانی عصاره‌های گیاهی پی برده است. از مزیت‌های شناخته شده این عصاره‌ها عدم وجود عوارض جانبی خطرناک و گستردگی طیف اثر آن‌ها می‌باشد. از جمله این گیاهان می‌توان به اعضای گونه Allium (سیر و پیاز و موسیر) اشاره نمود (۸).

گیاه موسیر که گونه مهمی از جنس آلیوم (Allium) محسوب می‌گردد از دیرباز در بسیاری از کشورها از جمله ایران مصارف درمانی سنتی یا غذایی داشته است. این گیاه دارای خواص شناخته شده‌ای مثل اثر بر روی شاخص‌های هماتولوژیکی، پتانسیل آنتی‌اکسیدانته، خواص ضد قارچ و ضد باکتریایی بوده که مورد مطالعه قرار گرفته است (۹-۱۲). علاوه بر این، ترکیب شیمیایی آن نشان می‌دهد که دارای ترکیبات زیادی مثل

ازگانوسولفورها و پلی‌فنل‌ها بوده که بسیار مشابه ترکیبات موجود در گونه‌های هم خانواده آن می‌باشد (۱۳-۱۵). مطالعات قبلی در رابطه با اثرات ضد تکثیری و سایتوتوکسیک عصاره آبی و الکلی موسیر بر روی رده‌های سلولی سرطانی MCF-7, Hela و L-929 انجام شده است. نتایج آنها نشان می‌دهد عصاره آبی و الکلی موسیر اثرات سایتوتوکسیک مختلفی را اعمال می‌کند و IC50 عصاره برای هر رده سلولی متفاوت است (۱۶). در مطالعه حاضر اثر سایتوتوکسیسیته عصاره آبی و الکلی موسیر بر روی رده سلولی 4T1 مورد مطالعه و بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

ابتدا رده سلولی 4T1 سرطان پستان موش از انستیتو پاستور ایران خریداری شد و برای تهیه سلول‌های القایی، پس از پایان دوره تیمار رت با DMBA -7-12 (Dimethylbenz(a)anthracene) و رسیدن تومور به اندازه‌ی لازم، حیوان با رعایت اصول اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی توسط دی‌اتیل‌تر بی‌هوش شد. سپس موهای ناحیه اطراف تومور با تیغ تراشیده شده و محل تشریح با استفاده از الکل ۷۰ درصد و ساوین رقیق شده استریل شد. پس از شکافتن قسمت مورد نظر تومور به‌طور کامل خارج و به زیر هود لامینار منتقل شد. از قسمت‌های داخلی‌تر تومور قطعاتی بریده شد و به فالكون‌های حاوی ۱۰ میلی‌لیتر (Salt Soution HBSS Hank's Balanced) استریل انتقال داده شد.

سپس نمونه‌ها از HBSS خارج شده و در پتری استریل قرار داده شد و به آن محیط کشت تازه افزوده شد. پس از جدا کردن خون و بافت اضافه، باقیمانده تومور با اسکالپل به ذرات بسیار ریز خرد شد (chopping) و سوسپانسیون حاصله چندین بار از سوزن سرنگ ۵ میلی‌لیتر عبور داده شد تا سلول‌ها به‌خوبی از بافت جدا شوند، سپس مخلوط به‌دست آمده به فالكون ۱۵ میلی‌لیتر منتقل شده و با دور ۲۰۰۰rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد، پس از آن محلول رویی دورریخته شد. به‌رسوب ته فالكون ۵

میلی‌لیتر محیط کشت (DMEM) Dulbecco's Modification of Eagles Medium کامل حاوی ۱۰ درصد FBS (Fetal bovine serum) اضافه گشت. پس از پیپتاژ کردن، ۱/۵ تا ۲ میلی‌لیتر از مخلوط همگن شده به فلاسک‌های T25 منتقل شده و حجم محیط داخل فلاسک به ۵ میلی‌لیتر رسانده شد. سپس فلاسک داخل انکوباتور CO₂ دار قرار داده

شد. پس از گذشت ۲۴ ساعت محیط رویی فلاسک تخلیه و ۵ میلی لیتر محیط کشت تازه به فلاسک افزوده گشت.

بعد از تهیه موسیر و خشک شدن، آن را پودر نموده و سه مرتبه با اتانول ۹۵ درصد (به نسبت ۱ به ۵) برای مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق عصاره گیری می شود. سپس فیلتر شده و پس از آن حلال جدا و عصاره تغلیظ گشت (۱۷). برای تهیه عصاره آبی موسیر، حدود ۱۰۰ گرم از پیازچه های سالم گیاه موسیر انتخاب و پوسته خارجی آن ها جدا شد. سپس پیازچه در یک دستگاه آسیاب برقی به صورت ماده نرم درآمده و پس از له شدن کامل بافت موسیر، به نسبت ۱ به ۱ آب دیونیزه استریل مخلوط و با همزن به آرامی همزده شد. پس از عصاره گیری کامل عصاره جهت صاف شدن تحت شرایط ۱۴۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شده و مایع رویی جدا شد و با استفاده از دستگاه فریز درایر به صورت پودر خشک درآمده و در فریزر نگهداری شد و برای هر بار استفاده، مقدار مورد نیاز از آن وزن و در محیط کشت حل گردید (۱۸). برای سنجش قدرت زیستی سلول های تیمار شده با تاکسول، کربوپلاتین، عصاره آبی و الکی موسیر، ابتدا سلول ها با تریپسین جدا و پس از سانتریفوژ، رسوب سلولی با محیط کشت تازه به حجم یک میلی لیتر رسید و سپس مقدار ۳۰۰ میکرو لیتر از سوسپانسیون سلولی حاصل با حجم مساوی از تریپان بلو مخلوط و به مدت ۲ دقیقه در انکوباتور قرار داده شد. تعداد سلول های زنده و مرده با لام هموسایتومتر بررسی و به صورت درصد بیان شد. در این روش، سلول های مرده به علت نفوذ پذیری به تریپان بلو، به رنگ آبی دیده شد. علاوه بر روش تریپان بلو برای بررسی قدرت زیستی سلول های تیمار شده از روش $dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl -[4,5-(3)$ از روش MTT assay (tetrazolium bromide) نیز استفاده شد. در این روش آنزیم سوکسینات دهیدروژناز در میتوکندری توانایی احیای رنگ زرد دی متیل تیازول را به بلورهای ارغوانی و نامحلول فورمازان دارد. سلول های سرطانی به مدت ۲۴ ساعت در پلیت ۹۶ خانه کشت و پس از چسبیدن این سلول ها به کف پلیت ۹۶ خانه با غلظت های مذکور از تاکسول، کربوپلاتین، عصاره آبی و الکی موسیر تیمار و پس از زمان های ۴۸ و ۷۲ ساعت ۱۰ میکرو لیتر MTT به ازای ۱۰۰ میکرو لیتر از محیط کشت به چاهک ها اضافه و به مدت ۴ ساعت انکوبه شد سپس بلورهای فورمازان حاصل در DMSO حل و جذب آن توسط (enzyme-linked immunosorbent) ELISA reader (Model Bio-Rad 680) در طول موج ۵۰۵ نانومتر اندازه گیری

شد. سلول های چسبیده به پلیت ۲۴ خانه با دوز ۰/۱ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر به ترتیب تاکسول و کربوپلاتین و ۰/۰۴ و ۰/۰۳ گرم بر لیتر برای عصاره آبی و الکی به مدت ۴۸ ساعت تیمار شد (با توجه به نتایج آماری آزمون های تریپان بلو و MTT در مرحله دوزیابی و مدت زمان ۴۸ ساعت برای بررسی های مورفولوژی انتخاب شد). رنگ آمیزی کروماتین با هوخست برای مطالعه مورفولوژی هسته و پروپیدیوم آیوداید همراه با هوخست برای تمایز بین سلول مرده و زنده توسط میکروسکوپ فلورسنس انجام گردید. (Olympus, Japan)

بررسی آپوپتوزیس و تغییرات مورفولوژیک سلول: در این مطالعه تغییرات آپوپتوزیس و مورفولوژیک سلول ها با استفاده از رنگ آمیزی فلورسانت هوخست و پروپیدیوم یدید بررسی شد. جهت بررسی وقوع مرگ سلولی و تشخیص آنکه مرگ سلولی از نوع آپوپتوزیس می باشد، از میکروسکوپ فلورسنس و رنگ آمیزی هوخست ۳۳۲۸۵ استفاده شد. در این رنگ آمیزی سلول های طبیعی به صورت رنگ آبی یکنواخت دیده می شوند، در صورتی که هسته سلول های دستخوش آپوپتوزیس به واسطه متراکم شدن کروماتین و قطعه قطعه شدن هسته، به طور غیر منظم و به صورت نقاط آبی درخشان قابل مشاهده خواهد بود. رنگ آمیزی با پروپیدیوم یدید نیز تخریب غشا و چروکیدگی سیتوپلاسم را نشان خواهد داد.

آنالیز آماری: با استفاده از نرم افزار آماری SPSS آنالیز واریانس یک طرفه، آزمون Tukey بر روی داده ها انجام شد و $P < 0/05$ معنی دار تلقی گردید.

نتایج

در این پژوهش به منظور یافتن غلظتی از عصاره و دارو که بتواند زیستایی سلول ها را تا ۵۰ درصد کاهش دهد، دوره تیمار ۴۸ و ۷۲ ساعته و محدوده های دوز از عصاره ها و داروها با توجه به مطالعات مشابه انتخاب شد (جدول ۱). بعد از انجام آزمایش ها، داده های به دست آمده از این آزمون ها نشان داد که عصاره آبی و الکی موسیر، تاکسول و کربوپلاتین موجب کاهش چشم گیر توانایی زیستی سلول های سرطانی شدند.

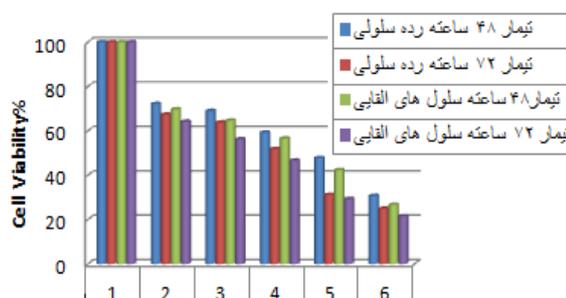
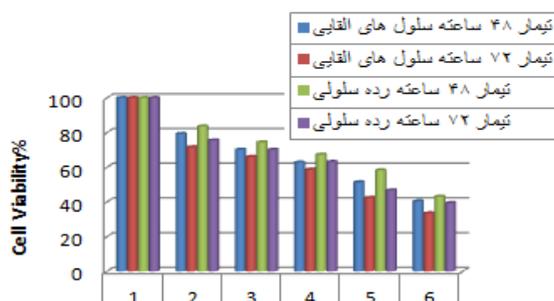
جدول ۱: غلظت‌های مختلف تاکسول، کربوپلاتین، عصاره آبی و الکی موسیر و غلظت‌های هم‌زمان

● غلظت‌های مختلف عصاره آبی موسیر (۰/۰۱، ۰/۰۲، ۰/۰۳، ۰/۰۴، ۰/۰۵ گرم بر لیتر)
● غلظت‌های مختلف عصاره الکی (۰/۰۱، ۰/۰۲، ۰/۰۳، ۰/۰۴، ۰/۰۵ گرم بر لیتر)
● غلظت‌های مختلف کربوپلاتین (۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ۴۰۰، ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر)
● ترکیب کربوپلاتین و عصاره: (۱=۱۰۰+۰/۰۱)، (۲=۲۰۰+۰/۰۲)، (۳=۳۰۰+۰/۰۳)، (۴=۴۰۰+۰/۰۴)، (۵=۵۰۰+۰/۰۵)
● غلظت‌های مختلف تاکسول: (۰/۰۱، ۰/۰۱، ۰، ۱، ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر)
● ترکیب تاکسول و عصاره: (۱=۰/۰۱+۰/۰۱)، (۲=۰/۰۱+۰/۰۲)، (۳=۰/۰۱+۰/۰۳)، (۴=۱+۰/۰۴)، (۵=۱۰+۰/۰۵)

در حالی که تاثیر هم‌زمان عصاره آبی موسیر و تاکسول باعث کاهش سایتوتوکسیسیته تاکسول شده و در تاثیر هم‌زمان عصاره آبی و الکی موسیر با کربوپلاتین، تاثیر هم‌زمان این عصاره‌ها با کربوپلاتین، باعث افزایش سایتوتوکسیسیته کربوپلاتین شده است.

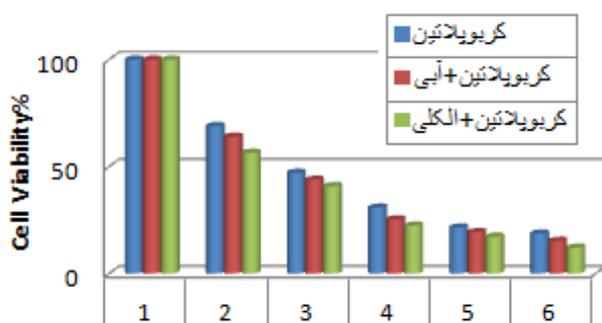
در آزمون‌های بعدی تاکسول و کربوپلاتین را به‌صورت هم‌زمان با عصاره آبی و الکی گیاه موسیر به‌صورت تیمارهای ۴۸ و ۷۲ ساعته بر روی سلول‌ها اثر داده (نمودار ۱) و مشاهده شد که تاثیر هم‌زمان عصاره الکی موسیر با داروی تاکسول به‌صورت وابسته به دوز باعث مهار بیشتر این سلول‌ها می‌شود و این عصاره باعث افزایش تاثیر تاکسول بر روی سلول‌های سرطانی می‌گردد.

نمودار ۱: مقایسه میانگین توانایی زیستی رده سلولی 4TI و سلول‌های القایی سرطان پستان پس از تیمار با غلظت‌های مختلف عصاره آبی و الکی، تاکسول، کربوپلاتین، تاثیر هم‌زمان تاکسول و کربوپلاتین با عصاره‌های آبی و الکی

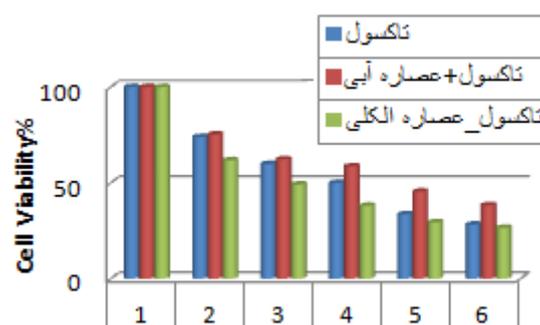


۲-۱: مقایسه میانگین درصد حیات سلول‌ها سلول‌های القایی با DMBA و سلول‌های رده 4TI در تیمار با عصاره آبی موسیر

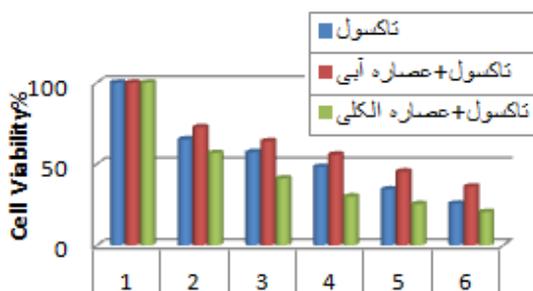
۱-۱: مقایسه میانگین درصد حیات سلول‌های القایی با DMBA و سلول‌های رده 4TI در تیمار با عصاره الکی موسیر



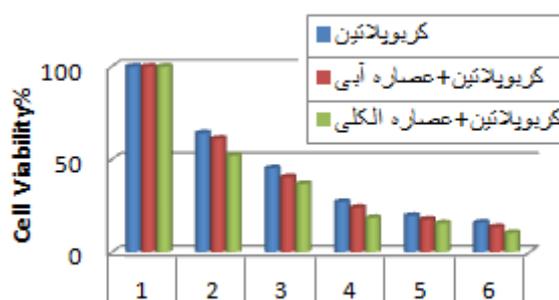
۴-۱: تیمار ۴۸ ساعته در رده سلولی 4TI



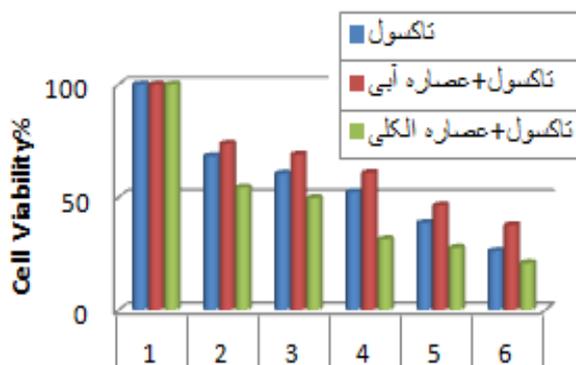
۳-۱: تیمار ۴۸ ساعته در رده سلولی 4TI



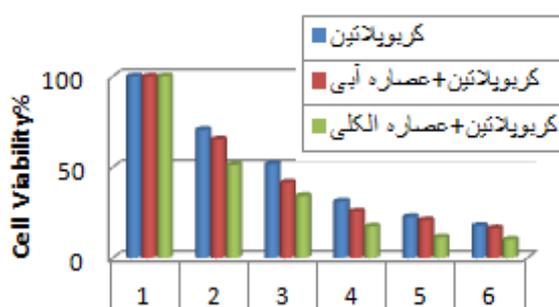
۱-۶: تیمار ۴۸ ساعته در سلول های القایی با DMBA



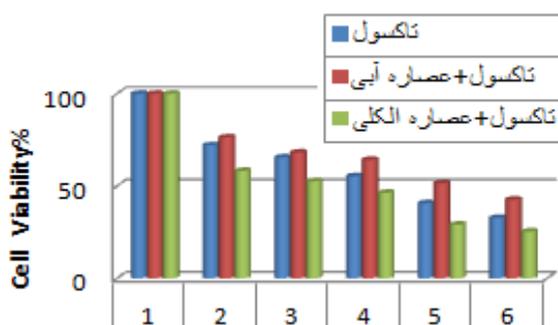
۱-۵: تیمار ۴۸ ساعته در سلول های القایی با DMBA



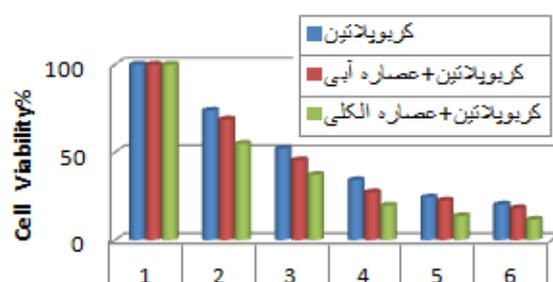
۱-۸: تیمار ۷۲ ساعته در سلول های القایی با DMBA



۱-۷: تیمار ۷۲ ساعته در سلول های القایی با DMBA



۱-۱۰: تیمار ۷۲ ساعته در رده سلولی 4T1

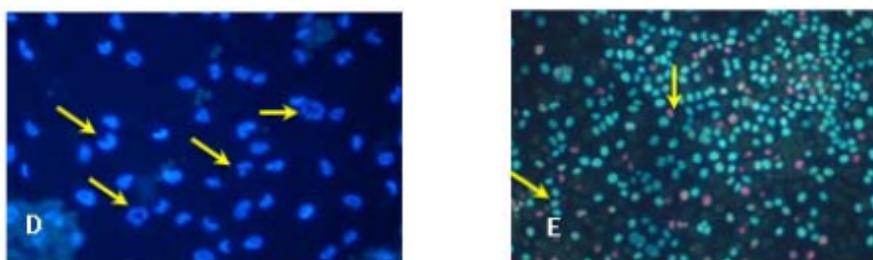
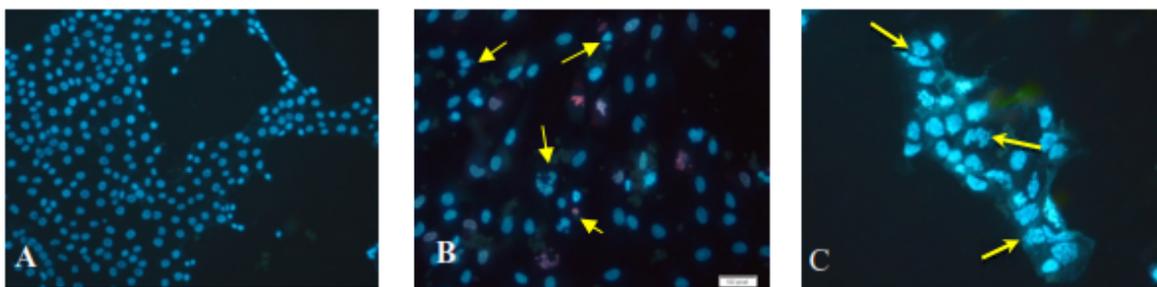


۱-۹: تیمار ۷۲ ساعته در سلول های القایی با DMBA

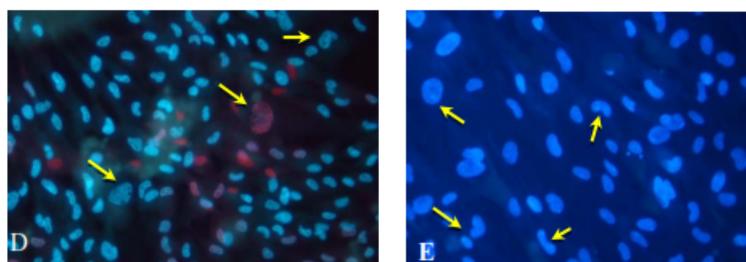
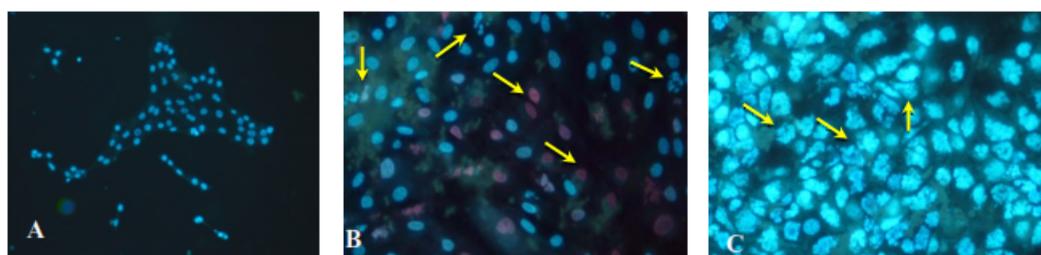
PI غیر قابل نفوذ بودند (شکل های ۱ و ۲، B و E) و هسته سلول های تیمار شده در رنگ آمیزی با هوست به صورت متراکم و قطعه قطعه مشاهده گردید (فلش ها هسته های تغییر یافته در تیمارهای مختلف را نشان می دهند (شکل های ۱ و ۲، C و D).

تغییرات مرفولوژیک سلول ها پس از تیمار با عصاره و دارو، در مدت زمان ۴۸ ساعت با استفاده از رنگ فلوروسنت هوست شامل تغییر شکل هسته در مقایسه با گروه کنترل در زیر نشان داده شده است. (شکل های ۱ و ۲).

جهت بررسی مورفولوژی سلولی، سلول ها قبل و بعد از تیمار با عصاره ها به دقت توسط میکروسکوپ اینورت مورد بررسی قرار گرفتند. سلول ها قبل از تیمار با عصاره ها به صورت سالم و یکپارچه با هسته کاملاً طبیعی ظاهر شدند. در این سلول ها پس از تیمار با غلظت های بالاتر و رنگ آمیزی با پروپیدیوم دید، غشا سیتوپلاسم در مقایسه با سلول های شاهد تخریب شده بودند و رنگ PI به درون سلول های آسیب دیده (تیمار شده با غلظت های مختلف عصاره) راه یافته و لذا هسته این سلول ها به رنگ قرمز رنگ آمیزی شدند. سلول های شاهد (شکل های ۱ و ۲، A) دارای غشا پلاسمایی سالم بوده و به رنگ فلوروسنت پروپیدیوم پوداید



شکل ۱: رنگ آمیزی فلورسین سلول‌های سرطانی القایی با استفاده از DMBA برای مدت زمان ۴۸ ساعت (بزرگنمایی $\times 40$). فلش‌ها هسته سلول‌های تغییر یافته و غشا سلولی آسیب دیده (هسته قرمز رنگ) بر اثر تیمار را نشان می‌دهند. (A) نمونه شاهد، (B) سلول‌های القایی DMBA تیمار شده با غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر کربوپلاتین و رنگ آمیزی هم‌زمان هوخست و پروپیدیوم یوداید، (C) سلول‌های القایی DMBA تیمار شده با غلظت ۰/۰۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر تاکسول، (D) سلول‌های القایی DMBA تیمار شده با غلظت ۰/۰۳ گرم بر لیتر عصاره الکی، (E) سلول‌های القایی DMBA تیمار شده با غلظت ۰/۰۴ گرم بر لیتر عصاره آبی و رنگ آمیزی هم‌زمان هوخست و پروپیدیوم یوداید.



شکل ۲: بررسی تغییرات مورفولوژیک و آپوپتوزیس برای مدت زمان ۴۸ ساعت در رده سلولی 4TI (بزرگنمایی $\times 40$). فلش‌ها هسته سلول‌های تغییر یافته و غشا سلولی آسیب دیده (هسته قرمز رنگ) بر اثر تیمار را نشان می‌دهند. (A) نمونه شاهد، (B) سلول‌های 4TI تیمار شده با غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر کربوپلاتین، (C) سلول‌های 4TI تیمار شده با غلظت ۰/۰۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر تاکسول، (D) تیمار سلول‌های 4TI با غلظت ۰/۰۴ گرم بر لیتر عصاره آبی، (E) تیمار سلول‌های 4TI با غلظت ۰/۰۳ گرم بر لیتر عصاره الکی موسیر.

بحث

هسته، نردبانی شدن DNA و همچنین فعال شدن کاسپاز ۳، ۸ و ۹ می شود (۲۶). به‌رحال نیاز به مطالعات بیشتر برای شناسایی اثر موسیر بر روی سلول‌های سرطانی ضروری به‌نظر می‌رسد.

در این مطالعه مشخص شد که تاکسول به‌صورت وابسته به غلظت دارای اثر مهاری بر روی سلول‌های سرطانی است ولی با افزایش تیمار از ۴۸ به ۷۲ ساعت، سایتوتوکسیسیته تاکسول کاهش می‌یابد. اختلاف در نتایج مطالعه حاضر و تحقیق انجام شده بر روی سلول‌های سرطانی MCF-7، HeLa، A549، U373، HT-29، OVG-1، PC-Sh، PC-Zd (۲۱)، ممکن است به‌دلیل اختلاف در نوع سلول و غلظت‌های تاکسول باشد.

بر اساس نتایج به‌دست آمده از دو آزمون رنگ آمیزی تریپان بلو و رنگ سنجی MTT مشخص شد که استفاده هم‌زمان تاکسول و عصاره آبی، باعث کاهش سایتوتوکسیسیته تاکسول شده است در حالی‌که درمورد تاثیر هم‌زمان تاکسول و عصاره الکی این‌چنین نبوده است.

در طی یک بررسی نشان داده شد که فلاونوئید کوئرستین فعالیت تاکسول و نوکودازول را از طریق مداخله با سیکل سلولی مهار می‌کند (۲۷). بنابراین شاید بتوان یکی از دلایل کاهش اثر سمیت تاکسول توسط عصاره آبی موسیر را ناشی از وجود کوئرستین در این عصاره دانست. همچنین در این بررسی مشخص شد که با افزایش تیمار از ۴۸ به ۷۲ ساعت، سایتوتوکسیسیته کربوپلاتین نیز کاهش می‌یابد و استفاده هم‌زمان کربوپلاتین و عصاره آبی والکی، اثرات سایتوتوکسیک کربوپلاتین را در سطح معنی‌داری افزایش می‌دهد.

با این وجود انجام آزمایشات بیشتری جهت آنالیز ترکیبات شیمیایی موجود در هر یک از عصاره‌ها و نوع تاثیرشان بر سلول‌های سرطانی و برهم کنش آن‌ها با داروهای نظیر تاکسول و کربوپلاتین مورد نیاز می‌باشد.

از طرفی به‌دنبال تیمار سلول‌های سرطانی با عصاره موسیر در مدت زمان ۴۸ ساعت تغییرات مورفولوژیک از قبیل تغییر شکل و حباب‌دار شدن هسته و همچنین افزایش تعداد سلول‌های مرده نیز مشاهده شد که می‌تواند علت آن، فعالیت آنزیمی درون سلولی باشد که موجب تغییر شکل سلول‌های تیمار شده باشد.

بررسی توانایی زیستی سلول‌های سرطانی با استفاده از دو آزمون تریپان بلو و MTT نشان داد که عصاره آبی و الکی، تاکسول و کربوپلاتین موجب کاهش چشم‌گیر توانایی زیستی سلول‌های سرطانی شدند. نتایج به‌دست آمده از هر دو آزمون در یک راستا بوده و یکدیگر را تایید نمودند.

سایر مطالعاتی که پیش از این در رابطه با اثرات سایتوتوکسیک تاکسول، کربوپلاتین، عصاره‌ی آبی و الکی موسیر صورت گرفته است نیز توانایی این ترکیبات در کاهش توانایی زیستی سلول‌های سرطانی را نشان داده‌اند. مشخص شده که تاکسول با توقف رونویسی DNA در مرحله G2/M تقسیم میتوز (۱۹) و کربوپلاتین با اتصال به DNA از طریق اتصالات عرضی بین رشته‌ای و تداخل با عملکرد آن (۲۰) موجب مرگ سلول‌ها می‌شود. بررسی‌های صورت گرفته بر رده‌های سلولی U373، A549، PC-Sh، HeLa، MCF-7، OVG-1، HT-29، PC-Zd (۲۱)، SKOV3، U937 (۲۲)، NUGC-3 (۲۱)، OVCAR-3 و SK-OV-3 (۲۴) همگی سایتوتوکسیسیته بالای تاکسول و کربوپلاتین را نشان داده‌اند.

مطالعاتی که تاکنون در رابطه با اثرات ضد تکثیری و سایتوتوکسیک عصاره آبی و الکی موسیر بر روی رده‌های سلولی سرطانی HeLa، MCF-7 و L-929 صورت گرفته نشان می‌دهد که این عصاره بر روی رده‌های سلولی مختلف بسته به نوع سلول اثرات سایتوتوکسیک مختلفی اعمال می‌کند و IC50 عصاره برای هر رده سلولی متفاوت است (۱۶).

تجزیه شیمیایی عصاره‌ی موسیر نشان داده است که از نظر ترکیبات شیمیایی دارای دو ترکیب گوگردی آلیسین - آلیساتین (۱ و ۲)، فلاونوئیدهایی از قبیل کوئرستین و ساپونین‌ها می‌باشد که بخشی از خواص ضد سرطانی آن نیز ناشی از وجود همین ترکیبات می‌باشد (۲۵).

هر چند که مکانیسم مهاری موسیر به‌خوبی روشن نیست، اما نتایج برخی مطالعات نشان داده است که کوئرستین موجود در آن، اثرات ضد تکثیری خود را از طریق افزایش القای p53 و کاهش پروتئین‌های آنتی‌آپوپتوزی Survivin و Bcl-2 اعمال می‌کند (۱۶) و همچنین آلیسین موجود در موسیر باعث تحریک تشکیل جسم آپوپتوتیک، توقف سیکل سلولی، متراکم شدن

نتیجه گیری

شیمیایی عصاره‌ی موسیر نشان داده است که از نظر ترکیبات شیمیایی دارای دو ترکیب گوگردی آلیسین - آلیستاتین ۱ و ۲، فلاونوئیدهایی از قبیل کوئرستین و ساپونین‌ها می‌باشد که بخشی از خواص ضد سرطانی آن نیز ناشی از وجود همین ترکیبات می‌باشد (۲۵). هر چند که مکانیسم مهاره‌ی موسیر به‌خوبی روشن نیست، اما نتایج برخی مطالعات نشان داده است که کوئرستین موجود در آن، اثرات ضد تکثیری خود را از طریق افزایش القای p53 و کاهش پروتئین‌های آنتی آپوپتوزی Survivin و Bcl-2 اعمال می‌کند (۱۶) و همچنین آلیسین موجود در موسیر باعث تحریک تشکیل جسم آپوپتوتیک، توقف سیکل سلولی، متراکم شدن هسته، نردبانی شدن DNA و همچنین فعال شدن کاسپاز ۳، ۸، ۹ می‌شود (۲۶). به‌هرحال نیاز به مطالعات بیشتر برای شناسایی اثر موسیر بر روی سلول‌های سرطانی ضروری به‌نظر می‌رسد.

Hela, MCF-7 و L-929 صورت گرفته نشان می‌دهد که این عصاره بر روی رده‌های سلولی مختلف بسته به نوع سلول اثرات سایتوتوکسیک مختلفی اعمال می‌کند و IC50 بر اساس نتایج به‌دست آمده از دو آزمون رنگ آمیزی تریپان بلو و رنگ سنجی MTT مشخص شد که استفاده هم‌زمان تاکسول و عصاره آبی، باعث کاهش سایتوتوکسیسیته تاکسول شده است در حالی‌که در مورد تاثیر هم‌زمان تاکسول و عصاره الکی این‌چنین نبوده است.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله مولفین مقاله از حمایت‌های مالی معاونت محترم پژوهش و فناوری دانشگاه اراک در تحقق این پژوهش تشکر و سپاسگزاری می‌نمایند.

منابع

1. Ferlay J, Bray F, Pisane P, Parkin DM. Cancer incidence, mortality and prevalence worldwide, Lyon: Globocan IARC. 2000. In Press.
2. Albano JD, Ward E, Jemal A, Anderson R, et al. Cancer mortality in the United States by education level and race. J Natl Cancer Inst. 2007; 99(18): 1384-94.
3. Li Ci, Uribe DJ, Daling JR. Clinical characteristic of different histologic types of breast cancer. Br J Cancer. 2005; 93(9): 1046-52.

سلول‌های سرطانی القایی با استفاده از 4T1 و سلول‌های القایی سرطان پستان پس از تیمار با غلظت‌های مختلف عصاره آبی و الکی، تاکسول، کربوپلاتین، تاثیر هم‌زمان تاکسول و کربوپلاتین با عصاره‌های آبی و الکی PI به‌درون سلول‌های آسیب دیده (تیمار شده با غلظت‌های مختلف عصاره) راه یافته و لذا هسته این سلول‌ها به‌رنگ قرمز رنگ آمیزی شدند. سلول‌های شاهد (شکل‌های ۱ و ۲، A) دارای غشا پلاسمایی سالم بوده و به‌رنگ فلورسنت پروپیدیوم پوداید PI غیر قابل نفوذ بودند (شکل‌های ۱ و ۲، B و E). و هسته سلول‌های تیمار شده در رنگ آمیزی با هوخست به‌صورت متراکم و قطعه قطعه مشاهده گردید (فلش‌ها هسته‌های تغییر یافته در تیمارهای مختلف را نشان می‌دهند (شکل‌های ۱ و ۲، C و DMBA: D برای مدت زمان ۴۸ ساعت (بزرگنمایی $\times 40$). فلش‌ها هسته سلول‌های تغییر یافته و غشا سلولی آسیب دیده (هسته قرمز رنگ) بر اثر تیمار را نشان می‌دهند. (A نمونه شاهد، B) سلول‌های القایی DMBA تیمار شده با غلظت ۱۰۰ میکرو گرم بر میلی‌لیتر کربوپلاتین و رنگ آمیزی هم‌زمان هوخست و پروپیدیوم پوداید، C) سلول‌های القایی DMBA تیمار شده با غلظت ۰/۰۱ میکرو گرم بر میلی‌لیتر تاکسول، D) سلول‌های القایی DMBA تیمار شده با غلظت ۰/۰۳ گرم بر لیتر عصاره الکی، E) سلول‌های القایی DMBA MTT نشان داد که عصاره آبی و الکی، تاکسول و کربوپلاتین موجب کاهش چشم‌گیر توانایی زیستی سلول‌های سرطانی شدند. نتایج به‌دست آمده از هر دو آزمون در یک راستا بوده و یکدیگر را تایید نمودند.

DNA در مرحله G2/M تقسیم میتوز (۱۹) و کربوپلاتین با اتصال به DNA از طریق اتصالات عرضی بین رشته‌ای و تداخل با عمل کرد آن (۲۰) موجب مرگ سلول‌ها می‌شود. بررسی‌های صورت گرفته بر رده‌های سلولی HeLa, MCF-7, A549, U373, PC-Zd, PC-Sh, 7, OVG-1, HT-29, NUGC-3 (۲۱) SC-, SK-OV- و OVCAR-3 (۲۳) SKOV3, U937 (۲۲) M1 (۲۴) 3 همگی سایتوتوکسیسیته بالای تاکسول و کربوپلاتین را نشان داده‌اند.

سرطانی HeLa, MCF-7 و L-929 صورت گرفته نشان می‌دهد که این عصاره بر روی رده‌های سلولی مختلف بسته به نوع سلول اثرات سایتوتوکسیک مختلفی اعمال می‌کند و IC50 تجزیه

4. Fruebauf JP, Bosanquet AG. In vitro determination of drug response: a discussion of clinical applications. principle and practice of oncology. 1993; 7: 25-32.
5. Gerrero MR, et al. Recent advances in breast cancer biology. *Curr Opin Oncol*. 2001; 13(6): 415-9.
6. Alvaro MA, Edith AP. Treatment options for breast cancer resistant to anthracycline and taxane. *Mayo Clin Proc*. Jun. 2009; 84(6): 533-545.
7. Adlercreutz H. Western diet and western diseases: some hormonal and biochemical mechanisms and associations. *Scandinavian J Clin Lab Invest*. 1990; 50 (S201): 3-23.
8. Fan TP, Yeh JC, Leung KW, Yue PYK, et al. Angiogenesis: from plants to blood vessels. *Trends Pharmacol Sci*. 2006; 27(6): 297-309.
9. Adeniyi BA, Anyiam FM. In vitro anti-Helicobacter pylori potential of methanol extract of *Allium ascalonicum* Linn. (Liliaceae) leaf: susceptibility and effect on urease activity. *J Phytother Res*. 2002; 18(5): 358-361.
10. Leelarungrayub N, Rattanapanone V, Chanarat N, Gebicki J. Quantitative evaluation of the antioxidant properties of garlic and shallot preparations. *J Nutrition*. 2006; 22(3): 266-274.
11. Owoyele BV, Alabi OT, Adebayo JO, Soladoyea AO, et al. Haematological evaluation of ethanolic extract of *Allium ascalonicum* in male albino rats. *J Fitoterapia*. 2004; 75: 322-326.
12. Wang HX, Ng TB. Ascalin, a new anti-fungal peptide with human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase-inhibiting activity from shallot bulbs. *J Peptides*. 2002; 23(6): 1025-1029.
13. Bianchini F, Vainio H. Allium vegetables and organosulfur compounds: do they help prevent cancer? *J Environ Health Persp*. 2001; 109(9): 893-902.
14. Fattorusso E, Iorizzi M, Lanzotti V, Tagliatalata-Scafati O. Chemical composition of shallot (*Allium ascalonicum* Hort.). *J Agr Food Chem*. 2002; 50(20): 5686 -5690.
15. Mubarak AM, Kulatilleke CP. Sulfur constituents of need seed volatiles: a revision. *J Phytochemistry*. 1990; 29: 3351-3352.
16. Ghodrati Azadi H, Riazi GH, Ghaffari SM, Ahmadian SH, et al. Effects of *Allium hirtifolium* (Iranian shallot) and its allicin on microtubule and cancer cell lines. *African Journal of Biotechnology*. 2002; 8 (19), 5030-5037.
17. Mohammadi Motlagh HR, et al. Anti-Angiogenic Effect of Aqueous Extract of Shallot (*Allium ascalonicum*) Bulbs in Rat Aorta Ring Model. *Yakhteh Medical Journal*. 2009; 11(2): 190-195.
18. Trakranungsie A. Chatchawanchonteera, W. Khunkitti. Ethnoveterinary study for antidermatophytic activity of Piper betle, *Alpinia galanga* and *Allium ascalonicum* extracts in vitro. *Research in Veterinary Science*. 2008; 84(1): 80-84.
- 19.
20. Lee CS1, Kim YJ, Jang ER, Myung SC, et al. Akt inhibitor enhances apoptotic effect of carboplatin on human epithelial ovarian carcinoma cell lines. *Eur J Pharmacol*. Apr. 2010; 25; 632(1-3): 7-13.
21. Liebmann JE, Cook JA, Lipschultz C, Teague D, et al. "Cytotoxic studies of Paclitaxel (Taxol) in human tumor cell lines". *British Journal of Cancer*. 1993; 68(6): 1104-1109 .
22. Chang YF, Li LL, Wu C, Liu T, et al. Paclitaxel induced apoptosis in human gastric carcinoma cell lines. *Cancer*. 1996; 77(1): 8-14.
23. Ofir R, Seidman R, Rabinski T, Kurp M, et al. Taxol-induced apoptosis in human SKOV3 ovarian and MCF7 breast carcinoma cells is caspase-3 and caspase-9 independent. *Cell Death and Differentiation*. 2002; 9(6): 636-642.
24. Günther B, Henri B, Nick G, Christian L, et al. Carboplatin derivatives with superior antitumor activity compared to the parent compound . *Inorganica Chimica Acta*. 2004; 357(15): 4452-4466.
25. Fattorusso E, Iorizzi M, Lanzotti V, Tagliatalata-Scafati O. Chemical composition of shallot (*Allium ascalonicum* L.). *J. Agric. Food Chem*. 2002; 50 (12236699): 5686-5690.
26. Oommen S, John Anto R, Srinivas G, Karunakaran D. Allicin (from garlic) induces caspase-mediated apoptosis in cancer cells. *European Journal of Pharmacology*. 2004; 485(1-3): 97-103.
27. Samuel T, et al. The Flavonoid Quercetin Transiently Inhibits the Activity of Taxol and Nocodazole Through Interference With the Cell Cycle. *Nutrition and Cancer*. 2010; 62(8): 1025-1035.

Cytotoxicity Effect of Aqueous and Alcoholic Total Extract of Shallot (*Allium ascalonicum*) on Cancer Cells Derived from Mammary Tumors in Rat and Cell Line (4T1) in Mouse, and Comparison with Taxol and Carboplatin Chemotherapy Drugs

Hamta A, Ph.D. *, Shariatzadeh SMA, Ph.D., Soleimani M, Ph.D., Tajali Ardakani M, MSc.

-Department of Biology, Arak University, Arak 38156-8-8349, Iran

* Email corresponding author: a-hamta@araku.ac.ir

Received: 17 Sep. 2013

Accepted: 18 May. 2014

Abstract

Aim: The present study aimed to investigate the effects of aqueous and alcoholic extracts of shallot on breast cancer cells compared to carboplatin and taxol treatments.

Material and methods: Different concentrations of drugs taxol and carboplatin and aqueous and alcoholic extracts of shallots were prepared.

Using Trypan blue and MTT, cytotoxicity on breast cancer cells, in different times and concentrations were evaluated. Utilized Hoechst and propidium iodide staining morphological changes and possible apoptosis of cells were determined. The data statistically analyzed using one-way analysis of variance and the mean level of $P < 0.05$ was considered significant.

Results: The results indicate that shallot alcoholic extract has more inhibitory effects on cancer cells than aqueous extract at concentration range (0.01 to 0.05 g/L). Also, the simultaneous effect of shallot's extract, accompaniment with carboplatin, caused enhancement in cytotoxicity of carboplatin. On the other hand, accompaniment of aqueous extract with taxol led to reduction of taxol cytotoxicity.

Conclusions: This study showed aqueous and alcoholic extracts of shallots has cytotoxicity effects on breast cancer cells on rats affected by breast cancer. This plant is a herb which can be used against breast cancer can be subjects for further research.

Keywords: Cytotoxicity, Extract of shallot, Breast cancer, DMBA, Taxol, Carboplatin