Journal of Cell and Tissue 13(1), Spring (2022) 11-22

Journal of Cell and Tissue
http://jct.araku.ac.ir

# A study on the effect of *Tamarindus indica* kernel extracts on viability, proliferation, and induction of apoptosis in human - prostate cancer (LNCaP), colon cancer (HT-29), and fibroblast cell lines

**Pourali M[a], Yaghoobi MM[a*]**

[a] Department of Biotechnology, Institute of Science and High Technology and Environmental Sciences, Graduate University of Advanced Technology, Kerman, Iran

Use your device to scan and read the article online

**Citation**: Pourali M, Yaghoobi MM. A study on the effect of *Tamarindus indica* kernel extracts on viability, proliferation, and induction of apoptosis in human prostate cancer (LNCaP), colon cancer (HT-29), and fibroblast cell lines. Journal of Cell and Tissue . 2022; 13(1):11-22.

https://10.52547/JCT/13.1.11

KEYWORDS

Apoptosis, Cytotoxicity, DNA synthesis, Medicinal plants, Plant extract.

ABSTRACT

**Aim:** Cancer is one of the leading causes of death worldwide, and its treatment is always associated with side effects such as drug resistance. So, there is a strong tendency for the identification of new herbal anti-cancer compounds.

**Material and Methods:** In this study, a range of 0.5-12 µg/mL of hydroalcoholic extract of *Tamarindus indica* kernel and 5-Fluorouracil was applied to prostate cancer (LNCaP), colon cancer (HT-29) and normal fibroblast (HSkMC) cells for 24 hours. The cytotoxic effect of the extracts was measured by the MTT method. The rate of DNA synthesis and incidence of apoptosis was measured by BrdU and TUNEL assays, respectively.

**Results:** Following treatment with the highest amount of the extract, the viability of prostate, colon, and fibroblast cells was reduced to 4.8, 65.1, and 60.5%, respectively. The $IC_{50}$ for the three cell lines was 4.60, 17.0 and 13.79 µg/mL respectively. The rate of DNA synthesis also reduced by 32, 37 and 15% for prostate, colon and fibroblast cancer cells, respectively. The rate of apoptosis in LNCaP and HT-29 cells was 31 and 4%, respectively.

**Conclusion:** Collectively, the toxicity of the extract was higher for LNCaP cells than for the other two cells (p-value <0.01). Further studies in vivo and analysis of compounds in tamarind can lead to the identification of anti-cancer compounds from this plant.

* Corresponding author. Tel.: +98-34-31623209 ; Fax: +98-34-33776617
E-mail address: m.yaghoobi@kgut.ac.ir
DOI: https://10.52547/JCT/13.1.11
Received: October 27, 2021; Received in revised form: January 30 2022; Accepted: February 23, 2022
© Author

سلول و بافت، دوره ۱۳، شماره ۱، بهار ۱۴۰۱، صفحات۱۱ تا ۲۲

سلول و بافت

# مطالعه اثر عصاره تمرهندی روی بقا، تکثیر و القای آپوپتوزیس در سلول‌های سرطانی پروستات، روده بزرگ و سلول طبیعی فیبروبلاست انسان

مسعود پورعلی[۱] ، محمدمهدی یعقوبی[۲*]

[۱] کارشناسی ارشد، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته کرمان، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، گروه بیوتکنولوژی، کرمان، ایران

[۲] دانشیار، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته کرمان، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، گروه بیوتکنولوژی، کرمان، ایران

**واژگان کلیدی**

آپوپتوزیس، سنتز DNA، عصاره گیاه، کشندگی سلولی، گیاهان دارویی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۸/۰۵

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۰/۱۱/۱۰

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۲/۰۴

**چکیده**

**هدف:** سرطان یکی از دلایل اصلی مرگ و میر در سراسر جهان است که درمان آن با عوارضی هم‌چون مقاومت دارویی همراه است. طبیعت همواره یکی از منابع دارویی برای بشر بوده است. لذا تمایل زیادی به شناسایی ترکیبات ضدسرطانی جدید در گیاهان وجود دارد. **مواد و روش‌ها:** در این تحقیق هفت غلظت (۰/۵ تا ۱۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر) از عصاره هیدروالکلی هسته تمرهندی (*Tamarindus indica*) و داروی فلورواوراسیل روی سه رده سلولی سرطان پروستات (LNCaP)، سرطان روده بزرگ (HT-29) و سلول طبیعی فیبروبلاست (HSkMC) به‌مدت ۲۴ ساعت اثر داده شد. اثر کشندگی عصاره‌ها با استفاده از روش MTT و اثر عصاره‌ها بر میزان ساخت DNA با استفاده از روش BrdU و میزان مرگ آپوپتوزی نیز به‌روش TUNEL اندازه‌گیری شد. **نتایج:** زنده‌مانی سلول‌های سرطان پروستات، روده بزرگ و فیبروبلاست در حضور بیش‌ترین مقدار از عصاره به‌ترتیب به ۲۴/۸، ۶۵/۱ و ۶۰/۵ درصد کاهش یافت. شاخص $IC_{50}$ برای سه رده سلولی فوق به‌ترتیب ۴/۶۰، ۱۷/۰ و ۱۳/۷۹ محاسبه شد. عصاره میزان ساخت DNA را نیز به‌ترتیب به‌میزان ۳۲ و ۳۷ و ۱۵ درصد در سلول‌های سرطان پروستات، روده و فیبروبلاست کاهش داد. مرگ آپوپتوزی پس از تیمار با عصاره در سلول‌های سرطانی پروستات و روده بزرگ نیز به‌ترتیب ۳۱ و ۴ درصد مشاهده شد. **نتیجه‌گیری:** درمجموع، سمیت عصاره و مهار ساخت DNA و القای مرگ آپوپتوزی برای سلول سرطان پروستات نسبت به دو سلول دیگر بیش‌تر بود ($p\ value<0/01$). تجزیه ترکیبات موجود در گیاه تمرهندی و مطالعات بیش‌تر در موجود زنده می‌تواند به شناسایی ترکیبات ضدسرطان از این گیاه منجر شود.

* نویسنده مسئول؛ تلفن: ۳۱۶۲۳۲۰۹ -۰۳۴؛ فکس: ۰۳۴۳۳۷۷۶۶۱۷

آدرس پست الکترونیک: m.yaghoobi@kgut.ac.ir

## ۱- مقدمه

سرطان نامی است که به مجموعه بیش از یک‌صد بیماری اطلاق می‌شود. بسته به وضعیت پیشرفت اقتصادی و بهداشتی کشورها، این بیماری در جایگاه دوم تا سوم عوامل مرگ‌ومیر در سراسر دنیا محسوب می‌شود. به‌طوری‌که در سال ۲۰۲۰ میلادی بیش از نوزده میلیون مورد جدید سرطان و ده میلیون مرگ ناشی از سرطان در کل دنیا رخ داده است. تخمین زده می‌شود آمار موارد سرطان تا سال ۲۰۴۰ به بیش از بیست و هشت میلیون برسد (۱). روش‌های رایج درمان سرطان مثل شیمی‌درمانی و پرتودرمانی داری مشکلات و عوارضی هستند. یکی از این مشکلات جدی، بروز مقاومت به این داروها در توده سرطانی است. به‌طوری‌که در ابتدای درمان، اغلب سلول‌های سرطانی می‌میرند. اما تعداد معدودی سلول که در اثر مقاومت به دارو باقی مانده‌اند تکثیر یافته و جمعیت غالب را تشکیل می‌دهند که دیگر به درمان‌های قبلی پاسخ نمی‌دهد. این سلول‌ها اغلب توانایی تهاجم و متاستاز را هم کسب می‌کنند. لذا جست‌وجوی ترکیبات جدید ضدسرطان در منابع طبیعی و به‌ویژه گیاهان یکی از زمینه‌های تحقیقاتی داغ در بین محققین این زمینه می‌باشد. گیاهان در پاسخ به محرک‌های محیطی و پاتوژن ها متابولیت‌های ثانویه‌ای را تولید می‌کنند. بیش‌تر ترکیبات با ارزش دارویی از همین متابولیت‌های ثانویه هستند. غربال‌گری گیاهانی که دانش سنتی اثرات طبی آن‌ها را نشان داده است می‌تواند به شناسایی ترکیبات ضدسرطان جدید منجر شود. جالب توجه است که از ۲۴۷ داروی ضدسرطان معرفی شده از سال ۱۹۸۰ تا سال ۲۰۱۹ بیش از ۵۷ درصد از منابع زیستی و طبیعی من‌جمله گیاهان بوده است (۵-۲).

تمرهندی (*Tamarindus indica*) گیاهی از خانواده نخود (Fabaceae) و یکی از مهم‌ترین گونه‌های درختی گرم‌سیری است. خاستگاه تمرهندی مناطق استوایی غرب آفریقا است. تمرهندی صدها سال پیش توسط کشتی به شبه جزیره هند منتقل شد و در آن‌جا پرورش و به کشورهای مجاور نیز گسترش پیدا کرد. در ایران به‌نام تمرهندی یا خرمای هندی معروف است. تقریبا تمام بخش‌های گیاه تمرهندی، قابل استفاده است. به‌عنوان مثال در تهیه غذا، صنایع غذایی و داروسازی، صنعت نساجی و هم چنین به‌عنوان سوخت استفاده می‌شود. در طب سنتی اغلب این کشورها از برگ، پوست و یا میوه تمرهندی جهت درمان دردهای شکمی، عفونت‌های گوارشی، التیام زخم و مالاریا استفاده می‌شود. این گیاه هم‌چنین دارای فعالیت آنتی‌دیابتیک، آنتی‌اکسیدانتی، ضدالتهاب و ضدچاقی می‌باشد (۱۲-۶).

علی‌رغم مطالعات فوق تاکنون اثرات این گیاه روی سلول‌های سرطانی مختلف بررسی نشده است. تحقیق حاضر با هدف بررسی اثر عصاره هیدروالکلی پوست دانه گیاه تمرهندی بر میزان کشندگی سلولی، میزان سنتز DNA و القا آپوپتوزیس در سلول‌های سرطانی پروستات و روده بزرگ انسان انجام شده است.

## 2- مواد و روش‌ها

**تهیه نمونه و عصاره‌گیری**: میوه تمرهندی محصول تایلند در سال ۱۳۸۸ از بازار تهیه و توسط آقای دکتر محمدحسین صالحی سورمقی تایید و به آزمایشگاه گروه فارماکوگنوزی دانشکده داروسازی دانشگاه تهران منتقل شدند. میوه‌های تمرهندی پس از جداسازی با آب مقطر شسته و به‌مدت یک هفته در سایه خشک و سپس به‌طور کامل آسیاب شدند. از پودر حاصل با دستگاه سوکسله با حلالی متشکل از ۲۰ درصد آب مقطر و ۸۰ درصد متانول به‌مدت ۱۲ ساعت عصاره‌گیری انجام شد. عصاره با دستگاه روتاری تغلیظ شده و باقی مانده حلال در آون با دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد تبخیر شد. عصاره‌های حاصل تا زمان انجام آزمون‌ها در ظروف درب بسته تاریک و در یخچال چهار درجه سانتی‌گراد نگه‌داری و موقع تیمار ابتدا با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در متانول و سپس با رقیق سازی متوالی در محیط کشت حل شدند.

**کشت‌سلول:** رده‌های سلولی سرطان کارسینومای پروستات (LNCaP)، سرطان آدنوکارسینومای روده بزرگ (HT-29) و سلول طبیعی فیبروبلاست (HSkMC) به‌عنوان سلول شاهد از بانک سلول انستیتو پاستور تهران به‌صورت زنده در فلاسک کشت خریداری و در محیط کشت RPMI 1640 با ۱۰ درصد سرم FBS (هر دو از شرکت Invitrogen آمریکا) کشت داده و در انکوباتور با دمای ۳۶/۵ درجه سانتی‌گراد با دی‌اکسیدکربن پنج‌درصد نگه‌داری شد.

**سنجش میزان کشندگی عصاره با استفاده از روش رنگ‌سنجی MTT:** تعداد ۵ هزار از هریک از سلول‌ها در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه کف صاف در ۵۰ میکرولیتر محیط کشت کامل کشت داده شده و به مدت حدود ۲۴ ساعت در انکوباتور نگه‌داری شدند تا بین ۷۰-۶۰ درصد سطح چاهک پر از سلول شود. ردیف بالا و چپ به‌منزله بلانک بدون سلول خالی نگه داشته شد. سپس به ازای هر غلظت یک ستون با چهار ردیف (هر غلظت چهار تکرار) در نظر گرفته شده و ۵ میکرولیتر از هر یک از هفت غلظت عصاره (۰/۵، ۱، ۲، ۵، ۷، ۱۰ و ۱۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر) به چاهک‌ها اضافه شد.

غلظت صفر برای چاهک شاهد (محیط کشت بدون عصاره) اعمال شد. یک ستون از پلیت به داروی ۵-فلورواوراسیل (Austria,EBEWE Pharma) به‌عنوان کنترل مثبت با غلظت به‌ترتیب ۰/۶ و ۱/۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر برای رده سلولی سرطان پروستات و سرطان روده بزرگ اختصاص داده شد و پلیت تا ۴۲ ساعت به انکوباتور منتقل شد.

آزمون MTT با کیت Cell Proliferation Kit, MTT طبق روش شرکت سازنده (Roche applied science ,Germany) انجام شد. پس از ۲۴ ساعت تیمار با عصاره، به هر چاهک پنج میکرولیتر از محلول نشانگذاری MTT اضافه شده و پلیت به‌مدت چهار ساعت در انکوباتور قرار گرفت تا بلور فورمازان تشکیل شود. بعد از گذشت این مدت، محیط کشت چاهک‌ها با ۵۰ میکرولیتر محیط کشت تازه تعویض و به هر چاهک ۵۰ میکرولیتر حلال MTT اضافه شد. سلول‌ها به مدت یک شب در انکوباتور نگهداری شدند و روز بعد جذب چاهک‌های پلیت توسط دستگاه الایزا ریدر (BioTek,USA) به‌روش اسپکتروفتومتری در طول موجهای ۴۹۰و ۶۸۰ نانومتر خوانده شد. درصد سلول‌های زنده یا درصد زنده‌مانی از رابطه زیر محاسبه شد:

۱۰۰× (میانگین OD سلول‌های کنترل/ میانگین OD سلول‌های تیمار شده) = درصد سلول‌های زنده

غلظتی از عصاره که رشد ۵۰ درصد از سلول‌ها را پس از مدت ۲۴ ساعت متوقف کند به‌عنوان شاخص $IC_{50}$ در نظر گرفته شد.

**سنجش میزان سنتز DNA بااستفاده از میزان مصرف BrdU**: در این بخش کشت سلول و تیمار با غلظت‌های عصاره و داروی ۵-فلورواوراسیل طبق همان روش آزمون MTT در ظروف کشت ۹۶ خانه و به‌مدت ۲۴ ساعت انجام شد. هدف این آزمایش سنجش میزان تکثیر سلول است که با توجه به میزان سنتز DNA اندازه گرفته می‌شود. هرچه تکثیر سلولی بیش‌تر باشد، میزان سنتز و یا همانندسازی DNA آن نیز بیش‌تر است. سلولی که DNA بیش‌تری می‌سازد، میزان BrdU بیش‌تری نیز مصرف می‌کند. این ماده آنالوگ تیمین است و به‌جای آن در مولکول DNA وارد می‌شود. مطابق دستورالعمل کیت Cell proliferation BrdU kit (Roche applied science, Germany) مراحل بدین ترتیب دنبال شد: پنج میکرولیتر از محلول BrdU به‌هر چاهک اضافه و پلیت به‌مدت سه ساعت در انکوباتور نگه‌داری شد. سپس محیط کشت چاهک‌ها تخلیه و به‌هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر از محلول FixDenat افزوده و پلیت به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. سپس این محلول از چاهک‌ها حذف و ۵۰ میکرولیتر محلول Anti-BrdU-PoD اضافه شد و ۹۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. پس از آن چاهک‌ها سه مرتبه با PBS شست‌وشو داده شدند و ۵۰ میکرولیتر محلول سوبسترا به‌هر یک اضافه شد. درنهایت پس از ۲۰ دقیقه، جذب پلیت در طول موج‌های ۴۰۵ و ۴۹۰ نانومتر در دستگاه الیزا ریدر خوانده شد.

**تشخیص مرگ آپوپتوزی به‌روش TUNEL:** برای سنجش مرگ آپوپتوزی از کیت In Situ Cell Death Detection Kit, TMR Red (Roche Applied Science, Germany) طبق دستورالعمل استفاده شد. در این روش رنگ TMR Redبه ناحیه هضم شده DNA که در مرگ آپوپتوزی رخ می‌دهد متصل شده و به‌صورت نور فلورسانس قرمز قابل مشاهده است. قطعه قطعه شدن DNA در فواصل منظم بین نوکلئوزومی نشان‌گر مرگ آپوپتوزی سلول است. در ابتدا سلول‌ها روی لامل‌های استریل شده در کف چاهک‌های پلیت شش خانه، در دو میلی‌لیتر محیط کشت کامل کشت داده و به‌مدت حدود ۲۴ ساعت در انکوباتور نگه‌داری شد تا حدود ۶۰ تا ۷۰ درصد سطح فلاسک را سلول‌ها پر کنند. پس از این مدت محیط کشت چاهک‌ها تعویض و به‌یک چاهک عصاره با غلظت هفت میکروگرم بر میلی‌لیتر افزوده شد و مجددا در انکوباتور قرار گرفت. ۲۴ ساعت بعد پلیت خارج شده و لامل‌ها با PBS شسته شده و در معرض هوا خشک شدند. سپس لامل‌ها به‌مدت یک ساعت در پارافرمالدهید چهاردرصد در دمای اتاق انکوبه شدند تا سلول‌ها تثبیت شوند. به‌منظور تراوا نمودن غشای سلول، لامل‌ها به‌مدت دو دقیقه در محلول تازه تهیه شده تریتون X-۱۰۰ ۰/۱ درصد روی ظرف یخ غوطه‌ور شدند. سپس لامل‌ها با PBS شسته شده و لبه‌ها توسط دستمال استریل خشک شدند. در مرحله بعد ۲۵ میکرولیتر از محلول واکنش‌گر تانل روی لامل تحت تیمار عصاره ریخته شد. به‌لامل کنترل منفی تنها ۲۵ میکرولیتر از محلول نشان‌گذاری اضافه شد. لامل کنترل مثبت ابتدا با آنزیم DNase I به‌مدت ۱۰ دقیقه تیمار شد. سپس ۲۵ میکرولیتر از محلول واکنش‌گر تانل بر سطح آن اضافه شد. سه گروه لامل فوق به‌مدت یک ساعت در پلیت شش خانه درب بسته در انکوباتور نگه‌داری شدند. در انتها لامل‌ها با اتانل آب‌گیری شده و با چسب انتالن روی لام شیشه‌ای چسبانیده شد. لامل‌ها با میکروسکوپ فلورسانس Axioplan 2 (Ziess) در طول موج ۵۹۰ نانومتر با بزرگ نمایی ۲۰۰ بررسی شدند و در پنج میدان دید تصادفی تعداد سلول‌های رنگ گرفته و رنگ نگرفته شمرده شد. در انتها با عدسی ۱۰۰۰ توسط دوربین عکس‌برداری انجام شد و درصد آپوپتوزیس به‌روش زیر محاسبه شد:

تعداد کل سلول‌ها/تعداد سلول‌های رنگ گرفته=درصد آپوپتوزیس

## 3- آنالیز آماری

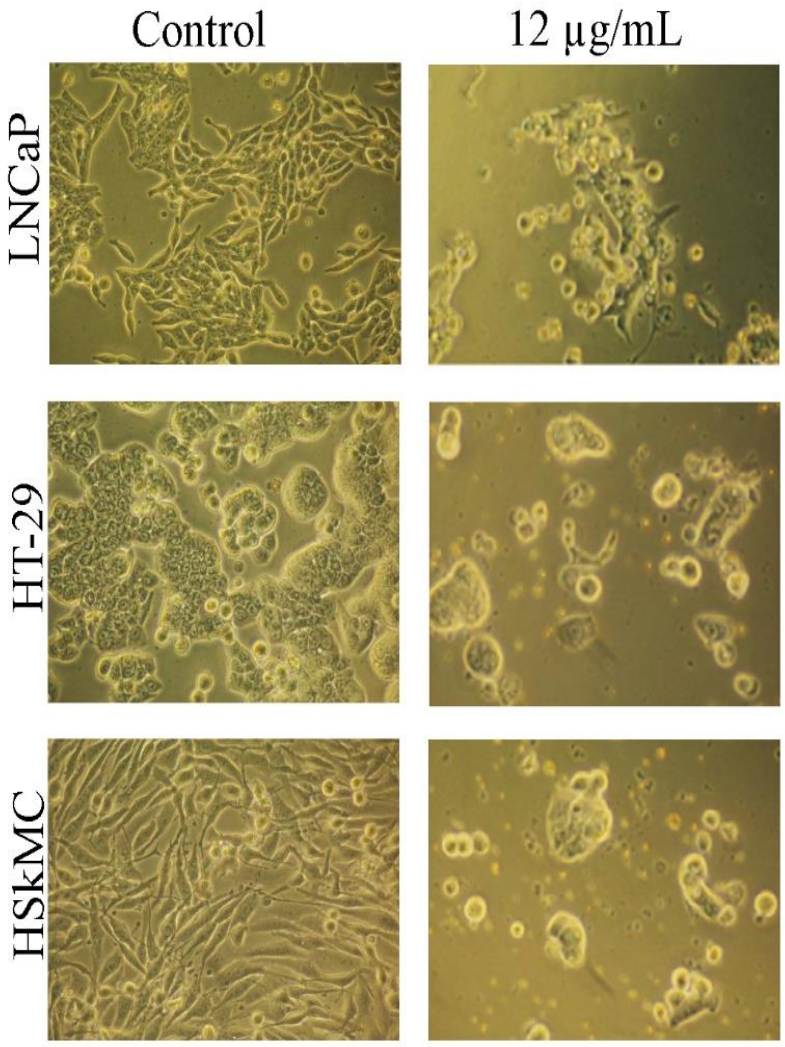
میزان کشندگی عصاره به‌روش MTT و میزان ساخت DNA در حضور عصاره به‌روش BrdU در قالب طرح پایه‌ی کاملا تصادفی با چهار تکرار انجام شد و نتایج این دو آزمون به‌ترتیب به‌صورت درصد زنده‌مانی و میزان جذب برآورد شد. تجزیه واریانس داده‌های حاصل به‌روش ANOVA و مقایسه میانگین داده‌های چهار تکرار در طرح پایه‌ی کاملا تصادفی بااستفاده از نرم‌افزارهای آماری SAS (SAS Institute Inc,V; 9.1.3) و SPSS (IBM,V; SPSS Statistics 18) مورد بررسی قرار گرفتند. مقایسه میانگین درصد زنده‌مانی بااستفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن و مقایسه‌ی میانگین تیمارها با استفاده از آزمون دانت هر دو در سطح معنی‌داری یک درصد بررسی شد. پنجاه درصد سمیت سلولی ($IC_{50}$) با استفاده از نرم‌افزار ED50plus برآورد شد.

## 4- نتایج

### بررسی کشندگی سلولی با استفاده از روش MTT

در ابتدا میزان زنده‌مانی رده‌های سلولی سرطان پروستات، سرطان روده بزرگ و سلول فیبروبلاست انسان به‌عنوان سلول شاهد، در تیمار ۲۴ ساعته با هفت غلظت (۰/۵، ۱، ۲، ۵، ۷، ۱۰ و۱۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر) از عصاره گیاه T. indica سنجیده شد. مشاهدات بصری گویای کاهش میزان زنده‌مانی و افزایش مرگ‌ومیر همزمان با افزایش غلظت عصاره در رده‌های سلولی سرطان پروستات سرطان روده بزرگ بود. این در حالی است که سلول‌های تیمار نشده با ظاهر دوکی شکل و یا چندوجهی به طور عادی به‌سطح ظرف کشت چسبیده و ریخت طبیعی داشتند. با افزایش غلظت عصاره مورفولوژی سلول‌ها به‌شکل کروی متمایز شده، هم‌چنین تراکم و انقباض هسته و سیتوپلاسم و تاولی شدن غشا که می‌تواند از علایم مرگ باشد دیده می‌شد. این

تفاوت در ریخت‌شناسی سلول از غلظت ۵ تا ۱۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر بیش‌تر دیده می‌شد. در محیط کشت هم ضایعات سلولی ناشی از تخریب سلول‌ها به‌وضوح قابل مشاهده بود. تغییرات مورفولوژیک ناشی از حضور عصاره در رده سلولی سرطان پروستات نسبت به رده سلولی سرطان روده بزرگ بارزتر بود. به‌جهت رعایت اختصار تنها تصویر سلول شاهد و سلول تیمار شده با بالاترین غلظت نشان داده شده است (شکل ۱).

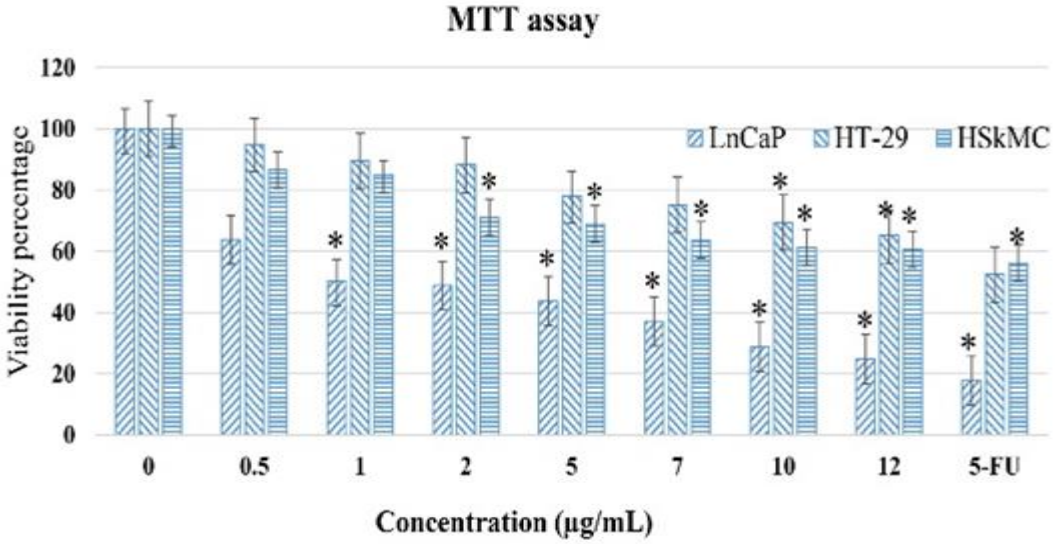



شکل۱: ریخت‌شناسی سلول‌های سرطان پروستات (LNCaP)، روده بزرگ (HT-29) و فیبروبلاست (HSkMC) در دو گروه شاهد و تیمار شده با غلظت ۱۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصاره گیاه تمرهندی. پس از ۲۴ ساعت تیمار با عصاره، سلول‌ها به‌شدت آسیب دیده‌اند و تغییر شکل آن‌ها و ضایعات سلولی به‌طور واضح دیده می‌شوند (بزرگ‌نمایی ۳۲۰X):

هم‌چنین شاخص $IC_{50}$ عصاره برای سلول سرطان پروستات ۴/۶، سلول سرطان روده ۱۷/۰۰ و برای سلول فیبروبلاست ۱۳/۷۹ میکروگرم بر میلی‌لیتر به‌دست آمد، که بیان‌گر مرگ‌ومیر بیش‌تر سلول سرطان پروستات نسبت به دو سلول سرطان روده و فیبروبلاست در حضور عصاره است. بررسی میزان زنده‌مانی به‌روش MTT در سه رده سلولی تیمار شده با غلظت‌های متفاوت عصاره و داروی ۵-فلورواوراسیل بیان‌گر تاثیر کشندگی بیش‌تر برروی رده سلولی سرطان پروستات نسبت به‌دو سلول دیگر است (شکل ۲). درحالی‌که زنده‌مانی سلول پروستات پس از تیمار با غلظت ۱≥ میکروگرم بر میلی‌لیتر نسبت به گروه

شاهد کاهش معنی‌دار داشت. اما سلول زنده‌مانی فیبروبلاست از غلظت ۲≥ میکروگرم بر میلی‌لیتر و زنده‌مانی سلول روده

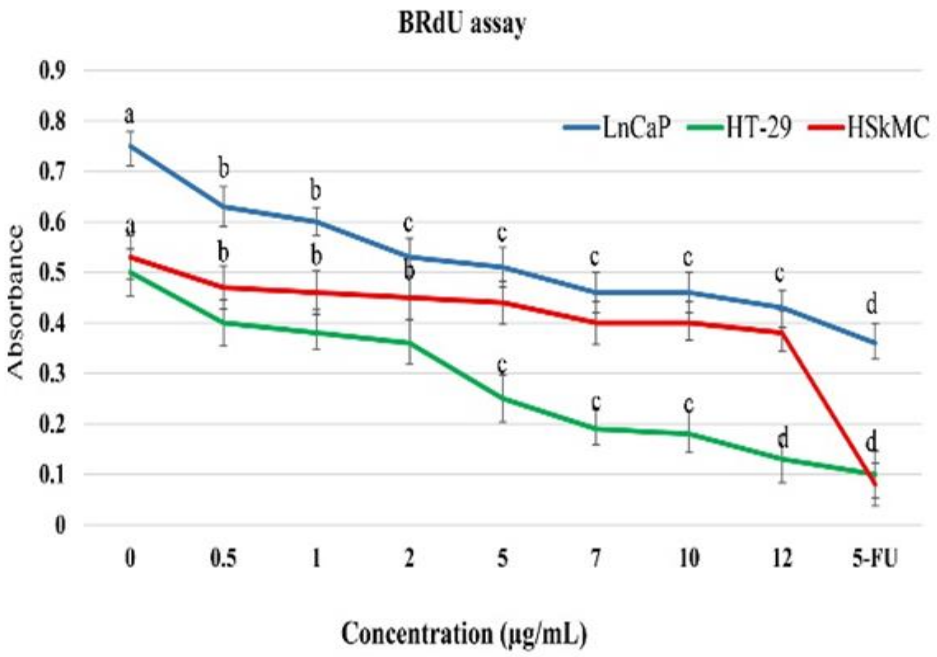
بزرگ از غلظت ۱۰≥ میکروگرم بر میلی‌لیتر کاهش معنی‌دار نشان داد. هم‌چنین نتایج نشان می‌دهد میزان کشندگی غلظت ۱۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصاره نزدیک به‌میزان کشندگی داروی فلورواوراسیل است که یک داروی متداول در شیمی‌درمانی سرطان می‌باشد (شکل ۲).




شکل ۲: زنده‌مانی سلول‌های سرطان پروستات (LNCaP)، روده بزرگ (HT-29) و فیبروبلاست (HSkMC) پس از ۲۴ ساعت تیمار با چند غلظت از عصاره تمرهندی و داروی فلورواوراسیل. داده‌ها به‌صورت mean ±SE چهار تکرار ارائه شده‌اند. * تفاوت معنی‌داری در سطح یک‌صدم در مقایسه با سلول‌های تیمار نشده (غلظت صفر) را نشان می‌دهد.

بررسی میزان تکثیر سلولی با استفاده از سنجش BrdU

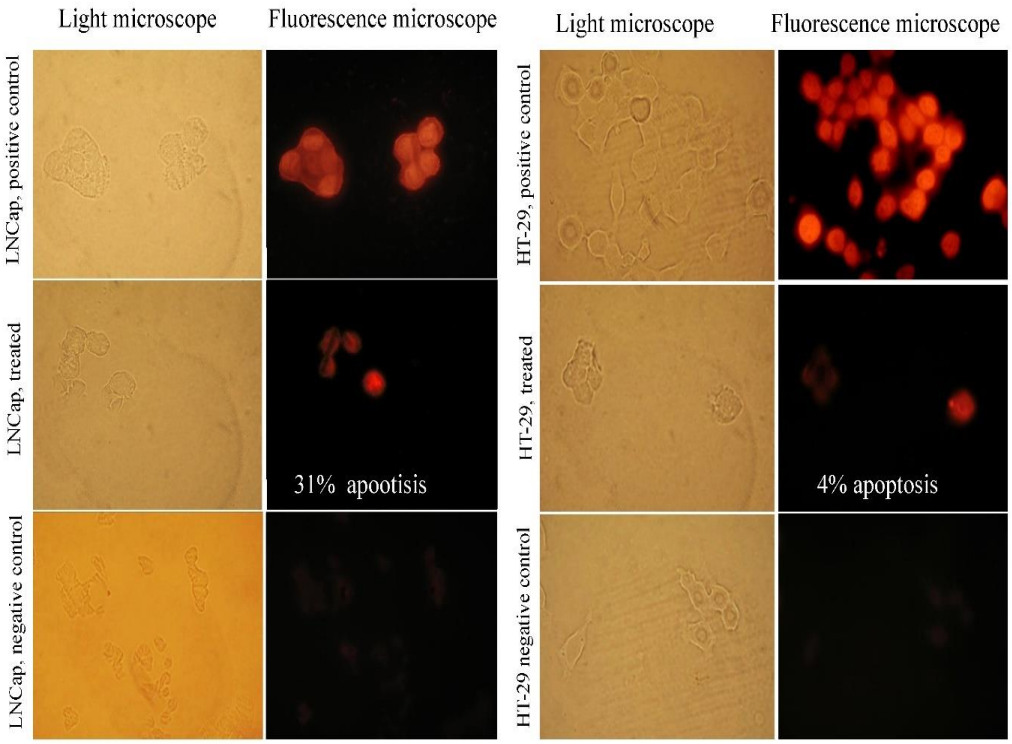
در بخش دوم به‌منظور بررسی اثر ممانعت‌کننده عصاره روی تکثیر سلول و میزان ساخت DNA، سلول‌ها با هفت غلظت از عصاره گیاه تمرهندی به‌همراه داروی فلورواوراسیل به‌مدت ۲۴ ساعت تیمار شده و آزمون BrdU انجام شد. نتایج مبین تکثیر بیش‌تر سلول‌های سرطان پروستات نسبت به‌دو سلول دیگر در حالت طبیعی (بدون تیمار) بود. پس از تیمار با عصاره، تاثیر کاهنده آن در میزان ساخت DNA در هر سه رده سلولی مشاهده شد. جالب آن‌که میزان کاهش تکثیر DNA که وابسته به غلظت بود، در سلول سرطان پروستات ۳۲ درصد، در سلول سرطان روده حدود ۳۷ درصد و در سلول فیبروبلاست کم‌تر از هر دو سلول سرطانی و ۱۵ درصد بود. میزان ساخت DNA در سلول‌هایی که با داروی فلورواوراسیل تیمار شده بودند نیز در هر سه سلول کاهش معنی‌دار نشان داد. اثر کاهشی فلورواوراسیل در سلول طبیعی فیبروبلاست شدیدتر از عصاره بود (شکل ۳).




شکل ۳: میزان ساخت DNA سلول‌های سرطان پروستات (LNCaP)، روده بزرگ (HT-29) و فیبروبلاست (HSkMC) پس از تیمار با چند غلظت از عصاره تمرهندی و داروی فلورواوراسیل به‌مدت ۲۴ ساعت. داده‌ها حاصل چهار تکرار بوده و آزمون معنی‌دار بودن تغییرات با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال یک صدم انجام شد. تفاوت در معنی‌دار بودن تغییرات با حروف (a, b, c, d) مشخص شده است.

بررسی میزان مرگ‌سلولی به‌روش آزمون TUNEL

در بخش آخر جهت بررسی تاثیر عصاره گیاه *T. indica* در القای مرگ‌سلولی دو رده سلولی سرطان پروستات و سرطان روده بزرگ، با غلظت ۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصاره به‌مدت ۲۴ ساعت تیمار شده و سپس تست TUNEL انجام شد. نتایج این آزمون رده سلولی سرطان پروستات را متحمل ۳۱ درصد و رده سلولی سرطان روده بزرگ را متحمل چهار درصد مرگ آپوپتوزی نشان داد. درحالی‌که نمونه کنترل مثبت که با آنزیم DNase تیمار شده است، ۱۰۰ درصد رنگ قرمز را نشان می‌دهد، در نمونه کنترل منفی هیچ رنگی دیده نشد. (رنگ مختصر ناشی از اتوفلورسانس سلول است) این نشان دهنده صحت و اعتبار رنگ‌آمیزی اختصاصی آپوپتوزی می‌باشد (شکل۴).




شکل ۴: نتیجه تست TUNEL روی سلول‌های LNCaP (ستون سمت چپ) و HT-29 (ستون سمت راست) تیمارشده با غلظت ۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصاره تمرهندی به‌مدت ۲۴ ساعت. در هر ستون، تصویر سمت چپ یک میدان را با میکروسکوپ نوری نشان می‌دهد و تصویر سمت راست همان میدان با میکروسکوپ فلورسانس نشان می‌دهد. مطابقت کامل سلول‌ها در دو تصویر به‌طور واضح دیده می‌شود. ردیف بالا نمونه کنترل مثبت است که سلول‌ها با DNase I تیمار شده‌اند و تمام سلول‌ها رنگ گرفته‌اند. ردیف پایین نمونه کنترل منفی است که هیچ تیماری روی سلول‌ها انجام نشده و لذا هیچ سلولی رنگ نگرفته است. این دو کنترل اختصاصی بودن و حساسیت روش را تایید می‌کنند. درصد سلول‌های رنگ شده که نشان دهنده میزان آپوپتوز می‌باشد به‌ترتیب به‌میزان ۴ درصد و ۳۱ درصد در سلول‌های سرطان روده و سرطان پروستات محاسبه و گزارش شد (بزرگ‌نمایی×۱۰۰۰).

## 5- بحث

جست‌وجوی ترکیبات ضدسرطان از منابع طبیعی هم‌چون گیاهان یکی از زمینه‌های جذاب محققین در سال‌های اخیر می‌باشد. در این طرح اثرات کشندگی، مهاری و ضدحیاتی عصاره گیاه تمرهندی روی دو سلول سرطانی و سلول طبیعی فیبروبلاست بررسی شد. هدف بررسی اثر عصاره روی تکثیر و زنده‌مانی سلول‌های فوق بود. نتایج مجموع روش‌های MTT، BrdU و تست TUNEL نشان داد سلول سرطانی پروستات (LnCaP) بیش‌ترین میزان تکثیر را در بین سه رده سلولی دارد (شکل ۲) و بیش‌تر از آن دو سلول دیگر تحت تاثیر عصاره قرار می‌گیرد. میزان $IC_{50}$ این سلول در مقایسه با دو سلول دیگر نیز کم‌تر بود که نشان از آن دارد رشد سلول سرطانی پروستات در مقایسه با دو سلول دیگر، با مقدار کم‌تری از عصاره مهار می‌شود. در مقابل سلول طبیعی فیبروبلاست کم‌ترین تاثیر را از عصاره داشت. ما کم‌ترین کاهش در تکثیر سلول که با اندازه گیری میزان سنتز DNA محاسبه می‌شود را در سلول فیبروبلاست تیمار شده با عصاره دیدیم. دلیل آن می‌تواند تقسیم کم‌تر سلول طبیعی در مقایسه با سلول سرطانی باشد و لذا تکثیر آن هم کمتر توسط عصاره مهار شده است. سلول سرطان پروستات پس از تیمار با غلظت‌های رو به افزایش عصاره، متحمل بیش‌ترین کشندگی وابسته به دوز و بیش‌ترین مهار ساخت DNA شد (شکل ۱ و ۲). هم‌چنین میزان مرگ آپوپتوزی پس از تیمار ۲۴ ساعته با هفت میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصاره تمرهندی در سلول سرطان پروستات خیلی بیش‌تر از سلول سرطان روده بود (شکل ۴). جالب توجه است که اثر کشندگی عصاره در همین غلظت هفت میکروگرم بر میلی‌لیتر که در سنجش MTT به‌دست آمد نیز تاییدکننده نتایج روش TUNEL می‌باشد (شکل ۱). بنابراین نتایج ما حاکی از آن است که اثرات کشندگی عصاره گیاه *T. indica* بر رده سلولی سرطان پروستات بیش‌تر از رده‌های سلولی سرطان روده بزرگ و فیبروبلاست است. حتی داروی فلورواوراسیل که یک داروی متداول در شیمی‌درمانی سرطان‌های بافت پوششی (کارسینوما) ازجمله دستگاه گوارش است نیز روی سلول پروستات بیش از بقیه کشنده بود. این دارو که آنالوگ اوراسیل است پس از تبدیل شدن به فرم فعال مهارکننده سنتز DNA می‌شود (۱۳). از آنجا که هم مهار سنتز DNA و هم میزان آپوپتوز در سلول سرطانی مشاهده شد، می‌توان حدس زد که احتمالا مهار سنتز DNA سبب راه‌اندازی مسیر داخلی آپوپتوز در این سلول‌های سرطانی شده است. تایید این نتیجه‌گیری نیاز به مطالعات بیش‌تر دارد که از دایره امکانات و هدف این طرح بیرون است. هرگونه آسیب به DNA و یا مهار همانندسازی آن می‌تواند به فعال‌شدن پروتئین P53 شود. پروتئین P53 با باز کردن کانال در غشای خارجی میتوکندری موجب می‌شود سیتوکروم C از میتوکندری به سیتوپلاسم وارد شود و به‌دنبال آن کاسپاز ۹ فعال می‌شد. درحالی‌که در مسیر خارجی آپوپتوزیس گیرنده‌های اختصاصی مرگ در سطح سلول فعال شده و سپس کاسپازهای ۸ یا ۱۰ فعال می‌شوند (۱۴). احتمال این‌که در عصاره ترکیباتی مانند لیگاند FAS وجود داشته باشند که بتوانند گیرنده مرگ را فعال کنند ضعیف است و تاکنون نیز وجود چنین ترکیباتی در این گیاه گزارش نشده است. بنابراین احتمال راه‌اندازی مسیر داخلی آپوپتوزیس توسط عصاره بیش‌تر است تا مسیر خارجی آپوپتوزیس.

رده‌های سلول سرطانی که از افراد و بافت‌های مختلف اخذ شده‌اند تفاوتهای ژنتیکی با هم دارند. این تفاوت‌ها باعث می‌شود که پاسخ آن‌ها به داروهای شیمی‌درمانی و هم‌چنین ترکیبات و عصاره‌های گیاهی متفاوت باشد. از همین‌رو یافته‌های ما نیز تاثیر کم‌تر عصاره گیاه تمرهندی روی سلول سرطان روده بزرگ در مقایسه با سلول سرطانی پروستات نشان داد. یافته‌های ما هم‌چنین نشان داد که عصاره مورد نظر بر سلول طبیعی فیبروبلاست اثر کم‌تری دارد. این‌که یک ترکیب یا عصاره روی سلول طبیعی کشندگی کم‌تری داشته باشد تا سلول سرطانی یک مزیت بالقوه برای آن ماده یا عصاره است. چراکه هر چه‌قدر اثرات مضر یک ترکیب یا داروی ضدسرطان روی سلول‌ها و بافت‌های طبیعی کم‌تر باشد، عوارض آن هم کم‌تر است. در سال ۲۰۱۲ گروهی از محققان پلی‌ساکارید گالاکتوزیلوگلوکان PST001 را از پوست دانه تمرهندی جدا کرده و اثر آن را روی چند رده سلول سرطان انسانی و موشی به‌روش MTT بررسی کردند. آنان مشاهده کردند اثر ضدتوموری ترکیب PST001 اگر با داروی فلورواوراسیل ترکیب شود خیلی بیش‌تر می‌شود (۱۵). مطالعات دیگری نیز نشان داده اند تحویل پلی‌ساکارید PST001 با روش‌های تحویل دارو مثل نانوپارتیکلهای طلا و لیپوزوم‌ها سبب افزایش اثربخشی آن روی سلول‌های سرطانی می‌شود (۶۱-۸۱). اخیرا گروه دیگری ترکیبات فنولی، فلاونوئیدی و آنتی‌اکسیدانت را از سه فراکشن از دانه تمرهندی جداسازی کردند. آن‌ها بیش‌ترین مقدار فنول و فلاونوئید را در فراکشن بوتانول دیدند.

نتایج تست MTT آن‌ها نشان داد فراکشن بوتانولی روی دو سلول MCF-7 و HePG2 به‌ترتیب ۷۲ و ۵۲ درصد کشندگی دارد (۸). در تحقیق دیگری در سال ۲۰۱۶ فعالیت آنتی‌اکسیدانتی و ضد سرطانی عصاره آبی و اتانولی دانه تمرهندی روی سلول‌های سرطانی مطالعه شد. همه عصاره‌ها فعالیت آنتی‌اکسیدانتی قوی از خود نشان دادند و روی سلول طبیعی اثر سمی نداشتند. اما اثر عصاره آبی و کشندگی آن روی سلول‌های سرطانی قوی‌تر بود (۱۹). نتایج تحقیق ما نیز مشابه همین تحقیق نشان داد اثر عصاره روی سلول طبیعی فیبروبلاست کم‌تر از سلول سرطانی می‌باشد. البته ما کل عصاره خام و نه یک بخش جدا شده از آن را روی سلول اثر دادیم و در مطالعات فوق ترکیب خاصی را جدا سازی کرده و سپس اثر زیستی آن را بررسی کردند. اثرات آنتی‌اکسیدانتی دانه تمرهندی را عمدتا به ترکیبات فنولی آن نسبت داده‌اند که در عصاره این ترکیبات فنولی حضور دارند (۱۰). ما در این تحقیق عصاره آبی-متانولی دانه گیاه را استفاده کردیم. می‌توان گفت بیش‌تر ترکیباتی که ترجیحا در آب و یا الکل حل می‌شوند در عصاره‌ای که ما تهیه کردیم نیز حضور دارند. مطالعات دیگری در زمینه ترکیبات و یا اثرات ضدسرطانی گیاه تمرهندی منتشر نشده است.

## ۶- نتیجه‌گیری

در مجموع می‌توان نتیجه گرفت عصاره هیدروالکلی دانه تمرهندی اثرات کشندگی قابل توجه‌ای روی سلول سرطان پروستات دارد. با توجه به مطالعات قبلی و نتایج این طرح موارد زیر برای تحقیقات آینده پیشنهاد می‌شود: آنالیز شیمیایی و شناسایی ترکیبات و متابولیت‌های ثانویه موجود در بخش‌های مختلف گیاه تمرهندی از قبیل دانه، گل و برگ. تحویل ترکیبات عصاره به سلول با استفاده از روش‌هایی مانند نیوزوم و لیپوزوم. مطالعه حیوانی اثر عصاره تمرهندی در جلوگیری از رشد تومور پروستات در موش‌های دارای سرطان.

## 7- تشکر و قدردانی

این مقاله از پایان نامه کارشناسی‌ارشد آقای مسعود پورعلی فارغ التحصیل دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی کرمان استخراج شده است. از آقای دکتر محمدحسین صالحی سورمقی به‌خاطر همکاری در تهیه نمونه و عصاره‌گیری تشکر می‌شود. نویسندگان هیچ‌گونه تضاد منافعی با یکدیگر ندارند.

## منابع

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. CA: A Cancer Journal for Clinicians. 2021;71(3):209-49.

2. Huang M, Lu J-J, Ding J. Natural Products in Cancer Therapy: Past, Present and Future. Natural Products and Bioprospecting. 2021;11(1):5-13.

3. Newman DJ, Cragg GM. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. J Nat Prod. 2020;83(3):770-803.

4. Vasan N, Baselga J, Hyman DM. A view on drug resistance in cancer. Nature. 2019;575(7782):299-309.

5. Zheng H-C. The molecular mechanisms of chemoresistance in cancers. Oncotarget. 2017;8(35):59950-64.

6. Komakech R, Kim YG, Matsabisa GM, Kang Y. Anti-inflammatory and analgesic potential of Tamarindus indica Linn. (Fabaceae): a narrative review. Integr Med Res. 2019;8(3):181-6.

7. Azman KF, Amom Z, Azlan A, Esa NM, et al. Antiobesity effect of Tamarindus indica L. pulp aqueous extract in high-fat diet-induced obese rats. J Nat Med. 2012;66(2):333-42.

8. Guneidy RA, Gad AM, Zaki ER, Ibrahim FM, et al. Antioxidant or pro-oxidant and glutathione transferase P1-1 inhibiting activities for Tamarindus indica seeds and their cytotoxic effect on MCF-7 cancer cell line. J Genet Eng Biotechnol. 2020;18(1):74.

9. Sreelekha TT, Vijayakumar T, Ankanthil R, Vijayan KK, et al. Immunomodulatory effects of a polysaccharide from Tamarindus indica. Anticancer Drugs. 1993;4(2):209-12.

10. Sudjaroen Y, Haubner R, Würtele G, Hull WE, et al. Isolation and structure elucidation of phenolic antioxidants from Tamarind (Tamarindus indica L.) seeds and pericarp. Food Chem Toxicol. 2005;43(11): 1673-82.

11. Havinga RM, Hartl A, Putscher J, Prehsler S, et al. Tamarindus indica L. (Fabaceae): patterns of use in traditional African medicine. J Ethnopharmacol. 2010;127(3):573-88.

12. Arshad MS, Imran M, Ahmed A, Sohaib M, et al. Tamarind: A diet-based strategy against lifestyle maladies. Food Sci Nutr. 2019;7(11):3378-90.

13. Longley DB, Harkin DP, Johnston PG. 5-Fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. Nature Reviews Cancer. 2003;3(5):330-8.

14. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. Toxicol Pathol. 2007;35(4):495-516.

15. Aravind SR, Joseph MM, Varghese S, Balaram P, et al. Antitumor and immunopotentiating activity of polysaccharide PST001 isolated from the seed kernel of Tamarindus indica: an in vivo study in mice. ScientificWorldJournal. 2012;2012: 1-14.

16. Govindappa M, Birawat R, Akshatha K, Raghavendra VB, et al. In vitro therapeutic evaluation of nanoliposome loaded with Xyloglucans polysaccharides from Tamarindus flower extract. Int J Biol Macromol. 2021;178:283-95.

17. Joseph MM, Aravind SR, George SK, Pillai KR, et al. Galactoxyloglucan-modified nanocarriers of doxorubicin for improved tumor-targeted drug delivery with minimal toxicity. J Biomed Nanotechnol. 2014;10(11):3253-68.

18. Joseph MM, Aswathy G, Manojkumar TK, Sreelekha TT. Galactoxyloglucan-doxorubicin nanoparticles exerts superior cytotoxic effects on cancer cells-A mechanistic and in silico approach. Int J Biol Macromol. 2016;92:20-9.

19. Soradech S, Petchtubtim I, Thongdon AJ, Muangman T. Development of Wax-Incorporated Emulsion Gel Beads for the Encapsulation and Intragastric Floating Delivery of the Active Antioxidant from Tamarindus indica L. Molecules. 2016;21(3):380.