مقاله پژوهشی

مجله سلول و بافت (علمی - پژوهشی)
جلد ۱۱، شماره ۱، بهار ۱۳۹۹

مقایسه‌ی اثرات ضدتکثیری و مرگ برنامه ریزی شده سلولی عصاره‌های گیاهان متفاوت در غلظت‌های مختلف بر رده‌ی سلول‌های سرطان سینه

لیلا سلطانی Ph.D.[1*]، مریم درب امامیه Ph.D.[2]

۱- دانشگاه رازی، دانشکده علوم و مهندسی کشاورزی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، گروه علوم دامی، کرمانشاه، ایران
۲- دانشگاه رازی، دانشکده کشاورزی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، گروه گیاه پزشکی، کرمانشاه، ایران

* پست الکترونیک نویسنده مسئول: Leilasoltani7@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۲/۲۲ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۵/۱۹

چکیده

هدف: هدف از این مطالعه مقایسه‌ی خواص ضدتکثیری و مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی عصاره‌های هیدروالکلی گیاهان مختلف (بومادران، سرخارگل، دانه‌ی خارمریم، پرسیاوش و هسته‌ی زردآلو) بر علیه سلول‌های سرطان سینه (Mcf-7) بود.

مواد و روش‌ها: برای این منظور گیاهان مربوطه خشک و آسیاب شدند. پس از خیساندن آن‌ها در اتانول ۷۰ درصد برای مدت ۷۲ ساعت، عصاره‌های آن‌ها با کمک دستگاه روتاری استحصال شد. مقادیر متفاوت از آن‌ها (۱۲/۵، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر) به محیط کشت سلول‌های سرطانی اضافه شد و خواص سمیت سلولی آن‌ها و مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی به‌ترتیب بعد از گذشت ۲۴ ساعت با کمک آزمون MTT و رنگ‌آمیزی با آکریدین‌نارنجی-اتیدیوم‌بروماید مورد بررسی قرار گرفت. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS، مقایسه میانگین دانکن در سطح معنی‌داری ۵ درصد مورد آنالیز قرار گرفتند.

نتایج: افزودن حداکثر غلظت در تمامی عصاره‌ها به محیط کشت نسبت به سایر غلظت‌های همان عصاره بیشترین تاثیر معنی‌داری ضدتکثیری و مرگ برنامه‌ریزی شده را نشان داد ($p<۰/۰۵$). همچنین در بین حداکثر غلظت‌ها (۱۰۰ میکروگرم/میلی‌لیتر) بیش‌ترین اثر سمیت سلولی مربوط به عصاره‌های پرسیاوش و سرخارگل بود ($p<۰/۰۵$).

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که افزودن غلظت‌های بالای عصاره‌های پرسیاوش و سرخارگل به محیط کشت بیش‌ترین تاثیر معنی‌دار ضدتکثیری و مرگ برنامه ریزی شده سلولی بر سلول‌های سرطان سینه در مقایسه با سایر عصاره‌های گیاهی و غلظت‌های مختلف بر جای گذاشته است.

واژگان کلیدی: مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی، سلول‌های سرطان سینه، سمیت سلولی، عصاره‌های گیاهی

مقدمه

سرطان سینه یکی از عوامل تهدیدکننده‌ی زندگی زنان است. در سال ۲۰۱۲، بیش از ۱/۶ میلیون نفر مبتلای جدید به این بیماری شناسایی شد که از میان آنان، ۵۲۱۹۰۷ نفر به خاطر ابتلا به این بیماری جان خود را از دست دادند (۱). عمل جراحی یکی از موثرترین درمان‌ها برای سرطان سینه است. شیمی‌درمانی، پرتودرمانی و هورمون‌درمانی به‌طور معمول جهت حذف باقی‌مانده‌های تومور و مهار رشد آن و کاهش وقوع مجدد سرطان سینه موثر است. این درمان‌ها سبب بهبود کیفیت و افزایش طول عمر بیماران مبتلا به سرطان سینه می‌شوند (۲). اما متاسفانه، برخی بیماران با اثرات جانبی مرتبط با درمان یا مقاومت به این گونه درمان‌ها مواجه می‌شوند. بنابراین، یافتن مواد زیستی فعال طبیعی، ممکن است جایگزین مناسبی برای درمان سرطان سینه یا کاهش عوارض جانبی درمان‌های متداول باشد. مطالعات زیادی در رابطه با اثر عصاره‌های گیاهی بر سرطان انجام شده است (۳) و تحقیقات متعددی اثربخشی مثبت مواد موثره‌ی گیاهی برسلول‌های سرطانی را نشان داده‌اند (۴-۶).

گیاه بومادران با نام علمی *Achille wihelmsii* Koch، از تیره‌ی کاسنی بوده و با داشتن ۱۰۰ جنس و ۲۰۰۰۰ گونه در تمامی سطح کره زمین پراکنده است و در مناطق مختلف اروپا، شمال آمریکا و نواحی معتدل آسیا از جمله ایران رشد می‌کند (۷، ۸). این گیاه که دارای ساقه‌ی ضخیم و استوانه‌ای کم و بیش ایستاده و تا حدودی پوشیده از کرک است، در فصل اردیبهشت و خرداد گل می‌دهد (۹). اسانس بومادران می‌تواند جهت پیش‌گیری از آسیب‌های کبدی ناشی از شیمی‌درمانی همراه با سیس پلاتین، به‌عنوان یک داروی گیاهی با خواص آنتی‌اکسیدانتی توصیه شود (۱۰). عصاره‌ی الکلی این گیاه کاهنده‌ی فشار سیستولی و دیاستولی خون است، اثر مهاری بر ترشح اسید با مهار تولید استیل کولین از عصب واگ اعمال می‌کند و علاوه‌برآن محرک سیستم ایمنی نیز است (۸ ، ۱۱-۱۲). دلالی و همکاران (۱۳)، اثرات سیستوتوکسیک عصاره‌ی متانولی و اسانس گیاه بومادران در غلظت‌های متفاوت را بر رده‌ی سلولی HT-29 سرطان کلون مورد ارزیابی قرار دادند. نتایج حاکی از این بود که اسانس برگ در مقایسه با عصاره‌ی متانولی، اثرات سمیت سلولی قوی‌تری دارد و این اثر می‌تواند به‌دلیل وجود ترکیبات مونوترپنی بالاتر همچنون ۱و۸ سینئول و آلفاپنتین باشد.

گیاه سرخارگل، *Echinacea purpurea* (L.)، از خانواده گیاهان ستاره‌آسا (Asteraceae) است (۱۴) که در طب سنتی برای پیش‌گیری و درمان بیماری‌هایی از قبیل سرماخوردگی معمولی، عفونت‌های ریوی، اختلالات جلدی و بیماری‌های مزمن ناشی از نقص سیستم ایمنی استفاده داشته است (۱۷-۱۵). برای اولین بار این گیاه در سال ۱۳۷۲ وارد ایران شد و سرخارگل نامیده شد (۱۸). کافئیک اسید موجود در سرخارگل که جزو مواد فنولی این گیاه است، اثرات آنتی‌اکسیدانتی اعمال می‌کند و منجر به مهار تکثیر سلول‌های سرطانی سینه و کبد نیز می‌شود (۲۰، ۱۹). علاوه‌براین، غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره‌ی آبی این گیاه سبب کاهش بقای سلول‌های سرطانی آستروسایتوما در طی بررسی با آزمون MTT شده بود (۲۱).

گیاه خار مریم، *Silybum marianum* (L.)،گیاهی گل‌دار از خانواده گل آفتاب‌گردان یا آستراسه می‌باشد. این گیاه بومی نواحی مدیترانه، شمال آفریقا و خاورمیانه است. نام خار مریم از دو ویژگی برگ‌های آن مشتق شده استکه خالدار سفید بوده و دارای عصاره شیری رنگ می‌باشد. از ۲۰۰۰ سال قبل گیاه‌شناسان از دانه‌های این گیاه جهت مراقبت از بافت کبد برضد سموم و درمان بیماری‌های مزمن استفاده می‌کردند (۲۳ و۲۲). مواد موثره‌ی گیاه خار مریم که طی فرایند عصاره گیری استخراج

می‌شود، سیلی‌مارین و اسیدلینولئیک می‌باشند (۲۴). بخشی از سیلی‌مارین، سیلی‌بینین با دو ایزومر A و B است که اثرات قوی بر سلول‌های توموری نظیر پروستات، کلون و مثانه اعمال می‌کند (۲۵).

گیاه دارویی پرسیاوشان (*Adiantum capillus-veneris* L.) متعلق به تیره‌ی بسپایکیان است. اثرات متفاوتی از قبیل: ضداستفراغ، ضدسرفه، تب‌بر، مسکن و غیره به این گیاه نسبت داده می‌شود (۲۶). محل رویش این گیاه دارویی در اروپای جنوبی، کوه‌های آلپ و سواحل آتلانتیک و همچنین شمال ایران است (۲۷). از جمله ترکیبات متفاوت در پرسیاوشان می‌توان به فلاونوئیدها، استرهای سولفات، هیدروکسی سینامیک‌اسید، کافئیک‌اسید، کاپیلارین، موسیلاژ، انواع تری‌ترپنوئیدها، استرول‌ها، تانن، صمغ، کوئینیک‌اسید، شیکیمیک‌اسید و قند اشاره کرد (۲۸). از طرفی ترکیبات متعدد آنتی‌اکسیدانتی در این گیاه شناسایی شده است وتحقیقات متعدد اثرات ضدتوموری، ضدمیکروبی، ضدالتهابی، ضدآلرژی، ضد دیابت و تنظیم‌کننده‌ی فعالیت تیروئید را نیز به آن نسبت داده‌اند (۳۵-۲۹).

زردآلو، *Prunus armeniaca* L.، به‌عنوان یکی از درختان هسته دار مناطق معتدله در بسیاری از نقاط ایران کشت و کار می‌شود. مناطق عمده‌ی کشت زردآلو در کشور شامل استان‌های آذربایجان شرقی، غربی، سمنان، تهران، یزد، کرمان، زنجان، و خراسان رضوی است و ایران بعد از ترکیه مقام دوم در تولید زدآلو را در جهان دارد (۳۶). بر طبق مطالعات روان و همکاران (۳۷) هسته‌های زردآلو و هلو که به‌شکل خام آن مصرف می‌شوند سبب القای مرگ برنامه ریزی شده سلولی و تمایز در سلول-های توموری می‌شوند. سلول‌های سرطانی DU145 و LNCaP پروستات انسان تغییرات مورفولوژیکی مرتبط با مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی و به‌همان اندازه افزایش بیان Bax و فعالیت آنزیم کاسپاز-۳ را، بعد از اضافه کردن عصاره‌ی هسته‌ی زردآلو را نشان می‌دهند (۳۷). هسته‌های زردآلو و هلو متشکل از موادی نظیر گلیکوزیدها به‌شکل آمیگدالین، روغن‌هایی نظیر اولئیک‌اسید و لینولئیک‌اسید، روغن‌های فرار مانند بنزالدئید هستند (۳۸). علاوه‌براین، هسته‌ی زردآلو حاوی پلی‌فنول‌هایی نظیر فلاونوئیدها و گالیک اسید نیز است (۳۸، ۳۹). در مطالعه‌ایی که اخیرا منتشر شده، افزودن غلظت‌های بالای عصاره‌ی هسته‌ی زردآلو به محیط کشت سلول‌های سرطان کلون HT-29 در یک دوره‌ی ۲۴ ساعته، سبب کاهش تکثیر سلول‌ها شده بود. این‌درحالی است که غلظت‌های پایین سبب افزایش تکثیر شده بودند. علاوه بر این محققین مشاهده کردند که غلظت‌های بالا پس از گذشت ۷۲ ساعت باعث افزایش تکثیر و غلظت‌های پایین سبب کاهش تکثیرسلول‌ها شده بودند (۴۰).

اطلاعات کمی راجع به مقایسه تاثیر گیاهان مختلف در القای مرگ برنامه‌ریزی شده و اثرات ضد تکثیری آن‌ها بر علیه سلول-های سرطانی وجود دارد. در این تحقیق بر آن شدیم که به مقایسه‌ی اثرات ضدسرطانی (در قالب سمیت سلولی و بررسی مرگ برنامه‌ریزی شده) عصاره‌های اتانولی چند گیاه متفاوت (بومادران، سرخارگل، خارمریم، پرسیاوشان و هسته‌ی زردآلو) در غلظت‌های متفاوت با کمک آزمون MTT و رنگ‌آمیزی فلوروسنت آکریدین نارنجی-اتیدیوم‌بروماید، بر علیه رده‌ی سلول‌های سرطانی سینه MCF-7 بپردازیم.

مواد و روش‌ها

این مطالعه‌ی پژوهشی در زمستان سال ۱۳۹۸ در آزمایشگاه کشت سلول دانشگاه رازی انجام گرفت.

تهیه عصاره گیاهی: نمونه‌های گیاه بومادران در خرداد ۹۸ از شهرستان کرمانشاه جمع‌آوری، شسته و خشک شدند. هسته‌های زردآلو نیز پس از مصرف میوه‌ی آن، تهیه و خشک شدند. سه گیاه پرسیاوش، دانه‌ی خارمریم و سرخارگل از عطاری تهیه شدند. جهت تهیه عصارهای الکلی، نمونه‌های گیاهی در الکل ۷۰ درصد خیسانده شدند (۴۱). برای اجرای کار، نمونه‌های گیاهی (بومادران، سرخارگل، دانه‌ی خار مریم، هسته زردآلو و پرسیاوشان) با استفاده از دستگاه آسیاب پودر شدند. ۱۰ گرم از پودر به‌دست آمده به ۱۰۰ میلی‌لیتر الکل ۷۰ درصد اضافه شد و برای مدت ۷۲ ساعت در دستگاه همزن در دمای اتاق مخلوط شد. در ادامه محلول گیاه و الکل سانتریفیوژ شد و مایع رویی با کمک کاغذ صافی واتمن ۱ صاف شد. سپس در جهت جداسازی الکل با کمک دستگاه روتاری (Heidolph Rotary Evaporator 4011) نمونه عصاره به بالن تقطیر دستگاه اضافه شد و در خلا در ۴۵ درجه سانتی‌گراد، بادور ۱۲۰ و زمان ۱۵ دقیقه جداسازی صورت گرفت. فاز آبی در آون (Memmert) در ۴۵ درجه‌ی سانتی‌گراد برای مدت ۴۸ ساعت خشک شده، پودر شد و تا زمان استفاده در فریزر ۲۰- سانتی‌گراد نگه‌داری شد. از عصاره‌های خشک شده، غلظت‌های متفاوت ۲۱/۵، ۵۲، ۰۵ و ۰۰۱ میکروگرم در میلی‌لیتر آب برای استفاده تهیه شد.

رده‌ی سلولی MCF-7 از رده‌های سلولی سرطان سینه، از بانک سلولی انسیتیو پاستور تهیه شد و جهت فرآیند کشت مورد استفاده قرار گرفت. محیط کشت DMEM (Gibco) مکمل شده با ۱۰ درصد سرم گوساله‌ی جنینی FBS (Gibco) همراه با ۱ درصد آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین و استرپتومایسین (Sigma)، جهت اجرای آزمایش‌ها مورد استفاده قرار گرفت. سلول‌ها پس از کشت در محیط کشت DMEM مکمل شده با FBS و آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین و استرپتومایسین در انکوباتور (Binder) حاوی ۵ درصد دی‌اکسیدکربن، هوای اتمسفری مرطوب، و ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت و تکثیر شدند. از سلول‌های پاساژ سوم جهت مراحل کار استفاده شد. جهت شمارش سلولی و بررسی تعداد سلول‌های زنده، از رنگ تریپان بلو و لام هموسایتومتر استفاده شد (۴۲).

بررسی تاثیر سمیت عصاره‌های گیاهی بر سلول‌های سرطان سینه: جهت بررسی سمیت عصاره‌های گیاهی بر سلول‌های سرطان سینه از تست MTT (Sigma) استفاده شد. جهت انجام آن پودر MTT به‌حالت محلول با غلظت ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در بافر DPBS حل شد. در ادامه محلول تهیه شده با استفاده از فیلتر ۰/۲ میکرومتر جهت حذف آلودگی‌های احتمالی و همچنین باقی‌مانده‌های حل نشده‌ی پودر MTT فیلتر شد. رنگ تا زمان استفاده در فریزر نگه‌داری شد. سلول‌های مورد نظر با غلظت ۰۰۰۰۱ سلول در پلیت ۶۹ خانه کشت شدند. محیط رویی این سلول‌ها MEMD مکمل شده با ۰۱ درصد سرم گوساله‌ی جنینی و آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین و استرپتومایسین بود. برای هر عصاره ۴ غلظت در سه تکرار سلول در چاهک‌ها کشت شد. سلول‌ها در شرایط یکسان در انکوباتور کشت سلول ۵ درصد دی‌اکسیدکربن، هوای اتمسفری مرطوب، و ۷۳ درجه‌ی سانتی‌گراد کشت شدند. علاوه‌براین، جهت رسم نمودار استاندارد و محاسبه‌ی تعداد سلول-های گروه‌های تیماری، سلول‌ها با غلظت‌های متفاوت ۰۰۰۰۱، ۰۰۰۰۲، ۰۰۰۰۳، ۰۰۰۰۴، ۰۰۰۰۵ سلول در سه تکرار در پلیت ۶۹ خانه در همان روز کشت شدند. پس از گذشت ۴۲ ساعت از کشت، محیط کشت رویی خارج شد و به سلول‌ها محیط جدید با غلظت‌های متفاوت عصاره‌های اتانولی بومادران، خارمریم، سرخارگل، پرسیاوشان و هسته‌ی زردآلو در غلظت‌های متفاوت (۲۱/۵، ۵۲، ۰۵ و ۰۰۱ میکروگرم در میلی‌لیتر) اضافه شد. بعد از طی زمان انکوباسیون ۴۲ ساعت، ۰۲ میکرولیتر از

محلول TTM به سلول‌ها اضافه شد. در ادامه، سلول‌ها برای مدت زمان ۴ ساعت در انکوباتور انکوبه شدند. پس از پایان زمان انکوباسیون، مایع رویی برداشته شد. به‌هر چاهک ۰۰۱ میکرولیتر محلول amgiS(OSMD(اضافه شد. پس از حل شدن کریستال‌های بنفش رنگ، در دستگاه الایزاریدر 2SX evaW rewoP(keToiB(با طول موج ۰۷۵ نانومتر خوانش انجام گرفت (۳۴).

سنجش میزان مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی با کمک رنگ آکریدین‌نارنجی-اتیدیوم‌بروماید: برای انجام این آزمون و بررسی القای مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی، غلظت‌های مختلف عصاره‌های الکلی گیاهی (۱۲/۵، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) به محیط کشت سلول‌های سرطان سینه اضافه شد. بعد از گذشت ۲۴ ساعت از کشت، به‌وسیله‌ی رنگ آمیزی آکریدین نارنجی-اتیدیوم بروماید، مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی سلول‌ها مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور، پس از اتمام دوره‌ی کشت، مایع رویی سلول‌ها حذف شدند و با محلول بافر DPBS شست‌وشو انجام گرفت. در ادامه، سلول‌ها توسط محلول پارافرم‌آلدهید ۴ درصد برای مدت زمان ۱۵ دقیقه ثابت شدند. سپس مایع رویی حاوی محلول ثابت کننده، حذف شد و به آن DPBS اضافه شد. در ادامه، در زمان عکس‌برداری به‌هر چاهک ۲ میکرولیتر محلول آکریدین نارنجی-اتیدیوم بروماید (نسبت حجمی ۱:۱ هر کدام از رنگ‌ها) اضافه شد و پیپیتاژ شد. نهایتا، نمونه‌ها زیر میکروسکوپ فلورسانس ارزیابی، شمارش و عکس‌برداری شدند (۴۴).

تحلیل آماری

جهت اجرای آزمون MTT، همان‌طور که در قسمت مواد و روش‌ها ذکر شد، غلظت‌های متفاوت سلولی کشت شدند تا بتوان در اکسل نمودار استاندارد را رسم کرد. از فرمول رگرسیونی که نمودار استاندارد ارائه داد، با کمک OD حاصل از آزمون MTT عصاره‌های الکلی گیاهی مختلف و در غلظت‌های متفاوت، تغییرات تعداد سلول‌ها محاسبه شد. پس از محاسبه تعداد سلول‌ها با توجه به این‌که حدقل سه تکرار برای هر تیمار وجود دارد، نمونه‌ها وارد نرم افزار SSPS (ورژن ۶۱) شد و آنالیز آماری در قالب طرح فاکتوریل کاملا تصادفی و مقایسه میانگین دانکن صورت گرفت. جهت آزمون مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی نیز در قالب طرح فاکتوریل کاملا تصادفی و مقایسه میانگین دانکن، آنالیز آماری صورت گرفت. داده‌ها در سطح معنی‌داری ۵ درصد مورد آنالیز قرار گرفتند.

نتایج

نتایج این مطالعه نشان داد که افزودن غلظت‌های متفاوت عصاره‌های گیاهان ذکر شده (بومادران، سرخارگل، پرسیاوش و هسته‌ی زردآلود) به محیط کشت سلول‌های سرطانی، سبب کاهش تکثیر و افزایش مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی در سلول‌های سرطان سینه شده بود (جدول ۱و ۲ شکل ۱). بیش‌ترین میزان کاهش تکثیر و افزایش مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی، مربوط به غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بود ($p<۰/۰۵$). البته بایستی توجه داشت که کم‌ترین میزان کاهش تکثیر و افزایش میزان مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی مربوط به غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از عصاره‌های پرسیاوش و سرخارگل بود که نسبت به سایر عصاره‌ها با همان غلظت اختلاف معنی‌دار نشان می‌داد (جدول ۱و ۲) ($p<۰/۰۵$). در

مطالعه‌ی حاضر کمترین اثر کشندگی و مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی مربوط به عصاره‌ی اتانولی دانه‌ی گیاه خار مریم بود (p>۰/۰۵). هرچند که غلظت ۱۰۰ این عصاره در مقایسه با سایر غلظت‌های آن بیش‌ترین تاثیر را داشت (p<۰/۰۵). علاوه‌براین، غلظت ۱۰۰ عصاره‌ی خارمریم نسبت به سایر عصاره‌ها با همین مقدار،کم‌ترین تاثیر کشندگی و مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی را داشت.

جدول ۱: بررسی میزان سمیت سلولی غلظت‌های مختلف عصاره‌ی گیاهان مختلف (بومادران، خارمریم، سرخارگل، پرسیاوش و هسته‌ی زردآلو)- با کمک آزمون MTT

تیمار	تعداد سلول‌های زنده پس از آزمون MTT
شاهد	۱۰۹۹۴± ۸۵/۶۶[bc]
عصاره بومادران غلظت ۱۲/۵ میکروگرم در میلی لیتر	۱۰۰۴۸± ۹۲/۷۶[f]
عصاره بومادران غلظت ۲۵ میکروگرم در میلی لیتر	۸۹۱۶± ۷۸/۹۲[j]
عصاره بومادران غلظت ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر	۹۲۴۲±۷۵/۱۲[i]
عصاره بومادران غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر	۷۷۵۰±۵۲/۴۵[l]
عصاره خارمریم غلظت ۱۲/۵ میکروگرم در میلی لیتر	۱۱۵۲۵±۶۸/۰۱[a]
عصاره خار مریم غلظت ۲۵ میکروگرم در میلی لیتر	۱۱۱۴۱±۷۵/۴۰[b]
عصاره خار مریم غلظت ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر	۱۰۸۴۳±۹۷/۶۱[c]
عصاره خار مریم غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر	۹۲۸۷±۸۳/۶۰[hi]
عصاره سرخارگل غلظت ۱۲/۵ میکروگرم در میلی لیتر	۱۰۵۸۵±۶۳/۰۷[d]
عصاره سرخارگل غلظت ۲۵ میکروگرم در میلی لیتر	۱۰۴۴۱±۱۷۵/۷۴[ed]
عصاره سرخارگل غلظت ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر	۹۴۳۰±۱۰۴/۹۲[h]
عصاره سرخارگل غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر	۶۵۹۶±۱۴۸/۱۳[o]
عصاره پرسیاوش غلظت ۱۲/۵ میکروگرم در میلی لیتر	۹۸۷۶±۸۹/۱۵[g]
عصاره پرسیاوش غلظت ۲۵ میکروگرم در میلی لیتر	۸۹۲۹±۳۹/۵۲[j]
عصاره پرسیاوش غلظت ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر	۷۹۸۲±۶۵/۶۳[k]
عصاره پرسیاوش غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر	۶۷۶۹±۴۹/۳۶[n]
عصاره هسته‌ی زردآلو غلظت ۱۲/۵ میکروگرم در میلی لیتر	۱۰۳۱۳±۱۱۴/۱۶[e]
عصاره هسته‌ی زردآلو غلظت ۲۵ میکروگرم در میلی لیتر	۹۲۳۲±۵۵/۰۹[i]
عصاره هسته‌ی زردآلو غلظت ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر	۷۹۵۸±۵۵/۰۹[k]
عصاره هسته‌ی زردآلو غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر	۷۳۰۲±۶۴/۹۸[m]

میانگین‌های دارای حروف متفاوت در هر ستون اختلاف معنی‌دار دارند.

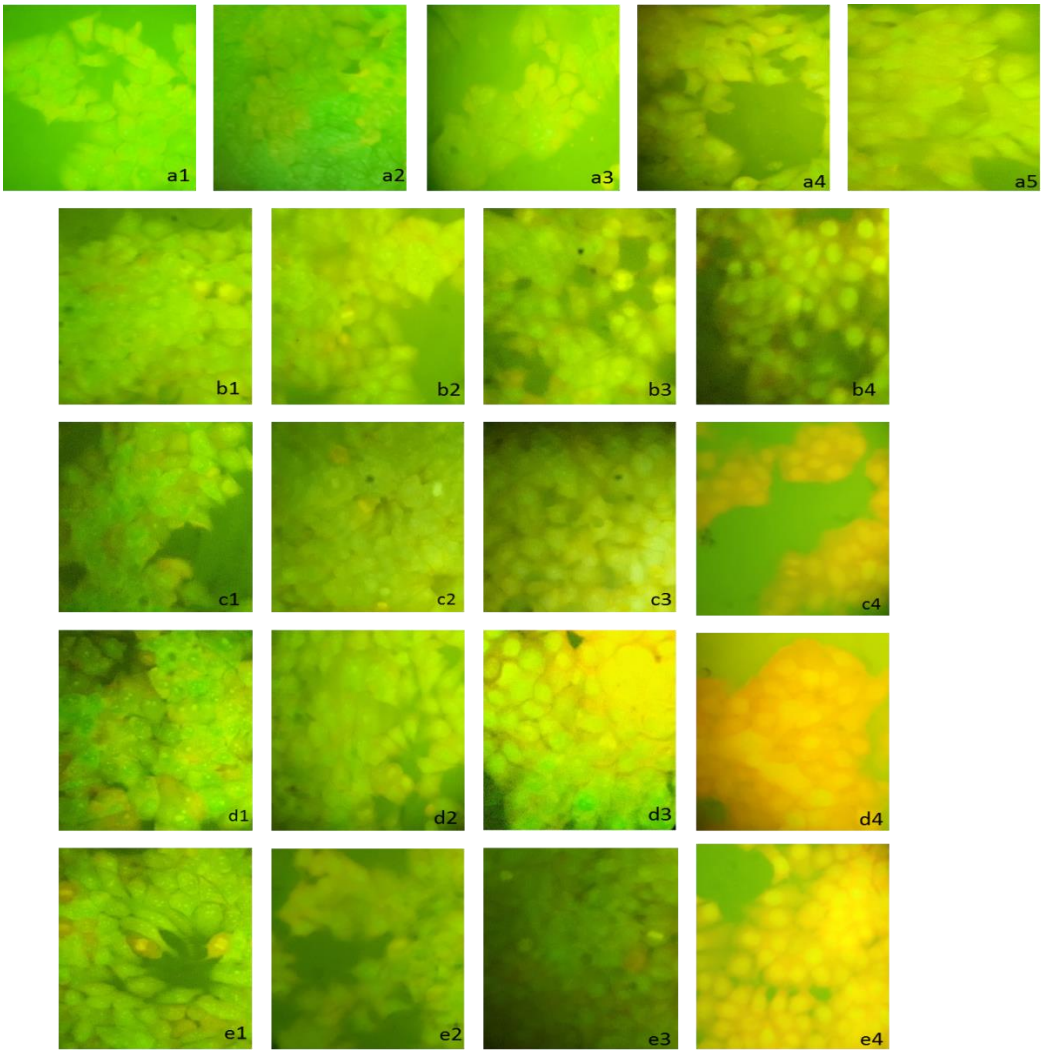
میانگین‌های دارای حروف مشترک در هر ستون نشان‌دهنده‌ی عدم اختلاف معنی‌دار بین گروههای تیماری است.

جدول ۲: درصد زنده‌مانی سلول‌های سرطان سینه رده‌ی (MCF-7) پس از تیمار با غلظت‌های مختلف عصاره‌ی گیاهان مختلف (بومادران، خارمریم، سرخارگل، پرسیاوش و هسته‌ی زردآلو) – با کمک ارزیابی آکریدین نارنجی- اتیدیوم بروماید

تیمار	درصد زنده‌مانی پس از بررسی مرگ برنامه ریزی شده سلولی با رنگ‌آمیزی آکریدین نارنجی-اتیدیوم بروماید
شاهد	۹۹/۵۶± ۰/۷۶[a]
عصاره بومادران غلظت ۱۲/۵ میکروگرم در میلی لیتر	۹۸/۱۷ ± ۰/۷۹[a]
عصاره بومادران غلظت ۲۵ میکروگرم در میلی لیتر	۹۱/۱۲ ± ۱/۹۴[cde]
عصاره بومادران غلظت ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر	۸۸/۲۴ ± ۱/۱۶[ef]
عصاره بومادران غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر	۷۲/۸۹ ± ۲/۱۴[h]
عصاره خارمریم غلظت ۱۲/۵ میکروگرم در میلی لیتر	۹۸/۶۸ ± ۱/۳۲[a]
عصاره خار مریم غلظت ۲۵ میکروگرم در میلی لیتر	۹۷/۹۴ ± ۲/۳۹[a]
عصاره خار مریم غلظت ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر	۹۶/۹۳ ± ۰/۶۳[ab]
عصاره خار مریم غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر	۸۹/۲۱ ± ۲/۰۹[def]
عصاره سرخارگل غلظت ۱۲/۵ میکروگرم در میلی لیتر	۹۵/۹۳ ± ۲/۲۵[ab]
عصاره سرخارگل غلظت ۲۵ میکروگرم در میلی لیتر	۹۲/۹۳ ± ۰/۶۷[bcd]
عصاره سرخارگل غلظت ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر	۸۸/۰۳ ± ۲/۷۴[ef]
عصاره سرخارگل غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر	۶۰/۱۱ ± ۲/۲۹[j]
عصاره پرسیاوش غلظت ۱۲/۵ میکروگرم در میلی لیتر	۹۳/۸ ± ۱/۴۰[bc]
عصاره پرسیاوش غلظت ۲۵ میکروگرم در میلی لیتر	۸۶/۸۰ ± ۲/۴۷[f]
عصاره پرسیاوش غلظت ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر	۸۰/۲۸ ± ۲/۹۴[g]
عصاره پرسیاوش غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر	۵۹/۳۳ ± ۳/۸۸[j]
عصاره هسته‌ی زردآلو غلظت ۱۲/۵ میکروگرم در میلی لیتر	۹۵/۹۶ ± ۲/۳۸[ab]
عصاره هسته‌ی زردآلو غلظت ۲۵ میکروگرم در میلی لیتر	۸۷/۱۳ ± ۱/۱۰[ef]
عصاره هسته‌ی زردآلو غلظت ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر	۸۵/۱۷ ± ۲/۴۱[f]
عصاره هسته‌ی زردآلو غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر	۶۵/۲۸ ±۲/۲۷[i]

میانگین‌های دارای حروف متفاوت در هر ستون اختلاف معنی‌دار دارند.

میانگین‌های دارای حروف مشترک در هر ستون نشان‌دهنده‌ی عدم اختلاف معنی‌دار بین گروههای تیماری است.



شکل۱: رنگ آمیزی همزمان اتیدیوم بروماید-آکریدین نارنجی سلول‌های سرطانی تیمار شده با غلظت‌های مختلف عصاره گیاهی مختلف (a1: شاهد، a2: غلظت ۱۲/۵ میکروگرم در میلی لیتر عصاره بومادران، a3: غلظت ۲۵ میکروگرم در میلی لیتر عصاره بومادران، a4: غلظت ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر عصاره بومادران، a5: غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر عصاره بومادران، b1: غلظت ۱۲/۵ میکروگرم در میلی لیتر عصاره خارمریم، b2: غلظت ۲۵ میکروگرم در میلی لیتر عصاره خار مریم، b3: غلظت ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر عصاره خار مریم، b4: غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر عصاره خار مریم، c1: غلظت ۱۲/۵ میکروگرم در میلی لیتر عصاره سرخارگل، c2: غلظت ۲۵ میکروگرم در میلی لیتر عصاره سرخارگل، c3: غلظت ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر عصاره سرخارگل، c4: غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر عصاره سرخارگل، d1: غلظت ۱۲/۵ میکروگرم در میلی لیتر عصاره پرسیاوش، d2: غلظت ۲۵ میکروگرم در میلی لیتر عصاره پرسیاوش ، d3: غلظت ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر عصاره پرسیاوش ، d4: غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر عصاره پرسیاوش، e1: غلظت ۱۲/۵ میکروگرم در میلی لیتر عصاره هسته‌ی زردآلو ، e2: غلظت ۲۵ میکروگرم در میلی لیتر عصاره هسته‌ی زردآلو ، e3: غلظت ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر عصاره هسته‌ی زردآلو ، e4: غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر عصاره هسته‌ی زردآلو).

بحث

بیشتر بیماران سرطانی در اثر رشد اولیه‌ی تومور جان خود را از دست نمی‌دهند، بلکه در پی رشد و توسعه‌ی آن جانشان در معرض خطر قرار می‌گیرد. جلوگیری و مهار رشد تومور مهاجم و متاسازی، ابزاری امیدوارکننده جهت کاهش مرگ و میر بیماران مبتلا به تومورهای بدخیم است. در سال‌های اخیر مطالعات بر روی داروهای ضدتومور رو به افزایش است. برخی از این مطالعات بر روی مواد طبیعی انجام می‌گیرد تا قابلیت جایگزینی درمان در برخی سرطان‌ها از جمله سرطان سینه بررسی شد (۴۷-۴۵). برخی بخش‌های داروهای گیاهی از قبیل، ریشه‌ها، ساقه‌ها، برگ‌ها و گل‌ها برای تولید غذا و درمان بر علیه برخی از بیماری‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند که می‌توانند حاوی متابولیت‌های اولیه و ثانویه باشند. متابولیت‌های اولیه همان کربوهیدرات‌ها، پروتئین‌ها، و لیپیدها هستند درحالی‌که متابولیت‌های ثانویه شامل فلاونوئیدها، کاروتنوئیدها، ترپنوئیدها

هستند که نقش مهمی در انواع فعالیت‌های بیولوژیکی برعهده دارند. علی‌رغم افزایش تحقیقات در این زمینه، هنوز ابهامات زیادی برای گسترش استفاده کاربردی از این ترکیبات وجود دارد.

در مطالعه‌ی حاضر، غلظت‌های بالای عصاره‌های هیدروالکلی کلیه گیاهان مورد استفاده، در مقایسه با غلظت‌های پایین آن اثرات معنی‌دار به مراتب بالاتری در زمینه‌های ضدتکثیری و مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی نشان می‌داد. علاوه‌براین، غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از گیاهان سرخارگل و پرسیاوش در مقایسه با سه گیاه دیگر تاثیر ضدتکثیری و مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی بالاتری را نشان می‌داد.

در مطالعات دیگر نیز تاثیرات مثبت این عصاره‌ها بر سلول‌های سرطانی مختلف ثبت شده است. در مطالعه‌ی جعفریانی و همکاران (۲۱) که از عصاره‌ی آبی سرخارگل بر سلول‌های سرطانی آستروسایتوما استفاده کردند، تاثیر مثبت غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر را طی آزمون MTT مشاهده کردند که این غلظت سبب کاهش بقای سلول‌ها شده بود. در مطالعه‌ی دیگر تاثیر عصاره‌ی هیدروالکلی گل‌های سرخارگل و ماده‌ی موثره‌ی آن (Cichoric acid) بر سلول‌های سرطان کولون انسانی Cavo-2 و HCT-116 مورد بررسی قرار گرفت. اثرات سمی این ترکیبات بر تکثیر سرطانی هر دو رده تایید شده بود (۴۸). علاوه‌براین، بخش هگزان عصاره‌ی ریشه‌ی سه گونه‌ی سرخارگل اثرات ضد سرطانی خود را اثبات کرده‌اند (۴۹). در مطالعه‌ایی دیگر تاثیر عصاره‌ی هیدروالکلی ریشه‌ی مخلوط دو گونه‌ی سرخارگل بر رده‌های مختلف سلولی در غلظت‌های متفاوت مورد ارزیابی قرار گرفت. مشاهده شد که عصاره‌ی مخلوط سبب افزایش رشد سلول‌های سرطانی Hela و QBC-939 می‌شود (۵۰). عصاره‌ی گیاه سرخارگل از ترکیبات متعددی شامل، ترکیبات قطبی (مشتقات کافئیک‌اسید)، غیرقطبی (آلکیل‌آمیدها و متابولیت‌های ثانویه‌ی استیلنی) و ساختارهای با وزن‌مولکولی بالا (پلی‌ساکاریدها و گلیکوپروتئین‌ها) تشکیل شده است. آلکیل‌آمیدهای جداسازی شده از گونه‌های سرخارگل اغلب متابولیت‌های ثانویه‌ای با یک یا بیش از یک گروه استیلنی در بخش انتهای زنجیره‌ی خود هستند که فعالیت‌های بیولوژیکی متعددی از خود نشان می‌دهند (۵۱). ترکیبات استیلنی منابع مختلف اثرات سمی برعلیه سلول‌های سرطانی اعمال می‌کنند و فعالیت سمیت سلولی داروهای ضدسرطانی را نیز افزایش می‌دهند (۵۲). مصرف عصاره‌ی ریشه‌ی آن سبب تحریک تولید سایتوکین TNF به‌وسیله‌ی کانکاوالین-A توسط سلول‌های طحال شده است (۵۳). مطالعات دیگری نیز مشابه با مطالعه‌ی حاضر تاثیر مثبت عصاره‌ی پرسیاوش را بر سلول‌های سرطانی مورد ارزیابی قرار داده‌اند. عصاره‌ی پرسیاوش دارای اثرات ضدسرطانی است که فعالیت خود را از طریق پروتئین‌های دخیل در چرخه‌ی سلولی و مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی یعنی Bcl-2 و سیکلین D1 اعمال می‌کند (۵۴). در مطالعه‌ایی دیگر اثر سمیت بخش‌های هوایی و زیرزمینی پرسیاوشان بر مهار رشد سلول‌های رده‌ی سرطان سینه مورد تایید قرار گرفته است (۵۵). در بخش‌های متعدد دنیا از گیاهان دارویی برای تقویت سلامتی استفاده می‌شود عصاره‌ی متانولی پرسیاوش اثرات ضدسرطانی را نشان داده است (۵۶).

عصاره‌ی هسته‌ی زردآلو نیز اثرات مثبت ضدتکثیری و القای مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی بر سلول‌های مورد مطالعه اعمال کرده بود. گرچه این غلظت در مقایسه با بومادران و دانه‌ی خارمریم اثرات معنی‌دار بیش‌تری نشان می‌داد، اما در مقایسه با سرخارگل و پرسیاوش تاثیر ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر آن معنی‌دار نبود. بررسی خواص آنتی‌اکسیدانتی عصاره‌ی واریته‌های مختلف هسته‌ی زردآلو در مطالعه دیگری نشان داده است که واریته‌های Habbi، Waflu Chuli، Thukdeena و Balaani منابع غنی از ترکیبات بیواکتیو و آنتی‌اکسیدانتی هستند. بیش‌ترین فعالیت مهار رشد سلول‌های سرطانی (HepG2) در واریته‌ی Waflu Chuli دیده شده هرچند که ارتباطی بین محتوی فیتوشیمیایی و مهار تکثیر سلول‌های سرطانی پیدا نشده است (۵۷). در مطالعه‌ی ما از مخلوطی از هسته‌های واریته‌های متفاوت زردآلو عصاره‌گیری انجام گرفت.

شاید اگر ما نیز مشابه با مطالعه‌ی چن و همکاران (۵۷) در سال ۲۰۱۹، از واریته‌های مختلف عصاره‌گیری انجام می‌دادیم تاثیرات به‌مراتب مثبت‌تر را در این مطالعه مشاهده می‌نمودیم و اختلافات بین واریته‌ها نیز مشخص می‌شد. در مطالعه‌ی دیگر اثرات ضدتکثیری غلظت‌های متفاوت عصاره‌ی هسته‌ی زردآلو بر روی سلول‌های سرطان کولون HT-29 مورد ارزیابی قرار گرفت. پس از گذشت ۲۴ ساعت، غلظت‌های پایین محرک رشد سلول‌های سرطانی بوده و غلظت‌های بالا به‌عنوان مهارکننده-ی رشد عمل کرده است. این‌درحالی بود که پس از گذشت ۷۲ ساعت، غلظت پایین اثرات مهارکنندگی داشته و غلظت‌های بالا اثرات محرکی برای تکثیر سلول‌های سرطانی اعمال کرده‌اند (۴۰).

اثر سودمند غلظت بالای بومادران در مطالعه‌ی ما مشاهده شده است هر چند که نسبت به غلظت بالای عصاره‌ی سرخارگل، پرسیاوش و هسته‌ی زردآلو معنی‌دار نبود. شاهانی و همکاران (۵۸) اثرات سودمند عصاره‌ی متانولی گیاه بومادران را بر مهار رشد سلول‌های سرطانی پروستات همراه با bleomycin مورد بررسی قرار داده‌اند. این محققین برخلاف مطالعه‌ی ما که از عصاره‌ی اتانولی استفاده نمودیم، از عصاره متانولی و همچنین از غلظت‌های بسیار بالای این عصاره در مطالعه‌ی خود استفاده کردند (۲۰، ۵۰، ۱۰۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) و اثرات ضدتکثیری را در ترکیب با bleomycin و به‌تنهایی مشاهده نمودند. به‌علاوه، در آن مطالعه مشاهده شد که عصاره‌ی متانولی بومادران سبب مهار رشد سلول‌های طبیعی پوست انسان HFFF2 نمی‌شود (۵۴). متابولیت‌های Guaianolide جداسازی شده از عصاره‌ی گیاه بومادران، پتانسیل ضدتکثیری بالایی را بر پنج رده‌ی سلولی تومور سرطان ریه در انسان ارائه نموده و حتی در آن مطالعه گزارش شده که از سیس-پلاتین نیز قویتر عمل کرده است (۵۹). مطالعات دیگری نیز اثرات ضدتکثیری عصاره بومادران را بر رده‌های سرطانی سلول‌های کبدی (۶۰) نشان داده‌اند. علاوه‌براین در سال ۲۰۱۷، در مطالعه‌ی دیگر بر روی سلول‌های سرطانی پروستات (PC3) مشاهده شد که عصاره‌ی هیدروالکلی بومادران علاوه‌بر اعمال اثرات ضدتکثیری و مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی، قادر به مهار بیان تلومراز ترانس‌کریپتاز معکوس انسانی در سلول‌های سرطان پروستات انسان بود (۶۱). براساس این مطالعه، آسیب کبدی به سلول‌ها و هپاتوسیت، ناشی از مصرف سیس‌پلاتین در موش‌های صحرایی پس از مصرف اسانس و عصاره‌ی بومادران کاهش یافته بود (۱۰).

در جستجوی داروهایی با اثرات ضدسرطانی و بدون اثرات جانبی که تنها سلول‌های سرطانی را حذف کند، تلاش‌های بسیاری صورت پذیرفته است و سنتز و استفاده از ترکیبات با پایه‌ی طبیعی یا تغییر ساختار محصولات طبیعی می‌تواند کمک‌کننده باشد. یکی از محصولات طبیعی گیاه خار مریم است. در حقیقت از این گیاه برای حفاظت از بافت کبد در طول و بعد از شیمی درمانی و پرتودرمانی به‌عنوان نوعی درمان کمکی همچنین جهت درمان عوارض کبدی و صفراوی نیز استفاده می‌شود (۶۲). دانه‌ی خار مریم غنی از سیلیمارین و مخلوطی از مولکول‌های پلی‌فنولی است. یکی از ترکیبات موثر در این گیاه با اثرات ضدسرطانی، سیلیمارین است و بیشتر ماده‌ی موجود در آن، سیلیبین است، نوعی از فلاونون خارمریم و فلاونولیگنان که اثرات ضدتوموری ویژه دارد (۶۵-۶۳). در مطالعه‌ی حاضر در مقایسه با سایر عصاره‌های گیاهی، عصاره‌ی اتانولی دانه‌ی خار مریم در مقایسه با سایر عصاره‌ها در غلظت بالا پس از گذشت ۲۴ ساعت از تیمار، کم‌ترین تاثیر کشنده‌گی معنی دار را داشت. هرچند که غلظت ۱۰۰ میکروگرم این عصاره درمقایسه با سایر غلظت‌های پایین‌تر آن، بیش‌ترین کشندگی را نشان می‌داد. افزودن عصاره‌ی آبی خار مریم سبب مهار فعالیت سلول‌های سرطانی معده شده است (۶۶). پاسخ سلول‌های مختلف به عصاره‌ها و حتی ترکیبات مختلف متفاوت است. شاید اگر ما از غلظت‌های به‌مراتب بالاتری در مورد بومادران و خارمریم حتی سایر عصاره-های موجود در این مطالعه استفاده می‌کردیم، تاثیرات مثبت و معنی‌دار بیشتری را مشاهده می‌کردیم.

نتیجه‌گیری

در پایان به‌نظر می‌رسد که غلظت‌های بالای عصاره‌های گیاهی (۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) مورد استفاده در این مطالعه در مقایسه با غلظت‌های پایین اثرات معنی‌داری بیشتری را نشان می‌دهد. همچنین در بین غلظت‌های ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر از عصاره گیاهان مورد استفاده در این مطالعه، گیاه سرخارگل و پرسیاوش در مقایسه با سه گیاه دیگر تاثیرات معنی‌دار بالاتری را نشان دادند. مطالعات بیش‌تری نیاز است که تاثیر معنی‌دار گیاهان دارویی را با هم مقایسه کند و علاوه‌براین، غلظت‌های بالاتر این ترکیبات نیز بایستی مورد بررسی قرار بگیرند. هم‌چنین بررسی اثرات ضدسرطانی ترکیبی از عصاره‌های گیاهان استفاده شده در این مطالعه در شرایط آزمایشگاهی و درون‌تنی توصیه می‌شود.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از همکاری معاونت محترم پژوهشی و فناوری، مدیریت محترم امور پژوهشی و سرپرست محترم گروه برنامه‌ریزی و نظارت پژوهشی دانشگاه رازی جهت انجام این پژوهش قدردانی می‌شود.

منابع

1. Ghoncheh M, Pournamdar Z, Salehiniya H. Incidence and mortality and epidemiology of breast cancer in the world. Asian Pac J Cancer Prev. 2016; 17(S3):43–6.
2. Chew HK. Adjuvant therapy for breast cancer: who should get what? West J Med. 2001;174(4): 284–7.
3. Greenwell M, Rahman PK. Medicinal plants: their use in anticancer treatment. Int. J. Pharm. Sci. Res. 2015; 6(10):4103-12.
4. Borneo R, Leone A.E, Aguirre A, Ribotta P, et al. Antioxidant capacity of medicinal plants from the province of Cordoba (Argentina) and their in vitro testing in a model food system. Food Chem. 2009; 112:664-70.
5. Wichtl M, Bisset NG, Czygan FC, Brinckmann JA, et al. Herbal drugs and phytopharmaceuticals: A handbook for practice on a scientific basis. Medpharm Scientific Publishers. 2001. 125-75.
6. Nair SC, Kurumboor SK, Hasegawa JH. Saffron chemoprevention in biology and medicine: a review. Cancer Biother. 1995;10(4): 257-64.
7. Amjad L, Majd A , Fallahian F, Saadatmand S. Comparative study of allergenicity of mature and immature pollen grains of Achillea wilhelmsii. J Arak Uni Med Sci. 2008; 11(2):1-9.
8. Asgary S, Naderi GH, Sarrafzadegan N, Mohammadifard N, et al. Antihypertensive and antihyperlipidemic effects of Achillea wilhelmsii. Drugs Exp Clin Res. 2000; 26(3): 89-93.
9. Ghahreman A. Flore Iran. 11th Ed. Tehran: Research Institute of Forests and Rangelands; 1989.
10. Ghanbari S, Amjad L, Shahanipur K. The effect of essential oil of Achillea wilhelmsii flowers on cisplatininduced hepatotoxicity. Feyz. 2017; 21(5): 398-406.
11. Niazmand S, Khooshnood E, Derakhshan M. Effects of Achillea wilhelmsii on rat's gastric acid output at basal, vagotomized, and vagal-stimulated conditions. Pharmacog Mag. 2010; 6(24): 282- 285.
12. Sharififar F, Pournourmohammadi SH, Arabnejad M. Immunomodulatory activity of extract aqueous of Achilleawilhelmsii C.Koch in mice. Indian J Exp Biol. 2009; 47(8): 668-671.
13. Dalali Isfahani L,Monajemi R, Amjad L. Cytotoxic effects of extract and essential oil Leaves of Achillea wilhelmsii C.Koch on colon cancers cells. Exp Animl Biol. 2013; 3: 1-6.

14. Amira MK, Abouelella Yasser E, Shahein Sameh S, Tawfik Ahmed M. Phytotherapeutic effects of Echinacea purpurea in gamma-irradiated mice. J Vet Sci. 2007;8(4):341-51.
15. Awang DVC, Kindack DG. Herbal medicine. Echinacea. Can Pharm J. 1991; 124:512-5.
16. Bauer R, Wagner H. Echinacea species as potential immunostimulatory drugs. EMPRJ. 1991; 5:253 - 321.
17. Schoneberger D. The influence of immune- stimulating effects of pressed juice from Echinacea purpurea on the course and severity of colds. Pharmacogn Res. 1992; 8:2-12.
18. Hashemi M, Soudy S. Study the effect of purple coneflower (Echinacea purpurea) extract in tardiness plethora and reproductive response of lien in mouse. Cell J. 2007; 4: 254-261.
19. Chung T, Sung M, Young C. Novel and therapeutic effect of caffeic acid and caffeic acid phenyl ester on hepatocarcinoma cells: complete regression of hepatoma growth and metastasis by dual mechanism. FASEB. 2004; 18(14): 1670-81.
20. El-Refaei MF, El-Naa MM. Antioxidant and apoptotic effects of caffeic acid phenethyl ester induced marked inhibition on human breast cancer cell line. Asian J Biochem. 2011; 6(1): 82- 89.
21. Jafaryani H, Sabooni F, Sanjarian F, Abdoosti V. Evaluation of cytotoxic effect of aerial part Echinacea purpurea extract on astrocytoma cancer cells. 2th National Conference on Sustainable Medicinal Plants and Agriculture. Hamedan. Assessment Environment Association Hegmataneh. 21 August 2014.
22. Tamayo C, Diamond S. Review of clinical trials evaluating safety and efficany of milk thistle. Integr. Cancer Ther. 2007; 6(2): 146-157.
23. Hogan FS, Krishnegowda NK, Mikhailova M, Kahlenberg MS. Flavonoid, silibinin, inhibits proliferation and promotes cell-cycle arrest of human colon cancer.J Surg Res. 2007; 143(1): 58-65.
24. Kroll DJ, Shaw HS, Oberlies NH. Milk thistle nomenclature: why it matters in cancer researcher and pharmacokinetic studies. Integr. Cancer Ther. 2007; 6(2): 158-168.
25. Mohan S, Dhanalakshmi S, Mallikarjuna GU, Singh RP, et al. Silibinin modulates UVB-induced apaptosis via mitochondrial protein, caspases activation, and mitogen-activated protein kinase signaling in human epidermal carcinoma A431 cell. Biochem Biophys Res Commun. 2004; 320(1): 183-189.
26. Ansari R, Ekhlasi-Kazaj K. Adiantum capillus-veneris. L: phytochemical cons-tituents, traditional uses and pharmacological properties. J Adv Sci Res. 2012; 3(4): 15-20.
27. Heber, PDR for herbal medicine. 3rd ed. London: Thomson publication; 2004. 542-3.
28. Nakane T, Maeda Y, Ebihara H, Arai Y, et al. Fern constituents: Triterpenoids from Adiantum capillus subsp. veneris. Chem Pharm Bull. 2002; 50(9): 1273–1275.
29. Guha P, Mukhopadhyay R, Pal PK, Gupta K. Antimicrobial activity of crude extracts and extracted phenols from gametophyte and sporophytic plant parts of Adiantum capillus subsp veneris. Allelopathy J. 2004; 13: 57-66.
30. Viral D, Shivanand P, Jivani NP. Anticancer evaluation of Adiantum venustum Don. J Young Pharm.2011; 3(1): 48-54.
31. Tantawy EL. Antimicrobial affects of alcoholic extracts of Adiantum capillus subsp. veneris. Biochem J. 2003; 2: 256-261.
32. Mabeza GF, Macfarlane J. Pulmonary actinomycosis. Eur Respir J. 2003; 21(3): 545–555.
33. Yuan Q, Zhang X, Liu Z, Song S, et al. Ethanol extract of Adiantum capillus subsp. veneris L. suppresses the production of inflammatory mediators by inhibiting nf-κb activation. J. Ethnopharmacol. 2013; 147(3): 603-611.
34. Ranjan V, Vats M, Gupta N, Sardana S. Antidiabetic potential of whole plant of Adiantum capillus subsp. veneris L. In streptozotocin induced diabetic rats. Int J Pharm Clin Res. 2014; 6: 341-347.

35. Vijayalakshmi A, Kiran Kumar Y. Evaluation of goitrogenic and antithyroidal effect of the fern Adiantum capillus subsp. veneris. Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian. J Pharmacogn. 2013; 23: 802-810.
36. Anonymous. FAO statistical database. 2011; Available at: http://apps.fao.org.
37. Ruan W, Lai M, Zhou J. Anticancer effects of Chinese herbal medicine, science or myth? J Zhejiang Univ SciB. 2006; 7(12):1006–14.
38. Bensky D, Clavey SES. Chinese Herbal Medicine Materia Medica. 3rd ed. Seattle, WA 98139, USA: Eastland Press Inc; 2004: 437–627.
39. Korekar G, Stobdan T, Arora R, Yadav A, et al. Antioxidant capacity and phenolics content of apricot (Prunus armeniaca L.) kernel as a function of genotype. Plant Foods Hum Nutr. 2011; 66(4): 376–83.
40. Cassiem W, Kock M. The anti-proliferative effect of apricot and peach kernel extracts on human colon cancer cells in vitro. BMC Complement Altern Med. 2019; 19(1):32.
41. Khacha-ananda S, Tragoolpua KH, Chantawannakul P, Tragoolpua Y. Antioxidant and anti-cancer cell proliferation activity of propolis extracts from two extraction methods. Asian Pac J Cancer Prev. 2013; 14(11): 6991-6995.
42. Kheradmand P, Vallian Boroujeni S, Esmaeili Mahani S. Evaluation of drug resistance to doxorubicin in MCF-7 breast cancer cell line as a result of insulin treatment. Cell & Tissue (JCT). 2019; 9 (4): 353-360.
43. Soltani L, RahmaniHR, Ph, Daliri Joupari M, Ghaneialvar H, Mahdavi AH, Shamsara M, Amirizadeh N. Evaluation of the effect of Chir99021 on proliferation of ovine fetal mesenchymal stem cells isolated from bone-marrow. Cell & Tissue (JCT). 2016; 6(4): 91-101.
44. Mohamadian Namaqi M, Parvaneh Tafreshi A, Abbasi Sh. The synthesis of albumin nanocarriers conjugated with a GSK3β inhibitor to investigate its effect on survival of breast cancer cell line MCF-7. Cell & Tissue (JCT). 2018; 9(3): 292-310.
45. Zamani Sh, Baghbani-Arani F, Sadat Shandiz SA. Evaluation of toxicity and anti-metastatic effects of Cerium oxide on human breast cancer MCF-7 and T47D cell lines nanoparticles. Cell & Tissue (JCT). 2018; 9(2): 150-159.
46. Zhou QM, Zhang H, Lu YY, Wang XF, et al. Curcumin reduced the side effects of mitomycin C by inhibiting GRP58-mediated DNA cross-linking in MCF-7 breast cancer xenografts. Cancer Sci. 2009; 100(11): 2040–2045.
47. Zhou QM, Wang XF, Liu XJ, Zhang H, et al. Curcumin enhanced antiproliferative effect of mitomycin C in human breast cancer MCF-7 cells in vitro and in vivo. Acta Pharmacol Sin. 2011; 32(2011): 1402–1410.
48. Tsai YL, Chiu CC, Chen JYF, Chan KC, et al. Cytotoxic effects of Echinacea purpurea flower extracts and cichoric acid on human colon cancer cells through induction of apoptosis. J. Ethnopharmacol. 2012; 143(3): 914–919.
49. Chicca A, Adinolfi B, Martinotti E, Fogli S, et al. Cytotoxic effects of Echinacea root hexanic extracts on human cancer cell lines. J. Ethnopharmacol. 2007; 110(1):148–153.
50. Cichello SA, Yao Q, He XQ. Proliferative activity of a blend of Echinacea angustifolia and Echinacea purpurea root extracts in human vein epithelial, HeLa, and QBC-939 cell lines, but not in Beas-2b cell lines. J Tradit Complement Med. 2016; 6(2): 193-197.
51. Pellati F, Benvenuti S, Prati F, Nieri P. Isolation, structure elucidation, synthesis, and cytotoxic activity of polyacetylenes and polyenes from echinacea pallida. Emerging Trends in Dietary Components for Preventing and Combating Disease. Chapter: 8. 2012; 131-149.
52. Dembitsky VM. Anticancer activity of natural and synthetic acetylenic lipids. Lipids. 2006; 41(10): 883–924.

53. Cadiz MP, Schara MR, Kemp BH, Johanson RMG. Echinacea purpurea root extract increases tumor necrosis factor production by concanavalin activated murine splenocytes. J Med Food. 2019; 22(11):1146-1150.
54. Rautray S, Panikar S, Amutha T, Rajananthini UA. Anticancer activity of *Adiantum capillus veneris* and *Pteris quadriureta* L. in human breast cancer cell lines.Mol Bio Rep. 2018; 45(6):1897-1911.
55. Hassanpour H, Shokrzadeh Lamouki M, Tabaripour R, Rezaei F, et al. The phytochemical study and antiprolifrative effect of hydroalcoholic extract of Adiantum capillus-veneris L. on MCF-7 and MRC-5 cell lines. Nova Biol. Rep. 2018; 5(2): 118-127.
56. Pourmorad F, Hosseinimehr SJ, Shahabimajd N. Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants.Afr. J. Biotechnol. 2006; 5(11): 1142-1145.
57. Chen Y, Al-Ghamdi AA, Elshikh MS, Shah MH, et al. Phytochemical profiling, antioxidant and HepG2 cancer cells' antiproliferation potential in the kernels of apricot cultivars. Saudi J Bio Sci. 2019; 27(1):163-172.
58. Shahani S, Hamzkanlu N, Zakeri N, Hosseinimehr SJ. Synergistic anti-tumoral effect of Achillea millefolium combined with bleomycin on prostate cancer cells. Res. Mol. Med. 2015; 3 (1): 12-17.
59. Li Y, Zhang ML, Cong B, Wang SM, et al. Achillinin A, a cytotoxic guaianolide from the flower of Yarrow, Achillea millefolium. Biosci Biotechnol Biochem. 2011; 75(8):1554-6.
60. Lin LT, Liu LT, Chiang LC, Lin CC. In vitro anti-hepatoma activity of fifteen natural medicines from Canada. Phytother Res. 2002; 16(5):440-4.
61. Ashtiani M, Nabatchian F, Galavi HR, Saravani R, et al. Effect of Achillea wilhelmsii extract on expression of the human telomerase reverse transcriptase mRNA in the PC3 prostate cancer cell line. Biomed. Rep. 2017; 7(3): 251-256.
62. Greenlee H, Abascal K, Yarnell E, Ladas E. Clinical applications of *Silybum marianum* in oncology. Integr. Cancer Ther. 2007; 6(2): 158–65.
63. Wellington K, Jarvis B. Silymarin: A review of its clinical properties in the management of hepatic disorders. BioDrugs. 2001; 15(7): 465–89.
64. Mallikarjuna G, Dhanalakshmi S, Singh RP, Agarwal C, et al. Silibinin protects against photocarcinogenesis via modulation of cell cycle regulators, mitogen-activated protein kinases, and Akt signaling. Cancer Res. 2004; 64(17):6349–56.
65. Singh RP, Dhanalakshmi S, Tyagi AK, Chan DC, et al. Dietary feeding of silibinin inhibits advance human prostate carcinoma growth in athymic nude mice and increases plasma insulin-like growth factor-binding protein-3 levels. Cancer Res. 2002; 62(11):3063–9.
66. Öztürk B, Kocaoğlu EH, Durak ZE. Effects of aqueous extract from Silybum marianum on adenosine deaminase activity in cancerous and noncancerous human gastric and colon tissues. Pharmacogn Mag. 2015; 11(41): 143-146.

Journal of Cell & Tissue (JCT)
Spring 2020; 11(1) *Original Article*

Comparison of *Achillea wilhelmsii*, *Silybum marianum*seed, *Echinacea purpurea*, *Adiantum capillus-veneris* and apricot kernel extracts effects on the proliferation and apoptosis of breast cancer cells

Soltani L, Ph.D.[1]*, Darbemamieh M, Ph.D. [2]

1. Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture and Engineering, Razi University, Kermanshah, Iran
2. Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Razi University, Kermanshah, Iran

* Email corresponding author: Leilasoltani7@yahoo.com

Received: 12 Mar. 2020 Accepted: 5 Aug. 2020

Abstract

Aim: The aim of this study was to compare the anti-proliferative and apoptotic effects of hydroalcoholic extracts of different herbal medicines (*Achillea wilhelmsii*, *Silybum marianum*seed, *Echinacea purpurea*, *Adiantum capillus-veneris*and apricot kernel) against breast cancer cells (Mcf-7).

Material and method: For this purpose, the plants were dried and milled, then, soaked in 70% ethanol for 72 hours and their extracts were extracted using a rotary evaporator.Different concentrations of herbal extracts (12.5, 25, 50 and 100 µg/ml) were added to the cancer cell culture medium and their cytotoxicity and apoptotic effects were investigated after 24h by MTT assay and acridine orange - ethidium bromide staining, respectively.Data was analyzed by SPSS software at the significant level of 5%.

Results: Addition of the highestconcentration of all extracts to the culture mediumshowed the most significant anti-proliferative and apoptotic effects ($P<0.05$) compared to other concentrations of the same extracts.Also, among the high concentrations (100µg/ml), the highest cell cytotoxicity effects were related to the extracts of *Echinacea purpurea*and *Adiantum capillus-veneris* ($P<0.05$).

Conclusion: The results of this study indicated that the addition of *Echinacea purpurea* and *Adiantum capillus-veneris*extractsto the cell culturesin high concentrationshad the most significant anti proliferative and apoptotic effects on breast cancer cells in comparison with other plant extractsand concentrations.

Keywords: Apoptosis, Breast cancer cells, Cytotoxicity, Herbal extracts