مقاله پژوهشی

ارمغان دانش، مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی یاسوج
دوره ۲۰، شماره۱۲، اسفند ۱۳۹۴(شماره پی در پی۱۰۷)

اثر عصاره هیدروالکلی گل بابونه و اوستین بر میزان بقای سلولی و تولید نیتریک اکساید در رده سلولی HT29 سرطان کولورکتال انسانی

نازنین دانایی[۱]، اسماعیل پناهی کوخدان[۲]، لیلا منظوری[۳]، محسن نیک سرشت[۴*]

[۱]کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، یاسوج، ایران،[۲] گروه زیست شناسی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران [۳]مرکز تحقیقات عوامل اجتماعی عوامل مؤثر بر سلامت، دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، یاسوج، ایران،[۴] مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، یاسوج، ایران

تاریخ وصول: ۱۳۹۴/۹/۱۶ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۱۱/۲۴

چکیده

زمینه و هدف: آنژیوژنز با رشد تومور و متاستاز سلول‌های توموری مرتبط است، هم‌چنین این فرآیند در ارتباط مستقیم با تولید نیتریک اکساید است. هدف از این مطالعه تأثیر عصاره هیدروالکلی گل بابونه بر بقای سلولی و میزان تولید نیتریک اکساید در رده سلولی HT29 سرطان کولورکتال انسان بود.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی، تعداد 10^4 سلول از رده سلول سرطانی HT29 در فلاسک‌های کشت T25 کشت داده شدند. شرایط کشت، شامل محیط RPMI1640 حاوی ۱۰درصد FBS بوده که ۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر پنی‌سیلین، ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر استرپتومایسین به آن اضافه شده است. سلول‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و اتمسفر مرطوب با ۵٪ دی‌اکسید کربن در پلیت‌های ۹۶ خانه انکوبه شدند. سپس سلول‌ها در فاز نمایی رشد به گروه‌های کنترل و تیمار تقسیم شدند. سلول‌ها با دوز های مختلف عصاره گل بابونه(۲۶۰۰ ، ۲۲۰۰، ۱۸۰۰، ۱۴۰۰، ۱۰۰۰ میکرو گرم در میلی لیتر محیط کشت) و اوستین(۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) تیمار شدند. توان زیستی سلول‌ها و هم‌چنین آزادسازی نیتریک اکساید از سلول‌های سرطانی به ترتیب از طریق سنجش تترازولیوم(MTT) و واکنشگر گریس اندازه‌گیری شد. داده‌ها با آزمون‌های آماری آنالیز واریانس یک طرفه و تست تعقیبی توکی تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: نتایج حاصل از این مطالعه اثر مهاری عصاره گل بابونه و اوستین را بر آزادسازی نیتریک اکساید در رده HT29 نشان داد. هم‌چنین آزمون MTT نشان داد که اثرات مهاری بر روی رشد و تکثیر رده سلولی عصاره گل بابونه و داروی اوستین وابسته به زمان و غلظت است. بیشترین میزان مرگ سلولی در بالاترین غلظت اوستین(۳۰۰میکروگرم در میلی‌لیتر) پس از ۴۸ساعت تیمار مشاهده شد. IC50 عصاره پس از ۲۴ ساعت و ۴۸ ساعت به ترتیب ۱۸۸۱ و ۱۶۶۹ میکروگرم در میلی‌لیتر بود. بیشترین مهار تولید نیتریک اکساید در غلظت ۲۶۰۰میکروگرم در میلی لیتر ایجاد شد.

نتیجه‌گیری: هیدرو الکلی گل بابونه اثر مهاری بر رشد و تکثیر رده سلولی HT29 دارد. تولید نیتریک اکساید به وسیله سلول‌های HT29 پس از تیمار به وسیله عصاره و داروی اوستین کاهش یافت. این اثر با مهار آنژیوژنز رابطه مستقیم داشته و اثر ضدمتاستازی عصاره را نشان می دهد.

واژه‌های کلیدی: سرطان کولورکتال،نیتریک اکساید،عصاره بابونه، رده سلولی HT29

* **نویسنده مسئول: محسن نیک سرشت**، یاسوج، دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی

Email: nikmohsen@yahoo.com

مقدمه

سرطان‌های کولون و رکتوم(کولورکتال) یکی ازمهم‌ترین علل مرگ ومیر در جهان می‌باشند. این سرطان‌ها سومین سرطان‌های شایع منجر به مرگ و میر در کشورهای غربی هستند(۳ـ۱). سرطان کولورکتال دومین سرطان شایع در زنان و سومین سرطان شایع در مردان است. با توجه به آمارهای جهانی رو به رشد انواع سرطان‌ها، تلاش در جهت یافتن داروهایی با پتانسیل بالا که عوارض جانبی کمتری دارند ضروری به نظر می‌رسد(۴). استفاده از گیاهان در درمان سرطان سابقه طولانی دارد(۵). گیاهان خانواده کاسنی *Compositae* یا *Astraceae* گیاهان علفی با برگ‌ها با شکل متنوع هستند که به ندرت به صورت درختچه می‌باشد. یکی از گونه‌های ارزشمند این خانواده بابونه با نام علمی *Matricaria chamomila* و نام انگلیسی *German Camomolla* است.

مهم‌ترین ترکیب‌های این گیاه شامل: فلاونوئیدها، سزکویی ترپن‌های آلفا بیزابولول[۱]، کامازولن[۲]، فارنزن[۳] و نیز ایزومرهای سیس و ترانس ان ـ این دی سیکلو اتر می‌باشد(۶). علاوه بر این دارای ترکیبات میرستئین، پروآزولن، لوتئولین[۴] و مشتقات کومارین می‌باشد. فلاونوئیدهای آن عمدتاً از دسته فلاون‌ها و فلاونول‌ها و به صورت آزاد و یا گلیکوزیدی یافت می‌شوند و گلچه‌های این گیاه حاوی روتین، آپی‌ژنین و هم‌چنین کوئرستین آزاد می‌باشد(۹ـ۶).

ازجمله داروهای مورد استفاده در مهار رگزایی (Bvacizumab)، Avastin می‌باشد که نسبت به داروهای هم گروه خود دارای عوارض جانبی کم‌تری می باشد(۱۰). Avastin آنتی‌بادی منوکلونال انسانی است که به فاکتور رشد اندوتلیال عروقی(VEGF) اتصال پیدا کرده و یک مولکول بزرگ را ایجاد می‌کند و باعث می‌شود که نتواند به گیرنده تیروزین کینازی خود متصل شود و به صورت اساسی برای درمان سرطان کلورکتال پیشرفته کاربرد دارد(۱۱ و ۱۰).

رادیکال‌های آزاد اکسیژن در پاتوفیزیولوژی بسیاری از بیماری‌ها و از جمله التهاب و سرطان دخیل می‌باشند. یافته‌های قبلی نشان داده‌اند که ترکیب‌های فنلی موجود در ساختار بابونه به عنوان آنتی‌اکسیدان و از بین برنده رادیکال‌های آزاد عمل می‌کنند و از تخریب کلاژن در برابر رادیکال‌های آنیون سوپراکسید حفاظت می‌نمایند(۷).

نیتریک اکساید رادیکال آزادی است که به وسیله آنزیم‌های نیتریک اکساید سنتاز[۵] تولید می‌شود(۱۳ و۱۲). نیتریک اکساید از اکسیداسیون درون سلولی اسید آمینه آرژنین به وسیله نیتریک اکساید سنتتازها تولید می‌شود. نیتریک اکساید در بسیاری از فرآیندهای فیزیولژیک از جمله تنظیم گشادی و تنگی عروق، ارتباط سلول‌های عصبی و

1-α-bisabolol
2-chamazulene
3-farnesene
4-Luteolin
5-Nitric Oxide Synthase

پاسخ‌های ایمنی شرکت دارد. نیتریک اکساید به شدت ناپایدار است و در اثر اکسیداسیون به نیترات و نیتریت تبدیل می‌شود. مطالعه‌ها نشان می‌دهند که نیتریک اکساید با بیولوژی تومور و رگزایی ارتباط و اثرات متقابل پیچیده‌ای دارد. تحقیق در مورد نقش نیتریک اکساید در آنژیوژنز و گسترش سلول توموری می‌تواند به طراحی داروهای جدید جهت ایجاد رگزایی نرمال و همچنین بهبود اثر گذاری دارو و درمان سرطان کمک کند(۱۴). تحقیق‌های قبلی نشان داده است که NO تنظیم کننده فاکتور رشداند و تلیال عروقی(VEGF) است، همچنین موجب مهاجرت و تمایز سلول‌های اندوتلیال و تبدیل شدن آن‌ها به مویرگ می‌شود. مطالعه‌هایی که قبلاً به وسیله گروه پژوهشی حاضر انجام شده نشان می‌دهد که این عصاره بر روی مهاجرت و تهاجم سلولی اثر دارد، بنابراین مطالعه حاضر مقدمه‌ای برای پی بردن به چگونگی عملکرد این عصاره بر مهاجرت و تهاجم این سلول‌ها می‌باشد. هدف از مطالعه حاضر بررسی اثرعصاره گل بابونه و داروی اوستین بر تولید نیتریک اکساید در رده سلولی سرطان کولورکتال انسانی و همچنین بقای سلول‌های سرطانی تحت تیمار عصاره گیاهی گل بابونه و داروی اوستین می‌باشد.

روش بررسی

در مطالعه تجربی حاضر سر شاخه‌های گلدار گیاه *Matricaria chamomilla* L از شرکت Royan Boum Daroo (IRAN) تهیه و نام علمی آن به وسیله مؤسسه مذکور تأیید شد. در فصل گلدهی(اوایل بهار) سرشاخه‌های گل دار با گل‌های کاملاً باز شده برداشت شدند. جمع‌آوری گیاه در استان قم در منطقه‌ای با مختصات جغرافیایی N 34°29'29 و E 51°4'49 انجام شد. سرشاخه‌های گلدار در سایه و دمای اتاق خشک شد.

برای تهیه عصاره گل بابونه، از روش خیساندن استفاده شد. میزان ۱۰ گرم پودر حاصل با ۱۰۰ میلی‌لیتر الکل اتیلیک ۷۰ درصد مخلوط شد. پس از گذشت ۲۴ ساعت در دمای آزمایشگاه نگهداری شد، سپس محتویات داخل ظرف به وسیله کاغذ صافی واتمن، صاف گردید. محلول صاف شده در دمای اتاق خشک و وزن شد و تا زمان انجام آزمایش‌ها در فریزر نگهداری گردید(۱۶).

رده سلولی HT29 از بانک سلولی انستیتوپاستور تهران خریداری شد و در مجاورت یخ خشک به آزمایشگاه کشت سلولی دانشگاه علوم پزشکی یاسوج انتقال داده شدند. سلول‌ها در محیط کشت RPMI-1640 (جیبکو، آمریکا) غنی شده با سرم جنین گاوی(FBS) ۱۰ درصد(جیبکو،آمریکا) و آنتی‌بیوتیک‌های استرپتومایسین(۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) و پنی‌سیلین(۱۰۰واحد بر میلی‌لیتر)(جیبکو، آمریکا) در انکوباتور با شرایط ۵ درصد دی اکسیدکربن، دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۹۵ در صد کشت داده شد(۱۸ و ۱۷).

غلظت نیتریک اکساید با تست گریس(Griess) اندازه‌گیری شد. در این روش واکنشگر گریس (سولفانیلامیدوN-(۱-نفتیل)اتیلن دی آمین) برای سنجش غلظت نیتریک اکساید به مایع رویی نمونه‌ها(۲۰۰،۳۰۰، و۱۰۰)میکروگرم در میلی‌لیتر اوستین و ۱۰۰۰،۲۶۰۰،۲۲۰۰،۱۸۰۰ و ۱۴۰۰میکروگرم در میلی‌لیتر عصاره گل بابونه) اضافه گردید. در این سنجش از نیتریت سدیم به عنوان استاندارد استفاده شد. در این روش۱۰۰ میکرولیتر از محیط کشت با ۱۰۰ میکرولیتر معرف گریس حاوی ۲ درصد سولفانیل آمید در اسید سولفوریک ۵ درصدو ۰/۱ درصد -N (۱-نفتیل)اتیلن دی آمین مخلوط گردید. سپس جذب نوری با دستگاه الیزا ریدر در طول موج ۵۴۰ نانومتر قرائت شد(۱۹ و ۱۷). هر چه غلظت نیتریک اکساید در نمونه بیشتر باشد، میزان جذب در این طول موج بیشتر خواهد بود.

میزان بقای سلول‌ها به وسیله تست MTT تعیین شد. این روش که بر فعالیت آنزیم سوکسینات دهیدروژناز در میتوکندری سلول‌های زنده استوار است، که محلول زرد رنگ MTT را به کریستال‌های نامحلول فورمازان بنفش رنگ تبدیل می‌کند، که می‌توان پس از حل کردن در دی متیل سولفواکساید (DMSO) با دستگاه الیزا ریدر سنجش نمود. میزان (۱×۱۰^{۴}) سلول به پلیت ۹۶ خانه منتقل شدند(۲۰). به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه انکوبه گردید، سپس به وسیله غلظت‌های مختلف عصاره بابونه(۱۰۰۰،۱۴۰۰، ۱۸۰۰، ۲۲۰۰ و ۲۶۰۰میکروگرم بر میلی‌لیتر) و همچنین دوزهای متفاوت از داروی اوستین(۲۰۰، ۲۲۵، ۲۵۰، ۲۷۵، ۳۰۰، ۴۵۰، ۵۰۰، ۵۵۰ و ۶۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) تیمار شدند و در نهایت حجم چاهک‌ها به ۱۰۰ میکرولیتر رسید. پلیت‌های حاوی سلول و عصاره به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت در شرایط یکسان انکوبه شدند. پس از گذشتن زمان مورد نظر، پلیت‌های ۹۶ خانه از انکوباتور خارج و ۱۰ میکرولیتر محلول (۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) MTT به هر چاهک اضافه گردید و به مدت ۳ ساعت در انکوباتور قرار گرفتند. سپس ۱۰۰ میکرولیترDMSO جایگزین محیط انکوبه شده با MTT شد و به مدت نیم ساعت در تاریکی قرار گرفتند. DMSO، بلورهای فورمازان تولید شده را حل کرده و این بلورها پس از حل شدن در DMSO، محلول بنفش رنگی را به وجود می‌آورند که میزان رنگ به وجود آمده نشان دهنده توان زیستی سلول‌های تیمار شده می‌باشد. جذب نوری پلیت‌ها در طول موج ۵۷۰ نانومتر مورد سنجش قرار گرفت(۱۷).

داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزار SPSS و آزمون آماری آنالیز واریانس یک طرفه و تست تعقیبی توکی تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها

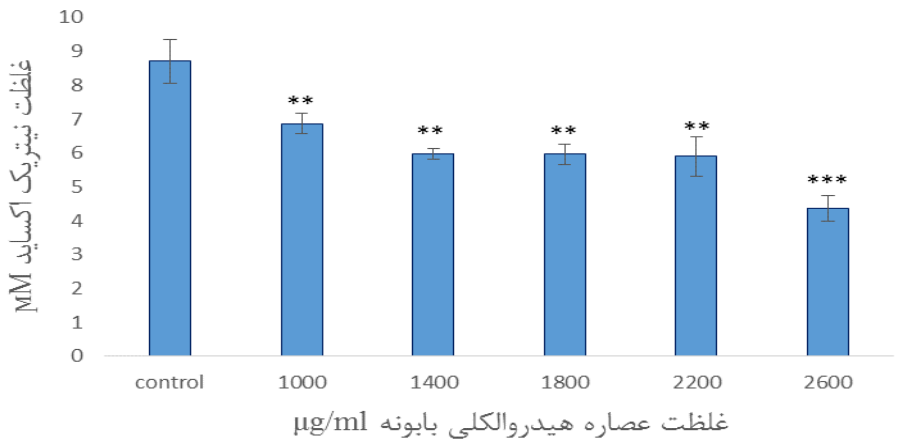
میزان نیتریک اکساید تولید شده به وسیله سلول‌ها به درون محیط کشت سلولی پس از ۲۴ ساعت در تیمارهای مختلف عصاره هیدروالکلی بابونه نسبت به کنترل کاهش یافت(p=۰/۰۰۰۱) به این صورت که غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصاره بابونه برای کاهش میزان NO ارتباط معنی‌داری با کنترل نشان نداد. اثر غلظت ۱۴۰۰و۱۸۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در کاهش میزان NO معنی‌دار بود(p=۰/۰۰۹). بیشترین کاهش در گروه تیمار شده به وسیله عصاره هیدرو الکلی گل بابونه مربوط به دوز ۲۶۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود(p=۰/۰۰۰۱)(نمودار۱).

نتایج حاصل از آنالیز واریانس یک طرفه نشان داد که میانگین غلظت NO در دوزهای مختلف داروی اوستین کاهش معنی‌داری نشان داد. کاهش میزان NO به وسیله غلظت‌های ۱۰۰،۲۰۰ و ۳۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر نسبت به گروه کنترل معنی‌دار بود(p=۰/۰۰۰۱).(نمودار۲)

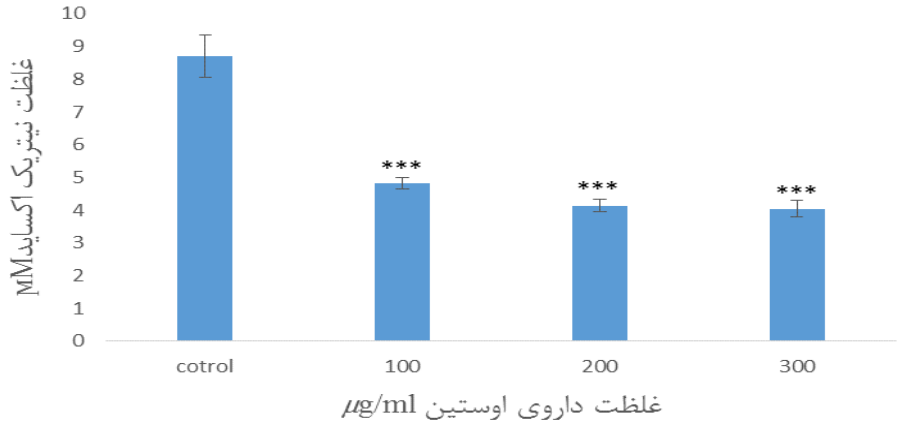
میزان بقای سلول‌های سرطانی HT29 در تیمار با عصاره بابونه در ۲۴ ساعت پس از تیمار، نسبت به کنترل کاهش معنی‌داری را نشان داد(p=۰/۰۰۰۳). تیمار ۴۸ ساعته این سلول‌ها نیز نسبت به کنترل کاهش معنی‌داری را نشان داد(p=۰/۰۰۰۱). میزان IC50 برای عصاره هیدروالکلی گل بابونه به ترتیب ۱۸۸۱ و ۱۶۶۹ میکروگرم در میلی‌لیتر محاسبه گردید(نمودار۳).

میزان بقای سلول‌های سرطانی HT29 در تیمار با داروی اوستین در ۲۴ ساعت پس از تیمار، نسبت به کنترل کاهش معنی‌داری را نشان نداد(p=۰/۰۵۹). تیمار ۴۸ ساعته این سلول‌ها نیز نسبت به کنترل کاهش معنی‌داری را نشان نداد(p= ۰/۰۳۵)(نمودار۴).

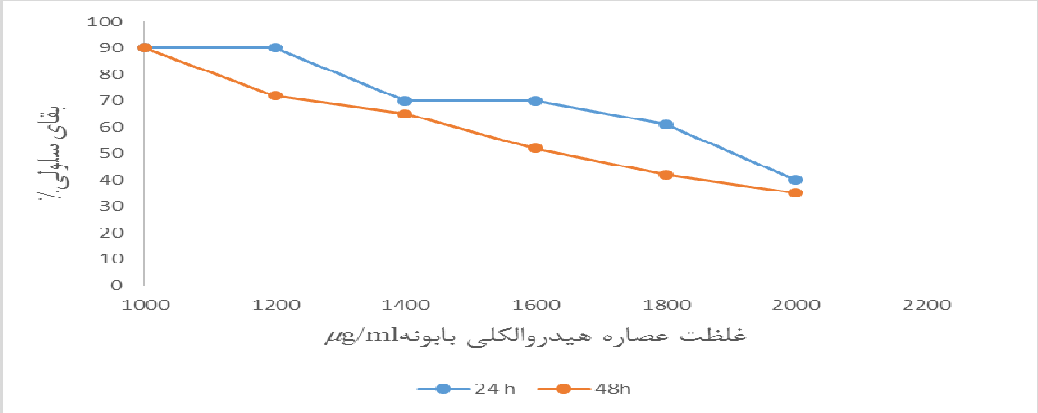
سلول‌های سرطانی رده HT29 سرطان کولورکتال انسانی ۲۴ ساعت پس از تیمار با عصاره بابونه از بستر خود جدا شده شکل سلول‌ها از حالت بیضی کشیده به شکل کروی تبدیل گردید. این در حالی است که داروی اوستین تغییرات کمتری بر مورفولوژی رده سلولی HT29 داشتند. با افزایش دوز تیمار به وسیله عصاره بابونه میزان سلول‌های کروی جدا شده از سطح افزایش یافت. تا جایی که در بالاترین دوز تیمار(۲۶۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر)، پاره شدن غشای سلولی و خروج محتویات سلول و از بین رفتن کامل مورفولوژی نسبت به حالت کنترل مشاهده شد(تصویر ۱).



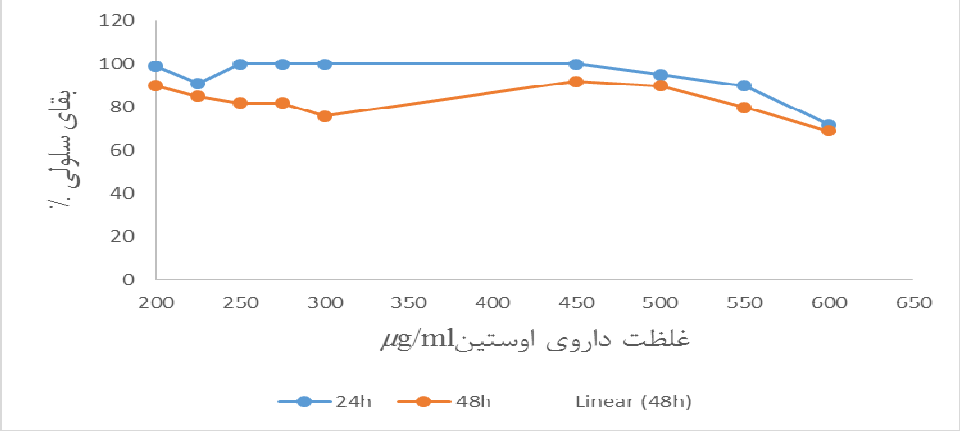
نمودار ۱: میانگین و انحراف معیار غلظت NO در تیمار با غلظت‌های ۱۰۰۰،۱۴۰۰،۱۸۰۰،۲۲۰۰،۲۶۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از عصاره هیدروالکلی گل بابونه پس از ۲۴ ساعت. ستاره ها نشان دهنده سطح معنی داری است (*p<۰/۰۵، **p<۰/۰۱، ***p<۰/۰۰۱)



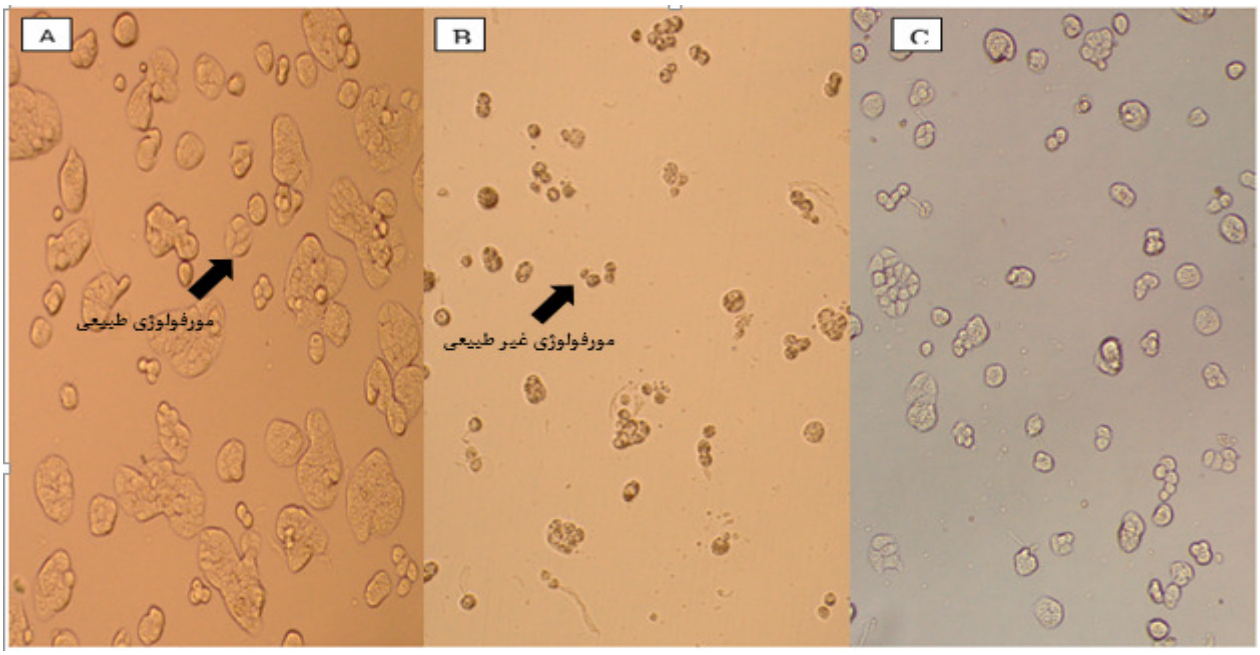
نمودار ۲: میانگین و انحراف معیار غلظت NOدر غلظت‌های ۱۰۰،۲۰۰،۳۰۰میکروگرم در میلی‌لیتر داروی اوستین پس از ۲۴ ساعت. ستاره ها نشان دهنده سطح معنی داری است (*p<۰/۰۵، **p<۰/۰۱، ***p<۰/۰۰۱)



نمودار ۳: میانگین بقای سلول‌های سرطانی HT29 در تیمار با غلظت‌های ۱۰۰۰،۱۲۰۰،۱۴۰۰،۱۶۰۰،۱۸۰۰،۲۰۰۰ میکرو گرم در میلی‌لیتر عصاره هیدرو الکلی گل بابونه پس از ۲۴ و۴۸ ساعت. ستاره ها نشان دهنده سطح معنی داری است (*p<۰/۰۵، **p<۰/۰۱، ***p<۰/۰۰۱)



نمودار۴: میانگین بقای سلول‌های سرطانی HT29 در تیمار با غلظت‌های ۴۵۰،۳۰۰،۲۷۵،۲۵۰،۲۲۵،۲۰۰،۶۰۰،۵۵۰،۵۰۰ میکرو گرم در میلی‌لیتر داروی اوستین پس از ۲۴ و ۴۸ساعت. ستاره ها نشان دهنده سطح معنی داری است (*p<۰/۰۵، **p<۰/۰۱، ***p<۰/۰۰۱)



تصویر۱: سلول‌های رده HT29 زیر میکروسکوپ فاز معکوس ۲۴ ساعت پس از تیمار. A سلول‌های کنترل، B سلول‌های تیمار شده با غلظت ۱۸۰۰میکروگرم در میلی‌لیتر عصاره گل بابونه،C سلول‌های تیمار شده با غلظت۳۰۰میکرو گرم در میلی‌لیتر داروی اوستین. بزرگنمایی۲۰X

بحث

تاکنون مطالعه‌های فراوانی روی گیاهان دارویی و اثر آنها دربیماری‌های مختلف انجام گرفته است. گیاهان برای مهار رشد و تکثیر سلول‌های توموری مکانیسم‌های متعددی را به کار می‌گیرند. بسیاری از این گیاهان از زمان‌های قدیم مورد استفاده انسان بوده‌اند و اکثر آنها در طب امروزی نیز کاربرد دارند. نیتریک اکساید توسط سلول‌های اندوتلیال و با استفاده از اسید آمینه آرژینین و ملکول اکسیژن و به وسیله آنزیم نیتریک اکساید سنتتاز ساخته می‌شود.

این آنزیم ال ــ آرژینین را به نیتریک اکساید و ال ـ سیترولین تبدیل می‌کند. نیتریک اکساید نقش مهمی در مهار مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی، افزایش تکثیر و مهاجرت سلول‌های اندوتلیال دارد(۲۲ و ۲۱). هم‌چنین نیتریک اکساید می‌تواند سنتز و آزاد شدن VEGF از سلول‌های عروقی را افزایش دهد(۲۳). ارتباط متقابلی بین نیتریک اکساید وVEGF وجود دارد. مطالعه‌ها نشان داده‌اند که VEGF بیان نیتریک اکساید سنتتاز را افزایش داده و بیوسنتز نیتریک اکساید را از سلول‌های کشت شده‌اند و اندوتلیوم افزایش می دهد(۲۴).

در مطالعه حاضر، اثر عصاره هیدروالکلی گیاه بابونه و داروی اوستین بر میزان تولید نیتریک اکساید مورد بررسی قرار گرفت. غلظت ایجاد کننده مسمومیت سلولی عصاره و دارو با آزمون MTT تعیین شد. حداقل غلظتی که باعث مسمومیت سلولی نشد و بیشترین اثر را بر میزان تولید NO داشت، غلظت ۱۴۰۰میکروگرم در میلی‌لیتر بود. عصاره گیاهی اثرکاهندگی بر میزان تولید NO داشت. غلظت ۲۶۰۰ از این عصاره میزان NO را تا ۵۰ درصد کاهش داد.

در مطالعه لی و همکاران نشان داده شد که ترکیب‌های فیتوکمیکال مشتق شده از گیاه بابونه (Hibiscus cannabinus) موجب مهار تولید واسطه‌های التهابی نیتریک اکساید، گونه‌های واکنشگر اکسیژن، پروستاگلندین E2 و هم‌چنین مهار بیان مولکول‌های کمک تحریکی CD80 و CD86 در سلول‌های ماکروفاژی شد(۲۵).

در مطالعه سلیمانی و همکاران، اثرات تنظیم کنندگی ایمنی و ضد توموری اسانس زیره سبز بر روی ماکروفاژهای صفاقی وماکروفاژهای فعال شده با لیپوساکارید مورد بررسی قرار گرفت. میزان بقاء ماکروفاژها هم‌چنین میزان تولید نیتریک اکساید در غلظت‌های ۵۰ و ۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از اسانس زیره سبز کمتر از گروه کنترل گزارش شد(۲۶).

در مطالعه چیونگ و همکاران اثر عصاره Ginkgo biloba بر میزان تولید NO در سلول‌های اندوتلیوم بررسی شد و عصاره این گیاه میزان تولید NO را در سلول‌های اندوتلیوم کشت شده تا ۷۰ درصد نسبت به کنترل کاهش داد که با نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر هم‌خوانی دارد(۲۷).

در مطالعه حاضر، با توجه به خواص آنتی‌اکسیدانی گیاه بابونه، کاهش میزان تولید NO به وسیله سلول‌های سرطانی کولورکتال در تیمار با عصاره هیدروالکلی گل بابونه را می‌توان به خاصیت رادیکال زدایی رادیکال‌های NO نسبت داد.

نتایج حاصل از بررسی مورفولوژیک ونتایج حاصل از آزمون میزان زنده ماندن سلول‌ها به روش MTT نشان داد، اثرات مهاری عصاره گیاهی از غلظت‌های کم (۱۰۰۰میکروگرم بر میلی‌لیتر)تا غلظت (۲۶۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر)از همان ۲۴ ساعت اول شروع شده و با گذشت زمان یعنی ۴۸ ساعت پس از تیمار بیشترین اثر مهاری بر روی سلول‌های HT29 دیده شد. داروی اوستین در غلظت‌های تیمار شده اثر چندانی بر کاهش سلول‌های زنده نداشت و میزان

مرگ و میر سلول‌ها کاهش چشمگیری از خود نشان داد. در آزمون MTT مشخص شد که IC50 سلول‌های HT29 در ۲۴ساعت و ۴۸ ساعت برابر با ۱۸۵۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر و۱۶۶۹ میکروگرم بر میلی‌لیتر است. در مطالعه‌ای که اثرات ضد التهابی و ضد تکثیری ترکیب‌های فنولی مشتق از گونه‌های گیاهی مختلف بر رده سلولی HT29 کولورکتال انسانی بررسی شد. در نتایج تست MTT برای گیاه بابونه(chamaemelum nobile) عدد ۴۷۱۳ میکروگرم در میلی‌لیتر به عنوان IC50 گزارش شد که این مقدار بسیار بیشتر از عدد گزارش شده در مطالعه حاضر است(۲۸).

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که عصاره هیدروالکلی گل بابونه و داروی اوستین به طور مؤثری به صورت وابسته به دوز باعث مهار تولید رادیکال آزاد NO شد و هم‌چنین عصاره هیدروالکلی گل بابونه به صورت وابسته به دوز و زمان باعث مهار تکثیر و بقای سلول‌های سرطانی رده HT29 سرطان کولورکتال انسانی شد. این گیاه می‌تواند به عنوان یک داروی ضد رگزایی هدف درمانی مناسبی برای جلوگیری از رشد و تکثیر و متاستاز سلول‌های سرطانی باشد.

تقدیر و تشکر

این مقاله حاصل پایان‌نامه دانشجویی کارشناسی ارشد بیوشیمی بالینی دانشکده پزشکی یاسوج می‌باشد که با حمایت مالی این دانشگاه انجام شد.

REFERENCES

1.Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. CA: A Cancer Journal For Clinicians 2011; 61(2): 69-90.
2.Merrill RM, Harris JD, Merrill JG. Differences in incidence rates and early detection of cancer among non-Hispanic and Hispanic Whites in the United States. Ethn Dis 2013; 23(3): 349-55.
3.Siegel R, DeSantis C, Jemal A. Colorectal cancer statistics, 2014. CA: A Cancer Journal For Clinicians 2014; 64(2): 104-17.
4. Posey LM, Wells BG, Yee GC. Pharmacotherapy a pathophysiologic approach. The McGraw-Hill; 2008.
5.Hartwell G, Bellizzi R. Clinical investigation of in vivo endodontically treated mandibular and maxillary molars. Journal of Endodontics 1982; 8(12): 555-7.
6.Ganzera M, Schneider P, Stuppner H. Inhibitory effects of the essential oil of chamomile (Matricaria recutita L.) and its major constituents on human cytochrome P450 enzymes. Life Sciences 2006; 78(8): 856-61.
7.Mirshafiey A, Khodadadi A, Rehm B, Khorramizadeh M, Eslami M, Razavi A, et al. Sodium alginate as a novel therapeutic option in experimental colitis. Scandinavian Journal of Immunology 2005; 61(4): 316-21.
8.Raskin I, Ribnicky DM, Komarnytsky S, Ilic N, Poulev A, Borisjuk N, et al. Plants and human health in the twenty-first century. TRENDS in Biotechnology 2002; 20(12): 522-31.
9.Srivastava JK, Pandey M, Gupta S. Chamomile, a novel and selective COX-2 inhibitor with anti-inflammatory activity. Life Sciences 2009; 85(19): 663-9.
10.Hayes DF, Miller K, Sledge G. Angiogenesis as targeted breast cancer therapy. The Breast 2007; 16: 17-9.
11.Mostafaie A, Mohammadi Motlagh H, Mansouri K. Angiogenesis and the models to study angiogenesis. Yakhteh Medical Journal 2010; 11(4): 374-81.
12.Batra J, Chatterjee R, Ghosh B. Inducible nitric oxide synthase (iNOS): role in asthma pathogenesis. Indian Journal of Biochemistry & Biophysics 2007; 44(5): 303.
13.Bruckdorfer R. Nitric oxide in physiology and pathology. Molecular Aspects of Medicine 2005; 26(1): 1-2.
14.Ziche M, Morbidelli L. Molecular regulation of tumour angiogenesis by nitric oxide. European Cytokine Network 2009; 20(4): 164-70.
15.Khazaei M, Moshayedi MA, Jervekani MT, Aghili S, Montazeri S, Dastjerdi RM, et al. The effect of L-Arginine (nitric oxide precursor) and L-NAME (nitric oxide synthase inhibitor) on coronary angiogenesis in normal rats. Journal of Isfahan Medical School. 2011; 29: 158.
16.Kamali AM, Nikseresht M, Delaviz H, Barmak MJ, Servatkhah M, Ardakani MT, et al. In Vitro Cytotoxic Activity of Matricaria Chamomilla Root Extract in Human Breast Cancer Cell Line MCF-7. Life Science Journal 2014;11(5s).
17.Tezuka Y, Irikawa S, Kaneko T, Banskota AH, Nagaoka T, Xiong Q, et al. Screening of Chinese herbal drug extracts for inhibitory activity on nitric oxide production and identification of an active compound of Zanthoxylum bungeanum. Journal of Ethnopharmacology 2001; 77(2): 209-17.
18.Yoshida M, Feng W, Saijo N, Ikekawa T. Antitumor activity of daphnane-type diterpene gnidimacrin isolated from Stellera chamaejasme L. International Journal of Cancer. 1996; 66(2): 268-73.
19.Kim OK, Murakami A, Nakamura Y, Ohigashi H. Screening of edible Japanese plants for nitric oxide generation inhibitory activities in RAW 264.7 cells. Cancer letters 1998; 125(1): 199-207.
20.Herrera-Carrera E, Moreno-Jiménez MR, Rocha-Guzmán NE, Gallegos-Infante JA, Díaz-Rivas JO, Gamboa-Gómez CI, et al. Phenolic composition of selected herbal infusions and their anti-inflammatory effect on a colonic model in vitro in HT-29 cells. Cogent Food & Agriculture 2015; 1(1): 1059033.
21.Morbidelli L, Chang C-H, Douglas JG, Granger HJ, Ledda F, Ziche M. Nitric oxide mediates mitogenic effect of VEGF on coronary venular endothelium. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology 1996; 270(1): H411-H5.
22.Ziche M, Morbidelli L, Masini E, Amerini S, Granger H, Maggi C, et al. Nitric oxide mediates angiogenesis in vivo and endothelial cell growth and migration in vitro promoted by substance P. Journal of Clinical Investigation 1994; 94(5): 2036.

23.Dulak J, Józkowicz A ,Dembinska-Kiec A, Guevara I, Zdzienicka A, Zmudzinska-Grochot D, et al. Nitric oxide induces the synthesis of vascular endothelial growth factor by rat vascular smooth muscle cells. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology 2000; 20(3): 659-66.
24.Hood JD, Meininger CJ, Ziche M, Granger HJ. VEGF upregulates ecNOS message, protein, and NO production in human endothelial cells. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology 1998; 274(3): H1054-H8.
25.Lee YG, Byeon SE, Kim JY, Lee JY, Rhee MH, Hong S, et al. Immunomodulatory effect of Hibiscus cannabinus extract on macrophage functions. Journal of Ethnopharmacology 2007; 113(1): 62-71.
26.Soleimani N, Daneshmandi S, Sattari M, Pourfathollah AA. Immuno-modulatory and anti-tumor effects of cuminum cyminum essential oil. Arak Medical University Journal 2011; 13(4): 22-9.
27.Cheung F, Siow YL, Chen WZ, Karmin O. Inhibitory effect of Ginkgo biloba extract on the expression of inducible nitric oxide synthase in endothelial cells. Biochemical Pharmacology 1999; 58(10): 1665-73.
28.Herrera-Carrera E, Moreno-Jiménez MR, Rocha-Guzmán NE, Gallegos-Infante JA, Díaz-Rivas JO, Gamboa-Gómez CI, et al. Phenolic composition of selected herbal infusions and their anti-inflammatory effect on a colonic model in vitro in HT-29 cells. Cogent Food & Agriculture 2015; 1(1): 1059033.

Armaghane-danesh, Yasuj University of Medical Sciences Journal (YUMSJ)

Original Article

The Effect of Avastin and Hydroalcohlic Extract of *Matricaria chamomilla* on Cell Viability and Nitric Oxide (NO) Production in HT-29; a Human Colorectal Cancer Cell Line

Danaei N[1], Panahi Kokhdan E[2], Manzouri L[3], Nikseresht M[4*]

[1]Student Research Committee, Yasuj University of Medical Sciences, Yasuj, Iran, [2] Department of Biology, Faculty of Sciences, Guilan University, Rasht, Iran, [3]Social Determinants of Health Research Center, Yasuj University of Medical Sciences, Yasuj, Iran,[4]Cellular and Molecular Research Center, Yasuj University of Medical Sciences, Yasuj, Iran

Received: 7 Dec 2015 Accepted: 13 Feb 2016

Abstract

Background & aim: Angiogenesis is associated with tumor growth and metastasis of tumor cells, this processes directly linked with the production of nitric oxide. In this study anticancer effects of hydroalcohoic extract of *M. chamomill*a and avastin (bevacizumab) were investigated via dimethyl thiazol diphenyltetrazolium bromide (MTT) cell viability assay and nitric oxide (NO) production level in colon cancer cell line (HT-29).

Methods: In the present experimental study, the HT-29 cell line was cultured in RPMI-1640 media supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS), 1% antibiotic solution (consisting of100 U/mL penicillin and 100 µg/ml streptomycin). After growing to a favorite confluent, 10^4cells were seeded into separate 96-well culture microtiter plates and incubated at 37^0C in an incubator with 5% CO_2 for 24 h prior to treatment. Every plate was treated with different concentrations of the extract (1000, 1400, 1800, 2200, 2600 µg/ml of medium) and bevacizumab (100,200,300 µg/ml). The production of NO was assessed by Griess reagent and the cell viability was determined by MTT assay. The results were compared by one-way ANOVA followed by Tukey-Kramer.

Result: The results of MTT assay indicated that the extract and bevacizumab anticancer effect is time and dose dependent. The highest percentage of cell death was observed after 48 h incubation which increased in the bevacizumab concentration ($P<0.01$). Fifty percent inhibitory concentration (IC50) of extract in 24 h and 48h was 1881 and 1669 µg/ml, respectively. Inhibition of nitric oxide (NO) production was maximum in 2600 µg/ml extract concentration.

Conclusion: The results of the present study demonstrated that bevacizumab and the hydroalcohoic extract of *M. chamomill*a had an inhibitory effect on NO production by HT-29. The production of NO by HT-29 was inhibited after treatment by the extract of *M. chamomilla*may contribute to angiogenesis via decreasing of NO production and has antimatastatic effect.

Key words*:* *Matricaria chamomilla*, avastin, HT-29, colorectal cancer, Nitric oxide

[*]**Corresponding author: Nikseresht M**, Cellular and Molecular Research Center, Yasuj University of Medical Sciences, Yasuj, Iran.
Email: nikmohsen@yahoo.com

Please cite this article as follows:
Danaei N, Panahi Kokhdan E, Manzouri L, Nikseresht M. The Effect of Avastin and Hydroalcohlic Extract of Matricaria chamomilla on Cell Viability and Nitric Oxide (NO) Production in HT-29; a Human Colorectal Cancer Cell Line. Armaghane-danesh 2016; 20 (12): 1107-1118.