ارمغان دانش، مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی یاسوج
دوره ۲۴، شماره۱، فروردین و اردیبهشت ۱۳۹۸(شماره پی در پی۱۳۲)

مقاله پژوهشی

تأثیر آپوپتوتیک عصاره گیاه سنبله‌ای کرکدار(*Stachys pilifera Benth*) روی سلول‌های سرطان کلورکتال رده HT-29

اسماعیل پناهی کوخدان[۱]، حسین صادقی[۲]، حسین غفوری[۱]، هیبت الله صادقی[۲]، نازنین دانایی[۲]، شیراوان سلامی‌نیا[۲]، محمودرضا آقامعالی[۱*]

[۱] گروه زیست شناسی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران، [۲]مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، یاسوج، ایران

تاریخ وصول: ۱۳۹۷/۳/۱۲ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۵/۲۸

چکیده:

زمینه و هدف: در طب سنتی از گیاه سنبله‌ای کرکدار برای درمان انواع بیماری‌ها استفاده می‌شود. علی‌رغم برخی گزارش‌ها در مورد اثرات ضد توموری برخی از گونه‌های این جنس، فعالیت ضد سرطان سنبله‌ای کرکدار هنوز گزارش نشده است. هدف از این مطالعه بررسی اثر آپوپتوزی عصاره سنبله‌ای کرکدار(*Stachys pilifera Benth*) و فرکشن آلکالوئیدی و ترپنوئیدی آن در سلول‌های سرطانی کولورکتال HT-29 می‌باشد.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی سلول‌های HT-29 کشت شد و سپس سلول‌ها با غلظت‌های مختلف عصاره متانولی سنبله‌ای کرکدار، فرکشن‌های آلکالوئیدی و ترپنوئیدی و سیس پلاتین به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. بقای سلول‌های سرطانی با استفاده از آزمون(MTT) اندازه‌گیری شد. اثرات عصاره و تست‌های انجام شده بر روی مکانیزم‌های مرگ و میر سلولی مانند قطعه قطعه شدنDNA و آپوپتوز به وسیله دستگاه فلوسیتومتری انجام شد. سیس پلاتین به عنوان کنترل مثبت در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفت. داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از آزمون‌های آماری آنالیز واریانس یک طرفه و تست تعقیبی توکی تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: نتایج IC_{50} عصاره متانولی، فرکشن‌های آلکالوئیدی، ترپنوئیدی و سیس پلاتین بر روی سلول HT-29 بعد از ۲۴ ساعت به ترتیب برابر ۶۱۲٫۸، ۴۶٫۴، ۴۶٫۸ و ۴٫۰۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. نتایج نشان داد که مهار تکثیر سلولی به صورت وابسته به دوز می‌باشد. عصاره متانولی سنبله‌ای کرکدار و سیس پلاتین باعث قطعه قطعه شدن DNA شدند. نتایج تست آپوپتوز نشان داد که بیشترین درصد افزایش آپوپتوز در تیمار با سیس پلاتین(۳۰/۸ درصد) و عصاره متانولی(۲۳/۲درصد) نسبت به گروه کنترل(تیمار نشده) بود($p<۰/۰۵$).

نتیجه‌گیری: عصاره هیدروالکلی سنبله‌ای کرکدار و فراکشن الکالوئیدی به صورت وابسته به دوز تکثیر سلول‌های سرطانی کلورکتال HT-29 را متوقف و سلول‌ها را وارد فاز آپوپتوتیک می‌کند. بنابراین گیاه کاندیدای مناسبی برای جلوگیری از تکثیر سلواهای سرطانی کلورکتال می‌تواند باشد.

واژه‌های کلیدی: سنبله‌ای کرکدار، آپوپتوز، قطعه قطعه شدن DNA، رده HT-29

نویسنده مسئول: محمودرضا آقامعالی، رشت، دانشگاه گیلان، گروه زیست‌شناسی

Email: aghamaali@guilan.ac.ir

مقدمه

سرطان رشد و تکثیر افسارگسیخته سلول‌های غیر نرمال در بدن می‌باشد و یک بیماری خطرناک با آمار مرگ و میر بسیار بالا می‌باشد که درگیری‌های روحی و اقتصادی متعددی را به دنبال دارد(۱). امروزه می‌توان سرطان را بیماری تعریف کرد که شامل؛ تغییرات یا جهش‌هایی در ژنوم سلول می‌شود و این تغییرات و جهش‌هایDNA، پروتئین‌هایی را تولید می‌کنند که تعادل ظریف بین مرگ سلولی و تقسیم سلولی را مختل کرده و موجب می‌شوند سلول‌ها به تقسیم ادامه دهند تا سرطان را تشکیل دهند(۲). درمان و پیشگیری از بیماری سرطان یک چالش بزرگ در جوامع بشری در سراسر جهان به شمار می‌رود. سرطان‌های کولون و رکتوم(کولورکتال) یکی از مهم‌ترین علل مرگ در جهان می‌باشند. این سرطان‌ها سومین سرطان‌های شایع منجر به مرگ و میر درکشورهای غربی هستند(۵ ـ ۳). سرطان کولورکتال سومین سرطان شایع در مردان و دومین سرطان شایع در زنان است. بر اساس آمار سازمان بهداشت جهانی، این سرطان در کشورهای در حال رشد رو به افزایش است و دومین بدخیمی رایج در این کشورها محسوب می‌شود(۳). کشورهای در حال توسعه یک سوم از کل موارد سرطان کولورکتال را به خود اختصاص می‌دهد. در هر سال تقریباً نیمی از مبتلایان دچار مرگ و میر می‌شوند(۶).

پژوهش‌های محدودی در رابطه با اپیدمیولوژی سرطان کولورکتال در ایران انجام شده است. بررسی‌های اخیر افزایش چشمگیری را در میزان ابتلا به سرطان در ایران گزارش کرده‌اند(۷). این سرطان در ایران ششمین سرطان شایع و در حال افزایش است. سالیانه ۴۰۰۰ مورد جدید و ۱۱۵۰ مورد مرگ ناشی از سرطان کولورکتال در ایران گزارش می‌شود(۸). اگر چه در ایران شیوع سرطان کولورکتال در افراد مسن در مقایسه با جمعیت غرب خیلی کمتر است، آمار موجود در جمعیت جوان افزایش شدیدتری را نشان می‌دهد(۹).

از جمله راهکارهای درمانی این بدخیمی می‌توان به شیمی درمانی، رادیوتراپی و جراحی اشاره کرد. با این وجود میزان مرگ و میر در افراد مبتلا که تحت درمان قرار می‌گیرند، بالا می‌باشد که خود حکایت از ناکارآمدی این راهکارهای درمانی دارد(۱۰). شناخت مکانیسم‌های مهم و دخیل در ایجاد سرطان برای پیشبرد روش‌های درمانی، جهت درمان نئوپلاسم‌ها بسیار مهم می‌باشد. القاء آپوپتوز یکی از ویژگی‌های مهم عوامل آنتی‌تومور سایتوتوکسیک می‌باشد. نشان داده شده که یک سری از ترکیب‌های طبیعی از جمله گیاهان دارویی باعث القاء مسیرهای آپوپتوزی می‌شوند که در سلول‌ها ی سرطان مهار شده‌اند. توانایی القاء آپوپتوز در سلول‌های سرطانی و توقف تکثیر این سلول‌ها موضوع بسیاری از پژوهش‌های ایمونوفارماکولوژی می‌باشد(۱۱). فرآورده‌های طبیعی به ویژه گیاهان، دارای پتانسیل بالایی برای ساخت ترکیب‌های دارویی

مـــی‌باشـــــند. بســـــیاری از داروهـــــای ضـــد سرطانی(شیمی‌درمانی) کـه سـنتز شـده‌انـد، از جملـه تاکسـان‌هـا، وینکـــا آلکالوئیـــدها، کامپتوتسین‌هـا از ترکیب‌های گیاهی مشتق شـده‌انـد و بـــرای درمـــان ســـــرطان‌هـــــای مختلـــــف متاســـــتاتیک و غیرمتاستاتیک اسـتفاده می‌شـود(۱۳ و۱۲).

جهت درمان بیماری سرطان از دیرباز در طب سنتی از گیاهان دارویی استفاده شده اسـت(۱۴). یکـی از خانواده‌های گیاهی غنی از ترکیب‌های آنتی‌اکسیدان گیاهان تیـره نعناعیـان مـی‌باشـد. سـنبله‌ای کـرکـدار (*Stachys pilifera. Benth*) گیـاهی بوتـه‌ای چنـد سـاله و بسیار معطر که متعلق به خانواده نعنائیـان مـی‌باشـد. این گیاه اغلب در دامنـه ارتفاعـات کوهسـتانی رویـش مـی‌یابـد. سـنبله‌ای کـرکـدار دارای سـاقه‌هـای کوتـاه پوشیده از کرک، برگ‌هـای سـاده و باریـک، گـل‌هـای صورتی متمایل بـه سـفید و تمـام انـدام هـوایی دارای عطر بسیار نافذ می‌باشد. بخش های هوایی این گیاه به صـورت چـای گیـاهی بـه شـکل خـوراکی در درمـان اختلالات عفونی، تنفسی، روماتوئیدی و التهابی کاربرد دارند(۱۵). هم‌چنین اثرات ضد میکروبی، ضـدتوموری و آنتی‌اکسیدانی گیاهان هم‌خـانواده سـنبله‌ای کرکـدار در پژوهش‌های مختلفی اثبات شده است(۱۶ و ۱۵). بـا توجه به خصوصیت‌های آنتی‌اکسیدان و ضـدتوموری عصاره هیدروالکلی اندام هوایی گیاه سنبله‌ای کرکدار و هم‌چنین نقـش اکسـیدان‌هـا در بـروز ایـن بیمـاری، هـدف از ایـن مطالعـه بررسـی خاصـیت آپوپتوتیـک عصاره متانولی، فرکشن‌های آلکالوئیدی و ترپنوئیـدی گیاه سنبله‌ای کرکـدار بـر روی سـلول هـای سـرطانی رده HT-29 می‌باشد.

روش بررسی

در ایـن مطالعـه تجربـی، انـدام هـوایی گیـاه سنبله‌ای کرکدار *Stachys pilifera* از ارتفاعات کـوه دنـا در اســـتان کهگیلویـــه و بویراحمـــد در منطقـــه‌ای بـا مختصـات جغرافیـایی 34º29'29 N و 51º4'49 E جمع‌آوری شدند. نام علمی‌آن بـه وسـیله گیـاه‌شـناس مرکز تحقیقات گیاهان دارویی دانشـگاه یاسـوج تأییـد شد و شـماره هربـاریوم NO.۱۸۹۷ بـرای آن‌هـا تهیـه گردید.

پس از جمع‌آوری گیاهـان مقـدار ۱۰۰ گـرم از گیاه در ۸۰۰ میلی‌لیتر متانول ۷۰ درصد خیسانده شـد و به مدت ۴۸ ساعت در دمای اتاق قرار گرفت. عصاره صاف شد و باقیمانده بعـد از گذشـت ۲۴ سـاعت بـار دیگر با همان حلال عصـاره‌گیـری شـد و بـه عصـاره اولیـه اضـافه شـد. سـپس حـلال در دمـای ۴۰ درجـه سانتی‌گراد به وسـیله دسـتگاه روتـاری تبخیـر شـد و سپس به وسیله دستگاه فریز درایر به عصاره خشـک تبدیل شد. بـرای تهیـه عصـاره آلکالوئیـد۲۰۰ گـرم از پـودر گیـاه *Stachys pilifera* را بـا ۵۰۰ میلـی‌لیتـر پترولیـوم اتـر بـه مـدت ۳ شـبانه روز بـه روش خیساندن(ماسراسیون) عصاره‌گیری و پس از صـاف کردن و تغلیظ به وسـیله دسـتگاه روتـاری بـه نسـبت برابر متانول۷۰ درصد سرد بـه عصـاره اضـافه و در این مرحله دوفاز ایجاد می‌شـود، فـاز رویـی عصـاره

روغنی(حاوی ترکیب‌های غیرقطبی گیاه) و فاز زیرین سایر ترکیب‌های گیاه را دارا می‌باشد. در مرحله بعد به نسبت برابر اسید کلریدریک ۲۰ درصد به محلول متانولی قبل اضافه گردید تا سایر ترکیب‌های رسوب کنند. پس از صاف کردن این محلول به محلول حاصل مقداری آمونیاک اضافه شد. در این مرحله مجدد دو فاز ایجاد می‌گردد که فاز زیرین حاوی آلکالوئیدهای گیاه می‌باشد. به محلول حاصله کلروفرم اضافه گردید تا الکالوئیدها وارد فاز کلروفرمی شود و سپس محلول حاصله رو با کاغذ صافی واتمن صاف و در انکوباتور ۳۷ درجه خشک شد(۱۷). مقدار ۲۰۰ گرم پودر گیاه *Stachys pilifera* به وسیله حلال n ـ هگزان در دمای اتاق عصاره‌گیری(به روش خیساندن) انجام شد. حاصل این تلاش پس از تبخیر حلال، عصاره هگزانی بود. به منظور جدا کردن چربی‌ها و هیدروکربن‌های اشباع، به عصاره حاصل مقدار کافی متانول اضافه شد و به مدت ۲۴ ساعت در فریزر قرار داده شد. بدین ترتیب چربی‌ها و هیدروکربن‌های سنگین رسوب داده شد و با صاف کردن از عصاره جدا شدند(۱۷).

رده سلولی HT-29 مربوط به سرطان کلورکتال با منشاء انسانی از انستیتو پاستور ایران به صورت ویال خریداری شد. این رده سلو لی با محیط کشت RPMI-1640، سرم جنین گاوی(FBS) ۱۰ درصد، پنی‌سیلین به میزان ۱۰۰ یونیت بر میلی‌مول در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و فشار ۵ درصد CO_2 کشت داده شد. به منظور تعیین اثرات بهینه عصاره از دوزهای مؤثر دارویی(غلظت‌های نزدیک به IC_{50}) در این تحقیق در نظر گرفته شد. هم‌چنین سلول‌های تیمار نشده به عنوان سلول‌های گروه کنترل و سیس پلاتین به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. در ضمن به منظور افزایش بهره وری کار و بررسی مقایسه‌ای، آزمایش‌های به صورت تریپلیکیت انجام شد(۱۹ و ۱۸).

برای این تست $۱×۱۰^۴$ سلول رده HT-29 در هر یک از چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای ریخته شد. گروه‌ها شامل؛ کنترل بدون تیمار، کنترل مثبت(سیس پلاتین) و گروه‌های درمان(عصاره متانولی و فراکشن آلکالوئیدی و ترپنوئیدی) و پس از تیمار سلول‌ها با دوزهای سیس پلاتین(۳/۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر)، عصاره متانولی(۴۸۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر)، فرکشن های آلکالوئیدی(۳۵/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و ترپنوئیدی(۳۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) بعد از گذشت ۲۴ ساعت ابتدا سلول‌ها با استفاده از بافر فسفات(PBS)[1] شستشو داده شدند، سپس محلول MTT ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای اضافه شد و به مدت ۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از طی زمان انکوباسیون، محلول رویی در چاهک‌ها خالی گردید و ۱۰۰ میکرولیتر

1-Phosphate Bufer Salin(PBS)
2-Dimethyl Sulfoxide (DMSO)

محلول دی متیل سولفواکساید (DMSO) به هر کدام از چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه جهت حل کردن در تاریکی تکان داده شد. سپس به وسیله الایزا ریدر جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۵۷۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

آپوپتوز، مرگ برنامه‌ریزی شده سلول می‌باشد که با یک سری ویژگی‌ها مشخص می‌شود، از جمله تراکم سیتوپلاسم، جوانه زدن غشای سیتوپلاسمی و شکسته شدن DNA برای این تست ۳ میلی‌لیتر از سوسپانسیون سلولی حاوی $۱×۱۰^{۶}$ سلول در پلیت‌های ۶ خانه‌ای ریخته شدند. سلول‌ها تحت تیمار با دوز دارویی سیسپلاتین، عصاره متانولی، فرکشن‌های آلکالوئیدی و ترپنوئیدی قرار گرفتند و بعد از گذشت زمان ۲۴ ساعت انکوباسیون DNA سلول‌ها با استفاده از کیت محصول کمپانی سیناژن (DNA Isolation Kit) استخراج گردید. برای این کار ابتدا سلول‌ها با استفاده از PBS شستشو شد و در دور ۱۳۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانترفیوژ شد، سپس مایع رویی خارج و طبق پروتکل کیت DNA سلول‌ها در میکروتیوپ‌های مخصوص استخراج شدند و نمونه DNA به دست آمده برروی ژل آگاروز ۱/۵ درصد الکتروفورز گردید و نتیجه با استفاده از ژل داک مشاهده شد.

به منظور سنجش آپوپتوز و تعداد سلول‌های آپوپتوز شده در یک جمعیت سلولی تیمار شده با عصاره‌های گیاهی و فرکشن‌های آن‌ها و قیاس آن با جمعیت سلولی در سلول‌های تیمار نشده(کنترل منفی) و سیس پلاتین رنگ‌آمیزی سلول‌ها با دو رنگ Annexin-FITC و PI طبق دستور کار و با کمک دستگاه فلوسیتومتری انجام گرفت. بدین صورت که سلول‌های HT-29 درتراکم $۵×۱۰^{۵}$ سلول در هر چاهک یک پلیت ۶ خانه کشت داده شده و پس از رسیدن به تراکم مناسب، با غلظت‌های مؤثر دارویی تیمار شدند. پس از ۲۴ ساعت، سلول‌ها به آرامی تری پسینه شدند و پس از سانتریفیوژ، رسوب سلولی با محیط کشت شستشو داده شد و مجدداً در ۵۰۰ میکرولیتر بافر اتصالی (1X Binding Buffer) سوسپانس گردید. سپس ۵ میکرولیتر از Annexin-FITC و ۵ میکرولیتر از رنگ PI (۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) به سوسپانسیون حاصل اضافه شد. پس از ۱۵ دقیقه انکوبه شدن در دمای محیط و در تاریکی، اتصال Annexin-FITC و رنگ PI با دستگاه فلوسیتومتر آنالیز شدند. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار دستگاه و تقسیم نقاط ثبت شده در منحنی دو بعدی به چهار ناحیه Q_1 تا Q4 صورت گرفت.

تمامی آنالیزهای داده‌ها در ۳ تکرار انجام شد. با استفاده از نرم افزار GraphPad Prism7 میانگین ۳ بار تکرار و انحراف معیار آنها

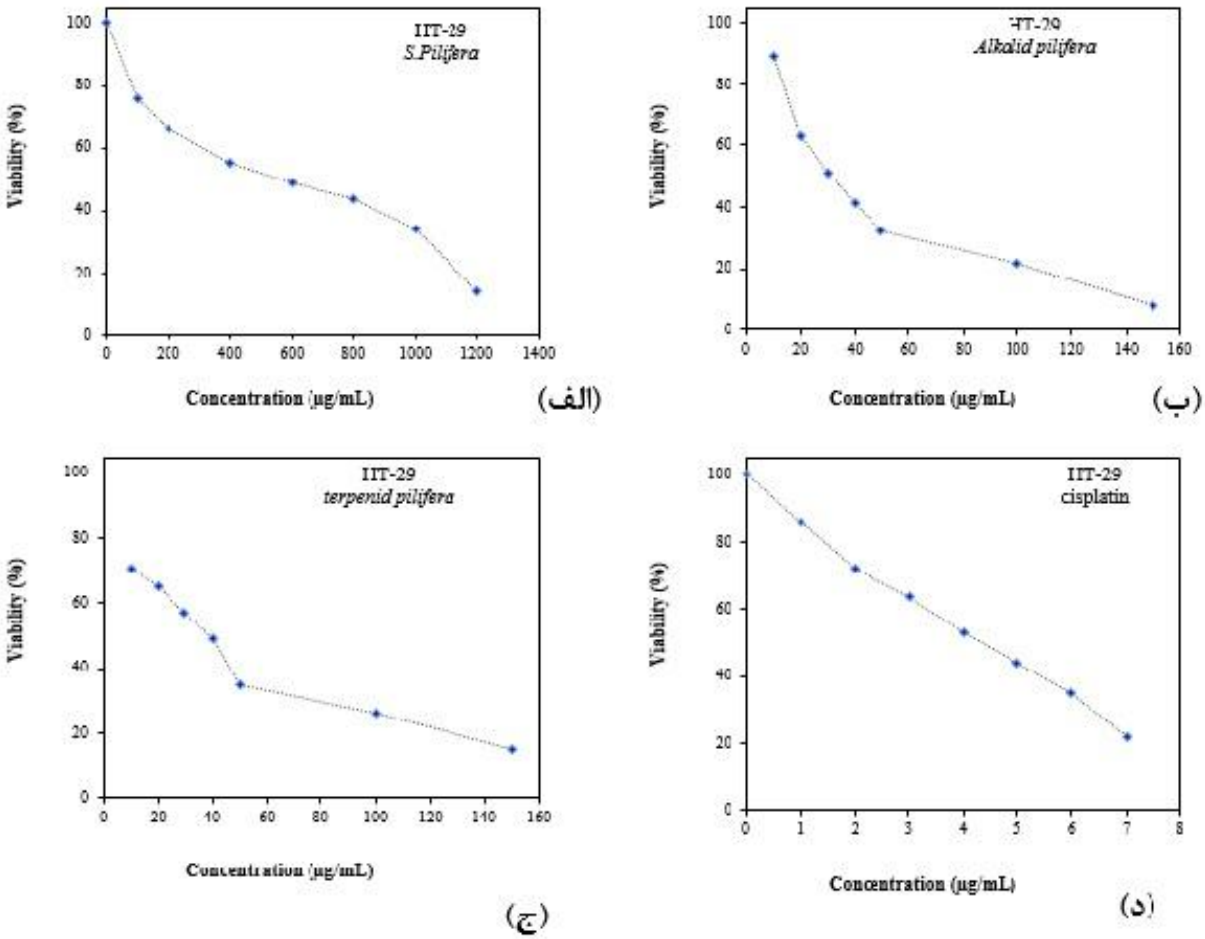
محاسبه شد. با استفاده از این نرم افزار مقدار IC_{50} نمونه‌ها که بیانگر غلظتی از نمونه است که موجب ۵۰ درصد مهار رشد سلول‌های سرطانی می‌شود، محاسبه شد. برای تجزیه و تحلیل اثر غلظت‌های مؤثر دارویی عصاره و فرکشن‌های آلکالوئیدی و ترپنوئیدی در تست‌های آپوپتوز بر رده سلول سرطانی رده HT-29 از آزمون آماری آنالیز واریانس یک طرفه و تست تعقیبی توکی استفاده گردید.

یافته‌ها

نتایج با استفاده از تست MTT پس از ۲۴ ساعت تیمار سلول‌های رده HT-29 با غلظت‌های مختلف عصاره(۱۴۰۰-۱ میکرو گرم بر میلی‌لیتر) در نمودار ۱ نشان داده شده است. نتایج ۵۰ درصد غلظت مهارکنندگی(IC_{50}) در جدول ۱ آورده شده است و با افزایش غلظت عصاره، فرکشن‌های آلکالوئیدی و ترپنوئیدی سنبله‌ای کرکدار جذب نوری(OD) حاصل از تست MTT کاهش یافت. نمودار بقای سلولی نشان می‌دهد که رشد سلول‌ها به صورت وابسته به دوز مهار می‌شود.

برای بررسی فرآیند آپوپتوز از آزمون قطعه قطعه شدن DNA استفاده شد. با توجه به(شکل ۱) مشاهده باند کشیده(Smear) در سلول‌های تیمار شده با دوز دارویی مؤثر سیس پلاتین، عصاره متانولی، فرکشن ترپنوئیدی و آلکالوئیدی آن‌ها بر روی ژل آگارز و عدم مشاهده آن در سلول‌های گروه کنترل، نشان دهنده وقوع مرگ سلولی‌آپوپتوزی در سلول‌های رده HT-29 می‌باشد. بیشترین شکست DNA در رده HT-29 مربوط به تیمار سیس پلاتین می‌باشد. در حالی که کشیدگی مربوط به آلکالوئیدی و ترپنوئیدی کمتر از سایر تیمارها می‌باشد(شکل۱).

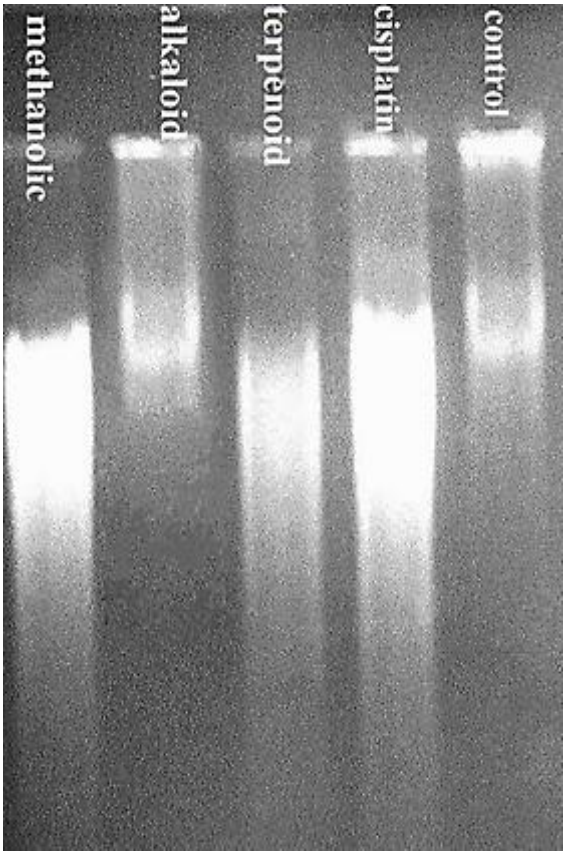
به منظور بررسی این که مرگ سلولی از طریق القای آپوپتوز روی داده است یا خیر، روش فلوسیتومتری با کمک رنگ‌آمیزی انکسین و پروپودیوم یداید انجام گرفت(نمودار ۲). آنالیز داده‌ها با کمک نرم افزار(Flow join) دستگاه فلوسیتومتری نشان داد که پس از ۲۴ ساعت تیمار سلول‌ها با غلظت‌های مختلف(کنترل، عصاره‌های متانولی، الکالوئیدی، ترپنوئیدی و سیس پلاتین) میزان آپوپتوز محاسبه گردید(جدول۲). جمعیت سلول‌های آپوپتوز شده با غلظت دارویی، به صورت معنی‌دار نسبت به میزان آپوپتوز در سلول‌های تیمار نشده افزایش یافت($p< ۰/۰۱$). بیشترین درصد افزایش آپوپتوز در این رده سلولی نسبت به کنترل مربوط به سیس پلاتین و عصاره متانولی بوده این در حالی است که فرکشن ترپنوئیدی افزایش کمتری نسبت به گروه کنترل دارد.



نمودار ۱: تأثیر عصاره هیدروالکلی سنبله‌ای کرکدار (*Stachys pilifera*)، فرکشن آلکالوئیدی، ترپنوئیدی و سیس پلاتین پس از ۲۴ ساعت تیمار بر تکثیر سلول‌های رده HT-29 (الف) تأثیرعصاره سنبله ای کرکدار بر بقای سلولی، (ب) تأثیر فرکشن آلکالوئیدی بر بقای سلولی، (ج) تأثیر فرکشن ترپنوئیدی بر بقای سلولی و (د)تأثیر داروی سیس پلاتین بر بقای سلولی. با افزایش مقدار دوز عصاره میزان مهار تکثیر سلولی نیز افزایش می‌یابد. بنابراین مهار تکثیرسلولی به صورت وابسته به دوز می‌باشد. تمام تست ها با سه تکرار انجام شد و آنالیز داده ها بر اساس میانگین ± انحراف‌معیار گزارش شده است.

جدول ۱: نتایج حاصل از تست(MTT)

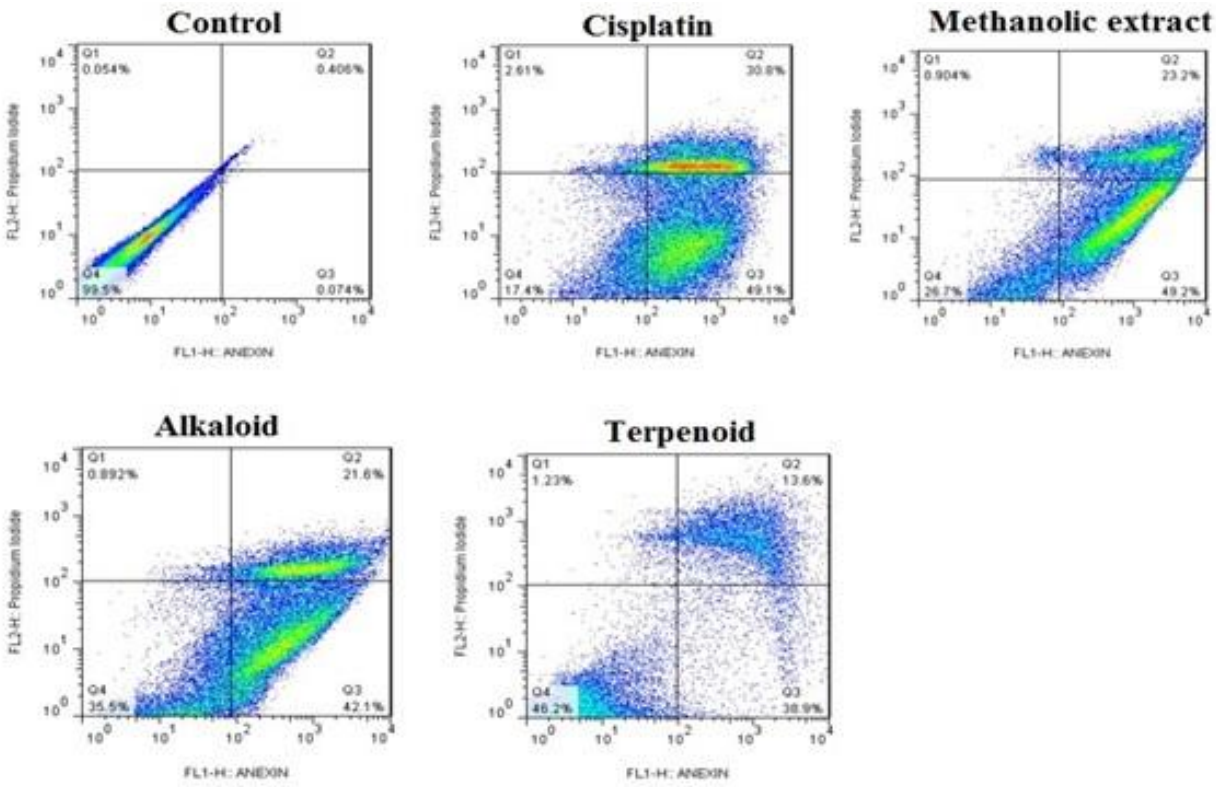
رده سلولی HT-29	IC50(میکروگرم بر میلی‌لیتر)
عصاره متانولی	۶۱۲/۸
فرکشن الکالوئیدی	۴۶/۴
فرکشن ترپنوئیدی	۴۶/۸
سیس پلاتین	۴/۰۶



شکل ۱: بررسی قطعه قطعه شدن DNA سلول‌های رده HT-29 تحت تیمار با دوز دارویی مؤثر عصاره متانولی سنبله‌ای کرکدار، فرکشن ترپنوئیدی، آلکالوئیدی و سیس پلاتین. حالت کشیدگی در باندها در تیمارهای مختلف و عدم مشاهده آن در سلول‌های کنترل می‌تواند حاکی از القاء آپوپتوز در تیمارهای بکار رفته باشد. وجود حالت اسمیر و نردبانی در تیمار با سیس پلاتین وجود آپوپتوز را نشان می‌دهد

جدول۲: میزان درصد آپوپتوز در سلول‌ها پس از ۲۴ ساعت تیمار با عصاره‌های متانولی ترپنوئیدی وآلکالوئیدی گیاه سنبله‌ای کرکدار (Stachys pilifera) و سیس پلاتین در سلول‌های سرطانی رده HT-29 به کمک فلوسیتومتری

گروه‌های مورد سنجش	میزان آپوپتوز (درصد)رده HT-29
کنترل(منفی)	۰/۴۰۶ ± ۰/۱۱
سیس پلاتین (کنترل مثبت)	۳۰/۸ ± ۰/۱۳
عصاره سنبله ای کرکدار	۲۳/۲ ± ۰/۵۱
عصاره آلکالوئیدی سنبله ای کرکدار	۲۱/۶ ± ۱/۴۶
عصاره ترپنوئیدی سنبله ای کرکدار	۱۳/۶۳ ± ۰/۶۷



نمودار۲: نمودارهای فلوسیتومتری حاصل از تیمارهای مختلف عصاره متانولی و فرکشن‌های آلکالوئیدی و ترپنوئیدی سنبله‌ای کرکدار (*Stachys pilifera*) با رنگ انکسین V و PI

بحث

سرطان کلورکتال سومین بدخیمی در دنیا بوده و شیوع ابتلا به این بدخیمی در اکثر کشورهای دنیا از جمله ایران رو به افزایش می‌باشد. از جمله علل مرتبط با شیب صعودی ابتلاء به سرطان می توان به عوامل محیطی از جمله؛ آلودگی هوا، استرس، الگوی زندگی و رژیم غذایی افراد اشاره کرد. مشخص شده است که مصرف مواد غذایی که دارای خاصیت آنتی‌اکسیدان می‌باشند، در پیشگیری و کاهش ابتلاء به سرطان‌ها نقش مؤثری دارد(۲۴). از طرفی دیگر، علی‌رغم استفاده از راهکارهای درمانی از جمله جراحی، شیمی درمانی و رادیوتراپی همچنان میزان مرگ و میر در بیماران مبتلا به سرطان بالا می‌باشد که خود حکایت از ناکارآمدی این راهکارهای درمانی دارد. گرایش و توجه به استفاده از فرآورده‌های طبیعی و مکمل‌های غذایی دارای خاصیت ضدسرطانی طی سال‌های اخیر بسیار افزایش داشته است. از جمله مکمل‌های غذایی مورد توجه در این خصوص، می‌توان به عصاره گیاه سنبله‌ای کرکدار اشاره کرد که اخیراً پژوهش‌هایی راجع به اثر ضد سرطانی این فرآورده گیاهی انجام شده است(۲۴). هدف از این مطالعه بررسی اثر آپوپتوزی عصاره سنبله‌ای کرکدار(*Stachys pilifera Benth*) و فرکشن آلکالوئیدی و ترپنوئیدی آن در سلول‌های سرطانی کولورکتال HT-29 می‌باشد.

درصد بالای از جمعیت جهان و به ویژه کشورهای در حال توسعه از داروهای گیاهی و مشتقات آن‌ها برای درمان بیماری‌ها استفاده می‌کنند، به این علت که معتقدند داروهای گیاهی در کنار ارزان بودن و قابل دسترس بودن عوارض جانبی بسیار کمتری می‌باشند. یک داروی ضدسرطانی مناسب باید بتواند سلول‌های سرطانی را بدون اثرات جانبی بر سلول‌های نرمال از بین ببرد. این شرایط ایده‌آل با القاء آپوپتوز بر سلول‌های سرطانی به دست می‌آید. بسیاری از داروهای رایج از گیاهان منشأ گرفته‌اند. در گذشته منشأ بسیاری از داروها از جمله؛ آسپیرین، دیگوسین و مورفین گیاهان بود(۲۰). دنیای امروز با شیوع زیاد بیماری سرطان مواجه است به طوری که این بیماری دومین علت مرگ و میر بعد از بیماری‌های قلبی و عروقی است. شناخت مکانیسم‌های مهم دخیل در ایجاد سرطان برای پیشبرد روش‌های درمانی برای درمان نئوپلاسم‌ها مهم می‌باشد(۱۲). یک سری جهش‌ها در سلول‌ها سبب مقاوم شدن سلول‌ها به محرک‌های مرگ و آپوپتوز می‌شود، لذا استفاده از ترکیب‌های شیمیایی گیاهان دارویی القاء کننده آپوپتوز یکی از اهداف اصلی درمان بیماری سرطان می‌باشد. گیاهان هم در پیشگیری و هم در درمان بیماری سرطان نقش چشمگیری دارند. این ترکیب‌ها با مکانیسم‌های مختلف عمل می‌کنند، اما القاء آپوپتوز نقطه مشترک بسیاری از این ترکیب‌ها می‌باشد. پژوهش‌های متعددی اثرات سایتوتوکسیک و ضدتوموری گونه‌های مختلف از جنس *Stachys* را نشان داده است. جاسبی و همکاران اثر سایتوتوکسیک گونه‌های مختلف جنس *Stachys* را بر روی رده‌های سلول سرطانی مختلف بررسی کردند و نشان دادند که عصاره گیاهان جنس *Stachys* باعث کاهش تکثیر سلول‌های سرطانی پستان و خون می‌شود(۲۱). لیپینگ ما و همکاران اثر سایتوتوکسیک عصاره و فرکشن پلی‌ساکاریدی گونه *floridana* بررسی کردند که عصاره اثرات مهاری نسبت به رده سلولی کلورکتال(HT-29) نشان داد(۲۲). نتایج این مطالعه نشان داد که عصاره متانولی و فرکشن‌های آلکالوئیدی و ترپنوئیدی سنبله‌ای کرکدار در مقایسه با کنترل دارای اثرات سایتوتوکسیک معنی‌داری بر روی سلول‌های سرطانی رده(HT-29) بوده و اثرات سایتوتوکسیک عصاره و فرکشن‌های گیاه وابسته به دوز باعث مهار رشد می‌شود. نتایج حاصل، مشابه مطالعه جاسبی و لیپینگ ما بود که بر روی سلول‌های سرطانی کلورکتال و پستان انجام داده بودند.

قطعه قطعه شدن DNA از شاخص‌های مورفولوژیک در آپوپتوز می‌باشد که این ویژگی با انجام DNA Fragmentation ثابت شد. نتایج به دست آمده از این تست نشان داد که عصاره و سیس پلاتین باعث شکست و قطعه قطعه شدن DNA در رده سلول HT-29 شده است و نتایج به دست آمده از این مطالعه با نتایج مطالعه‌ای که امیر غفران و همکاران

در بررسی شکست DNA با عصاره گونه *Stachys obtusicrena* انجام داده بودند، پرداختند که باعث قطعه قطعه شدن DNA در رده سلول‌های لوسمی شد، هم‌خوانی دارد(۲۳). نتایج حاصل از فلوسیتومتری نشان داد که میزان آپوپتوز در غلظت‌های دوز دارویی مؤثر ترکیب سیس پلاتین، عصاره و فرکشن‌های گیاهی افزایش یافت، آپوپتوز در دوزهای مؤثر دارویی سیس پلاتین نسبت به سلول‌های کنترل منفی افزایش معنی‌داری را نشان داد. مشخص شده سیس پلاتین، یکی از مؤثرترین داروهای ضد سرطانی، در دوزهای پایین باعث القای آپوپتوز در سلول‌های توموری می‌شود، در حالی که در غلظت‌های بالا احتمالاً از طریق ایجاد نکروز در سلول‌ها باعث مرگ آن‌ها می‌گردد(۲۴). عصاره متانولی گیاه و فراکشن آلکالوئیدی و ترپنوئیدی نیز در دوزهای مؤثر دارویی باعث القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی HT-29 شده است. این نتایج با پژوهش‌های لای و همکاران برای اولین بار نشان دادند که عصاره‌ها و فرکشن‌های گیاهی می‌توانند موجب القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی گردد(۲۵). پناهی و همکاران خاصیت ضد تکثیری و ضد سرطانی گیاه *Stachys pilifera* را نشان دادند(۲۶). مطالعه دیگری که حاکی از عملکرد القای آپوپتوزی در ترکیب‌های گیاهی و متابولیت‌های ثانویه آن‌ها بر روی انواع مختلف سلول‌ها می‌باشند(۲۷) و مطالعه توکلی و همکاران نشان دادند که برخی گونه‌های *Stachys* باعث القای آپوپتوز در سلول‌های مغزی می‌شوند(۲۸) کاملاً مطابقت دارد که خاصیت ضد آپوپتوزی گیاه سنبله‌ای کرکدار را می‌توان به دلیل وجود ترکیب‌های آلکالوئیدی و ترپنوئیدی موجود در آن نسبت داد.

نتیجه‌گیری

تیمار سلول‌های HT-29 با عصاره متانولی و فرکشن‌های آلکالوئیدی و ترپنوئیدی باعث مهار رشد این سلول‌ها شده و اثرات سایتوتوکسیک القا شده به وسیله این عصاره و فرکشن‌ها با غلظت ارتباط مستقیم دارد، به طوری که قابلیت زیست‌پذیری سلول‌ها با افزایش غلظت کاهش می‌یابد. عصاره متانولی و فرکشن آلکالوئیدی نسبت به کنترل از طریق شکست DNA و مسیرهای آپوپتوز باعث القای آپوپتوز می‌گردد. با توجه به نتایج به دست آمده عصاره متانولی می‌تواند کاندید مناسبی جهت شناسایی ترکیب‌های فعال ضدسرطانی باشد. برای بررسی دقیق مکانیزم‌های آپوپتوز پیشنهاد می‌شود از تست‌های تکمیلی آپوپتوز و ترکیب خالص گیاه سنبله‌ای کرکدار استفاده گردد.

تقدیر و تشکر

این مقاله حاصل بخشی از پایان نامه دانشجویی مقطع دکترا در رشته بیوشیمی با کد اخلاق IR.YUMS.REC.1394.144 دانشگاه گیلان می‌باشد، بدین وسیله از مرکز تحقیقات گیاهان دارویی دانشگاه علوم پزشکی یاسوج که مراحل انجام تحقیق در این مرکز صورت پذیرفت، سپاسگزاری می‌کنیم.

REFERENCES

1.Jena J, Ranjan R, Ranjan P, Sarangi MK. A study on natural anticancer plants. Int J Pharmaceut Chem Sci 2012; 1(1): 365-8.
2.Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Genetic instabilities in human cancers. Nature 1998; 396(6712): 643-9.
3.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.
4.Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, et al. Cancer statistics. CA: A Cancer Journal for Clinicians 2008; 58(2): 7; 91-6.
5.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. Ethnicity & Disease 2016; 23(3): 349-55.
6.Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics 2002. CA: A Cancer Journal For Clinicians 2005; 55(2): 74-108.
7.Mousavi SM, Gouya MM, Ramazani R, Davanlou M, Hajsadeghi N, Seddighi Z. Cancer incidence and mortality in Iran. Annals of Oncology 2009; 20(3): 556-63.
8.Moradi A, Khayamzadeh M, Guya MM, Mirzaei HR, Salmanian R, Rakhsha A, et al. Survival of colorectal cancer in Iran. Asian Pac J Cancer Prev 2009; 10(4): 583-6.
9.Azadeh S, Moghimi-Dehkordi B, Fatem S, Pourhoseingholi M, Ghiasi S, Zali M. Colorectal cancer in Iran: an epidemiological study. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention. APJCP 2007; 9(1): 123-6.
10.Yang G, Li X, Li X, Wang L, Li J, Song X, et al. Traditional chinese medicine in cancer care: a review of case series published in the chinese literature. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine 2012; 9(1): 1-8.
11.Møller P, Wallin H, Knudsen LE. Oxidative stress associated with exercise, psychological stress and life-style factors. Chemico-biological Interactions 1996; 102(1): 17-36.
12.HemaIswarya S, Doble M. Potential synergism of natural products in the treatment of cancer. Phytotherapy Research 2006; 20(4): 239-49.
13.Panahi Kokhdan E, Ahmadi K, Sadeghi H, Sadeghi H, Dadgary F, Danaei N, et al. Hepatoprotective effect of Stachys pilifera ethanol extract in carbon tetrachloride-induce hepatotoxicity in rats. Pharmaceutical Biology 2017; 55(1): 1389-93.
14.Chhetri D, Parajuli P, Subba G. Antidiabetic plants used by sikkim and darjeeling himalayan tribes, india. Journal of Ethnopharmacology 2005; 99(2): 199-202.
15.Zargari A. Medicinal plants. Tehran: Tehran University Press; 1992; 45.
16.Farjam MH, Khalili M, Rustayian A, Javidnia K, Izadi S. Biological activity of the n-butanolic extract of Stachys pilifera. African Journal of Microbiology Research 2011; 5(28): 5115-9.
17.Hadjiakhoondi F, Ostad S, Khanavi M, Hadjiakhoondi A, Farahanikia B, Salarytabar A. Cytotoxicity of two species of Glaucium from Iran. JMP 2013; 1(45): 85-92.
18.Mianabadi M, Panahi E, Sadeghi H, Jafari A. K562 cell cycle arrest in G0/G1 phase by two species of Daphne family. ISMJ 2015; 18(1): 125-34.
19.Kokhdan EP, Mianabadi M, Sadeghi H, Khalaf M. The effects of two species of daphne, betulin and betulinic acid on alkaline phosphatase activity in two human cancer cell lines, k562 and mcf-7. Armaghane Danesh Bimonthly Journal 2014;18(11): 900-9.
20.Pal SK, Shukla Y. Herbal medicine: current status and the future. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention 2003; 4(4): 281-8.
21.Jassbi AR, Miri R, Asadollahi M, Javanmardi N, Firuzi O. Cytotoxic, antioxidant and antimicrobial effects of nine species of woundwort (Stachys) plants. Pharmaceutical Biology 2014; 52(1): 62-7.
22.Ma L, Qin C, Wang M, Gan D, Cao L, Ye H, et al. Preparation, preliminary characterization and inhibitory effect on human colon cancer HT-29 cells of an acidic polysaccharide fraction from Stachys floridana Schuttl. ex Benth. Food and Chemical Toxicology 2013; 60: 269-76.
23.Amirghofran Z, Bahmani M, Azadmehr A, Javidnia K. Immunomodulatory and apoptotic effects of Stachys obtusicrena on proliferative lymphocytes. Medical Science Monitor 2007; 13(6): BR145-BR50.
24.Lieberthal W ,Triaca V, Levine J. Mechanisms of death induced by cisplatin in proximal tubular epithelial cells: apoptosis vs. necrosis. American Journal of Physiology-Renal Physiology 1996; 270(4): F700-F8.

25.Narendera P, Henry CL, Singh CH. Artemisinin induces apoptosis in human cancer cells. Anticancer Research 2004; 24(4): 2277-80.
26.Kokhdan EP, Sadeghi H, Ghafoori H, Sadeghi H, Danaei N, Javadian H, et al. Cytotoxic effect of methanolic extract, alkaloid and terpenoid fractions of Stachys pilifera against HT-29 cell line . Research in Pharmaceutical Sciences 2018; 13(5): 404.
27.Efferth T, Dunstan H, Sauerbrey A, Miyachi H, Chitambar CR. The anti-malarial artesunate is also active against cancer. International Journal of Oncology 2001; 18(4): 767-73.
28.Tavakkoli M, Miri R, Jassbi AR, Erfani N, Asadollahi M, Ghasemi M, et al. Carthamus, Salvia and Stachys species protect neuronal cells against oxidative stress-induced apoptosis. Pharmaceutical Biology 2014; 52(12): 1550-7.

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

Original Article

Apoptotic Effect of the *Stachys pilifera* Bent Plant Extracts on Colorectal Cancer Cell Line (HT- 29)

Panahi Kokhdan E[1], Sadeghi H[2], Ghafoori H[1], Sadeghi H[2], Danaei N[2], Salaminia SH[2], Aghamaali MR[1*]

[1]Department of Biology, University of Guilan, Rasht, Iran, [2]Medicinal Plants Research Center, Yasuj University of Medical Sciences, Yasuj, Iran

Received: 2 Jun 2018 Accepted: 19 Aug 2018

Abstract:

Background & aim*: Stachys pilifera Benth* (Lamiaceae) is used in traditional medicine to treat a variety of diseases. Despite some reports on the antitumor effects of some species of this genus, anticancer activity of *Stachys pilifera* has not been yet reported. In the present study, the researchers examined the cytotoxic effect and cell death mechanisms of methanolic extract of *Stachys pilifera* and its alkaloid and terpenoid fractions on the HT-29 colorectal cell line.

Methods: In the present study, HT-29 cells were cultivated and afterwards incubated in the methanolic extract of *Stachys pilifera* and its fractions at various concentrations for 24 hours. Cell viability was measured by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay. The effects of the extract and the tests performed on cell death mechanisms such as fragmentation of DNA and apoptosis were performed by flow cytometry. Cisplatin was used as the positive control. The collected data was analyzed by ANOVA and Tukey test.

Results: The results of IC50 of methanolic extract, alkaloid, tropenoid, and cisplatin on HT-29 cells after 24 hours were 612.8, 46.4, 46.8 and 4.06 µg / ml, respectively. The results indicated that the inhibition of cell proliferation was dose-dependent. The methanolic extracts of *Stachys* and cisplatin resulted in DNA fragmentation. The results of apoptosis test revealed that the highest percentage of apoptosis was observed in cisplatin (30.8%) and methanolic extracts (23.2%) than the control (untreated) group ($P < 0.05$).

Conclusion: These findings provide a basis for the therapeutic potential of S. pilfera in the treatment of colon cancer.

Keywords: *Stachys pilifera,* apoptosis, DNA fragmentation and HT- 29

[*]**Corresponding author**: **Panahi Kokhdan E.** Department of Biology, University of Guilan, Rasht, Iran
Email: aghamaali@guilan.ac.ir

Please cite this article as follows:
Panahi Kokhdan E, Sadeghi H, Ghafoori H, Sadeghi H, Danaei N, Salaminia SH, Aghamaali MR. Apoptotic Effect of the *Stachys pilifera* Bent Plant Extracts on Colorectal Cancer Cell Line (HT- 29). Armaghane-danesh 2019; 24(1): 17-30