

Cytotoxic Effect of Hydroalcoholic Extract of Cornus mas L. fruit on MCF7, HepG2 and CHO cell line by MTT Assay

Fatereh Rezaei¹,
Mohammad Shokrzadeh²,
Ahmad Majd³,
Taheer Nezhadsattari¹

¹Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

²Pharmaceutical Research Center, Department of Toxicology and Pharmacology, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

³Department of Biology, Faculty of Biological Sciences, North-tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

(Received June 9, 2013 ; Accepted April 28 , 2014)

Abstract

Background and purpose: Today cancer is considered as one of the leading causes of death worldwide. An impressive number of modern drugs used in cancer treatment are isolated or derived from natural sources based on their use in traditional medicine. *Cornus mas L.* (Cornaceae) has medicinal applications in treating a wide range of diseases such as cancer. This study was designed to evaluate the Cytotoxic effect of *Cornus mas L.* fruit hydroalcoholic extract on normal and cancer cell lines.

Material and Methods: Rip fruit and unripe fruit extract was prepared by soxhlet extraction method. The anticancer activity of different concentrations of the extract (0, 10, 50, 100, 150, 200, 250 µg/ml) in three cell lines MCF7 (breast cancer), HepG2 (liver cancer), and CHO (normal hamster ovary) were examined using MTT. Statistical analysis was performed using SPSS V.16.

Results: The findings revealed time and dose-dependent inhibition and also significant differences between the levels of IC₅₀ of unripe and ripe fruit in all cell lines (P<0.05). Also, the level of IC₅₀ of unripe and ripe fruit on normal cell lines was significantly different from that of the cancer cell lines (P<0.05). However, cytotoxicity of unripe fruit was found more than ripe fruit.

Conclusion: This study showed that hydroalcoholic extract of *Cornus mas L.* (unripe and ripe), have a considerable cytotoxic effect on cancer and normal cell lines and should be further investigated to find effective compounds present in the fruit extract. Hence, effective steps could be taken towards finding new drugs in treating cancer.

Keywords: MTT assay, *Cornus mas L.*, cancer cell line, IC₅₀, cytotoxicity

بررسی اثرات سمیت سلولی عصاره هیدروالکلی میوه گیاه زغال اخته بر سلول های سرطانی و CHO

فاطمه رضایی^۱
محمد شکرزاده^۲
احمد مجد^۳
طاهر نژاد ستاری^۱

چکیده

سابقه و هدف: سرطان یکی از علل عمده مرگ و میر در سراسر جهان می باشد. امروزه تعداد زیادی از داروهای مدرن مورد استفاده در درمان سرطان، بر اساس استفاده آن ها در طب سنتی از منابع طبیعی جداسازی یا مشتق شده اند. گیاه زغال اخته (*Cornus mas L*) از خانواده Cornaceae کاربردهای دارویی متعددی جهت درمان طیف وسیعی از بیماری ها از جمله سرطان دارد. در این مطالعه اثرات سایتوتوکسیک عصاره میوه نارس و رسیده گیاه زغال اخته بر رده سلول های سرطانی و نرمال مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها: عصاره هیدروالکلی میوه نارس و رسیده به روش سوکسله تهیه شد. فعالیت ضد سرطانی در غلظت های متفاوت عصاره (۲۵۰، ۲۰۰، ۱۵۰، ۱۰۰، ۵۰، ۱۰ و ۰ میکروگرم در میلی لیتر) روی سه رده سلولی MCF7 (سرطان سینه)، HepG2 (سرطان کبد) و CHO (نرمال تخمدان همستر) با روش MTT مورد بررسی قرار گرفت. تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم افزار SPSS ۱۶ انجام شد. مقایسه های متعدد بین بیش از دو گروه توسط آنالیز واریانسیک طرفه ANOVA و به دنبال آن تست توکی انجام شد. مقدار P کم تر از $P < 0/5$ برای تعیین سطح معنی دار بودن بین گروه ها در نظر گرفته شد.

یافته ها: یافته های پژوهش بیانگر مهارت وابسته به دوز و زمان و همچنین تفاوت های معنی دار بین میزان (half maximal inhibitory concentration) میوه نارس و رسیده در همه خطوط سلولی بود ($p < 0/05$). هم چنین میزان IC50 میوه نارس و رسیده سلول های نرمال نیز نسبت به سلول های سرطانی تفاوت معنی داری را نشان داد ($p < 0/05$). اگرچه سیتوتوکسیسیته میوه نارس نسبت به رسیده بیش تر است.

استنتاج: این مطالعه نشان می دهد که عصاره هیدروالکلی میوه *Cornus mas L* (نارس و رسیده)، تأثیر سیتوتوکسیک قابل توجهی، روی سلول های سرطانی و نرمال دارد و باید بررسی های بیشتر جهت یافتن ترکیبات مؤثر موجود در عصاره میوه گیاه صورت گیرد تا گامی در جهت یافتن و طراحی داروهای جدید و مؤثر در درمان سرطان باشد.

واژه های کلیدی: روش MTT، زغال اخته، خطوط سلولی سرطانی، IC50، سمیت سلولی

مقدمه

سرطان ها عامل مهم و مسئول ۲۳ درصد موارد مرگ و میر در افراد جامعه می باشند. آمار مرگ ناشی از سرطان (بیش از ۷ میلیون در سال) در سراسر جهان هشدار دهنده است و این آمار بیش از چای آی وی / ایدز،

E-mail: faterehzeaei62@gmail.com

مؤلف مسئول: فاطمه رضایی - تهران: دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات

۱. گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران

۲. مرکز تحقیقات علوم و دارویی، گروه سم شناسی / فارماکولوژی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۳. گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۳/۱۹ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۲/۵/۱۵ تاریخ تصویب: ۱۳۹۳/۲/۸

بیماری در ارتباط است. این امر به وجود آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی از قبیل ویتامین C، توکوفرول، کاروتنوئیدها، پلی‌فنول‌ها و فلاونوئیدها که در جلوگیری از صدمه ناشی از رادیکال‌های آزاد نقش دارند، نسبت داده شده است. فنل‌های گیاه معمولاً در میوه، سبزیجات، برگ، دانه، پوست ساقه، ریشه حضور دارند. خاصیت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات فنولیک عمده‌تاً به دلیل خواص ردوکس آن‌ها می‌باشد. آن‌ها به عنوان عوامل کاهش، اهداکنندگان هیدروژن و کلاته‌کننده‌های فلز عمل می‌کنند (۱۲) و می‌توانند نقش مهمی در تعدیل یا پیشگیری از بیماری‌های دژنراتیو ناشی از رادیکال‌های آزاد از جمله سرطان و دیابت ایفاء کنند. تحقیقات نشان می‌دهد که کمیت و کیفیت ترکیبات فیتو شیمیایی فنولیک موجود در میوه و سبزیجات به شکل چشم‌گیری تحت تأثیر کالتیوار، محیط، نوع خاک، شرایط رشد قرار می‌گیرد. هم‌چنین کیفیت میوه و سبزیجات بسته به مرحله بلوغ و رسیدگی ممکن است تحت تأثیر قرار گیرد. رسیدگی میوه یک فرآیند تکوینی پیچیده است که به دنبال اعمال تغییرات بیوشیمیایی خاص در متابولیسم سلولی و چندین فاکتور فیزیکی شیمیایی، می‌تواند منابع تغذیه‌ای میوه‌ها را تحت تأثیر قرار دهد (۱۳).

گیاه دارویی زغال اخته با نام علمی *Cornus mas L* متعلق به خانواده Cornaceae می‌باشد. زغال اخته در طب سنتی برای درمان اسهال، ورم روده‌ها، رفع تب، درمان بیماری مالاریا، دفع سنگ کلیه، هم‌چنین برای درمان عفونت‌های کلیه و مثانه به کار می‌رود (۱۶-۱۴). میوه زغال اخته حاوی گلوکز، فروکتوز، لاکتوز، اسید آلی و تانن، بیوفلاونوئیدها، مقدار زیادی ویتامین از جمله ویتامین C و ursolic acid است (۱۷). وجود انواع مختلف ترکیبات آنتی‌اکسیدانی شامل آنتوسیانین‌ها، فلاونوئیدها و مقدار زیادی ویتامین سبب شده است تا تحقیقات گوناگونی روی این گونه و گونه‌های دیگر این جنس صورت گیرد، به طوری که خواص ضد

مالاریا و سل است. تخمین زده می‌شود که تعداد موارد جدید سرطان به ۱۵ میلیون در هر سال تا سال ۲۰۲۰ برسد، که ۷۰ درصد از آن در کشورهای در حال توسعه خواهد بود (۱).

سرطان پستان شیوع بالایی در بین زنان دارد به طوری که حدود ۱۰ درصد زنان در طول عمر خود به این بیماری مبتلا می‌شوند. مطالعات اخیر پیشنهاد می‌دهند که سرطان پستان با رشد رو به افزایش خود، به یکی از شایع‌ترین بدخیمی‌ها در میان زنان ایرانی تبدیل شده و از هر ۱۰۰۰۰ زن ۱۲۰ نفر به این سرطان مبتلا می‌شوند (۳،۲).

روش‌های درمان متفاوتی برای سرطان‌ها وجود دارد که می‌توان به جراحی، شیمی‌درمانی، رادیوتراپی، هورمون‌درمانی، ایمونوتراپی و ... اشاره داشت غیر از درمان‌های رایج ذکر شده، استفاده از گیاهان دارویی در درمان سرطان از اهمیت فوق‌العاده‌ای برخوردار است (۵،۴). زیرا داروهای گیاهی طبیعی بوده و از این رو نسبت به درمان‌های دیگر بدون عوارض جانبی قابل توجهی می‌باشند. با این حال، بسیاری از گیاهان به ویژه در مقادیر بالا و با استفاده مکرر می‌توانند اثرات سمی داشته باشند (۶، ۷). بین سال‌های ۱۹۸۱ و ۲۰۰۲، ۵ درصد از مجموع ۱۰۳۱ داروی تأیید شده توسط اداره دارو و غذای ایالات متحده آمریکا محصولات طبیعی و ۲۳ درصد دیگر مولکول‌های مشتق شده از محصولات طبیعی بودند (۹،۸).

در کشورهای مختلف مطالعات متعددی جهت بررسی اثرات ضد سرطانی گیاهان دارویی بومی انجام شده و اثر داروهای گیاهی بر انواع رده‌های سلول‌های سرطانی (۶) از جمله رده سرطانی پستان (۱۱،۱۰) مورد ارزیابی قرار گرفته است. اما هنوز تأثیر مثبت بسیاری از این گیاهان به صورت علمی مورد بررسی و تحقیق قرار نگرفته است.

مطالعات نشان داده است که افزایش مصرف غلات و حبوبات، میوه‌ها و سبزیجات با کاهش خطر ابتلا به

صفر) میکروگرم در میلی لیتر تهیه شده که غلظت صفر به عنوان شاهد در نظر گرفته شد (غلظت DMSO در محیط کشت جهت جلوگیری از سمیت حلال ۰/۱ درصد در نظر گرفته شده و نمونه کنترل سلول‌های انکوبه شده با DMSO ۰/۱ درصد می‌باشد) (۲۳).

ب) کشت سلولی

رده سلولی سرطانی سینه (MCF7)، کبد (HepG2) و نرمال تخمدان هم‌ستر (CHO) از بانک سلولی انستیتو پاستور تهران خریداری شده و در محیط کشت ۱۶۴۰ RPMI (PAA) حاوی FBS ۱۰ درصد، پنی‌سیلین - استرپتومایسین یک درصد، آمفوتریپسین یک درصد کشت داده شدند. برای انجام تست‌های مختلف زمانی که سلول‌ها حداقل به ۷۰ درصد رشد سلولی رسیدند توسط تریپسین-EDTA (اتیلن در آمین تتراستیک اسید) از ته فلاسک جدا شده و در دور ۱۵۰۰ rpm به مدت پنج دقیقه سانتریفوژ شدند. رسوب سلولی در یک میلی‌لیتر محیط کشت به حالت سوسپانسیون تهیه شد و درصد زنده بودن سلول‌های موجود در سوسپانسیون سلولی با مخلوط شدن نسبت مساوی از تریپان بلو با استفاده از لام هموسیتمتر و بررسی با میکروسکوپ نوری تعیین شد. پس از حصول اطمینان از عدم آلودگی سلول‌ها، از سلول‌های با درصد زنده بودن بالای ۹۰ درصد برای انجام تست استفاده شد (۲۴-۲۶).

ج) سنجش میزان سمیت سلولی

به منظور بررسی اثر عصاره میوه زغال افته (نارس و رسیده) بر رشد و تکثیر سلول‌های سرطانی از روش رنگ سنجی MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, a yellow tetrazole) استفاده شد (۲۶). این روش یک تست متابولیک رقابتی میتوکندریایی است و بر پایه شکستن نمک ترازولیوم توسط آنزیم سوکسینات دهیدروژناز میتوکندریایی استوار است. در این روش میزان ۲۰۰ μl محیط کشت

مالاریایی (۱۵)، ضد باکتریایی (۱۵)، ضد میکروبی (۱۵، ۱۸، ۱۹)، آنتی‌هیستامینی (۱۹، ۱۵)، آنتی‌آلرژیک (۱۹، ۱۵)، ضد دیابتی (۲۰، ۱۸)، ضد التهابی، تأثیرات آن در آترواسکلروزیس (۲۱، ۲۰) و غیره این گیاه گزارش شده است. نکته مهم آن است که مهار رشد در سلول‌های سرطانی (Inhibition concentration of IC50) به عنوان یک معیار برای جلوگیری یا خاموش نمودن و در نهایت مرگ این سلول‌ها به کار می‌رود. لذا با توجه به این‌که تاکنون تحقیق مشابهی روی این گونه انجام نشده است، بر آن شدیم تا عصاره هیدروالکلی میوه نارس و رسیده گیاه *Cornus mas L.* را به منظور مهار رشد سلول‌های نرمال و سرطانی انسانی مورد ارزیابی قرار دهیم.

مواد و روش‌ها

الف) جمع آوری گیاه و عصاره گیری

میوه گیاه زغال افته، پس از تأیید گونه و نوع بر اساس خصوصیات گیاه شناسی توسط متخصص هرباریوم مرکز تحقیقات کشاورزی قزوین با شماره هرباریوم ۱۹۷۲، از منطقه سوگا قزوین در سال ۱۳۹۱ جمع آوری گردید. میوه‌ها (نارس و رسیده) در سایه به مدت پنج روز و پس از حرارت مصنوعی ۴۰ درجه سانتی‌گراد به مدت یک هفته کامل خشک شده و پس از جدا کردن هسته به کمک آسیاب معمولی خرد و ریز شدند. ۱۰۰ گرم نمونه خشک شده پودر شده به روش سوکسله و باحلال آب-اتانول به نسبت ۲۰ به ۸۰ عصاره گیری گردید. سپس عصاره توسط دستگاه روتاری اوپوراتور دردمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد تغلیظ شده و عصاره حاصل توسط فریز درایر خشک و به صورت پودر تهیه شد و بر اساس وزن خشک استاندارد شد (بازده حدود ۴۴ گرم برای میوه نارس (سبز رنگ) و ۳۷/۴ گرم برای میوه رسیده (قرمز رنگ)) (۲۳، ۲۲).

عصاره در DMSO حل شد و سپس غلظت‌های مختلف از عصاره (۲۵۰، ۲۰۰، ۱۵۰، ۱۰۰، ۵۰، ۱۰ و

مورد آزمایش قرار گرفت. مقادیر IC50 مربوط به هر یک از عصاره‌ها روی رده‌های سلولی MCF-7، HepG2 و CHO در سه زمان مورد مطالعه (۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت)، در جدول شماره ۱ آورده شده است.

جدول شماره ۱: مقادیر IC50 مربوط به هر یک از عصاره‌ها روی رده‌های سلولی MCF-7، HepG2 و CHO در زمان‌های مورد مطالعه (۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت)

Ripe fruit total extract (IC50 ^a ±SD) ^b	Unripe fruit total extract (IC50 ^a ±SD) ^b	Time(h)	Cell line
۱۱۲/۲ ± ۴/۸	۶۷/۰۹ ± ۲/۱	۲۴	MCF-7
۵۰/۷ ± ۲/۵	۳۷/۲ ± ۲/۷	۴۸	
۴۸ ± ۲/۱	۳۰/۱ ± ۱/۸	۷۲	
۱۸۱/۱ ± ۴/۲	۱۳۰/۱ ± ۶/۸	۲۴	HepG2
۶۷/۹ ± ۱/۲	۵۶/۲ ± ۳/۶	۴۸	
۵۶/۴ ± ۳/۹	۴۷/۴ ± ۱/۲	۷۲	
>۲۵۰	>۲۵۰	۲۴	CHO
۲۰۱/۷ ± ۴/۱	۱۵۹/۹ ± ۷/۱	۴۸	
۱۳۷/۱ ± ۳/۲	۱۴۰ ± ۳/۲	۷۲	

^a μg/ml,

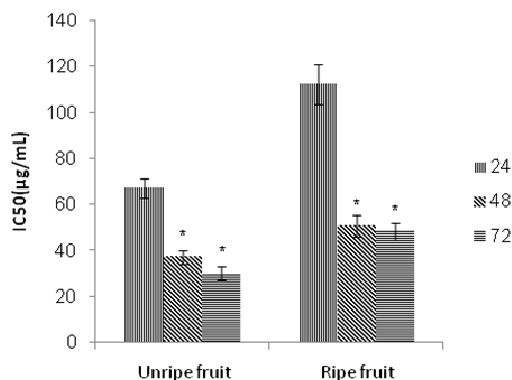
^b *p<0.05,

MCF-7: breast adenocarcinoma;

HepG2: liver hepatocellular carcinoma;

CHO: chinese hamster ovary

مقایسه داده‌های IC50 عصاره میوه نارس و رسیده روی رده‌های سلولی سرطانی سینه، کبد در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین تمامی داده‌ها وجود دارد (p < ۰/۰۵) (نمودار شماره ۱ و ۲).



نمودار شماره ۱: مقایسه آماری IC50 عصاره تام میوه نارس و رسیده در زمان‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲ در رده سلول سرطانی MCF7. تفاوت‌های معنی‌دار در هر گروه در مقایسه با نمونه‌های ۲۴h با $p < 0.05$ * نشان داده شده است. هر داده نشانگر $IC50 \pm SE$ حاصل از حداقل ۳ تکرار می‌باشد.

حاوی ۱۰^۵ سلول در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه کاشته شد. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون غلظت‌های ۲۵۰، ۲۰۰، ۱۵۰، ۱۰۰، ۵۰، ۱۰ و صفر) میکروگرم در میلی‌لیتر از هر دو عصاره به سلول‌ها اضافه شد و طی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت انکوبه شد. پس از طی زمان مذکور به هر چاهک پلیت ۲۰ μl MTT (از شرکت سیگما با غلظت ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) اضافه شد و به مدت چهار ساعت دیگر در تاریکی انکوبه شد. پس از طی زمان لازم محیط کشت حاوی MTT به دقت خارج شده و به هر خانه پلیت میزان ۲۰۰ μl محلول DMSO رقیق شده جهت حل کردن فورامازان ارغوانی رنگ اضافه شد. پس از ۱۵ دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق جذب نوری هر چاهک با استفاده از دستگاه الیزا در طول موج ۴۹۰ نانومتر قرائت شد. نتایج حاصل به صورت درصد بقای سلولی در برابر غلظت عصاره گزارش می‌شود.

$$100 * \left(\frac{\text{بقای سلولی}}{\text{کنترل}} \right) = \text{درصد بقای سلولی}$$

$$100 * \left(1 - \frac{\text{درصد سمیت سلولی}}{100} \right) = \text{درصد سمیت سلولی}$$

مقدار IC50 (غلظت موثری که ۵۰ درصد مهار ایجاد می‌کند) برای هر عصاره با استفاده از درصد سمیت سلولی غلظت‌های به کار رفته از آن عصاره، محاسبه شد و اعداد IC50 مبنای مطالعات آماری قرار گرفت. تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS ۱۶ انجام شد. مقایسه‌های متعدد بین بیش از دو گروه توسط آنالیز واریانسیک طرفه و به دنبال آن تست توکی انجام شد. مقدار p کم‌تر از ۰/۰۵ برای تعیین سطح معنی‌دار بودن بین گروه‌ها در نظر گرفته شد (۲۴-۲۷).

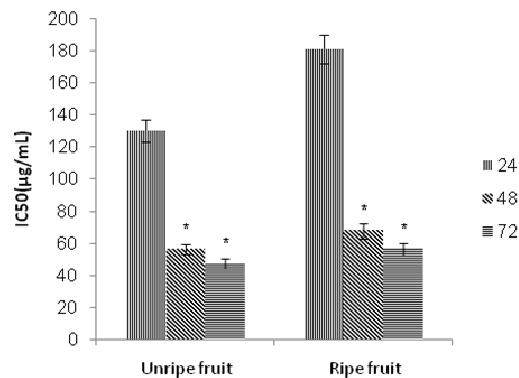
یافته‌ها

فعالیت ضد سرطانی میوه نارس و رسیده زغال اخته در غلظت‌های ۱۰، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰، ۲۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در برابر خط سلولی MCF-7 (سرطان پستان) و HepG2 (سرطان کبد) و CHO (نرمال تخمدان همستر)

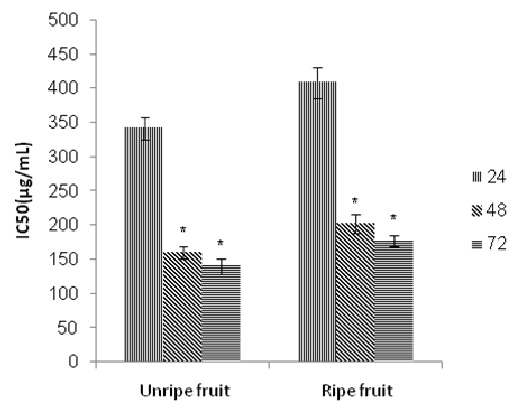
عصاره میوه نارس و رسیده روی رده سلول‌های سرطانی و نرمال نشان داد که تفاوت معنی داری بین اثر میوه نارس و رسیده در سرکوب رشد سلول‌های سرطانی وجود دارد و اثر بازدارندگی میوه نارس بیش‌تر بوده است ($p < 0.05$) (نمودارهای شماره ۱، ۲، و ۳).

بحث

باتوجه به این‌که تاکنون اثر مقایسه‌ای ضد سرطانی میوه زغال افته نارس و رسیده گزارش نشده است، در این مطالعه فعالیت ضد سرطانی عصاره اتانولی میوه نارس و رسیده زغال افته که از منطقه سوگای قزوین جمع‌آوری شده بود، در خطوط سلولی سرطانی MCF7 و HepG2 و نرمال CHO با روش MTT مورد بررسی قرار گرفت. در تحقیق حاضر در بررسی داخل سلولی عصاره میوه نارس و رسیده زغال افته اثرات مهارى رشد را روی خطوط سرطانی (MCF7 و HepG2) و نرمال (CHO) نشان دادند، اگرچه اثر مهارى عصاره میوه نارس بیش‌تر از میوه رسیده بوده است. سرطان یک بیماری چند مکانیستیک است که نیازمند طیف گسترده‌ای از رویکردها جهت درمان، کنترل و پیشگیری است. سرطان دومین بیماری است که سهم قابل توجهی در تعداد کل مرگ و میر دارد (۲۸). گزارش جهانی سرطان نشان می‌دهد که نرخ ابتلا به سرطان در سطح جهانی هشدار دهنده می‌باشد. گیاهان برای پیشگیری و درمان بیماری‌های انسان هم‌چنین بیماری سرطان از گذشته‌های دور استفاده می‌شدند. زغال افته به عنوان گیاهی ضد سرطان مورد استفاده در طب سنتی گزارش شده است (۱۶-۱۴). تحقیقات نشان داده است که گونه‌هایی از جنس *Cornus* دارای فعالیت ضد سرطان می‌باشد. در سال ۲۰۱۱ بررسی تأثیر حفاظتی کبدی عصاره اتانولی میوه *Cornus officinalis* در یک مدل موش با آسیب کبدی القا شده با استامینوفن نشان داد که عصاره میوه این گیاه می‌تواند از آسیب‌های کبدی مرتبط با هپاتوتوکسیسیته القا شده با استامینوفن به وسیله



نمودار شماره ۲: مقایسه آماری IC50 عصاره تام میوه نارس و رسیده در زمان‌های ۲۴، ۴۸، و ۷۲ در رده سلول سرطانی HepG2. تفاوت‌های معنی‌دار در هر گروه در مقایسه با نمونه‌های ۲۴h با $p < 0.05$ نشان داده شده است. هر داده نشانگر $IC_{50} \pm SE$ حاصل از حداقل ۳ تکرار می‌باشد.



نمودار شماره ۳: مقایسه آماری IC50 عصاره تام میوه نارس و رسیده در زمان‌های ۲۴، ۴۸، و ۷۲ در رده سلول نرمال CHO. تفاوت‌های معنی‌دار در هر گروه در مقایسه با نمونه‌های ۲۴h با $p < 0.05$ نشان داده شده است. هر داده نشانگر $IC_{50} \pm SE$ حاصل از حداقل ۳ تکرار می‌باشد.

مقایسه داده‌های IC50 عصاره میوه نارس و رسیده روی رده‌های سلولی نرمال تخمدان همستر در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین تمامی داده‌ها وجود دارد ($p < 0.05$) (نمودار شماره ۳). میزان IC50 عصاره میوه نارس و رسیده روی رده سلولی نرمال (رده نرمال در یک گروه)، با میزان آن بر روی رده سلولی سرطانی (۲ رده سرطانی در گروه دیگر) تفاوت معنی‌داری داشت ($p < 0.05$). میزان IC50

تصور می‌کنیم که علت تاثیر بیش تر میوه نارس نسبت به رسیده مربوط به تفاوت مقدار ترکیبات فنولیک و فلاونوئیدهای عصاره آنها باشد. میوه‌های نارس دارای مقدار بیش تری از اسیدآسکوربیک، فنولیک‌ها، نشاسته، کلروفیل، پکتین، اسیدها و ترکیبات آلی می‌باشد. طی بلوغ و رسیدگی فیتوهورمون اتیلن آزاد می‌شود که در فرایند رسیدگی میوه نقش دارد. در طی این فرایند متابولیسم سرعت یافته و همچنین تعدادی رادیکال آزاد تولید می‌شود. آنتی اکسیدان‌هایی چون اسیدآسکوربیک، فنولیک و برای نجات آمده و مسمومیت حاصل از تولید رادیکال‌های آزاد را از طریق ایجاد ترکیبات با ضرر کم تر کاهش می‌دهند و سبب کاهش در میزان اسید آسکوربیک، ترکیبات فنولیک و دیگر ترکیبات آنتی‌اکسیدانی در میوه‌های در حال رسیدن می‌شود. در نتیجه فعالیت آنتی‌اکسیدانی میوه رسیده از میوه نارس کم تر می‌شود (۱۲). بررسی‌ها نشان داده که تفاوت معنی داری در سه زمان تیمار (۷۲، ۴۸، ۲۴) وجود دارد. به طوری که با افزایش زمان تیمار، اثرات سمیت سلولی بیش تر می‌شود. این نتایج با گزارش‌های Abdolmohammadi و همکاران (۲۰۰۸) که اثرات سمیت سلولی عصاره Astradacus persicus را بر رده سلول سرطانی T47D در سه زمان ۲، ۴ و ۶ روز بررسی کرده و تفاوت معنی داری را در هر سه زمان تیمار مشاهده کردند، مطابقت دارد (۳۵). با مشاهده نتایج به دست آمده می‌توان گفت که در بین تمامی رده‌های سلولی (در هر سه زمان مورد مطالعه) بیش ترین IC50 مربوط به رده سلولی نرمال تخمدان هم‌ستر (CHO) و کم ترین میزان آن مربوط به رده سلولی سرطانی سینه (MCF7) بوده است که نشان‌دهنده اثر نسبی مهارکنندگی رشد و سمیت سلولی عصاره هیدروالکلی میوه زغال اخته روی رده MCF7 در مقایسه با رده سلولی نرمال بوده است. این امر می‌تواند نشأت گرفته از به هم خوردن توازن مکانیسم‌های سلولی و بروز اختلال در مکانیسم‌های دفاعی و حذفی (متابولیسم و دفع)

جلوگیری یا کم کردن استرس اکسیداتیو جلوگیری کند (۲۹).

شناسایی و جداسازی آنتوسیانین‌ها از میوه Cornus C.florida و C.kousa ، C.controversa ،alternifolia و بررسی تاثیر مهاری آنها روی پراکسیداسیون لیپید، آنزیم‌های سیکلو اکسیژناز و تکثیر سلول‌های توموری رده‌های سلولی سرطانی انسانی انجام شده است (۱۵). هم چنین جداسازی یک lignan glycoside جدید از میوه Cornus kousa و بررسی سیتوتوکسیتی آن در مقابل خطوط سرطانی انجام شد (۹).

Pawlowska و همکارانش با آنالیز کمی و کیفی فلاونوئیدهای میوه زغال اخته حضور هشت ترکیب فلاونوئیدی مانند quercetin ، kaempferol و مشتقات گلیکوزیده aromadendrin و سه آنتوسیانین را گزارش کردند (۳۰).

یافته‌های ما با یافته‌های Fategbe و همکارانش (۲۰۱۳)، Chukwuka و همکارانش (۲۰۱۳)، Rekha و همکارانش (۲۰۱۲) و Oboh و همکارانش (۲۰۰۷) که نشان دادند به ترتیب عصاره هیدروالکلی میوه نارس و رسیده Citrus، Carica paya ،melongena Solanum ،Pepeer دارای فعالیت آنتی اکسیدانی بوده اما فعالیت آنتی‌اکسیدانی میوه نارس بیش تر از میوه رسیده می‌باشد، هم‌خوانی دارد (۱۲، ۱۳، ۳۱، ۳۲). در سال ۱۹۹۹ Sudheese و همکارانش گزارش کردند که فلاونوئیدهای استخراج شده از S.melongena فعالیت آنتی اکسیدانی از خود نشان می‌دهند (۳۳). مطالعه Ghafar و همکارانش (۲۰۱۰)، Rekha و همکارانش (۲۰۱۲) نیز نشان داد که ارتباط مستقیمی بین فعالیت آنتی‌اکسیدانی گونه‌های سیتروس و محتوای فنولی آن وجود دارد. آنها هم چنین بیان داشتند که میزان pH میوه‌های نارس بیشتر از میوه‌های رسیده می‌باشد (۱۲، ۳۴).

در سال ۲۰۰۷ پیشنهاد شد تغییرات فلاونوئیدها و pH در سلول‌های سرطانی می‌تواند خاصیت ضد سرطانی داشته باشد (۳۵). هم‌سو با گزارش‌های مذکور

می‌باشد که از این ویژگی می‌توان جهت اهداف پزشکی، درمانی و داروسازی استفاده کرد. به دلیل اهمیت دارویی گیاه زغال اخته و بومی بودن آن و با توجه به این که امروزه با ایجاد تحول در امر پزشکی، از ترکیبات شیمیایی موجود در گیاهان جهت تولید داروهایی با عوارض کم‌تر استفاده می‌شود. به این ترتیب تحقیقات بیش‌تر روی اثرات درمانی گیاهان جهت تولید داروهایی با عوارض جانبی کم‌تر و کارایی بالاتر بسیار ضروری است.

سپاسگزاری

این پژوهش حاصل رساله خانم فاطمه رضایی دانشجوی دکتری زیست‌شناسی (سلولی تکوینی گیاهی) می‌باشد. از آقای زاوش زال زر، خانم عاطفه عاصمی و کارشناسان محترم آزمایشگاه سرکار خانم مریم علیزاده و جناب آقای مجتبی علیخانی، کارشناس محترم مرکز تحقیقات و علوم دارویی آقای حامد فتحی و همه عزیزانی که در انجام این رساله مشارکت داشته‌اند، صمیمانه سپاسگزاری می‌نمایم.

References

1. Kuete V, Efferth T. Pharmacogenomics of Cameroonian traditional herbal medicine for cancer therapy. *Journal of Ethnopharmacology* 2011; 137(1): 752-766.
2. Mousavi SM, Montazeri A, Mohagheghi MA, Jarrahi AM, Harirchi I, Najafi M, et al. Breast cancer in Iran: an epidemiological review. *Breast J* 2007; 13(4): 383-391.
3. Yavari P, Mosavizade M, Sadrol-Hefazi B, Mehrabi Y. Reproductive characteristics and the risk of breast cancer-a case-control study in Iran. *Asian Pac J Cancer Prev* 2005; 6(3): 370-375.
4. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005; 55(2): 74-108.
5. Shoeb M. Anticancer agents from medicinal plants. *Bangladesh Pharmacological Society* 2006; 1(2): 35-41.
6. Tavakoli J, Miar S, Zadehzare MM, Akbari H. Evaluation of Effectiveness of Herbal Medication in Cancer Care: A Review Study, *Iran J Cancer Prev* 2012; 5(3): 144-156.
7. Mahady G. global harmonisation of herbal health claims. *Journal of Nutrition* 2001; 131(3): 1120-1123.
8. Lee D, Lee MH, Jung TS, Kwon BM, Baek NI, Rho YD. Triterpenoid and lignan from the fruits of *Cornus kousa* inhibit the activities of PRL-3 and LDL-Oxidation. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry* 2010; 53(1): 97-100.

سلول‌ها به دنبال سرطانی شدن و تکثیر بی‌رویه سلولی نسبت به سلول‌های سالم باشد (۳۶). از سوی دیگر، می‌توان IC50 بالای رده‌های سلولی نرمال را در مقایسه با رده‌های سلولی سرطانی ناشی از توانایی این سلول‌ها در خارج نمودن داروها و عصاره مورد نظر از سلول دانست. هم‌چنین روش‌ها یا سرعت مقابله سلول‌های نرمال نسبت به سلول‌های سرطانی در مواجهه با ترکیبات مختلف بدین ترتیب است که سلول‌های نرمال مسیرهای مقابله با خصوصیات سمی ترکیبات را که منجر به مهار رشد می‌شود، با سرعت بیش‌تری راه‌اندازی می‌نمایند به عنوان مثال، ترکیبات آنتی‌اکسیدانی داخل سلولی از قبیل گلوکوتایون در مواجهه با ترکیبات سمی سبب حذف ترکیبات اکسیداتیو قوی می‌گردد (۳۷). در میان خطوط سرطانی میزان IC50 سینه از کبد کم‌تر بوده است که می‌تواند بیانگر اثر نسبی بیش‌تر این عصاره بر خط سلولی سرطانی سینه باشد.

پژوهش‌ها نشان می‌دهد که میوه زغال اخته حاوی انواع مختلف ترکیبات آنتی‌اکسیدانی شامل آنتوسیانین‌ها، فلاونوئیدها و مقدار زیادی ویتامین

9. Lee DY, Yoo Kh, Chung IS, Kim JY, Chung DK, Kim DK, et al. A new lignan glycoside from the fruits of *Cornus kousa* burg. Arch Pharm Res 2008; 31(7): 830-833.
10. El Babili F, Bouajila J, Fouraste I, Valentin A, Mauret S, Moulis C. Chemical study, antimalarial and antioxidant activities, and cytotoxicity to human breast cancer cells (MCF7) of *Argania spinosa*. Phytomedicine 2010; 17(27): 157-160.
11. Wattanapiromsakul C, Wangsintaweekul B, Sangprapan P, Itharat A, Keawpradub N. Goniothalamine, a cytotoxic compound, isolated from *Goniothalamus macrophyllus* (Blume) Hook. f. & Thomson var. *macrophyllus*. Songklanakarin J Sci Technol 2005; (27): 479-487
12. Rekha C, Poornima G, Manasa M, Abhipsa V, Pavithra Devi J, Vijay Kumar HT, et al. Ascorbic Acid, Total Phenol Content and Antioxidant Activity of Fresh Juices of Four Ripe and Unripe Citrus Fruits. Chem Sci Trans 2012; 1(2): 303-311.
13. Fategbe MA, Ibukun EO, Kade IJ, Rocha JBT. A comparative study on ripe and unripe eggplant (*Solanum melongena*) as dietary antioxidant sources. Journal of Medicinal Plants Research 2013; 7(6): 209-218.
14. Šavikin K, Zdunić G, Jankovic T, Stanojkovic T, Juranic Z, Menkovic N. In vitro cytotoxic and antioxidative activity of *Cornus mas* and *Cotinus coggygria*. Natural Product Research 2009; 23(18): 1731-1739.
15. Vareed SK, Reddy MK, Nair MG. Anthocyanins in *Cornus alternifolia*, *Cornus controversa*, *Cornus kousa* and *Cornus florida* fruits with health benefits. Sciencedirect 2006; (78): 777-784.
16. Tural S, Koca L. Physico-chemical and antioxidant properties of cornelian cherry fruits (*Cornus mas* L) grown in Turkey. Sciencedirect 2008; 116(4): 362-366.
17. Jayaprakasam B, Olson L, Schutzki RE, Tai MH, Nair MG. Amelioration of obesity and glucose intolerance in high by anthocyanins and ursolic acid in Cornelian cherry. Journal of Agriculture and Food Chemistry 2006; 54(1): 243-248.
18. Funatogawa K, Hayashi S, Shimomura H, Yoshida T, Hatano T, Ito H, Hirai Y. Antibacterial activity of hydrolyzable tannins derived from medicinal plants against helicobacter pylori. Microbiol. Immunol 2004; 48(4): 251-261
19. Ercisli S, Yilmaz S, Gadze J, Dzubur A, Hadziabulic S, Aliman Y. Some Fruit Characteristics of Cornelian Cherries (*Cornus mas* L.). Not Bot Hort Agrobot Cluj 2011; 39(1): 255-259.
20. Rafieian-Kopaei M, Asgary S, Adelnia A, Setorki M, Khazaei M, Shamsi F. The effects of cornelian cherry on atherosclerosis and atherogenic factors in hypercholesterolemic rabbits. Journal of Medicinal Plants Research 2011; 5(13): 2670-2676.
21. Asghary S, Rafieian-Kopaei M, Adelnia A, Khazaei M, Shamsi F. Comparing the effects of lovastatin and *Cornus mas* fruit on fibrinogen level in hypercholesterolemic rabbits. ARYA Atherosclerosis Journal 2010; 6(1): 1-5.
22. Lim SH, Choi SH, Oh YL, Kim SJ. Anti-oxidative effects of flavonoids enriched Corni fructus extract and the mechanism. Afr J Pharm Pharmacol 2011; 5(4): 506-511.
23. Salimi M, Majd A, Sepahdar Z, Azadmanesh K, Irian S, Ardestaniyan MH, et al. Cytotoxicity effects of various *Juglans regia* (walnut) leaf extracts in human cancer cell lines, Pharmaceutical Biology 2012; 50(11):

- 1416-1422.
24. Ismail M, Bagalkotkar G, Iqbal S, Adamu HA. Anticancer Properties and Phenolic Contents of Sequentially Prepared Extracts from Different Parts of Selected Medicinal Plants Indigenous to Malaysia. *Molecules* 2012; (17): 5745-5756.
 25. Motaal AA, Shaker S. Anticancer and Antioxidant Activities of Standardized Whole Fruit, Pulp, and Peel Extracts of Egyptian Pomegranate, The Open Conference Proceedings Journal 2011; 2(1): 41-45.
 26. Shokrzadeh M, Parvaresh A, Shahani S, Habibi O, Zalzar Z. Cytotoxic Effects of *Lagenaria siceraria* Standl. Extract on Cancer Cell Line. *J Mazandaran Univ Med Sci* 2013; 23(97): 225-230.
 27. Sukhramani PS, Sukhramani PS, Tirthani SR, Desai SA, Suthar MP. Biological cytotoxicity evaluation of spiro [azetidine-2, 3'-indole]-2', 4(1'H)-dione derivatives for anti-lung and anti-breast cancer activity. *Der Pharmacia Lettre* 2011; 3(5): 236-243.
 28. Marimuthu P. Projection of cancer incidence in "ve cities and cancer mortality in India. *Indian J Cancer* 2008; 45(1): 4-7.
 29. Lee NH, Seo C. Hepatoprotective and Antioxidative Activities of *Cornus officinalis* against Acetaminophen-Induced Hepatotoxicity in Mice. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2012; 32(1): 1-8.
 30. Pawlowska AM, Camangi F, Braca A. Qualitative analysis of flavonoids of *Cornus mas* L. (Cornaceae) fruits. (2010).
 31. Chukwuka KS, Iwuagwu M, Uka UN. Evaluation of Nutritional Components of *Carica papaya* L. At Different Stages of Ripening, *IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences* 2013; 6(4): 13-16.
 32. Oboh G, Puntel RL, Rocha JBT. *Hot pepper (Capsicum annum, Tepin & Capsicum Chinese, Habanero) Prevents Fe2+-induced Lipid Peroxidation in Brain: In vitro*, *Food Chem* 2005; 102(3): 178-185.
 33. Sudheesh S, Sandhya C, Koshy AS, Vijayalakshmi NR. Antioxidant Activity of Flavonoids from *Solanum melongena*. *Phytother Res* 1999; 13(5): 393-396.
 34. Ghafar MFA, Prasad KN, Weng KK, Ismail A. Flavonoid, hesperidine, total phenolic contents and antioxidant activities from Citrus species. *Afr J Biotechnol* 2010; 9(3): 326-330.
 35. Abdolmohammadi M.H., Fouladdel Sh., Shafiee A., Amin Gh., Ghaffari S.M, Azizi E. Anticancer effects and cell cycle analysis on human breast cancer T47D cells treated with extracts of *Astrodaucus persicus* (Boiss.) Drude in comparison to doxorubicin. *Daru* 2008; 16(2): 112-118.
 36. Dosik GM, Barlogie B, Johnston D, Mellard D, Freireich EJ. Dose-dependent suppression of DNA synthesis in vitro as a predictor of clinical response in adult acute myeloblastic leukemia. *Eur J Cancer* 1981; 17(5): 549-555
 37. Van Haaften RI, Evelo CT, Haenen GR, Bast A. No reduction of alpha-tocopherolquinone by glutathione in rat liver microsomes. *Biochem Pharmacol* 2001; 61(6): 715-719.