BRIEF REPORT

Evaluating the Cytotoxicity Effect of Hydroalcoholic Extract of Juglans regia on Human Cancer Cell Lines (HepG2- HeLa) by MTT Assay

Mohammad Shokrzadeh[1],
Emran Habibi[2],
Golara Dadkhah[3],
Mona Modanloo[4]

[1] Associate Professor, Department of Toxicology and Pharmacology, Pharmaceutical Sciences Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[2] Assistant Professor, Department of Pharmacognosy, Pharmaceutical Sciences Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[3] Pharmacy Student, Student Research Committee, Faculty of Pharmacy, International Unit, Mazandaran University of Medical Sciences , Ramsar , Iran
[4] PhD Student in Toxicology, Student Research Committee, Pharmaceutical Sciences Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received May 28, 2016 ; Accepted September 17 , 2016)

Abstract

Background and purpose: Today medicinal plants have received much attention in treatment of many cancers. *Juglans regia* has phenolic compounds and is used in cytotoxicity studies. This study investigated the effects of hydroalcoholic extract of *Juglans regia* on the growth of human cervical and liver cancer cells.

Materials and methods: The hydroalcoholic extract of the fruit of *Juglans regia* was prepared by percolation method. The HeLa and $HepG_2$ cancer cells were cultivated and further incubated with different concentrations of the extract. After 72 hours, cell growth inhibition was examined using MTT assay. The results were statistically analyzed in Prism ver.3 applying ANOVA and post-test.

Results: The inhibitory concentration 50 (IC50) of the plant extract on human $HepG_2$ and HeLa cancer cells were 449.1 ± 18.26 µg/ml and 222.4 ± 2.66 µg/ml, respectively. The IC50of Cisplatin on these cancer cells were found to be 15.96±1.117 and 15.79±1.147 µg/ml, respectively.

Conclusion: The IC50of *Juglans regia* on HeLa and $HepG_2$ was more than that in Cisplatin. Accordingly, further investigations are needed on other cancer cell lines. Moreover, due to the fact that the extract was total, future studies should aim at identifying its active substances.

Keywords: *Juglans regia*, cancer cell lines, inhibitory concentration 50, MTT assay

J Mazandaran Univ Med Sci 2016; 26 (141): 160-164 (Persian).

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-25]

گزارش کوتاه

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و ششم شماره ۱۴۱ مهر سال ۱۳۹۵ (۱۶۴-۱۶۰)

بررسی اثر سمیت سلولی عصاره هیدروالکلی گل (شاتون) درخت گردو *Juglans regia* بر خطوط سلول های سرطانی $HepG_2$ و HeLa به روش MTT

محمد شکرزاده[۱]
عمران حبیبی[۲]
گل آرا دادخواه[۳]
منا مدانلو[۴]

چکیده

سابقه و هدف: امروزه استفاده از گیاهان دارویی در درمان سرطان از اهمیت فوق العاده‌ای برخوردار است. گیاه *Juglans regia* به دلیل دارا بودن ترکیبات فنلی برای مطالعات سمیت سلولی با اهمیت می‌باشد. در این مطالعه به بررسی اثرات عصاره هیدروالکلی گل گیاه گردو روی مهار رشد سلول های سرطانی انسانی (کبد، سرویکس) پرداختیم.

مواد و روش‌ها: ابتدا عصاره هیدروالکلی میوه گیاه به روش پرکولاسیون تهیه شد. بعد از مواجهه سلول های سرطانی HeLa و $HepG_2$ با غلظت های مختلف از عصاره گیاه به مدت ۷۲ ساعت، مرگ و میر سلول‌ها باروش MTT مورد بررسی قرار گرفت. محاسبات آماری با نرم افزار Prismver-3 و مقایسه داده‌ها با روش آنالیز واریانس (ANOVA) و Posttest انجام گرفت.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که میزان IC50 عصاره گیاه بر رده‌های سلولی سرطان کبد انسانی ($HepG_2$) و سرطان سرویکس انسانی (HeLa) به ترتیب برابر با ۱۸/۲۶±۴۴۹/۱ و ۲/۶۶ ± ۲۲۲/۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر و میزان IC50 داروی سیس پلاتین بر این رده های سلولی به ترتیب برابر با ۱/۱۱۷± ۱۵/۹۶ و ۱/۱۴۷±۱۵/۷۹ میکروگرم بر میلی‌لیتر است.

استنتاج: میزان IC50 عصاره گیاه گردو بر روی رده‌های سلول سرطانی $HepG_2$ و HeLa در مقایسه با داروی ضد سرطان سیس پلاتین بیش‌تر بوده است. در کل بر اساس نتایج پیشنهاد می‌شود با توجه به تام بودن عصاره، آنالیز روی گیاه صورت بگیرد و تاثیر مواد موثره مختلف این گیاه بررسی گردد.

واژه های کلیدی: *Juglans regia* ، رده های سلولی سرطانی، IC50، MTT assay

مقدمه

سرطان یکی از بارزترین علل مرگ و میر دنیای امروزی است و جمعیتی میلیونی را تحت تأثیر مستقیم یا غیرمستقیم خود دارد(۱). لذا درمان این بیماری‌ها از اهمیت فوق العاده‌ای برخوردار می‌باشد. روش‌های درمان متفاوتی برای سرطان‌ها وجود دارد که می‌توان به جراحی، شیمی درمانی، رادیوتراپی، هورمون درمانی، ایمنوتراپی

مولف مسئول: منا مدانلو– ساری: دانشگاه علوم پزشکی مازندران، مرکز تحقیقات علوم دارویی Email: dr_modanloo@yahoo.com
۱. دانشیار، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، مرکز تحقیقات علوم دارویی، گروه سم شناسی داروشناسی، دانشکده داروسازی ساری، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۲. استادیار، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، مرکز تحقیقات علوم دارویی، گروه گیاهان دارویی، دانشکده داروسازی ساری - دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۳. دانشجوی دکترای داروسازی دانشگاه علوم پزشکی مازندران، دانشکده داروسازی، واحد بین الملل رامسر، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۴. دانشجوی دکترای پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مازندران، مرکز تحقیقات علوم دارویی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
تاریخ دریافت : ۱۳۹۵/۳/۸ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۳۹۵/۳/۸ تاریخ تصویب : ۱۳۹۵/۶/۲۷

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-25]

و... اشاره داشت(۱). اما فقدان سایتوتوکسیسیتی انتخابی اغلب منجر به بروز عوارض جانبی غیرقابل تحمل می‌گردد. غیر از روش‌های رایج ذکر شده، امروزه استفاده از گیاهان دارویی (خصوصاً گیاهان بومی) در درمان سرطان از اهمیت فوق‌العاده‌ای برخوردار است. از طرف دیگر استفاده از کشت سلولی در علم توکسیکوفارماکولوژی به منظور سنجش سایتوتوکسیسیته مواد شیمیایی، دارویی، آفت‌کش‌ها و بررسی invitro تمامی ترکیبات طبیعی و سنتتیک و... پیشرفت شگرفی را پیدا کرده است(۱). گیاه گردو با نام علمی *Juglans regia* متعلق به خانواده *Juglans regia* می‌باشد(۲). گل گردو دارای اثرات آنتی‌اکسیدانی، ضد افسردگی، ضد التهابی و آنتی‌هایپوکسیک می‌باشد(۳). طی مطالعه‌ای که نبوی و همکارانش در سال ۲۰۱۱ روی خواص گل گردو انجام دادند، اثرات دارویی این گل را به وجود فنل‌ها و فلاونوئیدها در این گیاه نسبت دادند(۳). در مطالعه‌ای دیگر که توسط ابراهیم زاده و همکارانش در سال ۲۰۱۳ روی گل گردو انجام شد، اثرات همولایتیک این گل را گزارش نمودند(۴). از آن‌جایی‌که تاکنون تحقیق مشابهی از گونه *Juglans regia* در ایران بر روی رده‌های سلولی سرطانی کبد و سرویکس انجام نشده، لذا در این پژوهش اثر عصاره هیدروالکلی گل درخت گردو به منظور مهار رشد رده‌های سلولی مذکور مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها

الف) تهیه گیاه و عصاره گیری

در این مطالعه آزمایشگاهی (Experimental)، گل درخت گردو از حوالی شهرستان ساری در فروردین سال ۱۳۹۴ جمع‌آوری گردید و با نمونه هرباریومی موجود در دانشکده داروسازی تهران مطابقت داده شده و نام علمی گیاه توسط متخصص فارماکوگنوزی دانشکده داروسازی ساری تایید شد. گل گیاه به مدت ۵ روز در سایه و به مدت ۱ هفته در حرارت ۴۰ درجه سانتی گراد خشک شد. سپس گیاه خشک شده به اندازه ذره‌ای با مش ۱۰۰ توسط آسیاب معمولی خرد و ریز شد. در مرحله بعد ۱۰۰ گرم از گل خشک شده به روش پرکولاسیون و با حلال متانول آب (به نسبت ۴ به ۱) عصاره‌گیری و با دستگاه تقطیر در خلاء دوار (Rotary evaporate) در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد تغلیظ و به کمک فریز درایر (Freeze dryer) کاملاً خشک شد.

ب) نگهداری و کشت سلولی

رده سلولی سرطانی کبد($HepG_2$) و سرویکس (HeLa) انسان از بانک سلولی انیستیتو پاستور تهران خریداری شد. سلول‌ها در محیط کشت DMEM حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (FBS)، سدیم پیرووات ۱۰۰ میلی‌گرم، ۱/۵ g/l سدیم بیکربنات و ۱ درصد آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین- استرپتومایسن در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و رطوبت کافی و میزان ۵ درصد دی اکسید کربن نگهداری شدند. پس از رشد ۷۰ درصدی سلول‌ها، توسط تریپسین- اتیلن دی امین تترا استیک اسید (EDTA) از ته فلاسک جدا شدند و با دور 1500 rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. رسوب سلولی حاصل به حالت سوسپانسیون تهیه شد و درصد زنده بودن سلول‌ها با استفاده از رنگ تریپان بلو و لام هموسایتومتر توسط میکروسکوپ نوری تعیین شد(۵).

ج)بررسی سمیت سلولی گل درخت گردو با روش رنگ سنجی MTT

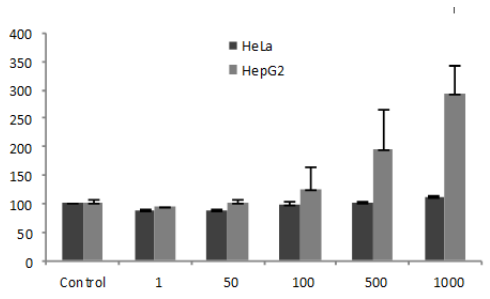
۱۰۰میکرولیتر محیط کشت حاوی تعداد 10^4 عدد سلول در هر چاهک پلیت ۹۶خانه قرار داده شد و بمدت ۲۴ساعت انکوباسیون گردید. غلظت‌های ۱، ۵۰، ۱۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصاره به سلول‌ها اضافه شد و طی ۷۲ ساعت انکوبه شد. ۲۰ میکرولیتر محلول MTT (با غلظت ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) به هر چاهک اضافه شد و به مدت ۴ ساعت در دمای 37° انکوبه شد. سپس محیط کشت خارج شد و به هر

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-25]

خانه ۵۰ میکرولیتر محلول DMSO رقیق شده جهت حل کردن فورمازان ارغوانی رنگ اضافه شد. بعد از ۱۵دقیقه انکوباسیون، جذب نوری هر چاهک با استفاده از دستگاه الایزا در طول موج ۴۹۰ و ۶۳۰ نانومتر قرائت شد(۵). درصد بقای سلولی با تقسیم جذب نوری تست بر جذب نوری کنترل در برابر غلظت عصاره حاصل گردید. داده‌ها با نرم‌افزار SPSS.16 و به روش ANOVA تجزیه و تحلیل شدند.

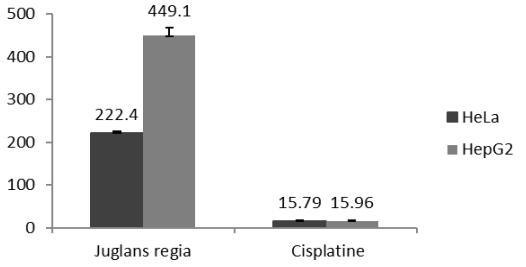
یافته ها و بحث

استفاده از روش کشت سلولی درک بسیار عمیق‌تری از تأثیر داروهای مختلف بر روی سلول‌های سرطانی و طبیعی پدید می‌آورد(۷). یکی از مهم‌ترین کاندیدای سنتز داروهای ضد سرطان به منظور تجویز در شیمی درمانی، ترکیبات دارای اثرات سمی و خصوصاً سمیت سلولی هستند،که امروزه سمیت سلولی آن‌ها با استفاده از روش‌های سنجش سمیت بر روی کشت سلولی و بافتی قابل اندازه‌گیری می‌باشد(۸). طی این مطالعه با استفاده از میزان جذب‌های خوانده شده در رده‌های سلولی HeLa و $HepG_2$، میزان درصد زنده ماندن سلول‌ها (%viability) پس از مواجهه با عصاره گل گیاه گردو و انجام تست MTT محاسبه گردید (نمودارهای شماره ۳).



نمودار شماره ۳: میزان بقای سلولی(درصد)رده های سلولی HeLa و HepG2 در مواجهه با عصاره گل گردو طی زمان انکوباسیون ۷۲ساعت

از سوی دیگر،امروزه ترکیبات با منشأ طبیعی (گیاهی، حیوانی، معدنی) به علت فراوانی، عوارض جانبی و تداخلات دارویی کم‌تر،ارزان بودن و...، کانون توجه داروسازان و پزشکان به منظور سنتز داروهای نوین و درمان بیماری‌ها (خصوصاً بیماری‌هایی که درمان و رژیم دارویی قطعی با دارای اثربخشی کافی آن‌ها وجود ندارد) می‌باشند(۸،۷) در این مطالعه مقایسه داده‌های IC_{50} عصاره گیاهی و داروی سیس پلاتین بر روی رده‌های سلولی کبد و سرویکس نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین تمامی داده‌ها وجوددارد. نتایج نشان داد که IC50 داروی سیس پلاتین به طور معنی‌داری بسیار کم‌تر از عصاره گیاه بوده است ($p < ۰/۰۰۰۱$) (نمودار شماره ۱).



نمودار شماره ۱: مقایسه میزان IC50 عصاره گل گردو و داروی سیس پلاتین بر روی رده های سلولی HeLa و HepG2 طی زمان انکوباسیون ۷۲ ساعت ($p < ۰/۰۰۰۱$)

با توجه به این موضوع، می‌توان ادعا کرد که عصاره این گیاه دارای اثر مهارکنندگی رشد قابل توجهی بر روی رده‌های سلولی سرطانی HeLa و $HepG_2$ نبوده است. علت اختلاف معنی‌دار داروی سیس پلاتین با عصاره گیاه گردو بر رده‌های سلولی مورد ارزیابی در این می‌باشد که داروی سیس پلاتین یک ترکیب خالص شیمیایی است که به‌طور وسیعی در درمان سرطان‌های ریه، تخمدان، بیضه، مثانه، لنفوم و ... به کار می‌رود، اما عصاره گیاه گردو مخلوط تعداد زیادی ترکیبات از جمله تانن، اولئوروپین، فیتین، فیتوسترول، انواع فسفات‌ها و... می‌باشد که چه بسا در نتیجه مطالعات بیشتر، ترکیبات خالص شده بتوانند با اثر بخشی قوی‌تر و عارضه کم‌تر جایگزین مناسبی برای داروهایی همچون سیس پلاتین باشند(۶-۸). با توجه به

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-25]

سایر مطالعات صورت گرفته بر روی اجزاء این گیاه (برگ، میوه،...) مشخص شده که گیاه گردو به دلیل دارا بودن ترکیبات فنلی نظیر پیرگالول، پارا هیدروکسی بنزوئیک اسید، وانیلیک اسید، گالیک اسید، اتیل گالات و ویتامین‌های A،B،E، اکسیداز، اثر سمی بر روی رده‌های سلول سرطانی P_۷۶۹ و Caco_۲ داشته و از جمله گیاهان دارویی با ارزشی به شمار می‌رود. ما نیز اثر عصاره هیدرولیک گل این گیاه را بر روی رده‌های سلولی سرطانی کبد (HeLa) و سرویکس ($HepG_2$) بررسی نموده که مشخص گردیده عصاره گل این گیاه نتوانسته مهار قابل ملاحظه‌ای را بر روی رده‌های سلولی سرطانی داشته باشد. لذا ما پیشنهاد می‌نماییم که علاوه بر این نوع عصاره (هیدروالکلی) اثرات عصاره‌های تام دیگر بی_استونی_اتیل استاتی و...) بر روی رده‌های سلولی سرطانی نیز مورد بررسی قرار گیرند و همچنین مواد مؤثره اعضای مختلف این گیاه برگ،گل، میوه، دانه و...) را جداسازی نموده و سپس اثرات آن‌ها بر مهار رشد رده‌های سلولی سرطانی مختلف نیز ارزیابی گردد و در پایان مکانیسم‌های مختلف مهار رشد را مورد بررسی قرار دهیم.

References

1. Chevallier A. The Encyclopedia of Medicinal Plants. London: Dorling Kindersley; 1996.
2. Mahdavi Maymand Z, Mirtajodin M. The collection and identification of the some plant species of Kerman province. Journal of Herbal Drugs 2010; 1(2): 1-24.
3. Nabavi SF, Ebrahimzadeh MA, Nabavi SM, Mahmoudi M, Rad SK. Biological activities of Juglans regia flowers. Rev Bras Farmacogn 2011; 21(3): 465-470.
4. Ebrahimzadeh MA, Nabavi SF, Nabavi SM. Antihemolytic activity and mineral contents of Juglans regia L. flowers. Eur Rev Med Pharmacol Sci 2013; 17(14): 1881-1883.
5. Shokrzadeh M, Saravi SS, Mirzayi M. Cytotoxic effects of ethyl acetate extract of Sambucus ebulus compared with etoposide on normal and cancer cell lines. Pharmacogn Mag 2009; 5(20): 316-319.
6. Shokrzadeh M, Azadbakht M, Ahangar N, Naderi H, Saravi SS. Comparison of the cytotoxic effects of Juniperus sabina and Zataria multiflora extracts with Taxus baccata extract and Cisplatin on normal and cancer cell lines. Pharmacogn Mag 2010; 6(22): 102-105.
7. Shokrzadeh M, Parvaresh A, ShahaniS, Habibi E, Zalzar Z. Cytotoxic effects of Lagenaria siceraria standl. Extract on cancer cell line. J Mazandaran Univ Med Sci 2013; 23(97): 225-230.
8. Mongelli E, Pampuro S, Coussio J, Salomon H, Ciccia G. Cytotoxic and DNA interaction activities of extracts from medicinal plants used in Argentina. J Ethnopharmacol 2000; 71(1): 145-151.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-25]