

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

Mohammad Shokrzadeh¹,
Emran Habibi²,
Golara Dadkhah³,
Mona Modanloo⁴

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 HepG₂ 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 HepG₂ and HeLa cancer cells were 449.1 ± 18.26 µg/ml and 222.4 ± 2.66 µg/ml, respectively. The IC₅₀ of Cisplatin on these cancer cells were found to be 15.96 ± 1.117 and 15.79 ± 1.147 µg/ml, respectively.

Conclusion: The IC₅₀ of *Juglans regia* on HeLa and HepG₂ 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

بررسی اثر سمیت سلولی عصاره هیدروالکلی گل (شاتون) درخت گردو *Juglans regia* بر خطوط سلول های سرطانی HepG₂ و HeLa به روش MTT

محمد شکرزاده^۱عمران حبیبی^۲گل آرا دادخواه^۳منا 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 HepG₂ با غلظت های مختلف از عصاره گیاه به مدت ۷۲ ساعت، مرگ و میر سلول‌ها با روش 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 (HepG₂) و سرطان سرویکس انسانی (HeLa) به ترتیب برابر با $449/1 \pm 18/26$ و $2/66 \pm 222/4$ میکروگرم بر میلی لیتر و میزان IC₅₀ داروی سیس پلاتین بر این رده های سلولی به ترتیب برابر با $15/96 \pm 1/117$ و $15/79 \pm 1/147$ میکروگرم بر میلی لیتر است.

استنتاج: میزان IC₅₀ عصاره گیاه گردو بر روی رده‌های سلول سرطانی HepG₂ و HeLa در مقایسه با داروی ضد سرطان سیس پلاتین بیش تر 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

اهمیت فوق العاده‌ای برخوردار می‌باشد. روش‌های درمان متفاوتی برای سرطان‌ها وجود دارد که می‌توان به جراحی، شیمی درمانی، رادیوتراپی، هورمون درمانی، ایمونوتراپی

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

Email: dr_modanloo@yahoo.com

مؤلف مسئول: منا مدانلو - ساری: دانشگاه علوم پزشکی مازندران، مرکز تحقیقات علوم دارویی

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 دکتری داروسازی دانشگاه علوم پزشکی مازندران، دانشکده داروسازی، واحد بین الملل رامسر، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۴. دانشجوی دکتری 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

... اشاره داشت (۱). اما فقدان سایتوتوکسیسیته انتخابی اغلب منجر به بروز عوارض جانبی غیر قابل تحمل می گردد. غیر از روش های رایج ذکر شده، امروزه استفاده از گیاهان دارویی (خصوصاً گیاهان بومی) در درمان سرطان از اهمیت فوق العاده ای برخوردار است. از طرف دیگر استفاده از کشت سلولی در علم توکسیکوفارماکولوژی به منظور سنجش سایتوتوکسیسیته مواد شیمیایی، دارویی، آفت کش ها 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* می باشد (۲). گل گردو دارای اثرات آنتی اکسیدانی، ضد افسردگی، ضد التهابی و آنتی هایپوکسیک می باشد (۳). طی مطالعه ای که نبوی و همکارانش در سال ۲۰۱۱ روی خواص گل گردو انجام دادند، اثرات دارویی این گل را به وجود فنل ها و فلاونوئیدها در این گیاه نسبت دادند (۳). در مطالعه ای دیگر که توسط ابراهیم زاده و همکارانش در سال ۲۰۱۳ روی گل گردو انجام شد، اثرات همولایتیک این گل را گزارش نمودند (۴). از آنجایی که تاکنون تحقیق مشابهی از گونه *Juglans regia* در ایران بر روی رده های سلولی سرطانی کبد و سرویکس انجام نشده، لذا در این پژوهش اثر عصاره هیدروالکلی گل درخت گردو به منظور مهار رشد رده های 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 جمع آوری گردید و با نمونه هرباریومی موجود در دانشکده داروسازی تهران مطابقت داده شده و نام علمی گیاه توسط متخصص فارماکونگوزی 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 ذره ای 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) عصاره گیری و با دستگاه تقطیر در خلاء دوار (Rotary evaporate) در دمای ۴۵ درجه سانتی گراد تغلیظ و به کمک فریز درایر (Freeze dryer) کاملاً خشک شد.

ب) نگهداری و کشت سلولی

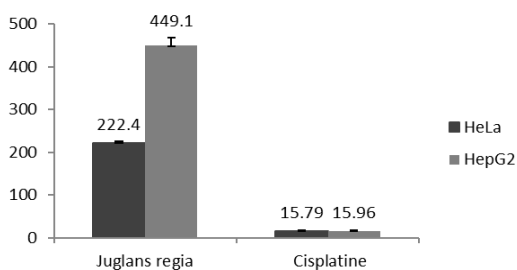
رده سلولی سرطانی کبد (HepG2) و سرویکس (HeLa) انسان از بانک سلولی انیستیتو پاستور تهران خریداری شد. سلول ها در محیط کشت DMEM حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (FBS)، سدیم پیرووات ۱۰۰ میلی گرم، ۱/۵ g/l سدیم بیکربنات و ۱ درصد آنتی بیوتیک پنی سیلین - استرپتومایسن در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و رطوبت کافی و میزان ۵ درصد دی اکسید کربن نگهداری شدند. پس از رشد ۷۰ درصدی سلول ها، توسط تریپسین - اتیلن دی امین ترا 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 سلول ها 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

۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت حاوی تعداد ۱۰^۴ عدد سلول در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه قرار داده شد و بمدت ۲۴ ساعت انکوباسیون گردید. غلظت های ۱، ۵۰، ۱۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر از عصاره به سلول ها اضافه شد و طی ۷۲ ساعت انکوبه شد. ۲۰ میکرولیتر محلول MTT (با غلظت ۵ میلی گرم بر میلی لیتر) به هر چاهک اضافه شد و به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷^o انکوبه شد. سپس محیط کشت خارج شد و به هر

جانبی و تداخلات دارویی کم تر، 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 وجود دارد. نتایج نشان داد که IC_{50} داروی سیس پلاتین به طور معنی‌داری بسیار کم‌تر از عصاره گیاه بوده است ($p < 0/0001$) (نمودار شماره ۱).



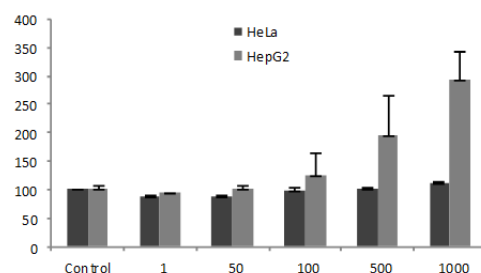
نمودار شماره ۱: مقایسه میزان IC_{50} عصاره گل گردو و داروی سیس پلاتین بر روی رده‌های سلولی HeLa و HepG2 طی زمان انکوباسیون ۷۲ ساعت ($p < 0/0001$)

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 HepG2 نبوده است. علت اختلاف معنی‌دار دارویی 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

خانه ۵۰ میکرولیتر محلول DMSO رقیق شده جهت حل کردن فورمازان ارغوانی رنگ اضافه شد. بعد از ۱۵ دقیقه انکوباسیون، جذب نوری هر چاهک با استفاده از دستگاه الیزا 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.

یافته‌ها 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 باقی‌قابل اندازه‌گیری می‌باشد (۸). طی این مطالعه با استفاده از میزان جذب‌های خوانده شده در رده‌های سلولی HeLa و HepG2، میزان درصد زنده ماندن سلول‌ها (% viability) پس از مواجهه با عصاره گل گردو و انجام تست MTT محاسبه گردید (نمودارهای شماره ۳).



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

از سوی دیگر، امروزه ترکیبات با منشأ طبیعی (گیاهی، حیوانی، معدنی) به علت فراوانی، عوارض

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.

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 E،B،A، 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_۲) بررسی نموده که مشخص گردیده عصاره گل این گیاه

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, Shahani S, 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.