ORIGINAL ARTICLE

Anticancer Effects of Deoxypodophyllotoxin and Juniperus communis L. on Prostate Cancer Cell Lines

Morteza Mahdavi[1],
Mohammad Azadbakht[2],
Akbar Vahdati[3],
Mohammad Shokrzadeh[4],
Ayub Farhadi[5]

[1] PhD Student in Biology, Department of Biology, Shiraz Branch, Islamic Azad University, Shiraz, Iran
[2] Professor, Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[3] Professor, Department of Biology, Shiraz Branch, Islamic Azad University, Shiraz, Iran
[4] Professor, Pharmaceutical Sciences Research Center, Department of Toxicology and Pharmacology, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[5] Assistant Professor, Laboratory of Molecular Cytogenetic, Faculty of Animal Sciences and Fisheries, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran

(Received May 18, 2019 ; Accepted September 16, 2019)

Abstract

Background and purpose: In this study, the effects of a mixture of deoxypodophyllotoxin/DPT and *Juniperus communis* L. on apoptosis and cellular inhibition were evaluated. Also, their cytotoxicity effects on prostate cancer cells (PC3 and DU145) and normal cells (HGFs), their anti-inflammatory effects, oxidation properties, and their effects on the expression of androgen receptors (AR) and clusterin (CLU) receptors were evaluated.

Materials and methods: In this experimental study, the cells were cultured in DMEM f12 medium containing L-glutamine, penicillin, streptomycin, and 10% FBS. Morphological changes induced by reverse microscope were investigated 24, 48, 72, and 96 hrs after adding pure DPT and juniper extract at 10, 100, 500, 1000 µg/ml. Survival rate was assessed by MTT assay in all three cell lines. The rate of apoptosis in all cell lines was assessed by flow cytometric analysis. The expression levels of AR and CLU genes were evaluated by Real-Time PCR.

Results: The 10, 100, 500, 1000 µg/ml of DPT and 500 and 1000 oncentrations of extract after 24 hours caused morphological changes in PC3 and DU145 cells and these changes intensified after 48, 72, and 96 hr. The MTT test showed significant decrease in PC3 and DU145 cell survival levels at 100, 500, and 1000 µg/ml ($P<0.001$). Also, the extract at 100 and 500 µg/ml significantly reduced the survival of PC3 and DU145 cancer cells ($P<0.042$).

Conclusion: Pure DPT and plant extracts have cytotoxic effects on PC3 and DU145 cells with minimal damage to normal cells.

Keywords: juniper extract, cancer, cytotoxic effect, apoptosis

J Mazandaran Univ Med Sci 2019; 29 (177): 13-29 (Persian).

*** Corresponding Author: Mohammad Azadbakht** - Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran (E-mail: azadbakhtm@hotmail.com)

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-03]

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و نهم شماره 177 مهر سال 1398 (29-13)

بررسی اثرات ضد سرطانی دئوکسی پودوفیلوتوکسین و عصاره گیاه لمبیر در رده‌های سلولی سرطانی پروستات

مرتضی مهدوی[1]
محمد آزادبخت[2]
اکبر وحدتی[3]
محمد شکرزاده[4]
ایوب فرهادی[5]

چکیده

سابقه و هدف: در این مطالعه، اثرات ترکیب دئوکسی پودوفیلوتوکسین و عصاره لمبیر (*Juniperus communis* L.) بر آپوپتوز و مهار سلولی ارزیابی شده است. همچنین سمیت سلولی آن‌ها بر روی سلول‌های سرطانی پروستات (PC3 و DU145) و سلول نرمال (HGFs)، اثرات آنتی‌اکسیدانی و اثرات آن‌ها در بیان ژن‌های گیرنده‌های آندروژن (AR) و کلاسترین (CLU) نیز مورد ارزیابی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، سلول‌ها در محیط کشت DMEM f12 حاوی ال-گلوتامین، پنی‌سیلین، استرپتومایسین و 10 درصد FBS کشت داده شده و 24، 48، 72 و 96 ساعت پس از اضافه نمودن دئوکسی پودوفیلوتوکسین خالص و عصاره میوه لمبیر با غلظت‌های µg/ml 10، 100، 500، 1000، تغییرات مورفولوژیک ایجاد شده با اینورت میکروسکوپ بررسی شد. درصد زنده ماندن هر سه ردهٔ سلولی نیز توسط آزمون MTT بررسی گردید. میزان آپوپتوزیس هر سه رده سلولی نیز توسط آنالیز فلوسایتومتری بررسی شد. بیان ژن‌های AR و CLU نیز توسط دستگاه real time بررسی گردید.

یافته‌ها: غلظت‌های µg/ml 10، 100، 500، 1000 ترکیب دئوکسی پودوفیلوتوکسین و غلظت‌های 500 و 1000 عصاره پس از 24 ساعت موجب تغییرات مورفولوژیک در سلول‌های PC3 و DU145 گردید و این تغییرات پس از 48، 72، 96 ساعت تشدید شد. نتایج آزمون MTT نشان‌دهندهٔ کاهش معنی‌داری در میزان زنده ماندن سلول‌های PC3 و DU145 در غلظت‌های µg/ml 100، 500، 1000 بود ($P<0/001$). همچنین، غلظت‌های µg/ml 100 و 500 موجب کاهش معنی‌دار در میزان زنده ماندن سلول‌های سرطانی PC3 و DU145 شد ($P<0/042$).

استنتاج: بر اساس نتایج، ترکیب ترکیب دئوکسی پودوفیلوتوکسین و عصاره میوه لمبیر در غلظت مذکور با کم‌ترین آسیب به سلول‌های طبیعی باعث تخریب سلول‌های سرطانی می‌شوند.

واژه های کلیدی: لمبیر، سرطان، اثر سایتوتوکسیک، آپوپتوز

مقدمه

لمبیر با نام علمی *Juniperus communis* L. و از خانواده Cupressaceae، درختچه ای که در ارتفاعات مازندران به علت باد شدید توانسته است به خوبی با شرایط سازگار شده و رشد نماید. همچنین بر روی

مولف مسئول: محمد آزادبخت: کیلومتر 72 جاده فرح آباد، مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم (ص)، دانشکده داروسازی E-mail: azadbakhtm@hotmail.com
1. دانشجوی دکترای زیست شناسی جانوری تکوین، گروه زیست شناسی، واحد شیراز، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز، ایران
2. استاد، گروه فارماکوگنوزی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران.
3. استاد، گروه زیست شناسی، واحد فارس، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز، ایران
4. استاد، مرکز تحقیقات علوم دارویی، گروه سم شناسی داروشناسی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
5. استادیار، آزمایشگاه سیتوژنتیک مولکولی، دانشکده علوم دامی و شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی، ساری، ایران
تاریخ دریافت : 1398/2/28 تاریخ ارجاع جهت اصلاحات :1398/2/28 تاریخ تصویب : 1398/6/25

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-03]

لبه‌های سنگ و پهلوهای بوته رشد می‌کند. اگرچه ممکن است در سطح زمین زیاد باشد ولی جمعیت‌های، بسیار کوچکی را تشکیل می‌دهد. پوست ساقهٔ آن تیره رنگ و بعداً خاکستری می‌شود. برگ های آن سوزنی، راست، نوک‌تیز مانند سوزن، روی برگ شیاردار و در طول آن خطی کبودرنگ دیده می‌شود. ابعاد برگ 18-1/4 میلی‌متر است. دانه گرده فاقد کیسه هوایی است. دستگاه ماده این گیاهان به شکل مخروط های کوچکی هستند که در راس شاخه‌ها هستند. میوهٔ آن تقریباً گرد و کروی، کبودرنگ به قطر 9-6 میلی‌متر و معمولاً دارای 3 عدد دانه سه وجهی است که در سال دوم می‌رسد(1). انتشار جغرافیایی گیاه در ارتفاعات گرگان بعد نهارخوران، درفک و شیرکوه گیلان، نور و کجور، جواهرده رامسر، رودسر، سوادکوه، تلمدره ساری، سفیدچال گلوگاه می باشد. میوه‌های لمبیر حاوی پیرواکسالیک اسید و به مقدار جزئی چند اسید دیگر، یک ترکیب سیکلولیگنان به نام دئوکسی پودوفیلوتوکسین (Deoxypodophyllotoxin/DPT) با فرمول $C_{22}H_{22}O_7$ به وزن مولکولی 398/411 و همچنین کمی قند و در حدود 1/2 – 0/8 درصد اسانس شامل D-α-Pinene است. حدود 8 درصد رزین و 0/36 درصد ماده تلخ Juniperin یافت می‌شود(3، 2). مشخص شده است که DPT مانع از پلیمریزاسیون توبولین می شود و همچنین مانع از توقف چرخه سلولی با آپوپتوز از طریق چندین پروتکل سلولی شامل فعال سازی ATM، ارتقاء P53 و BAX، فعال سازی کاسپاز 3 و 7 می‌شود. تاکنون چندین مکانیسم برای DPT در سرطان کشف شده است که این تنوع در مکانیسم اثر باعث کاهش احتمال مقاومت‌های دارویی در اثر موتاسیون در ژن‌های پروتئین‌های هدف می‌شود(4). یکی از مکانیسم‌های اثر این ترکیبات، مهار فاکتور رونویسی FNVB بوده که در سلول‌های سرطانی بسیار فعال می‌باشد. حضور این فاکتور در سلول‌های سرطانی جلوی آپوپتوز این سلول را می‌گیرد و مهار این عامل حساسیت سلول‌ها را در برابر عوامل القاء کننده آپوپتوز افزایش می‌دهد. DPT اثراتش را با تداخل در مسیر FNVB با اتصال به P65 اعمال می‌کند(5). علاوه بر این مکانیسم، این ترکیب با کاهش بیان یا افزایش بیان ژن پروتئین کیناز MARK و c-Jun-N-terminal kinase و تداخل با فاکتور رونویسی STAT3 عمل می‌کنند(6). مکانیسم اثر دیگر این ترکیب علاوه بر افزایش تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن، مهار تولید matrix metalloproteinase می‌باشد که برای رگ‌زایی بسیار حیاتی می‌باشد(7). DPT در لمبیر به عنوان متابولیت ثانویه در درمان شیمیایی دارای اثرات قوی زیستی می باشد. همچنین در درمان سرطان سینه از طریق تحریک آپوپتوزیس مؤثر است(8). ناقلین گیرنده آندروژن (AR) پس از اتصال لیگاندهای درونی خود، که شامل 5-آلفا دی هیدروتستوسترون و تستوسترون می‌باشند، نقش محوری در تکوین، فیزیولوژی و آسیب‌شناسی غده پروستات دارند. عملکرد اصلی گیرنده آندروژن تنظیم رونویسی در تنظیم بیان ژن می‌باشد. در هسته، لیگاند فعال ARs دستیار ویژه توالی DNA شناخته می‌شوند مانند عناصر پاسخ آندروژن (AREs) و همکار تنظیم کننده هسته‌ای و ماشین رونویسی و بنابراین در تنظیم رونویسی ژن‌های هدف نقش دارد. ناقلین AR به‌عنوان یک مرکز تنظیم کننده رشد طبیعی پروستات، تمایز سلولی و هموستازیس می‌باشند. علاوه بر این، تصور می‌شود که تنظیم غلط ناقلین AR منجر به شروع و پیشرفت سرطان پروستات شود(11-9).

فعالیت سرطان‌شناسی AR مطالعه جالبی می‌باشد که به طور خاص به سرطان پروستات می‌پردازد. مستندات منتشر شده برای بیشتر سلول‌های سرطانی پروستات اثر ناقلین AR بر رشد و تکثیر این سلول‌ها تا حدودی وابسته است. در مقایسه با فعالیت سرطان‌شناسی AR در سرطان پروستات، ناقلین AR معمولا برای جلوگیری از تکثیر سلول و تحریک تمایز و بقای سلول‌های اپیتلیالی پروستات لومینال در غده پروستات

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-03]

نرمال انسان و جوندگان اپیتلیوم پروستات حاوی لایه‌های پایه‌ای و لومینال با سلول‌های عصبی نادر چندین گروه نشان داده‌اند که سلول های متوسط و یک زیر مجموعه سلول‌های پایه بیان سطح پایین AR را نشان می‌دهند. به عنوان سلول‌های تمایزیافته حد واسط و مهاجر به لایه لومینال، بیان AR افزایش می‌یابد. اعتقاد براین است که افزایش فراوان بیان AR سلول‌های اپیتلیال لومینال موجب سرکوب تکثیر و حفظ عملکرد ترشحی آن می‌شود. علاوه بر این، ناقلین حد واسط AR در مزانشیم/استروما و مکانیسم ناقل پاراکرین همچنین می‌تواند بقای سلول‌های اپیتلیال لومینال در پروستات را تنظیم کند. در حالیکه وضعیت تکثیر سلول‌های تنظیم شده با AR به طور گسترده مورد مطالعه قرار گرفته است، درباره پاسخ استرس سلولی و آپوپتوزیس سلول‌های اپیتلیال پروستات از عملکرد ناقلین AR که برای رشد و هوموستازی غده پروستات نقش محوری دارند، شناخت کمی صورت گرفته است(11-9). آنچه مسلم است با قرار گرفتن در معرض انواع مختلف عوامل تنش‌زای داخل و خارج سلولی (به عنوان مثال عوامل التهابی، استرس اکسید کننده، آسیب DNA سموم و غیره)، سلول‌ها معمولا مسیرهای متعددی را برای مقابله با محرک‌ها و و تعمیرات ایجاد می‌کنند و پاسخ به آسیب استرس مداوم یا آسیب غیر قابل برگشت سلولی، ناقل اضافی را فعال می‌کند و مسیرهایی که در نهایت منجر به مرگ سلولی برنامه ریزی شده می‌شود. آپوپتوزیس بسیار تنظیم شده است، فرآیندی که در آن ناقلین با مرگ سلولی به روش وابسته به انرژی با ویژگی‌های مشخص می‌باشند. ناقلین مرکزی آپوپتوزیس از طریق فعال سازی مسیرهای بیرونی و یا مسیرهای درونی که بوسیله فعال‌سازی کاسپازهای مختلف مشخص می‌شود. در مسیر بیرونی، گیرنده‌های مرگ برنامه‌ریزی شده دسته فوقانی گیرنده فاکتور تومور نکروزیس در غشاء پلاسمایی لیگاندهای ناقل مرگ برنامه‌ریزی شده را حس می‌کند و آغازگر کاسپاز 8 و 10 را فعال‌تر می‌کند. فعالیت آغازگر کاسپاز منجر به جدا شدن و فعالیت مجریان کاسپاز 3، 6 و 7 می‌شود. در مسیر اصلی، ناقلین تنش چندگانه روی میتوکندری همگرا می‌شود و باعث نفوذپذیری ذراتی از غشای بیرونی میتوکندری (MOMP) می‌شود، از قبیل ذرات سیتوکروم c، فاکتور آزادسازی آپوپتوزیس میتوکندریایی 1/2 (AIFM1/2)، DIABLO. در ارتباط با سیتوکروم c فاکتور پپتیدی فعال‌کننده آپوپتوزیی یا ذرات (APAF1) و الیگومرهای مجتمع آپوپتوزوم که جدا می‌شوند و آغازگرهای کاسپاز 9 را فعال می‌کنند و مامور اجرای کاسپازها هستند. مهم این است که غشای خارجی میتوکندری و نفوذپذیری آن برای ناقلین آپوپتوزی درونی و بیرونی از واسطه‌های حیاتی می‌باشد. به طور معمول یکپارچگی میتوکندری به شدت توسط پروتئین‌های خانواده B-cell CLL/lymphoma 2 (BCL2) کنترل می‌شود. پروتئین‌های خانواده آپوپتوزی BCL2 مرتبط با پروتئین X (BAX) (شامل BAX, BCL2-antagonist/killer 1 (BAK), and BCL 2-related ovarian killer (BOK)) عمدتا در غشای میتوکندری عمل می‌کند. اولیگومرهای پروتئین پروآپوپتوزیس BAX و BAK سوراخ‌هایی را در سطح میتوکندری ایجاد کرده و در نتیجه باعث آزاد شدن عوامل پروآپوپتوزیس می‌شود. پروتئین پیش ابقائی خانواده BCL2 (شامل BCL2، BCL2L 1/BCL-XL، Leukemia 1 (MCL1) و غیره) تداخل با پروتئین خانواده پروآپوپتوزیس BCL2 باعث حفظ یکپارچگی غشای میتوکندری می‌شود. پروتئین BH-3 (شامل BID، BAD، BCL2L 11/BIM، NOXA، PUMA و غیره) همچنین پروآپوتوزیس‌هایی هستند، زیرا آن‌ها اثر متقابلی با پروتئین‌های پیش ابقائی خانواده BCL2 داشته و از تداخل آنان با پروآپوتوزیس BAX و BAK جلوگیری می‌کنند. در واقع، میزان برتری نسبت پروتئین‌های پیش ابقائی و آپوپتوزیس خانواده BCL2 تعیین کننده اصلی این است که آیا یک سلول زنده خواهد ماند یا می‌میرد. ناقلAR نقش مهمی در هوموستازی

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-03]

اپیتلیال پروستات داردکه وابسته است برتعادل خالص تقسیم سلولی و بازده محصول در یک مطالعه قبلی، ما یک مکانیسم رشد را تعریف کردیم که بموجب آن AR میانجیگر با تنظیم پائین دست ترکیب cyclin D-CDK4/6 باعث مهار پیشرفت چرخه سلولی سلول‌های اپیتلیال پروستات انسان (Primary Prostate Epithelial Cells; Normal, Human) می‌شود. با این حال، ناقل AR و پاسخ استرس آپوپتوزیس سلول اپیتلیال پروستات انسان به‌خوبی شناخته نشده‌اند، هر چند آنان مسیرهای ناقلین مرکزی هستند که در این سلول‌ها وتنظیم هوموستاز پروستات و آسیب‌شناسی دخالت دارند. مهم این است که، فعالیت ناقلین AR در سلول‌های (Primary Prostate Epithelial Cells; Normal, Human) در شرایط کشت وضعیت آپوپتوزیس آنان بهینه نشده است، نقش ثابت ناقل AR برای حفظ هوموستازی در تمایز سلولی و پیشرفت رشد سلول‌های اپیتلیال پروستات دارد. برای درک بهتر ناقلین AR در زمینه پاسخ استرس سلولی، فرض ما بر این است که ناقلین AR موجب افزایش تقاضا برای سلول‌های آسیب دیده ناشی از عملکرد سلول‌های اپیتلیال نرمال پروستات بر حفظ هموستازیس و بقاء سلول نرمال می‌گردد(11-9). با توجه به اثرات ضد سرطانی دئوکسی پودوفیلوتوکسین، هدف این مقاله بررسی اثرات ضد سرطانی ترکیب دئوکسی پودوفیلوتوکسین و عصاره تام میوه گیاه لمبیر که حاوی این ترکیب بوده، می‌باشد.

مواد و روش ها

این مطالعه از نوع تجربی، مستخرج از طرح مصوب دانشگاه علوم پزشکی مازندران و با تایید کمیته اخلاق دانشگاه بوده و تمامی مراحل کار اعم از کار گیاهی و سلولی بر اساس اصول اخلاقی توصیه شده کمیته اخلاق دانشگاه به انجام رسیده است.

جمع آوری گیاه

میوه لمبیر در شهریور 1394 از ارتفاعات سفیدچال گلوگاه جمع‌آوری شد. موقعیت لمبیر از منطقه سفیدچال گلوگاه در عرض جغرافیایی 36/551375 و طول جغرافیایی 53/828673 قرار دارد. پس از شناسایی دقیق، با نمونه هرباریومی دانشگاه پیام نور ساری با کد SPNH-2011 تطبیق داده شد. میوه لمبیر از نقاط مختلف در این موقعیت جغرافیایی جمع‌آوری شد تا نمونه‌برداری درستی انجام شده باشد (تصویر شماره1).



تصویر شماره 1: تصویر نمونه هرباریومی و گیاه لمبیر

خشک کردن و عصاره‌گیری

میوه گیاه جمع‌آوری شده در انبار بر روی توریهای فلزی با شرایط تهویه مناسب قرار داده شد تا به طور کامل خشک شود. پس از خشک شدن کامل، نمونه‌ها توسط آسیاب برقی به‌طور کامل خرد شد. میوه گیاه لمبیر و با روش ماسراسیون با حلال هیدروالکلی عصاره گیری گردید(14-12).

تعیین مقدار DPT تام عصاره به روش HPLC

شرایط مناسب به دست آمده با استفاده از نمونه استاندارد آن، Ammonium acetate 0/02 مولار در فاز متحرک، pH 5/5 فاز متحرک (با استفاده از بافر فسفات) و درجه حرارت ستون 30 درجه سانتی‌گراد تعیین شد. در این شرایط تهیه peak مناسب دئوکسی پودوفیلوتوکسین برای عصاره تهیه شده از میوه سرو کوهی در حداقل زمان 15 دقیقه شستشو با استونیتریل ضروری است. میزان جریان و حجم عصاره

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-03]

تزریق شده به ترتیب 1 میلی‌لیتر در دقیقه و 2 میکرولیتر تعیین شد(14).

کشت رده‌های سلولی سرطانی پروستات

رده‌های سلولی سرطانی پروستات (PC3، DU145) از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه شد (کد NCBI، C47). ردهٔ سلول‌های سرطانی در محیط کشت DMEM/f12 حاوی ال-گلوتامین، پنی‌سیلین (100 واحد در میلی‌لیتر)، استرپتومایسین (100 واحد در میلی‌لیتر) و 10 درصد سرم جنین گاوی (FBS) کشت شدند. سلول‌ها در انکوباتور 37 درجهٔ سانتی‌گراد، رطوبت 90 درصد و دی اکسید کربن 5 درصد قرار گرفتند. سلول نرمال فیبروبلاست از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه شده (کد NCBI، C165) و محیط کشت RPMI 1640 در شرایط نرمال کشت شد(14-12).

بررسی اثر DPT و عصاره بر مورفولوژی سلول‌های کشت داده شده

در بررسی مورفولوژی، غلظت‌های 10، 50، 100، 500، 1000 میکروگرم در میلی‌لیتر هر یک از دئوکسی پودوفیلوتوکسین (DPT) خالص (سیگما، آلمان) و عصاره لمبیر را بر سلول‌های کشت داده شده به تعداد متوسط (5×10^5) سلول در فلاسک‌های با درب فیلتردار استریل 50 میلی‌لیتر، که حاوی 5 میلی‌لیتر محیط کشت بودند، اثر داده شدند و نتایج در 24، 48، 72 و 96 ساعت بعد از تیمار کردن سلول‌ها با ترکیب، توسط اینورت میکروسکوپ مجهز به دوربین اولمپوس ژاپن، عکس برداری شد(14-12).

تست سمیت ماده استاندارد و عصاره گیاهی

بررسی میزان سمیت سایتوتوکسیک عصاره لمبیر و ماده استاندارد DPT بر هر دو رده سلولی سرطان پروستات (DU145، PC3) در مقایسه با گروه‌های کنترل بررسی شد. از هر دو ردهٔ سلولی، پس از انجام پاساژ، یک سوسپانسیون سلولی در محیط کشت تهیه شد. به این صورت که در هر خانه از پلیت 96 خانه‌ای، 5000 سلول موجود باشد. پلیت‌ها 24 ساعت در انکوباتور قرار داده شدند تا سلول‌ها به بستر خود بچسبند. غلظت‌های 10، 100، 500، 1000 میکروگرم در میلی‌لیتر عصاره لمبیر به 4 گروه سه‌تایی از خانه‌های مربوط به هر دو رده سلولی سرطان پروستات و DPT به 4 گروه سه‌تایی از خانه‌های مربوط به هر دو ردهٔ سلولی اضافه شد و به خانه‌های مربوط به گروه شاهد، برای کنترل منفی، آب مقطر استریل و به گروه کنترل مثبت سیس‌پلاتین اضافه شد. این پلیت‌ها در انکوباتور قرار گرفتند و پس از 48 ساعت به جای محیط کشت، 180 میکرولیتر محیط تازه همراه با 20 میکرولیتر رنگ تترازولیوم اضافه و 4 ساعت در انکوباتور گذاشته شد. پس از آن محیط کشت حاوی رنگ تترازولیوم خالی و 200 میکرولیتر DMSO و 25 میکرولیتر بافر گلایسین جایگزین آن شد و جذب نوری خانه‌ها توسط دستگاه میکروپلیت ریدر در طول موج 570 نانومتر اندازه‌گیری شد(14).

تست تعیین آپوپتوز و نکروز سلول‌ها به روش فلوسایتومتری

از هر رده سلولی، پس از انجام پاساژ، یک سوسپانسیون سلولی در محیط کشت تهیه شد. به این صورت که در هر خانه از پلیت 12 خانه‌ای 500000 سلول موجود باشد. برای این آزمون 3 پلیت 12 خانه‌ای در نظر گرفته شد و 30 خانه از پلیت‌های 12 خانه‌ای انتخاب شد. سپس 5 گروه سه‌تایی از خانه‌ها به سلول‌های هر دو رده سلولی پروستات با عصاره لمبیر و 5 گروه سه‌تایی از خانه‌ها به سلول‌های هر دو رده سلولی با ماده استاندارد DPT اختصاص داده شد. این پلیت‌ها 48 ساعت در انکوباتور قرار گرفتند و سپس برای سه دقیقه 200 میکرولیتر تریپسین 1 ایکس برای هر خانه ریخته شد و پس از سانتریفوژ برای بررسی سلول‌های آپوپتوز و نکروز از دستگاه فلوسایتومتری چهار کاناله تک لیزری (Sysmex Partect PSA)، طول موج 580 و 630 به

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-03]

بالا، کیت Annexin V-FITC Apoptosis ebiosince استفاده شد(14).

بیان نسبی ژن‌های AR و CLU به روش Real time PCR

RNA دو رده سلولی پروستات به وسیله کیت استخراج RNA شرکت کیاژن (74104) استخراج شد. پس از استخراج RNA برای اطمینان از صحت استخراج و بررسی کمیت و کیفیت آن، RNA استخراج شده روی ژل آگارز دو درصد الکتروفورز شد. برای ساخت cDNA از کیت کیاژن فست Reverse Transcriptase (QuantiFast) شرکت کیاژن (205311) استفاده شد. قبل از اندازه‌گیری بیان ژن‌های مورد نظر، صحت عملکرد آغازگرهای تهیه شده با استفاده از دستگاه PCR و تکثیر قطعه مورد نظر از روی cDNA تهیه شده بر اساس پرایمرهای اختصاصی برای هر ژن (TGTCACTATGGAGCTCTCACATGTGG به عنوان پرایمر مستقیم و CACCTCTCAAATATGCTAGACGAATCTGT به عنوان پرایمر معکوس AR و TGCCTTTCCCATGGACTGGG به عنوان پرایمر مستقیم و GAGTTCCAAAGGCCAAACCG به عنوان پرایمر معکوس)، بررسی شد. واکنش‌های Real Time QPCR با استفاده از آغازگرهای اختصاص و کیت کو آنتی‌فست سایبرگرین PCR شرکت کیاژن (204052) در دستگاه PCR از شرکت Corbett انجام شد(14-12).

روش اندازه‌گیری کمیت بیان ژن‌ها و تجزیه و تحلیل آماری نتایج

در مطالعه حاضر بیان ژن‌های مورد نظر از روش لیواک (2-ΔΔCT) اندازه‌گیری شده و تجزیه و تحلیل واریانس برای بررسی وجود یا عدم وجود اختلاف معنی‌دار آماری بین تیمارهای مختلف از نظر بیان ژن‌های مورد نظر از نرم‌افزار آماری SAS ویرایش 9/1 استفاده شد(19). اطلاعات به‌دست آمده توسط نرم افزار آماری SPSS (نسخه 20) به کمک آزمون واریانس یک طرفه (ANOVA) تجزیه و تحلیل شدند. در صورت وجود اختلاف معنی‌دار میان گروه‌ها و به‌منظور تفکیک گروه‌هایی که با یکدیگر اختلاف معنی‌دار داشتند، از آزمون تعقیبی Tukey در سطح معنی‌داری P<0/05 استفاده شد.

بررسی متیلاسیون ژن PMEPA1 در سلول‌های رده سرطانی پروستات

طراحی پرایمر با نرم‌افزار Blast انجام شد. ژن PMEPA1 از ژن‌های آندروژن رسپتور AR انتخاب شده و از طریق سایت NCBI به بررسی ژن و طراحی آن اقدام شد. یک میکروگرم DNA توسط بی‌سولفیت سدیم با استفاده از بسته EZ DNA Methylation-GoldTM در کیت بی‌سولفیت (EpiTect Bisulfite Kits) و پیروی از پروتکل عرضه کننده، با استفاده از بافر 50 میلی‌لیتر، بی‌سولفیت شد. غلظت پرایمر برای مخلوط با الیگونوکلئوتید بی‌سولفیت شده 700 نانوگرم تعیین شد. 50 میکرولیتر از نمونه‌های بی‌سولفیت شده از هر رده سلولی PC3 و DU145 با اثر ماده استاندارد DPT و نمونه کنترل با اثر سیس‌پلاتین بر روی هر یک از رده‌ها را برای سکانس به کشور کره فرستاده شد. نتایج سکانس با نرم‌افزار ChromasPro نسخه ۲،۴،۱ آنالیز شد(14-12).

تعیین آنتی‌اکسیدانی با روش DPPH

اثر آنتی‌اکسیدانی گیاه با ترکیب DPPH مورد ارزیابی قرار گرفت. در این روش غلظت‌های مختلف عصاره گیاه با حجم برابر با محلول 100 میکرومولار DPPH مخلوط و بعد از انکوباسیون برای مدت 15 دقیقه در دمای اتاق با دستگاه UV در طول موج 517 نانومتر آنالیز شد. همچنین اثر آنتی‌اکسیدنی آن با ترکیب آنتی‌اکسیدانی استاندارد BHA مقایسه شد(۱۲،۱۴).

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-03]

اطلاعات به‌دست آمده توسط نرم‌افزار آماری SPSS (ورژن 20) به کمک آزمون واریانس یک طرفه (ANOVA) تجزیه و تحلیل شدند. در صورت وجود اختلاف معنی‌دار میان گروه‌ها و به‌منظور تفکیک گروه‌هایی که با یکدیگر اختلاف معنی‌دار داشتند، از آزمون تعقیبی Tukey در سطح معنی‌داری P<0/05 استفاده شد(14-12).

یافته ها

اثر عصاره‌های گیاهی و ماده استاندارد بر میزان تکثیر رده سلولی با روش MTT assay

در ارزیابی مورفولوژیک دو ردهٔ سلولی PC3 و DU145 مشخص گردید که 48 ساعت پس از اضافه نمودن عصاره متانلی *Juniperus communis* و دئوکسی پودوفیلوتوکسین با غلظت 10 µg/ml درمقایسه با سلول‌های گروه شاهد، تغییر محسوسی در آن‌ها مشاهده نشد. اما، در غلظت 10µg/ml، 100، 500، 1000 سلول‌ها از بستر خود جدا شده و از حالت دوکی شکل به‌صورت گرد در آمده و گرانولاسیون سلولی درآن‌ها مشاهده گردید. شدت میزان کشندگی عصاره متانلی *Juniperus communis* و دئوکسی پودوفیلوتوکسین وابسته به غلظت بوده و با افزایش آن اثرکشندگی بیش‌تر می‌شود و با افزایش غلظت، تعداد سلول‌های تخریب شدهٔ بیشتری در فلاسک‌های کشت دیده شد (100 <500 <1000). 48 ساعت پس از اضافه کردن عصاره متانلی *Juniperus communis* و دئوکسی پودوفیلوتوکسین خالص با غلظت 50 µg/ml در مقایسه با سلول‌های فلاسک گروه شاهد، تغییر محسوسی در آن ها مشاهده نشد، اما در غلظت‌های 10µg/ml، 100، 500، 1000 تغییرات مورفولوژیک قابل توجه بود و این تغییرات با افزایش زمان شدیدتر گردید. در هر یک ازغلظت‌های 10µg/ml، 100، 500، 1000 اثر داده شده به سلول‌ها، با افزایش زمان اثرات سایتوتوکسیک در سلول‌ها (سرطانی و طبیعی) بیش‌تر شد و تعداد سلول‌های کشته شده افزایش یافت (48 <72 <96). در ارزیابی مورفولوژیک سلول‌های PC3 و DU145 تیمار شده با دئوکسی پودوفیلوتوکسین خالص نیز پس از گذشت 24 ساعت از اضافه کردن دئوکسی‌پودوفیلوتوکسین خالص در غلظت‌های 500µg/ml، 1000، کاهش تقسیم و گرانولاسیون سلولی مشاهده شد. اما، در غلظت‌های 10µg/ml، 100 سلول‌ها به بستر فلاسک چسبیده، شکل طبیعی خود را حفظ کرده و گرانولاسیون سلولی در آن‌ها مشاهده نشد. پس از گذشت 48، 72 و 96 ساعت، اثرات ترکیب در غلظت‌های µg/ml 500، 1000 تشدید گردید. جذب نوری به‌دست آمده از خانه‌ای حاوی سلول‌های تیمار شده با عصاره متانلی *Juniperus communis* و دئواکسی پودوفیلوتوکسین خالص با جذب نوری خانه‌های حاوی گروه شاهد مقایسه شد و درصد سلول‌های زنده مانده با فرمول زیر محاسبه گردید.

نتایج نشان داد با عصاره متانلی *Juniperus communis* و دئوکسی پودوفیلوتوکسین خالص با غلظت‌های 500µg/ml، 1000 در مقایسه با گروه شاهد، موجب کاهش معنی‌داری در میزان درصد زنده ماندن سلول‌های سرطانی ردهٔ PC3 و DU145 شد (جدول شماره 1 و 2). در غلظت µg/ml 10 با عصاره متانلی *Juniperus communis* و دئواکسی پودوفیلوتوکسین خالص، کاهش درصد زنده ماندن سلول‌های سرطانی PC3 و DU145 در مقایسه با گروه شاهد معنی‌دار نبود (P>0/05). در مقایسه با گروه شاهد، غلظت‌های 500µg/ml و 1000 عصاره متانلی *Juniperus communis*، موجب کاهش معنی‌داری در میزان درصد زنده ماندن سلول‌های PC3 و DU145 گردید (P<0/05) و در غلظت‌های 10µg/ml، 100 و 1000 دئواکسی پودوفیلوتوکسین خالص کاهش درصد زنده ماندن سلول‌های PC3 و DU145 نسبت به گروه شاهد معنی‌دار نبود (جدول شماره 1 و 2) (تصویر شماره 2). همچنین در تصویر شماره 3 و جدول شماره 3 نتایج ایجاد آپوپتوز آورده شده است. تصویر شماره 4 نتایج حاصل از بیان ژن رسپتور آندروژنی را نشان می‌دهد.

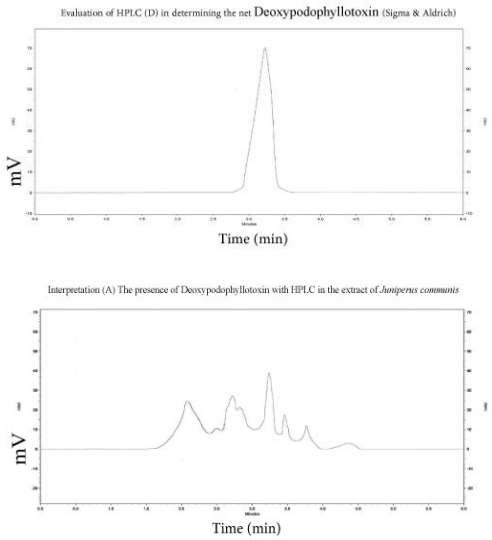
[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-03]

جدول شماره 1: درصد زنده ماندن سلول های DU145 در 24، 48، 72 ساعت پس از تیمار با DPT و عصاره متانلی Juniperus communis با غلظت های 10، 50، 100 و 500 میکروگرم بر میلی لیتر

گروه‌ها	DPT								عصاره *J. communis*			
	24ساعت	P	48 ساعت	P	72 ساعت	P	24ساعت	P	48 ساعت	P	72 ساعت	P
شاهد	%100		%100		%100		%100		%100		%100	
غلظت 10	%52/10	0/0003	%54/20	0/0213	%49/90	0/0217	%61/40	-0/003	%61/50	-0/002	%62/10	0/004
غلظت 100	%32/90	-0/005	%33/30	-0/001	%34/00	0/006	%58/10	-0/003	%55/10	-0/024	%58/70	0/027
غلظت 500	%15/10	0/024	%10/90	-0/018	%12/00	-0/007	%56/60	0/021	%54/50	-0/029	%59/60	0/008
غلظت 1000	%10/40	-0/015	%12/50	0/006	%12/70	0/008	%53/90	-0/004	%48/90	-0/014	%52/60	0/015

جدول شماره 2: درصد زنده ماندن سلول های PC3 در 24، 48، 72 ساعت پس از تیمار با DPT و عصاره متانلی Juniperus communis با غلظت های 10، 50، 100 و 500 میکروگرم بر میلی لیتر

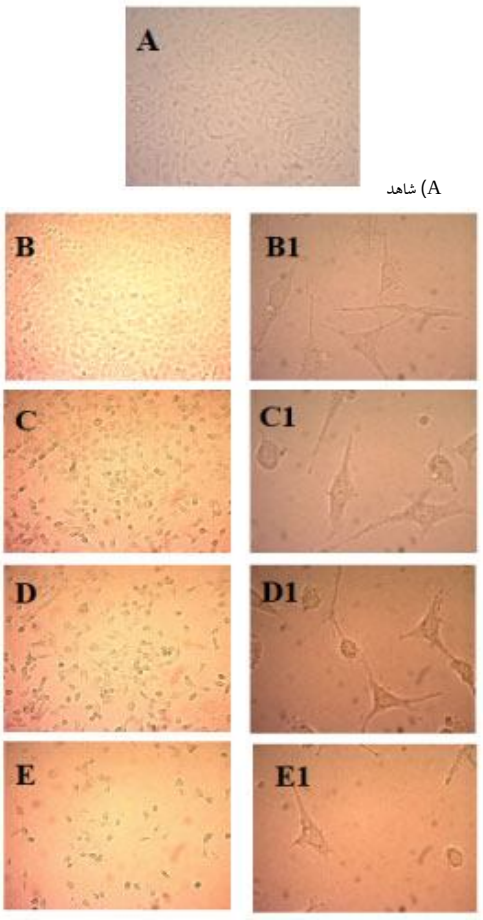
گروه‌ها	DPT								عصاره *J. communis*			
	24ساعت	P	48 ساعت	P	72 ساعت	P	24ساعت	P	48 ساعت	P	72 ساعت	P
شاهد	%100		%100		%100		%100		%100		%100	
غلظت 10	%52/10	0/0003	%54/20	0/0213	%49/90	0/0217	%60/90	-0/012	%61/50	-0/006	%63/90	0/018
غلظت 100	%32/90	-0/005	%33/30	-0/001	%34/00	0/006	%48/80	0/042	%55/50	-0/043	%54/10	-0/004
غلظت 500	%15/10	0/024	%10/90	-0/018	%12/00	-0/007	%56/20	0/001	%47/70	0/051	%52/00	0/049
غلظت 1000	%10/40	-0/015	%12/50	0/006	%12/70	0/008	%51/90	-0/013	%46/70	0/022	%56/70	-0/008



تصویر شماره 2: حضور ماده دئوکسی پودوفیلوتوکسین خالص با HPLC در عصاره میوه لمبیر (Juniperus communis)

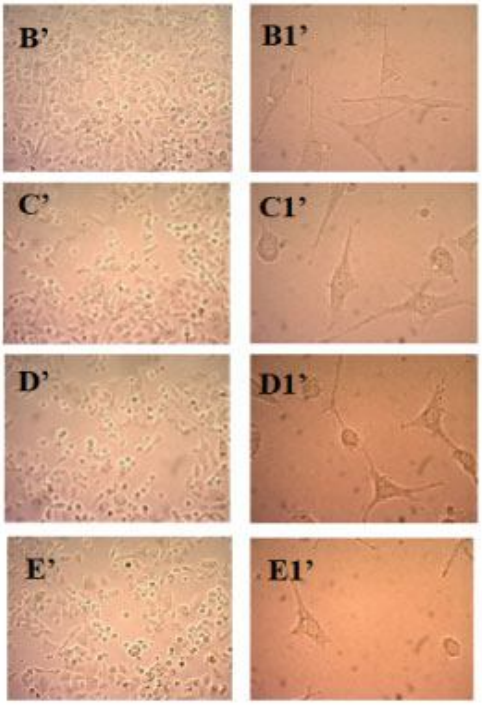
جدول شماره 3: نتایج حاصل از بررسی اثر عصاره گیاه (A) و ترکیب DPT (B) بر روی روند آپوپتوز در سه رده سلولی PC3، DU1454 و سلول نرمال فیبروبلاست (HGFs).

مقایسه مرگ برنامه ریزی شده (آپوپتوز) با مرگ سلولی (نکروز)	درصد فراوانی سلول ها پس از تاثیر عصاره گیاه			درصد فراوانی سلول ها پس از تاثیر ترکیب DPT		
	PC3	DU145	HGFs	PC3	DU145	HGFs
آپوپتوز ابتدایی	3/36	8/30	1/79	23/96	8/17	1/49
آپوپتوز انتهایی	83/83	44/74	1/50	6/92	4/01	44/41
نکروز ابتدایی	0/39	0/89	7/82	1/06	1/73	49/20
میزان بقای سلول زنده	12/42	46/07	88/79	68/06	86/09	4/90



تصویر شماره 3: رده سلولی PC3، B) غلظت 10 µg/ml، C) غلظت 100 µg/ml، D) غلظت 500 µg/ml، E) غلظت 1000 µg/ml.

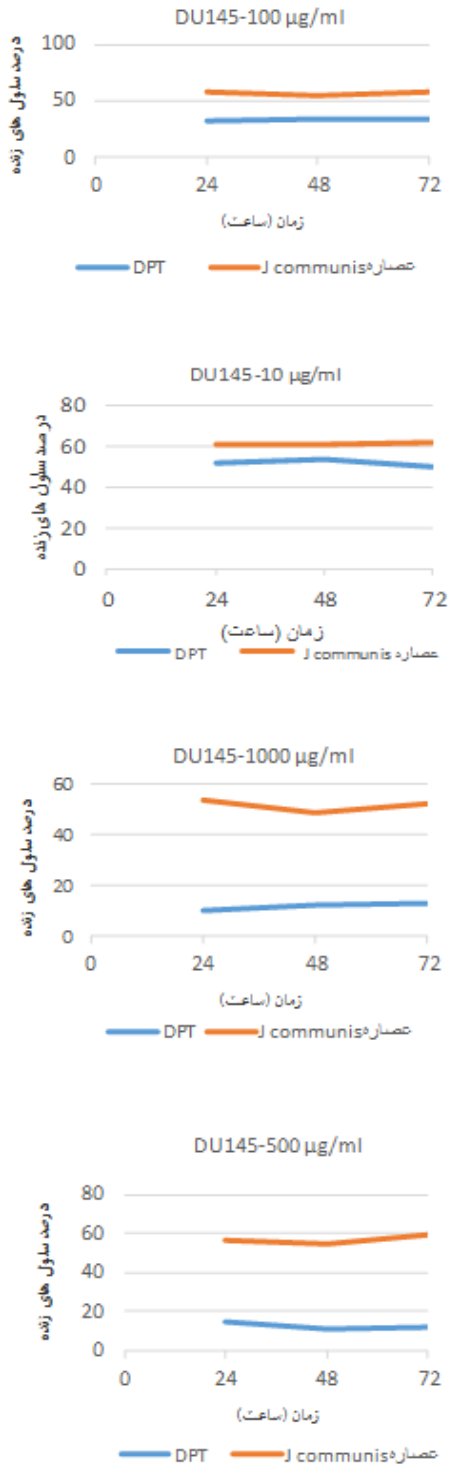
[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-03]



تصویر شماره 4: رده سلولی DU145، B') غلظت 10 µg/ml، C') غلظت 100 µg/ml، D') غلظت 500 µg/ml، E') غلظت 1000 µg/ml.

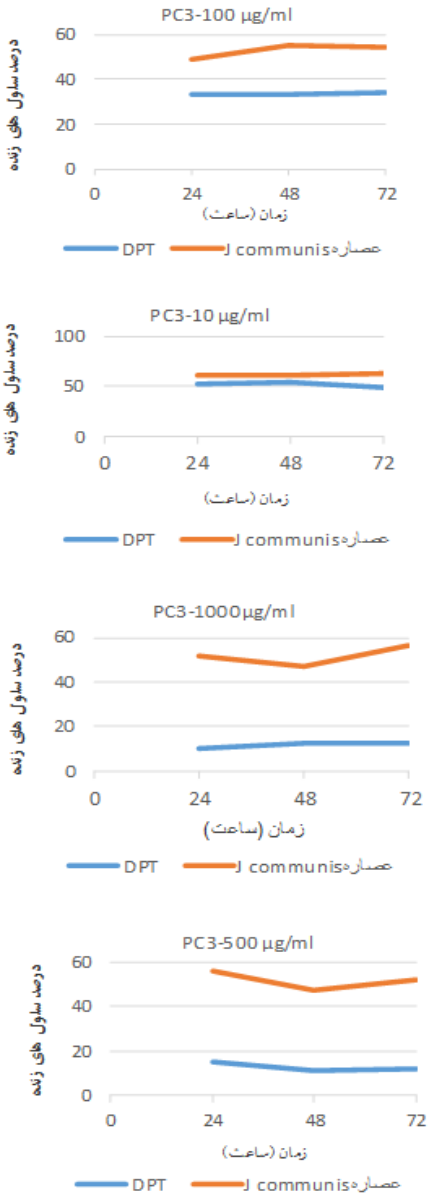
بررسی اثر تیمار J. communis و DPT با غلظت ۱۰،۱۰۰،۵۰۰ و 1000 میکروگرم بر میلی‌لیتر (به ترتیب از بالا به پائین) پس از 72 ساعت بر رده سلول‌های سرطانی PC3 (تصویر شماره 3) و DU145 (تصویر شماره 4) می باشد.

با غلظت سلول‌های سرطانی PC3 و DU145، 72 ساعت پس از تیمار با عصاره متانلی Juniperus communis و دئواکسی پودوفیلوتوکسین خالص (20×) (بدون شماره مربوط به دئوکسی پودوفیلوتوکسین و شماره 1 مربوط به عصاره). A) شاهد و B،B1) غلظت 10µg/ml پس از 72 ساعت، C1,C) غلظت 100 µg/ml پس از 72 ساعت، D1,D) غلظت 500 µg/ml پس از 72 ساعت، E1,E) غلظت 1000 µg/ml پس از 72 ساعت برای رده سلولیPC3 و B'، B1') غلظت 10µg/ml پس از 72 ساعت، C'،C1') غلظت 100µg/ml پس از72 ساعت، D، D1') غلظت 500 µg/ml پس از 72 ساعت، E، E1') غلظت 1000µg/ml پس از 72 ساعت (تصویر شماره 5و6).



تصویر شماره 5: نتایج مقایسه ای اثر عصاره گیاه و ترکیب DPT (در دوزهای ۱۰،۱۰۰،۵۰۰ و 1000 میکروگرم بر میلی لیتر از A تا E) در زمان های 24، 48 و 72 ساعت بر روی رده سلولی DU145

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-03]



تصویر شماره 6: نتایج مقایسه ای اثر عصاره گیاه و ترکیب DPT (در دوزهای ۵۰۰،۱۰۰،۱۰ و 1000 میکروگرم بر میلی لیتر از A تا E) در زمان های 24، 48 و 72 ساعت بر روی رده سلولی PC3

ارزیابی القاء آپوپتوزیس DPT وعصاره لمبیر با فلوسایتومتری

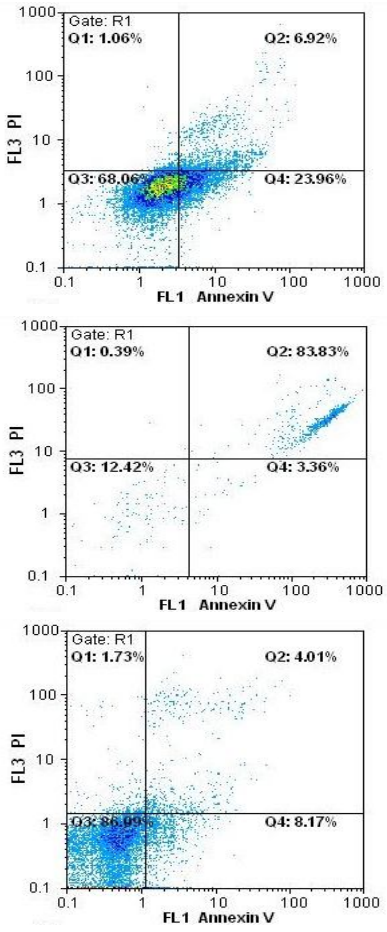
آپوپتوزیس و نکروزیس و بقای سلول زنده برای رده سلولی DU145، PC3 و فیبروبلاست نرمال با اثر عصاره میوه لمبیر به غلظت 100 µg/ml و ماده خالص DPT به غلظت 100 µg/ml که به مدت 24 ساعت تیمار داده شدند، با استفاده از کیت آپوپتوزیس (Annexin-V FITC and propidium iodide) و دستگاه فلوسایتومتر مورد ارزیابی قرار گرفت (تصویر شماره 7).

جدول شماره 4 نشان می دهد که میانگین بیان نسبی ژن AR و CLU با اثر ماده مؤثر استاندارد بر رده سلولی PC3 و DU145 و HGFs نسبت به گروه کنترل Cisplatin انتظار مناسب برخوردار است (تصویر شماره 8 و 9). همچنین نتایج متیلاسیون ژن مربوطه در تصویر شماره 10 آورده شده است.

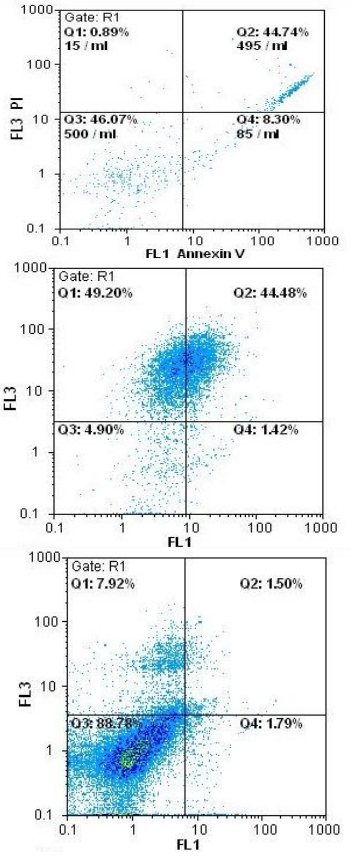
جدول شماره 4: میزان بیان نسبی ژن AR با اثر ماده مؤثر استاندارد بر رده سلولی پروستات

رده سلولی	بیان ژن CLU تحت تاثیر DPT	بیان ژن AR تحت تاثیر DPT
PC3	17.09[a]	6.54[a]
DU145	3.49[b]	7.59[a]
HGFs	1.006[a]	1.055[a]
control	3.43[b]	0.97[b]
P-value	0.0119	0/05
SEM	1/7	0/71

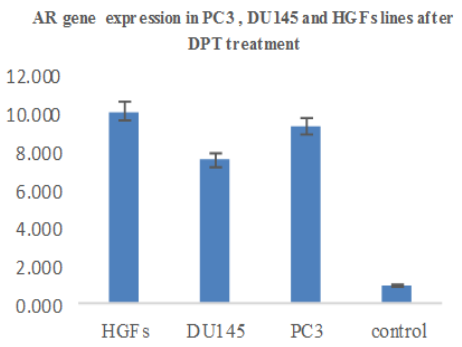
*میانگین های دارای حروف مشترک در هر ستون فاقد تفاوت معنی دار آماری هستند.



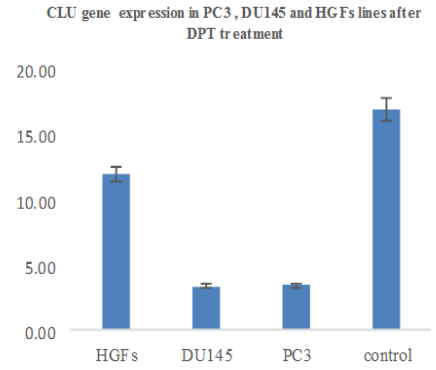
[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-03]



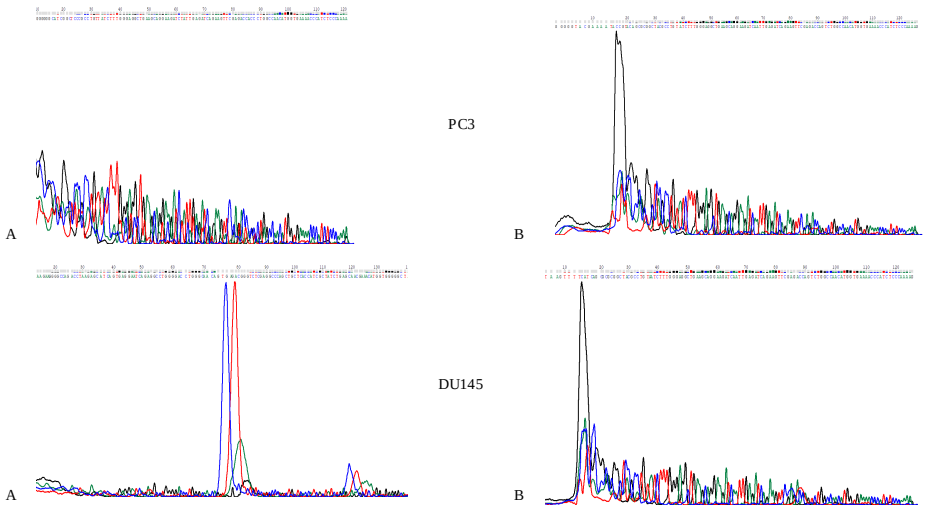
تصویر شماره 7: نتایج حاصل از بررسی اثر عصاره گیاه (A) و ترکیب DPT (B) بر روی روند آپوپتوز در سه رده سلولی PC3، DU1454 و سلول نرمال فیبروبلاست (HGFs).



تصویر شماره 8: بیان ژن آندروژن رسپتور (AR) در رده های سلولی PC3، DU145 و HGFs بعد از تاثیر DPT



تصویر شماره 9: بیان ژن کلاسترین (CLU) در رده های سلولی PC3، DU145 و HGFs بعد از تاثیر DPT



تصویر شماره 10: کروماتوگرام A اثر سیس پلاتین و B دئوکسی پودوفیلوتوکسین بر متیلاسیون ژن PMEPA1 در رده سلولی PC3 و DU145

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-03]

میزان فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره میوه لمبیر و دئوکسی پودوفیلوتوکسین

با توجه به نتایج به دست آمده، میزان IC_{50} عصاره گیاه، DPT و BHA یا هیدروکسی آنیزول بوتیله به ترتیب 57/48، 32/46 و 58/72 میکروگرم بر میلی‌لیتر محاسبه شد.

بحث

هدف اصلی این پژوهش بررسی اثرات سیتوتوکسیک عصاره متانلی *Juniperus communis* بر ردهٔ سلول‌های سرطانی PC3 و DU145 در مقایسه با اثرات سیتوتوکسیک دئوکسی پودوفیلوتوکسین خالص بر ردهٔ سلول‌های سرطانی PC3 و DU145 بود.

بر اساس مشاهدات مورفولوژیک، 24 ساعت پس از تیمار سلول‌های سرطانی با ترکیب متانلی دئوکسی پودوفیلوتوکسین با غلظت 100 µg/ml تغییرات مورفولوژیک محسوسی در مقایسه با نمونه‌های گروه شاهد مشاهده نشد و سلول‌های سرطانی از نظر شکل و اندازه تقریبا مشابه با سلول‌های گروه شاهد بودند. 48 و 72 ساعت بعد از اینکه سلول‌های سرطانی تحت اثر ترکیب با غلظت 100 µg/ml قرار گرفتند، تغییرات مورفولوژیک ایجاد شده در آن ها در مقایسه با گروه شاهد بسیار نامحسوس بود. بر اساس نتایج آزمون MTT، کاهش درصد زنده ماندن ردهٔ سلول‌های سرطانی PC3 و DU145 در 24 ساعت پس از تیمار سلول‌ها با غلظت 100 µg/ml از عصاره، در مقایسه با درصد زنده ماندن نمونه‌های گروه شاهد دارای اختلاف معنی‌داری نبود ($P>0/05$). با افزایش زمان، میزان درصد زنده ماندن سلول‌های سرطانی کاهش یافت، ولی این کاهش معنی‌دار نبود ($P>0/05$). بنابراین، افزایش زمان نسبت به 24 ساعت، کاهش معنی‌داری در میزان درصد زنده ماندن سلول‌هایی که تحت اثر عصاره با غلظت 10 µg/ml قرار داشتند، ایجاد نکرد. طبق مشاهدات مورفولوژیک، 24 ساعت پس از تیمار سلول‌های سرطانی PC3 و DU145 با عصاره متانلی *Juniperus communis* با غلظت 100 µg/ml، تغییرات مورفولوژیک قابل ملاحظه‌ای در مقایسه با نمونه‌های گروه شاهد در سلول‌ها مشاهده شد و این تغییرات در 48 و 72 ساعت بعد از تیمار سلول‌ها با عصاره متانلی *Juniperus communis* با غلظت 100 µg/ml تشدید گردید. بر اساس نتایج آزمون MTT، درصد زنده ماندن سلول‌های سرطانی PC3 و DU145 در 24 ساعت پس از تیمار با عصاره متانلی *Juniperus communis* با غلظت 10 µg/ml نسبت به گروه شاهد به‌طور معنی‌داری کاهش یافت ($P<0/05$). هم‌چنین، این کاهش با افزایش زمان نسبت به 24 ساعت، به‌طور معنی‌داری تشدید شد. بنابراین، می‌توان گفت علاوه بر اینکه غلظت عصاره متانلی *Juniperus communis* بر مورفولوژی و درصد زنده ماندن سلول‌های سرطانی موثر است، مدت زمانی که سلول‌ها تحت اثر ترکیب قرار می‌گیرند، می‌تواند اثرگذار باشد. در مقایسه با نمونه‌های گروه شاهد، تغییرات مورفولوژیک قابل توجهی در 24 ساعت پس از تیمار سلول‌ها عصاره متانلی *Juniperus communis* با غلظت 100 µg/ml، مشاهده نشد و آزمون MTT این نتایج را تایید نمود. کاهش درصد زنده ماندن سلول‌ها با دئوکسی پودوفیلوتوکسین خالص در 24 ساعت پس از تیمار سلول‌ها با غلظت 500 µg/ml در مقایسه با گروه شاهد معنی‌دار نبود ($P>0/05$). هم‌چنین، افزایش زمان نسبت به 24 ساعت نتوانست اثرات قابل توجهی بر مورفولوژی و درصد زنده ماندن سلول‌های تیمار شده با دئوکسی پودوفیلوتوکسین خالص در غلظت 100 µg/ml بگذارد. بنابراین، می‌توان گفت عصاره متانلی *Juniperus communis* در این غلظت می‌تواند درصد زنده ماندن سلول‌های سرطانی را در مقایسه با گروه شاهد بطور معنی‌داری کاهش دهد، ولی این کاهش در سلول‌های تیمار شده با دئوکسی پودوفیلوتوکسین خالص مشاهده نشد. با توجه به روش تحقیق این پژوهش، نمی‌توان از نظر مولکولی تفاوت‌های بین

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-03]

سلول‌های سرطانی تیمار شده با عصاره متانلی *Juniperus communis* و دئوکسی پودوفیلوتوکسین خالص که منجر به پاسخ متفاوت این دو ردهٔ سلولی نسبت به عصاره متانلی *Juniperus communis* در غلظت 100 µg/ml شده است، را بررسی و ردیابی نمود. اما، می‌توان گفت سلول‌ها از نظر مسیرهای بیان ژنی، گیرنده‌های موجود در خارج و داخل غشا و هم‌چنین مسیرهای سیگنال‌دهی سلولی متفاوت‌اند، که این امر ممکن است منجر به پاسخ متفاوت سلول‌های تیمار شده با دئوکسی پودوفیلوتوکسین خالص نسبت به سلول‌های تیمار با عصاره متانلی *Juniperus communis* در غلظت 500 µg/ml شده باشد. این تفاوت در مسیرهای سیگنال‌دهی در سلول‌ها، ممکن است منجر به فعال شدن آپوپتوز و عوامل مهار کنندهٔ نسخه‌برداری از DNA و یا منجر به مهار نمودن یک ژن خاص که نقش تنظیمی در چرخهٔ تقسیم سلولی دارد، در سلول‌های سرطانی تیمار با عصاره متانلی *Juniperus communis* شود. تغییرات مورفولوژیک در غلظت‌های 500µg/ml و 1000 با افزایش غلظت نسبت به گروه شاهد افزایش یافت و افزایش زمان نسبت به 24 ساعت پس از تیمار با ترکیب، توانست منجر به تشدید اثرات سایتوتوکسیک در سلول‌ها شود. بر اساس نتایج آزمون MTT، درصد زنده ماندن سلول‌ها در غلظت‌های 500µg/ml و 1000 در مقایسه با گروه شاهد به‌طور معنی‌داری کاهش یافت ($P<0/05$). هم‌چنین، درصد زنده ماندن سلول‌ها در غلظت‌های 500 µg/ml و 1000 وابسته به غلظت و زمان می‌باشد؛ یعنی با افزایش این فاکتورها، میزان مرگ و میر سلول‌ها به‌طور معنی‌داری افزایش می‌یابد. تاکنون گزارشی از اثرات سیتوتوکسیک عصاره متانلی *Juniperus communis* بر سلول‌های سرطانی ردهٔ PC3 و DU145 در دست نیست. بنابراین، وجود اثرات سایتوتوکسیک عصاره متانلی *Juniperus communis* بر سلول‌های طبیعی نیز می‌بایست مدنظر قرار گیرد و تحقیقات بیشتری در این زمینه انجام شود تا چنانچه دئوکسی پودوفیلوتوکسین خالص بر سلول‌های سالم انسانی اثرات مهاری و سیتوتوکسیک داشته باشند، در هنگام استفاده از غلظت‌های متفاوت این گیاه دارویی، به آن توجه شود. Abdullaev و همکاران در طی مطالعه‌ای دریافتند که دئوکسی پودوفیلوتوکسین خالص فعالیت‌های سه فرآیند مهم متابولیکی یعنی ساخت RNA، DNA و پروتئین را در سلول‌های سرطانی انسانی متوقف ومهارمی‌کند(16). هم‌چنین، Abdullaev وهمکاران در سال 2003 در طی مطالعه‌ای مشابه دریافتند، اثر بازدارندگی دئوکسی پودوفیلوتوکسین خالص روی سنتز نوکلئیک اسید می‌تواند یک اساس بیوشیمیایی برای اثر بازدارندگی آن روی تکثیر سلول‌های توموری باشد. این نکته توسط آزمایش اثرات دئوکسی پودوفیلوتوکسین خالص روی ساخت RNA و DNA در یک سیستم بدون سلول که هسته‌ها ایزوله شده بودند، بررسی شد(16). بر اساس مطالعات Dufresne و همکارانش مشاهده شد دئوکسی پودوفیلوتوکسین خالص، اثر مستقیم روی واکنش‌های سنتزی ندارد و مکانیسم‌های ضد سرطانی دئوکسی پودوفیلوتوکسین خالص را به‌طور خلاصه این‌گونه بیان نمودند: 1) اثر مهار کنندگی بر سنتز RNA و DNA دارد، اما بر سنتز پروتئین اثر مهاری ندارد؛ 2) اثر مهار کنندگی دئوکسی پودوفیلوتوکسین خالص، روی فعل و انفعالات زنجیرهٔ رادیکال‌های آزاد و به خواص آنتی‌اکسیدانی آن نیز ارتباط پیدا می‌کند؛ 3) اثر ضد سرطانی دئوکسی پودوفیلوتوکسین خالص، به‌صورت طبیعی کارتنوئیدها را به رتنوئید تبدیل می‌کند(17). Pozo-Rodríguez و همکارانش دریافتند، تیمار سلول‌های توموری با دئوکسی پودوفیلوتوکسین خالص، کاهشی را در سطح ترکیبات سولفیدریلی داخل سلولی ایجاد می‌کند که این کاهش می‌تواند یکی از توضیحات، برای اثرات سایتوتوکسیسیتی دئوکسی پودوفیلوتوکسین خالص باشد(18). Lee و همکارانش در سال 2010 دریافتند که ترکیب دئوکسی پودوفیلوتوکسین می‌تواند در مهار فاکتور رشد آندوتلیوم عروقی موثر

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-03]

باشد. مهار این فاکتور رشد، موجب مهار تکثیر، مهاجرت، تهاجم، تشکیل عروق و تولید بافت همبند در اطراف سلول‌های سرطانی می‌شود. هم‌چنین تجویز خوراکی دئوکسی پودوفیلوتوکسین خالص موجب مهار رشد سرطان پرستات گردید. در این مطالعه گزارش شد که تجویز دئوکسی پودوفیلوتوکسین خالص، موجب تحریک در فعالیت گلوتاتیون ترانسفراز، سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز شده است(7).

Shahverdi و همکارانش در سال 2006 دریافتند آنزیم متالوپروتیناز تولیدی توسط سلول‌های سرطانی نقش مهمی در تحریک تهاجم سلول‌های سرطانی و ایجاد التهاب دارد و تجویز دئوکسی پودوفیلوتوکسین خالص موجب مهار فعالیت این آنزیم و در نتیجه مهار تهاجم سلول‌های سرطانی می‌شود(20). Abul-Nasr و همکارانش برای توجیه اثرات سایتوتوکسیک دئوکسی پودوفیلوتوکسین خالص و ترکیبات موجود در آن مکانیسم‌های مختلفی پیشنهاد کردند که بخشی از آن نیز القا آپوپتوزیس در سلول‌های سرطانی از طریق مسیرهای وابسته به P53 و مسیر غیروابسته به P53 می‌باشند(21). به‌طور کلی می‌توان گفت ترکیب متانلی دئوکسی پودوفیلوتوکسین حاوی ترکیباتی است که می‌تواند روتد تکثیر و تقسیم سلولی را کاهش دهد و با فعال کردن روند آپوپتوز در سلول‌ها و هم‌چنین با آسیب رساندن به DNA و اختلال در روندهای سیگنال‌دهی سلولی منجر به تخریب و مرگ سلولی می‌شود. تمامی مطالب ذکر شده ممکن است هم در سلول‌های سرطانی و هم در سلول‌های طبیعی رخ بدهد. البته لازم به‌ذکر است تمامی اثراتی که عصاره متانلی *Juniperus communis* می‌تواند روی سلول‌ها (سرطانی و طبیعی) داشته باشد، رابطه مستقیم با غلظت مصرفی دارد. مطابق با نتایج به‌دست آمده در این پژوهش عصاره متانلی *Juniperus communis* در غلظت 100µg/ml بدون این‌که منجر به آسیب معنی‌داری در سلول‌ها شود، دئوکسی پودوفیلوتوکسین خالص قادر به کشتن سلول‌های سرطانی است. امید است این مطالعه زمینه‌ای را برای دست‌یابی به ترکیباتی از عصاره متانلی *Juniperus communis* که بتوانند به‌طور اختصاصی سلول‌های سرطانی را مورد هدف قرار دهند، فراهم آورد.

در این مطالعه مشخص گردید که عصاره متانلی *Juniperus communis* در غلظت‌های 100µg/ml، 1000 اثر سایتوتوکسیک بر سلول‌های PC3 و DU145 داشته و منجر به تغییرات مورفولوژی (افزایش اندازهٔ واکوئل‌ها، کاهش سیتوپلاسم و پیگمانه شدن هسته) در سلول‌های سرطانی می‌شود؛ درصورتی‌که اثر سایتوتوکسیک در سلول‌های تیمار شده با دئوکسی پودوفیلوتوکسین خالص فقط درغلظت‌های 500 µg/ml و 1000 مشاهده شد و در غلظت‌های 10 µg/ml و 100 این تغییرات مشاهده نشد. بنابراین، می‌توان از غلظت 100µg/ml عصاره متانلی *Juniperus communis* بدون آسیب رساندن به سلول‌ها، جهت کشتن سلول‌های سرطانی PC3 و DU145 استفاده کرد. ماده مؤثر به کار گرفته شده در درمان سرطان پروستات مستقل از تجویز آندروژن با افزایش بیان آندروژن منجر به کاهش پیشرفت تقسیم میتوز و افزایش آپوپتوز می‌گردد. به‌طوریکه در Real time میزان بیان AR نسبت به کنترل افزایش را نشان می‌دهد.

سپاسگزاری

این مقاله بخشی از پایان نامه آقای مرتضی مهدوی با کد اخلاق IR.MAZUMS.REC.95.2101 می باشد. از تمامی افراد که در این طرح کمک و همکاری کردند تشکر و قدر دانی می کنم.

References

1. Calvisi DF, Ladu S, Gorden A, Farina M, Conner EA, Lee JS, et al. Ubiquitous Activation of Ras and Jak/Stat Pathways in Human HCC. Gastroenterology 2006; 130(4): 1117-1128.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-03]

2. Clayson DB, Mehta R, Iversin F. International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens. Oxidative DNA damage--the effects of certain genotoxic and operationally non-genotoxic carcinogens. Mutat Res. 1994; 317(6): 25-42.
3. Troll W, Lim JS, Frenkel K. Prevention of cancer by agents that suppress production of oxidants. In: Ho CT, Osawa T, Huang MT, Rosen RT, Editors. Food phytochemicals for cancer prevention II, teas, spices, and herbs. Am Chem Soc 2000; 117(88): 116-121.
4. Rao PS, Kalva S, Yerramilli A, Mamidi S. Free Radicals and Tissue Damage: Role of Antioxidants. Free Radicals and Antioxidants 2011; 1(4): 2-7.
5. Behpour M, Ghoreishi S, Khayatkashani M, Soltani N. The effect of two oleo-gum resin exudate from Ferula assa-foetida and Dorema ammoniacum on mild steel corrosion in acidic media. Corrosion Sci 2011; 53(8): 2489-2501.
6. Khajeh M, Yamini Y, Bahramifar N, Sefidkon F, Pirmoradei MR. Comparison of essential oils compositions of Ferula assa-foetida obtained by supercritical carbon dioxide extraction and hydrodistillation methods. Food Chem 2005; 91(1): 639-644.
7. Lee JH, Choi S, Lee Y, Lee HJ, Kim KH, Ahn KS, et al. Herbal compound farnesiferol C exerts antiangiogenic and antitumor activity and targets multiple aspects of VEGFR1 (Flt1) or VEGFR2 (Flk1) signaling cascades. Mol Cancer Ther 2010; 9(2): 389-399.
8. Dehpour A, Ebrahimzadeh N, Fazeland S, Mohammad NS. Antioxidant activity of the methanol extract of Ferula assafoetida and its essential oil composition. Grasas Y Aceites 2009; 60(4): 405-412.
9. Heinlein CA, Chang C. Androgen receptor (AR) coregulators: an overview. Endocr Rev 2002; 23(2): 175-200.
10. Wang R, Macmillan L, Fremeau Jr R, Magnuson M, Lindner J, Limbird L. Expression of α2-adrenergic receptor subtypes in the mouse brain: evaluation of spatial and temporal information imparted by 3 kb of 5′ regulatory sequence for the α2A AR-receptor gene in transgenic animals. Neuroscience 1996; 74(1): 199-218.
11. Wang K, Sun Y, Tao W, Fei X, Chang C. Androgen receptor (AR) promotes clear cell renal cell carcinoma (ccRCC) migration and invasion via altering the circHIAT1/miR-195-5p/29a-3p/29c-3p/CDC42 signals. Cancer Lett 2017; 394: 1-12.
12. Yang S, Sheng L, Xu K, Wang Y, Zhu H, Zhang P, et al. Anticancer effect of quinacrine on diffuse large B-cell lymphoma via inhibition of MSI2-NUMB signaling pathway. MOL MED REP 2018; 17(1): 522-530.
13. Das A. Anticancer effect of antimalarial artemisinin compounds. Ann Med Health Sci Res 2015; 5(2): 93-102.
14. Mahdavi M, Azadbakht M, Vahdati A, Farhadi A, Davoodi A. Anticancer Effects of Senecionine and Senecio vulgaris L. on Prostate Cancer Cell Lines. J Mazandaran Univ Med Sci 2019; 28(169): 1-13(Persian).
15. Shaw AT, Kim D-W, Nakagawa K, Seto T, Crinó L, Ahn M-J, et al. Crizotinib versus chemotherapy in advanced ALK-positive lung cancer. N Engl J Med 2013; 368(25): 2385-2394.
16. Abdullaev FI. Cancer chemopreventive and tumoricidal properties of saffron (Crocus sativus L.). Exp Biol Med (Maywood) 2002; 227(1): 20-25.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-03]

17. Dufresne A, Cassier P, Couraud L, Marec-Bérard P, Meeus P, Alberti L, et al. Desmoplastic small round cell tumor: current management and recent findings. Sarcoma. 2012; 2012: 714986.
18. Pozo-Rodríguez F, Martín de Nicolás JL, Sánchez-Nistal MA, Maldonado A, García de Barajas S, Calero-García R, et al. Accuracy of helical computed tomography and [18F] fluorodeoxyglucose positron emission tomography for identifying lymph node mediastinal metastases in potentially resectable non–small-cell lung cancer. J Clin Oncol 2005; 23(33):8348-8356.
19. Forastiere AA, Goepfert H, Maor M, Pajak TF, Weber R, Morrison W, et al. Concurrent chemotherapy and radiotherapy for organ preservation in advanced laryngeal cancer. N Engl J Med 2003; 349(22): 2091-2098.
20. Iranshahi M, Kalategi F, Rezaee R, Shahverdi AR, Ito C, Furukawa H, et al. Cancer chemopreventive activity of terpenoid coumarins from Ferula species. Planta Med 2008; 74(02): 147-150.
21. Abul-Nasr H, Samra M, Ayoub B, Ghoname MH. Spinal aneurysmal Bone Cyst, surgical Treatment and Imaging (A Study of 8 Cases). Am J Sci 2012; 8(1): 1-10.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-03]