BRIEF REPORT

Cytotoxicity and Apoptotic Effect of Chitosan Nanoparticles Containing Hydroalcoholic Extract of Physalis alkekengi on HT29 Cell Line

Reza Mahmoudi[1],
Maryam Tajali Ardakani[2],
Hassan Bardania[3]

[1] Professor, Depatmetn of Anatomical Sciences, Cellular and Molecular Research Center, Yasuj University of Medical Sciences, Yasuj, Iran
[2] MSC in Developmental Biology, Cellular and Molecular Research Center, Yasuj University of Medical Sciences, Yasuj, Iran
[3] Assistant Professor, Cellular and Molecular Research Center, Yasuj University of Medical Sciences, Yasuj, Iran

(Received June 11, 2019 ; Accepted October 26, 2019)

Abstract

Background and purpose: In this study, we aimed to evaluate the anticancer activity of *Physalis alkekengi* extract encapsulated into chitosan nanoparticles on HT29 cell line.

Materials and methods: The fruits of the *P.alkekengi* were collected from Kohgiluyeh Boyerahmad province in south-west of Iran and dried in a dark environment. Then, the hydroalcoholic extract of the plant was extracted by percolation and encapsulated into chitosan nanoparticles. The toxicity effect of three samples; chitosan alone, chitosan containing the extract and the extract of *P.alkekengi* was investigated using MTT assay. Finally, Annxin V/propidium iodide (PI) kit was used to study the apoptotic effect of samples.

Results: According to the MTT assay, during 72 hours, the cytotoxicity effect of chitosan nanoparticles of 160 nm containing the extract increased significantly ($P< 0.05$). Moreover, the apoptosis assay indicated that chitosan nanoparticles containing the extract had more apoptotic effects than the extract alone (71% vs. 43%).

Conclusion: *P.alkekengi* extract encapsulated into chitosan nanoparticles had more anticancer activity compared with that of the extract alone.

Keywords: chitosan nanoparticles, apoptosis assay, anticancer activity, hydro-alcoholic extract, *Physalis alkekengi*

J Mazandaran Univ Med Sci 2020; 29 (180): 102-107 (Persian).

*** Corresponding Author: Hassan Bardania -** Cellular and Molecular Research Center, Yasuj University of Medical Sciences, Yasuj, Iran (E-mail: hasan.bardania@yums.ac.ir)

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

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و نهم شماره 180 دی سال 1398 (107-102)

بررسی اثر سمیت و آپوپتوزی نانوذرات کیتوزان حاوی عصاره هیدروالکلی گیاه عروسک پشت پرده (*Physalis alkekengi*) روی سرطان روده بزرگ (HT29)

رضا محمودی[1]
مریم تجلی اردکانی[2]
حسن بردانیا[3]

چکیده

سابقه و هدف: این مطالعه با هدف بارگذاری عصاره هیدروالکلی میوه گیاه عروسک پشت پرده (*Physalis alkekengi*) درون نانوذرات کیتوزان و بررسی خواص ضد سرطانی آن روی سلول‌های سرطان روده بزرگ، انجام پذیرفت.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، میوه گیاه عروسک پشت پرده (*Physalis alkekengi*) از استان کهگیلویه و بویراحمد جمع‌آوری، و در تاریکی خشک و آسیاب شد. عصاره هیدروالکلی این گیاه با استفاده از روش پرکولاسیون استخراج و درون نانوذرات کیتوزان بارگذاری گردید. اثر سمیت سه نمونه کیتوزان، کیتوزان حاوی عصاره و عصاره میوه گیاه عروسک پشت پرده با استفاده از آزمون MTT بررسی شد و برای مطالعه آپوپتوز از رنگ‌آمیزی آنکسین V / پروپیدیوم آیوداید Propidium iodide (PI) استفاده گردید.

یافته‌ها: نتایج MTT نشان داد که نانوذرات کیتوزان حاوی عصاره با اندازه حدود 160 نانومتر در طی زمان 72 ساعت سمیت معنی‌داری نسبت به عصاره تنها داشتند ($P< 0/05$) و عصاره بارگذاری شده در نانوذرات اثرات آپوپتوزی بیش‌تری نسبت به عصاره تنها داشته است (71 در مقابل 43 درصد).

استنتاج: عصاره بارگذاری شده در نانوذره کیتوزان خاصیت ضد سرطانی بیش‌تری نسبت به عصاره تنها دارد.

واژه های کلیدی: نانوذرات کیتوزان، سنجش آپوپتوز، عروسک پشت پرده، عصاره هیدروالکلی، خاصیت ضد سرطانی

مقدمه

عروسک پشت پرده با نام علمی *Physalis alkekengi* از خانواده سیب‌زمینی (Solanacae) است که در ایران معروف به عشق در قفس و کاکنج می‌باشد(2،1). میوه این گیاه (کاکنج) دارای اسید اسکوربیک، اسید سیتریک، زیگانتین و بتا کریپتوزیگانتین و فیزالین و قند است و میزان ویتامین C در میوه این گیاه بیش‌تر از لیمو و معادل دو برابر آن است(5-3). در سال 1986 برای اولین بار خواص ضد توموری گیاه عروسک پشت توسط Dornberger گزارش گردید(6). خواص ضدسرطانی این گیاه به علت حضور آنتی‌اکسیدان‌هایی همچون اسید اسکوربیک، اسید سیتریک و انواع متعددی استروئید و آلکالوئید و فلاونوئیدها می‌باشد(8،7).

مولف مسئول: حسن بردانیا - یاسوج: دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی E-mail: hasan.bardania@yums.ac.ir
1. استاد، گروه آناتومی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، یاسوج، ایران
2. فوق لیسانس سلولی تکوینی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، یاسوج، ایران
3. استادیار، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، یاسوج، ایران
تاریخ دریافت : 1398/3/21 تاریخ ارجاع جهت اصلاحات :1398/3/27 تاریخ تصویب : 1398/8/14

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

با وجود داشتن همه مزیت‌های بیان شده، به‌طور کلی بیش‌تر داروهای زیستی و شیمیایی در فاز کلینیکی به دلیل نداشتن توانایی دستیابی به ناحیه عمل هدف، رد می‌شوند، بنابراین در طی چندین دهه گذشته بسیاری از محققان توجه خود را به توسعه داروهای ایده‌ال که به طور اختصاصی ناحیه عمل را هدف قرار دهند، معطوف کرده‌اند(9). کیتوزان یک آمینو پلی‌ساکارید خطی ترکیبی از (4→1) واحدهای D- گلوکزآمین و N- استیل-D-گلوکزآمین است(10). این پلی‌ساکارید کاتیونی به دلیل دسترس پذیری فراوان، خواص دارویی مناسب و دیگر خواص سودمند بیولوژیکی مثل زیست سازگاری در موارد بیوپزشکی و دارویی مورد توجه گسترده قرار گرفته است(10). اتصال اجزاء هدفدار به سطح نانوذرات بارگیری شده با دارو، می‌تواند بازده درمانی دارو را بهبود بخشند. در مورد ریز پوشانی کردن عصاره غنی میوه عروسک پشت پرده و افزایش پایداری ترکیبات فعال عصاره این گیاه مطالعه‌ای گزارش نشده است. اهمیت گیاه عروسک پشت پرده به علت حضور آنتی‌اکسیدان‌هایی همچون اسید اسکوربیک، اسیدسیتریک و انواع متعددی استروئید و آلکالوئید و فلاونوئیدها می‌باشد و علاوه بر این، حضور فیزالین‌ها در این گیاه نیز منجر به ظاهر شدن اثرات ضد سرطانی قابل توجهی گردیده است. در مطالعه قبلی، عصاره هیدروالکلی میوه گیاه عروسک پشت پرده در نانوذرات کیتوزان بارگذاری و خواص آنتی‌اکسیدانی آن بررسی شد(11). این مطالعه با هدف بارگذاری عصاره هیدروالکلی میوه گیاه عروسک پشت پرده درون نانوذرات کیتوزان و بررسی خواص ضد سرطانی آن انجام پذیرفت.

مواد و روش ها

استخراج عصاره هیدروالکلی گیاه عروسک پشت پرده

در این مطالعه تجربی، میوه گیاه عروسک پشت پرده از استان کهگیلویه بویراحمد جمع‌آوری و در تاریکی خشک و آسیاب شد و عصاره الکلی با استفاده از روش پرکولاسیون از پودر موردنظر استخراج گردید(12).

سنتز نانوذرات کیتوزان و بارگذاری عصاره گیاه

نانوذرات کیتوزان حاوی عصاره گیاهی با استفاده از روش ژله ای شدن یونی سنتز شدند(13). برای تعیین مقدار عصاره بارگذاری شده در نانوذرات کیتوزان، مقدار فلاونوئید اولیه از مقدار فلاونوئید محلول رویی نانوذرات بعد از سنتز نانوذرات حاوی عصاره کم شد. مقدار فلاونوئیدها با استفاده از روش جذب UV از کمپلکس فلاونوئید-$AlCl_3$ تعیین گردید(14). در این روش ترکیب روتین به عنوان استاندارد استفاده شد و مقدار فلاونوئید به صورت معادل روتین (mg rutin/gr sample) از طریق منحنی استاندار روتین گزارش گردید.

تعیین ویژگی نانوذرات کیتوزان حاوی عصاره

در نهایت نانوذرات سنتز شده با استفاده از روش‌های میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) (KYKY-EM3200, KYKY Technology Development Ltd., Beijing, China) تعیین ویژگی شدند.

بررسی اثر سمیت و آپوپتوزی نانوذرات

رده سلولی سرطان HT29 سرطان روده بزرگ از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران خریداری شد. با استفاده از آزمون دی MTT، اثر سمیت نانوذرات کیتوزان حاوی عصاره روی سلول‌ها بررسی گردید(15). اثر سمیت سه نمونه کیتوزان، کیتوزان حاوی عصاره و عصاره در این آزمایش مورد بررسی قرار گرفت. برای مطالعه آپوپتوز از رنگ‌آمیزی آنکسین V[1]/پروپیدیوم آیوداید[2] (PI) استفاده شد. این رنگ‌آمیزی با استفاده از فلوسایتومتری و مطابق با روش راهنمای کیت مورد استفاده انجام گردید (Cat. No. 556420; BD Biosciences Pharmingen, San Jose, CA).

1. Annexin V
2. Propidium iodide

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

یافته ها و بحث

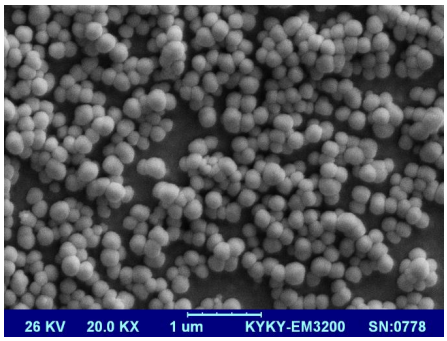
بارگذاری عصاره در نانوذرات کیتوزان

در صد بارگذاری عصاره در نانوذره کیتوزان طبق فرمول زیر حدود 95 درصد می‌باشد.

$$\text{بارگذاری درصد (\%)} = \frac{\text{(مقدار فلاونوئید موجود در محلول رویی نانوذرات - مقدار فلاونوئید موجود در عصاره اولیه)}}{\text{مقدار فلاونوئید موجود در عصاره اولیه}} \times 100$$

تعیین ویژگی نانوذرات

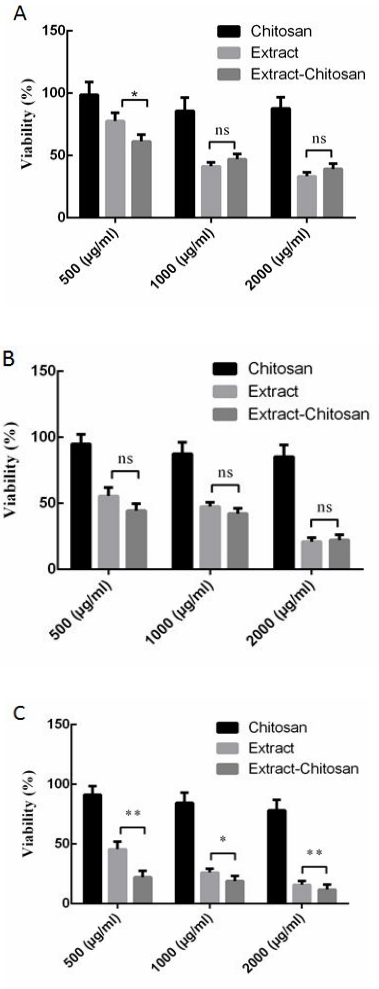
نتایج آنالیز SEM نشان داد که نانوذرات کیتوزان حاوی عصاره دارای اندازه حدود 160 نانومتر هستند (تصویر شماره 1).



تصویر شماره 1: تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) از نانوذرات کیتوزان حاوی عصاره گیاهی

بررسی سمیت نانوذرات

سمیت نانوذرات حاوی عصاره، عصاره و نانوذره بدون عصاره در طی زمان‌های 24، 48 و 72 ساعت با استفاده از روش MTT بررسی شد. نتایج نشان داد که نانوذرات حاوی عصاره در طی زمان‌های 24 و 48 ساعت اثر سمیت معنی‌داری نسبت به عصاره تنها ندارد ولی در طی زمان 72 ساعت اثر سمیت نانوذرات کیتوزان حاوی عصاره به صورت معنی‌داری افزایش می‌یابد (تصویر شماره 2). مقدار IC50 عصاره و عصاره بارگذاری شده در نانوذرات در طی 24 ساعت شبیه هم و حدود 1000 میکروگرم در میلی‌لیتر است. مقدار IC50 عصاره و عصاره بارگذاری شده در نانوذرات در طی 48 ساعت نیز شبیه هم و حدود 800 میکروگرم در میلی لیتر است. به علاوه مقدار IC50 عصاره تنها و عصاره بارگذاری شده در نانوذرات در طی 72 ساعت به ترتیب حدود 500 و 200 میکروگرم در میلی‌لیتر بوده است. عصاره گیاه عروسک پشت پرده حاوی ترکیبات فعال زیستی زیادی مانند فیزالین A، B و D با فعالیت ضد سرطانی بالا است(16). ماگالهیس و همکاران ترکیبات فیزالین B و D را از عصاره این گیاه جدا کرده و با بررسی فعالیت ضد سرطانی آن‌ها نشان دادند که این ترکیبات به ترتیب دارای IC50 در محدوده 0/58 تا 15/18 میکروگرم در میلی‌لیتر و 0/28 تا 2/43 میکروگرم در میلی‌لیتر هستند(17).

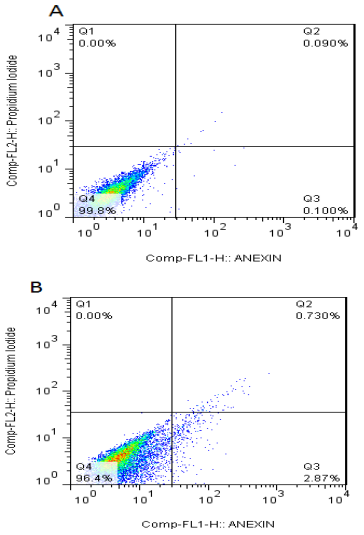


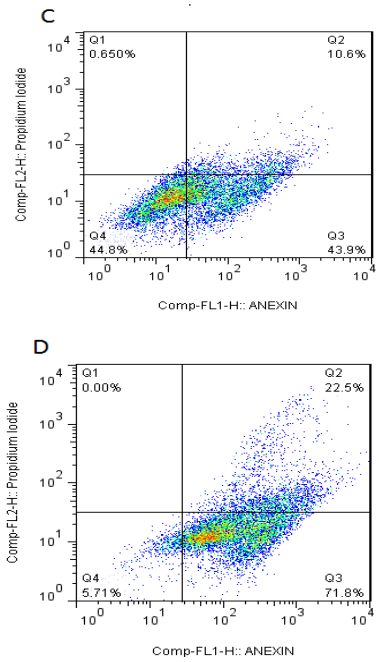
تصویر شماره2: بررسی سمیت نانوذرات با استفاده از تست MTT در طی زمان های 24 (A)، 48 (B) و 72 (C) ساعت

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

بررسی اثر آپوپتوزی نانوذرات

نتایج فلوسایتومتری نشان داد که عصاره بارگذاری شده در نانوذرات اثرات آپوپتوزی بیشتری نسبت به عصاره تنها دارد (71 در مقابل 43 درصد) (تصویر شماره 3). به علاوه نتایج نشان می‌دهد که نانوذرات کیتوزان بدون عصاره، اثر آپوپتوزی روی سلول ها ندارند. براساس گزارش مطالعات قبلی، گیاه عروسک پشت پرده دارای ترکیباتی است که آپوپتوز سلولی را تحریک می‌کند. هی و همکاران نشان دادند که ترکیب فیزالین A از طریق مسیر P53-Noxa و به واسطه تولید اکسیژن فعال آپوپتوز را تحریک می کنند(18).





تصویر شماره 3: نتایج بررسی اثر آپوپتوزی گزوه کنترل (A) نانوذرات تنها (B)، عصاره تنها (C) و عصاره بارگذاری شده در نانوذرات (D)

نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که عصاره بارگذاری شده در نانوذرات اثر سمیت و آپوپتوزی معنی‌داری نسبت به عصاره تنها روی سلول‌های سرطانی HT29 دارند. بنابراین می توان با بارگذاری عصاره های گیاهی درون نانوذرات پایداری و کارایی آن‌ها را بهبود بخشید.

References

1. Montaserti A, Pourheydar M, Khazaei M, Ghorbani R. Anti-fertility effects of Physalis alkekengi alcoholic extract in female rat. Iranian Journal of Reproductive Medicine 2007; 5(1): 13-16.
2. Amini A. Dictionary of therapeutic plants. Tehran University, Tehran, 2004; 157-159.
3. Weller P, Breithaupt D E. Identification and quantification of zeaxanthin esters in plants using liquid chromatography-mass spectrometry. J Agric Food Chem 2003; 51(24): 7044-7049.
4. Kawai M, Yamamoto T, Makino B, Yamamura H, Araki S, Butsugan Y, et al. The structure of physalin t from Physalis alkekengi var. J Asian Nat Prod Res 2001; 3(3): 199-205.
5. Zarei A, Ashtiyani SC, Rasekh F, Mohammadi A, Jabary A. The effects of Physalis Alkekengi extract on lipids concentrations in rats. Arak Medical University Journal 2011; 14(55): 36-42.
6. Dornberger K. The potential antineoplastic acting constituents of Physalis alkekengi L.

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

var franchetii Mast. Die Pharmazie 1986; 41(4): 265-268.

7. Beilby J, Ambrosini GL, Rossi E, de Klerk NH, Musk AW. Serum levels of folate, lycopene, β-carotene, retinol and vitamin E and prostate cancer risk. Eur J Clin Nutr 2010; 64(10): 1235-1238.
8. Ramadan, M.F. *Bioactive phytochemicals, nutritional value, and functional properties of cape gooseberry (Physalis peruviana): An overview.* Food Research International 2011; 44(7): 1830-1836.
9. Park JH, Saravanakumar G, Kim K, Kwon IC. Targeted delivery of low molecular drugs using chitosan and its derivatives. Adv Drug Deliv Rev 2010; 62(1): 28-41.
10. Kumar MN, Muzzarelli RA, Muzzarelli C, Sashiwa H, Domb AJ. Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives. Chem Rev 2004; 104(12): 6017-6084.
11. Mahmoudi R, Ardakani M, Hajipour Verdom B, Bagheri A, Mohammad-Beigi H, Salehpour Z, et al. Chitosan nanoparticles containing Physalis alkekengi-L extract: preparation, optimization and their antioxidant activity. Bulletin of Materials Science 2019; 42(3): 131.
12. Nbaavi S F, Nabavi SM, Ebrahimzadeh MA, Eslami B, Jafari N. *In vitro antioxidant and antihemolytic activities of hydroalcoholic extracts of Allium scabriscapum Boiss. & Ky. aerial parts and bulbs.* International Journal of Food Properties 2013; 16(4): 713-722.
13. Lee JS, Kim GH, Lee HG. Characteristics and antioxidant activity of Elsholtzia splendens extract-loaded nanoparticles. J Agric Food Chem 2010; 58(6): 3316-3321.
14. Karimian P, Kavoosi G, Amirghofran Z. Anti-inflammatory effect of Mentha longifolia in lipopolysaccharide-stimulated macrophages: reduction of nitric oxide production through inhibition of inducible nitric oxide synthase. J Immunotoxicol 2013; 10(4): 393-400.
15. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods 1983; 65(1-2): 55-63.
16. Makino B, Ohya J, Yamamura H, Araki S, Butsugan Y, Kawai M. Cytotoxic activity of physalins possessing modified skeletal structures against HeLa cells. Pharmazie 2003; 58(1): 70-71.
17. Magalhães HI, Veras ML, Torres MR, Alves AP, Pessoa OD, Silveira ER, et al. In-vitro and in-vivo antitumour activity of physalins B and D from Physalis angulata. J Pharm Pharmacol 2006; 58(2): 235-241.
18. He H, Zang LH, Feng YS, Chen LX, Kang N, Tashiro S, et al. Physalin A induces apoptosis via p53-Noxa-mediated ROS generation, and autophagy plays a protective role against apoptosis through p38-NF-κB survival pathway in A375-S2 cells. J Ethnopharmacol 2013; 148(2): 544-555.

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