ORIGINAL ARTICLE

Effect of Viola odorata Extract on Cell Survival of Triple Negative Breast Cancer MDA-MB-468 Cells

Hiva Alipanah[1],
Mohammad Reza Bigdeli[2,3],
Mohamma Ali Esmaeili[4],
Mohammad Esmaeil Akbari[5]

[1] PhD Student in Animal Physiology, Faculty of Science, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran
[2]Associate Professor, Cancer Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[3]Associate Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran
[4] Assistant Professor, Department of Biology, Medicinal Plants and Drugs Research Institute, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran
[5] Professor, Cancer Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

(Received July 20, 2015 Accepted October 6, 2015)

Abstract

Background and purpose: Recently studies have shown that main compound (Cyclotides) of *Viola odorata* has an inhibitory effect against proliferation of cancer cells. Also, melatonin reduces size and growth of tumor cells. The main purpose of this study was to compare the inhibitory effect of *Viola odorata* and melatonin on MDA-MB-468 cells proliferation.

Materials and methods: In this exprimental study, triple negative human breast cancer cells (MDA-MB-468) were cultured in 96-well plates and incubated with different concentrations of *Viola odorata* hydroalcoholic extract and melatonin for 24h. Cell viability was measured using MTT assay. In the *in vivo* study Balb/c mice (6 group, n=6) received subcutaneous injection of 100 µl of cell suspension (4T1 cells) in the left hind flank. The animals were treated with different concentrations of *Viola odorata* extract (50, 150, 250, and mg/kg) and melatonin (40 mg/kg) for three weeks. Tumor volume changes were measured weekly and weight changes were measured at day 21.

Results: The in vitro study showed that different concentrations (30, 40, 60, 80,100,150, and 200 µg/ml) of *Viola odorata* significantly decreased cell survival in cancer cells ($P<0.05$). Also, melatonin at concentration of 1mM significantly decreased cell viability ($P<0.05$). The in vivo study found that melatonin (40 mg/kg) and *Viola odorata* at 250 mg/ml concentration inhibited increasing of tumor volume after 21 days compared with control group.

Conclusion: Treatment with melatonin and *Viola odorata* extract was found effective in reducing cell survival and tumor volume.

Keywords: *Viola*, melatonin, breast neoplasms, cell survival

J Mazandaran Univ Med Sci 2015; 25(132): 186-199 (Persian).

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-29]

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و پنجم شماره ۱۳۲ دی سال ۱۳۹۴ (۱۹۹-۱۸۶)

اثر عصاره *Viola odorata* [گل بنفشه] بر میزان بقای رده سلولی MDA-MB-468 سه گانه منفی سرطان سینه

هیوا علی پناه[1]
محمد رضا بیگدلی[2,3]
محمد علی اسماعیلی[4]
محمد اسماعیل اکبری[5]

چکیده

سابقه و هدف: مطالعات اخیر نشان داده‌اند که ترکیب اصلی گیاه بنفشه (سیکلوتایدها) اثر مهاری بر تکثیر سلول‌های سرطانی دارد. ملاتونین نیز موجب کاهش اندازه و رشد سلول‌های توموری می‌شود. هدف اصلی این مطالعه مقایسه اثر مهاری عصاره هیدروالکلی گل بنفشه و ملاتونین بر رشد سلول‌های MDA-MB-468 بوده است.

مواد و روش‌ها: در مطالعه تجربی حاضر سلول‌های سه گانه منفی سرطان سینه انسانی (MDA-MB-468) در پلیت‌های ۹۶ تایی کشت داده شدند و به مدت ۲۴ ساعت با غلظت‌های مختلف از عصاره هیدروالکلی گل بنفشه و ملاتونین تیمار شدند. میزان تکثیر سلولی توسط تکنیک MTT assay مورد ارزیابی قرار گرفت. در مطالعه in vivo موش‌های Balb/c (۶گروه ۶تایی) ۱۰۰ µl از سوسپانسیون سلولی (4T1 cell) را با تزریق زیرپوستی در سمت چپ دریافت کردند. حیوانات با دوزهای مختلف عصاره (۲۵۰،۱۵۰،۵۰ mg/kg) و ملاتونین (۴۰mg/kg) به مدت سه هفته تیمار شدند. تغییرات حجم به صورت هفتگی و تغییرات وزن در روز ۲۱ مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: در مطالعه in vitro غلظت‌های مختلف عصاره (۳۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) باعث کاهش معنی‌داری در بقای سلولی شدند ($p<0/05$). غلظت ۱ میلی‌مولار ملاتونین نیز موجب کاهش معنی‌داری در بقای سلول‌های سرطانی شد ($p<0/05$). در مطالعه in vivo دوز ۲۵۰mg/kg عصاره و ۴۰mg/kg ملاتونین، افزایش حجم تومور در مقایسه با گروه کنترل را در روز ۲۱ تیمار مهار کرد.

استنتاج: تیمار ملاتونین و عصاره موجب کاهش چشمگیری در بقای سلولی و حجم تومور می‌شود.

واژه های کلیدی: بنفشه، ملاتونین، سرطان سینه، بقای سلولی

مقدمه

پس از بیماری‌های قلبی- عروقی، سوانح و حوادث، سرطان سومین عامل مرگ و میر در ایران است. در این بین سرطان سینه اولین عامل مرگ و میر در بین زن‌های ایرانی است(۱). روش‌های درمانی متعددی برای درمان سرطان سینه وجود دارد و هزینه‌های زیادی نیز در این مسیر صرف شده است. برای همه کاملاً آشکار است که

مولف مسئول: محمدرضا بیگدلی- تهران: دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، آزمایشگاه مغز و اعصاب- قلب و عروق E-mail: mohammadrezabigdeli@yahoo.com
۱. دانشجو دکترا فیزیولوژی جانوری، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران
۲. دانشیار، مرکز تحقیقات سرطان، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
۳. دانشیار، گروه علوم جانوری، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران
۴. استادیار، گروه بیولوژی، پژوهشکده گیاهان دارویی دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران
۵. استاد، مرکز تحقیقات سرطان، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۴/۲۹ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۴/۵/۶ تاریخ تصویب: ۱۳۹۴/۷/۱۴

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-29]

برای مقابله با سرطان بهترین و ارزان‌ترین راه، پیشگیری از آن است. در این میان تغییر الگوی زندگی و نحوه تغذیه جایگاه ویژه‌ای دارد. گل بنفشه معطر (*Viola odorata*) در پزشکی سنتی ایرانی دارای یک تاریخچه طولانی است و برای درمان سرطان، میگرن و به عنوان آرام بخش مورد استفاده قرار می‌گیرد(۳،۲). برخی از مطالعات گذشته اثرات ضدالتهابی، تب بری و ضد میکروبی گل بنفشه را نشان داده‌اند(۳). در سیستم طب سنتی، گل بنفشه برای درمان اضطراب، کاهش فشار خون، برونشیت، کاهش اختلال عملکرد کلیه‌ها و کبد و هم‌چنین کاهش درد بیماران سرطانی مورد استفاده قرار می‌گیرد(۴). عصاره گیاه *Viola odorata* جهت پیشگیری و درمان کمکی سرطان به خصوص در سرطان‌های دستگاه گوارش و متاستاز بعد از جراحی تومورها استفاده می‌شود(۵). گل‌ها و برگ‌های بنفشه معطر حاوی سالیسیلیک اسید متیل است و بتانیتروپروپیونیک اسید می‌باشد. از دیگر مواد موثر فلاونوئیدها، ساپونین‌ها، موسیلاژ، ویتامین C، آلکالوئید و پولین می‌باشد. مهم‌ترین ماده موثر گیاه بنفشه معطر گروه مواد پپتیدی گیاهی از جمله سیکلوویولاسین (Cycloviolacin) و سیکلوتایدها (Cyclotides) می‌باشد(۶). سیکلوویولاسین O2 (Cyc O2) یک سیکلوتاید از گیاه *Viola odorata* با نفوذپذیر کردن غشاء موجب مرگ سلول‌های سرطانی MCF-7 در محیط کشت می‌شود(۷).

از طرفی دیگر فلاونوئیدها در برابر بسیاری از سرطان‌ها اثرات حفاظتی از خود نشان می‌دهند. فلاونوئیدها با مهار Bcl-2، Bclx(L)، AP-1، رسپتورهای فاکتورهای رشد، MMP (Matrix Metalloproteinase) و VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) موجب کاهش و مهار تهاجم، متاستاز، رگ‌زایی و تکثیر سلولی در سرطان‌های مختلف می‌شوند(۸). از طرفی نشان داده شده که عصاره آبی *Viola odorata* توانایی مهار رادیکال‌های آزاد را دارد و می‌تواند به عنوان یک آنتی‌اکسیدان عمل کند(۹). ملاتونین اصلی‌ترین محصول غده پینئال است. ملاتونین دارای مکانیسم‌های آنتی اکسیدانی وابسته و غیر وابسته به رسپتور است و از طریق رسپتورهای مختلفی هم‌چون MT1 و MT2 وساطت می‌شود. علاوه بر اثرات اندوکرینی و ایمنی، ملاتونین از طریق رسپتور MT1 فعالیت‌های تنظیمی در تکثیر سلولی را از خود بروز می‌دهد. مطالعات گذشته اثرات ضد تکثیری ملاتونین بر رده‌های سلولی سرطان سینه در انسان و مدل‌های حیوانی را به خوبی نشان داده است(۱۰). ملاتونین می‌تواند با مهار محور HPG (Hypothalamic–Pituitary–Gonadal Axis) و به دنبال آن کاهش هورمون‌های جنسی و هم‌چنین با مهار عوامل اکسیدان، تحریک سیستم ایمنی بدن و مهار فعالیت آنزیم تلومراز موجب مهار رشد سلول‌های سرطان پستان شود. به جرأت می‌توان گفت که ملاتونین از معدود هورمون‌هایی است که علاوه برگیرنده غشایی (MT1,MT2) دارای گیرنده سیتوپلاسمی (MT3) و گیرنده هسته‌ای (Nucleare Receptor) مانند RZR/RORa نیز می‌باشد. این شاید گواه خوبی برای اهمیت ملاتونین و پیچیدگی عملکرد آن باشد. بر همین اساس پیامبرهای ثانویه ملاتونین هم متنوع بوده و مسیرهای بیولوژی مختلفی را تحت تأثیر قرار می‌دهد که از جمله این پیامبرها می‌توان کلسیم، cGMP، دی اسیل گلیسرول و PKC را نام برد(۱۱). ملاتونین در سلول‌های سرطانی MCF-7، تهاجم را کاهش می‌دهد و می‌تواند موجب افزایش بیان پروتئین‌های اتصالی مانند E-cadherin و β1 integrin شود. علاوه بر این در چندین مطالعه در محیط in vivo نشان داده شده که ملاتونین وقوع متاستاز را مهار می‌کند(۱۲). در مجموع این یافته‌ها نشان می‌دهد که ملاتونین احتمالاً از طریق کاهش اتصال سلول‌ها با غشای پایه موجب مهار متاستاز و تهاجم در سرطان پستان می‌شود. مشابه با رده MCF-7 ملاتونین رشد سایر رده‌های سرطان سینه ER^+ مانند T47D، ZR، 1-75 را نیز مهار می‌کند اما در رده‌های سلولی ER^- فقط رشد رده سلولی MDA-MB-468 را مهار می‌کند(۱۰). علاوه بر این نشان داده شده است ملاتونین فرآیند رگ‌زایی

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-29]

(Angiogenesis) را در تومورها با کاهش بیان VEGF و HIF-alpha (Hypoxia Inducible Factor 1 Alpha) مهار می‌کند(۱۳). از طرفی ملاتونین می‌تواند فرآیند مرگ برنامه‌ریزی شده سلول (Apoptosis)را با افزایش بیان پروتئین‌های P53 و P21 القاء کند(۱۱). به طور خلاصه مکانیسم‌های محتمل برای اثر ضدسرطانی ملاتونین را می‌توان به این صورت خلاصه کرد: ۱- اثرات آنتی‌اکسیدانی ۲-تنظیم بیان وعملکرد رسپتورهای استروژن ۳- تنظیم چرخه سلولی و القای آپوپتوز ۴- مهار فعالیت تلومرازی ۵- مهار متاستاز ۶- مهار رگ‌زایی ۷- تحریک تمایز سلولی و ۸-تقویت سیستم ایمنی بدن(۱۴).

سلول‌های سه گانه منفی سرطان سینه (Triple Negative of Breast Cancer) گونه‌های مهاجم از سرطان سینه می‌باشند که الگوهای مولکولی و فنوتیپی مختلفی را از خود نشان می‌دهند و به داروهای ضد استروژنی و پروژسترونی مقاومت نشان می‌دهند(۱۵). به دلیل مقاومت این رده‌های سلولی به داروهای ضد استروژنی و پروژسترونی، حضور رسپتور ملاتونین دراین رده‌های سرطانی امید به استفاده از ملاتونین را به عنوان درمان کمکی تقویت می‌کند. 4T1 یک رده سلولی از سرطان سینه با توان تهاجمی و متاستازی بالا است. برخلاف بسیاری از رده‌های سلولی سرطان سینه، 4T1 به طور خود به خودی می‌تواند از تومور اولیه در پستان به بافت‌های مختلفی هم‌چون گره‌های لنفاوی، خون، کبد، ریه، مغز و استخوان متاستاز بدهد(۱۶). تومورهای 4T1 چندین ویژگی مهم دارند که آن‌ها را کاندیدای مناسبی برای بررسی سرطان سینه انسانی در مدل‌های حیوانی می‌کند. این سلول‌ها به راحتی به غده پستانی پیوند داده می‌شوند و به سرعت رشد می‌کنند. به علاوه در این رده سلولی همانند سرطان سینه انسانی متاستاز به طور خود به خودی از تومور اولیه آغاز می‌شود. هم‌چنین گسترش تدریجی متاستاز رده سلولی 4T1 به غدد لنفاوی و سایر بافت‌ها بسیار شبیه به سرطان غدد پستانی انسان است(۱۶). شبیه‌سازی متاستاز سلولی در مدل‌های زنوگرافت سرطان سینه که رده‌های انسانی را به موش‌هایی با سیستم ایمنی سرکوب شده پیوند می‌زنند، بسیار مشکل است. سلول‌های توموری انسان به طور ضعیفی در موش متاستاز می‌دهند و در صورت متاستاز نیز اغلب خصوصیات غیر منتظره‌ای را شاهد خواهیم بود(۱۷). بنابراین استفاده از مدل‌های سرطانی 4T1 الگوی مناسبی را برای بررسی سرطان سینه انسانی در اختیار ما قرار می‌دهد. MDA-MB-468 یک رده سلول سرطان سینه انسانی است. این رده سلولی از لحاظ ایمنی $HER2/neu^-$، PR^- و ER^- است. بیان بالای رسپتور EGFR، سیتوکراتین ۵/۶، سطح بالایی از Ki67 (مارکر پروتئینی تکثیر سلولی)، عدم حساسیت به سیستم اندوکرینی و پاسخ کم به شیمی درمانی از ویژگی‌های بارز این رده سلولی است(۱۸). به عنوان یک مدل در مطالعات in vitro رده سلولی MDA-MB-468 علاوه بر موارد ذکر شده، نقص در پروتئین TP53 (یک تومور سوپرسور)، کاهش در PTEN (یک نوع فسفاتاز) و افزایش در فعالیت مسیر MEK/ERK از ویژگی‌های دیگر این رده سلولی است. بر خلاف رده‌های سلولی سرطان سینه، ژن BRCA1 در رده MDA-MB-468 که در تعمیر DNA نقش دارد، جهش یافته نیست(۱۹). مطالعات اخیر نشان داده است ملاتونین با غلظت‌های مختلفی در گیاهان متفاوتی هم‌چون ذرت (۱/۸۷۸ng/g) و خردل (۱۲۳ ng/g) وجود دارد(۲۰). فیتوملاتونین (ملاتونین گیاهی) می‌تواند به عنوان یک آنتی‌اکسیدان، بافت‌های گیاهی را از استرس‌های اکسیداتیو داخلی و محیطی حفظ کند. با وجود این که مکمل‌های گیاهی با غلظت ملاتونین بالا به‌طور سنتی برای درمان بیماری‌های انسانی استفاده می‌شود اما عملکرد آن به روشنی مشخص نشده است. برای مثال بعضی از گیاهان دارویی که حاوی ملاتونین هستند مانند *Viola odorata* (گل بنفشه) برای کاهش دردهای میگرنی استفاده می‌شوند(۳). ملاتونین می‌تواند به شکل قرص یا محلول مورد استفاده قرار گیرد و به درون سیستم گردش مواد در بدن نیز وارد

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-29]

شود. خیلی بعید به نظر نمی‌رسد که ملاتونین موجود در غذاها و عصاره‌های گیاهی می‌تواند توسط لوله گوارشی جذب شود(۲۰). نشان داده شده است که مصرف غذاهای حاوی ملاتونین می‌تواند غلظت ملاتونین خون را در موش‌های صحرایی و جوجه‌ها افزایش دهد و به دنبال آن ظرفیت آنتی‌اکسیدانی خون نیز افزایش پیدا می‌کند(۲۰). مصرف گیاهان غنی از فیتوملاتونین می‌تواند پیک غلظتی ملاتونین در بدن را تا ۱۰۰ برابر بیش‌تر از پیک نرمال آن در طول شب بالا ببرد(۲۱). به نظر می‌رسد در درمان سرطان استفاده از گیاهان دارای ملاتونین، علاوه بر اثر بر سلول‌های سرطانی می‌تواند با افزایش غلظت ملاتونین بدن و فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی خون اثر مؤثرتری در درمان سرطان یا پیشگیری از آن ایجاد کند. با توجه به مطالب ذکر شده هدف از این مطالعه بررسی اثر عصاره گیاهی *Viola odorata* ومقایسه اثر آن با ملاتونین بر رشد سلول‌های سرطان سینه در محیط in vitro و میزان تغییرات حجم و وزن تومور در مدل‌های سرطان سینه 4T1 می باشد.

مواد و روش ها

در مطالعه تجربی حاضر گل بنفشه (*Viola odorata*) با شماره هرباریوم MPH-615 از پژوهشکده گیاهان و مواداولیه دارویی دانشگاه شهید بهشتی تهران مورد استفاده قرار گرفت. قسمت‌های هوایی گیاه برای تهیه عصاره هیدروالکلی (۵۰ درصد آب – ۵۰ درصد متانول) مورد استفاده قرار گرفت. عصاره گیری به مدت ۳ هفته انجام گرفت و عصاره تهیه شده به صورت پودر برای مراحل مختلف آزمایش نگهداری شد.

برای تهیه غلظت‌های مورد آزمایش ۱mg از عصاره تهیه شده در ۱cc ترکیب دی متیل سولفوکساید (DMSO) حل شد و با رقیق‌سازی غلظت‌های ۰، ۲، ۵، ۱۰،۲۰،۳۰،۴۰، ۶۰،۸۰،۱۰۰،۱۵۰، ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به دست آمد. ملاتونین (تهیه شده از شرکت داروسازی سپید طب) در ترکیب DMSO حل شد و با رقیق‌سازی دوزهای ۰، ۰/۰۰۱، ۰/۰۱، ۰/۱ و ۱ میلی‌مولار آن برای تیمار استفاده شد. غلظت صفر محیط کنترلی بوده است که به جای عصاره و ملاتونین، سلول‌ها فقط در معرض محیط کشت (با حجمی معادل با حلال یعنی DMSO) قرار گرفتند. دوزها طوری انتخاب شدند که درصد DMSO برای تیمار کم‌تر از ۱درصد باشد.

تعیین غلظت ملاتونین در نمونه

آماده سازی نمونه

۵۰ میلی گرم از عصاره بنفشه با استفاده از حلال (۷۰ درصد متانول و ۳۰ درصد آب) در بالن حجمی ۱۰ میلی‌لیتر با استفاده از التراسونیک حل گردید و به حجم رسانده شد.

آماده سازی استاندارد

۰/۱ میلی گرم از استاندارد روتین در یک میل لیتر متانول حل شد.

شرایط کروماتوگرافی لایه نازک با کارایی بالا

فاز ساکن	HPTLC Plate (Silica gel 60 F 254 glass 10*10 cm)
نسبت حلال های فاز متحرک	Toluene,ethyl acetate, acid formic (5:4.5:0.5)

نمونه‌گذاری به میزان ۲۰ میکرولیتر با سه بار تکرار با استفاده از سیستم نمونه‌گذاری خودکار شرکت CAMAG انجام گرفت. غلظت‌های نمونه‌گذاری استاندارد: غلظت‌های ۱ و ۰/۵، ۰/۱، ۰/۰۵ و ۰/۰۱ میکروگرم بر میکرولیتر با استفاده از سیستم نمونه‌گذاری خودکار نمونه‌گذاری شد. در پلیت حاوی نمونه و استاندارد با استفاده از فاز متحرک فوق جداسازی انجام پذیرفت. پلیت بعد از جداسازی و خشک شدن با استفاده از سیستم اسکنر جذبی و نشری شرکت CAMAG اسکن گردید و شدت جذب استاندارد در غلظت‌های مختلف و جزء ملاتونین معادل آن در نمونه به صورت کروماتوگرام با استفاده از نرم‌افزار WINCATS در طول موج ۲۹۰ نانومتر ترسیم گردید.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-29]

هم‌چنین تصاویر پلیت جداسازی شده توسط سیستم تصویربرداری شرکت CAMAG تحت طول موج ۳۶۶ نانومتر تهیه شد.

کشت سلولی و تیمار

سلول‌های سه گانه منفی MDA-MB-468 (مرکز ذخایر ژنتیک ایران، IBRC C10095) سرطان سینه در فلاسک‌های $75\ cm^2$ در محیط کشت Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) حاوی FBS ۱۰ درصد و آنتی‌بیوتیک پنی سیلین ۱درصد درون انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سلسیوس و CO_2 ۵ درصد نگهداری شدند. پس از پر شدن بستر فلاسک‌ها، سلول‌ها با ترپسین جدا و به پلیت ۹۶ خانه (1×10^4 cell) منتقل گردید. به محیط کشت سلول‌ها غلظت‌های مختلف عصاره (۰، ۵، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) و ملاتونین (۰/۰۰۰۱، ۰/۰۰۱، ۰/۰۱، ۰/۱ و ۱ میلی‌مولار) اضافه شدند و به مدت ۲۴ ساعت سلول‌ها در انکوباتور برای انجام تکنیک MTT assay نگهداری شدند.

تکنیک MTT assay

بعد از تیمار ۲۴ ساعته سلول ها با عصاره و ملاتونین به منظور تعیین درصد سلول های زنده از روش MTT یا احیاء نمک تترازولیوم استفاده شد. ۲۰۰ میکرولیتر از محلول MTT (۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) به خانه‌های پلیت اضافه و پلیت به مدت ۳ ساعت انکوبه شد. بعد از برداشت محیط رویی به هر خانه پلیت ۱۰۰ میکرولیتر DMSO اضافه شد. بعد از حل کردن کریستال‌ها با عمل پیپتینگ، پلیت به مدت ۲۰ دقیقه انکوبه شد. میزان جذب نوری محلول در طول موج ۵۷۰ نانومتر ثبت شد. درصد سلول‌های زنده بر اساس فرمول زیر محاسبه شدند.

$$\text{درصد سلول های زنده} = 1 - \frac{(\text{طول موج نمونه} - \text{طول موج کنترل})}{\text{طول موج کنترل}} \times 100$$

حیوانات و اصول اخلاقی

تعداد ۳۶ رأس موش BALB/c با میانگین وزنی ۱±۲۰ گرم از انستیتوپاستور ایران خریداری شد و با دسترسی آزاد به آب و غذا و در شرایط ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی و در دمای ۲±۲۲ سانتی‌گراد نگهداری شدند. تمام مسائل اخلاقی در زمینه نگهداری، تزریق و گاواژ نمونه‌ها توسط محقق رعایت شده است.

بررسی تغییرات حجم و وزن تومورها

سلول‌های سرطانی 4T1 (انستیتوپاستور ایران، C604) سرطان سینه در فلاسک‌های $75\ cm^2$ در محیط کشت RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute) حاوی FBS 10درصد و آنتی بیوتیک پنی‌سیلین ۱درصد درون انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سلسیوس و CO2 ۵ درصد نگهداری شدند. پس از پر شدن بستر فلاسک‌ها، سلول‌ها با ترپسین جدا شدند و بعد از شست و شو با PBS تعداد ۸۰۰/۰۰۰ از سلول‌ها (عاری از محیط کشت) به صورت زیرپوستی به پهلوی چپ موش‌ها تزریق شدند.

تغییرات حجم تومور با کولیس دیجیتال مورد بررسی قرار گرفت. بعد از رسیدن حجم تومورها به $200\ mm^3$ نمونه ها به طور تصادفی به ۶ گروه ۶تایی تقسیم شدند. گروه اول (D1) با دریافت دوز ۲۵۰mg/kg، گروه دوم (D2) با دریافت دوز ۱۵۰mg/kg، گروه سوم (D3) با دریافت دوز ۵۰mg/kg از عصاره به مدت سه هفته گاواژ شدند. گروه چهارم (Mel) دوز ۴۰ mg/kg از ملاتونین را به صورت پنج روز در هفته و به مدت سه هفته از طریق تزریق درون صفاقی یک ساعت قبل از خاموشی دریافت کرد. گروه کنترل (C) نیز با آب مقطر گاواژ شد. یک گروه نیز با دریافت حلال ملاتونین (PBS+DMSO) جهت بررسی اثر حلال مورد ارزیابی قرار گرفت. تغییرات حجم تومور به صورت هفتگی به وسیله کولیس دیجیتال و با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد.

تغییرات حجم تومور = ۱/۲ × (طول) × (عرض)^2

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-29]

درصد مهار رشد تومور نیز با فرمول زیر مورد محاسبه قرار گرفت:

$$\text{درصد مهار رشد تومور} = \frac{(\text{وزن تومور گروه تیمار} - \text{وزن تومور گروه کنترل})}{\text{وزن تومور گروه کنترل}} \times 100$$

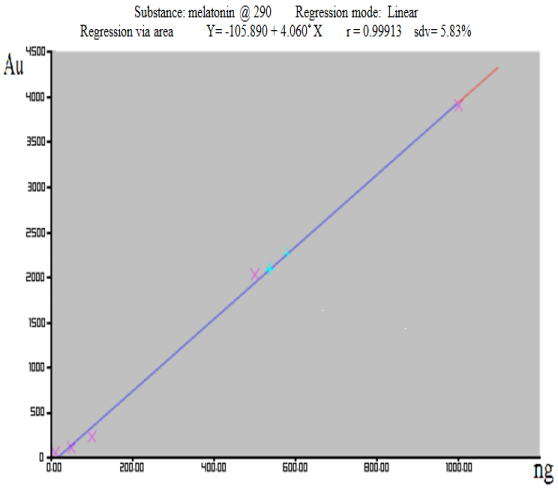
تجزیه و تحلیل آماری

داده‌ها بر اساس روش آماری one-way ANOVA و به کمک نرم‌افزار SPSS16 آنالیز شدند و در تمام موارد ($p <$ ۰/۰۵) معنی دار در نظر گرفته شد.

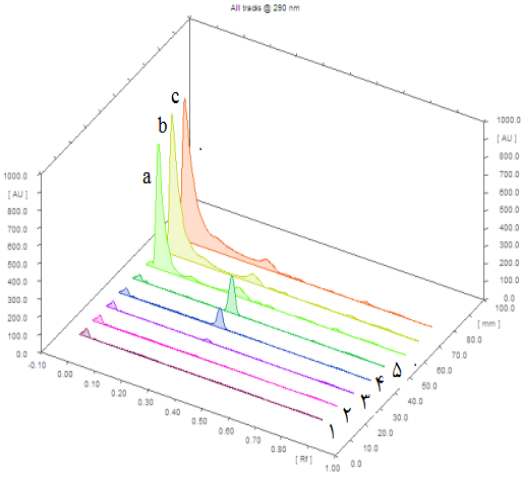
یافته ها

غلظت ملاتونین در گل Viola odorata

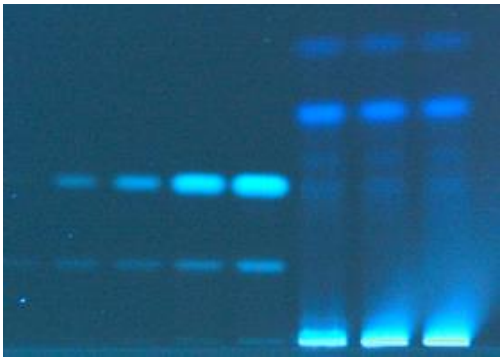
با استفاده از رسم منحنی کالیبراسیون استاندارد ملاتونین (با فرمول y=-105.890+4.060x) در غلظت‌های متفاوت و مقایسه با مقدار ملاتونین در نمونه (نمودار شماره۱) و به منظور تأیید بیش‌تر، بررسی منحنی کروماتوگرافی سه بعدی (نمودار شماره ۲) و تصویر پلیت‌های جدا شده در طول موج ۳۶۶ نانومتر (تصویر شماره ۱)، مقدار ملاتونین در نمونه‌ها ۰/۵۵ درصد محاسبه شد.



نمودار شماره ۱: منحنی کالیبراسیون شدت جذب به غلظت در طول موج ۲۹۰ نانومتر(نشان×معادل نسبت شدت جذب به غلظت استاندارد در غلظت های مختلف و نشان + معادل غلظت ملاتونین در نمونه دربازه غلظتی استاندارد می باشد.)



نمودار شماره ۲: کروماتوگرام سه بعدی (اعداد ۱ تا ۵ استاندارد ملاتونین به ترتیب در غلظت های ۱ و ۰/۵ و ۰/۱ و ۰/۰۵ و ۰/۰۱ میکروگرم بر میکرولیتر و نمونه با سه بار تکرار(c،b،a)

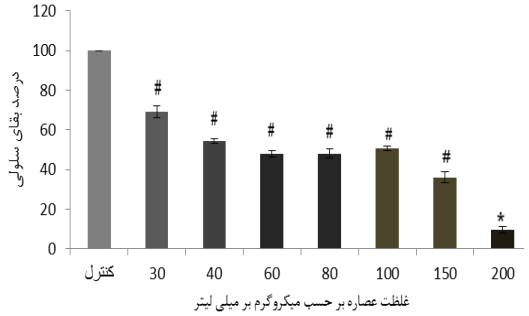


تصویر شماره ۱: تصویر پلیت جداسازی شده در طول موج ۳۶۶نانومتر (سمت راست ملاتونین در نمونه با سه بار تکرار و سمت چپ استاندارد ملاتونین به ترتیب در غلظت های ۱ و ۰/۵ و ۰/۱ و ۰/۰۵ و ۰/۰۱ میکروگرم بر میکرولیتر را نشان می دهد)

اثر عصاره هیدروالکلی گل بنفشه بر تکثیر سلولی

درصد سلول‌های زنده در دوزهای ۵، ۱۰ و ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره تفاوت معنی‌داری با گروه کنترل (۵±۱۰۰ درصد) نداشت. این در حالی است که غلظت‌های ۳۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره به ترتیب باعث کاهش ۳۴/۱۳، ۶۰/۳۴، ۴۸/۵۷، ۵۷/۶۰، ۶۲/۸۳، ۶۷/۷۶ و ۸۸/۲۵ درصدی سلول‌های سرطانی شدند که این کاهش در مقایسه با گروه کنترل از نظر آماری معنی‌دار بود ($p <$ ۰/۰۵) (نمودار شماره ۳).

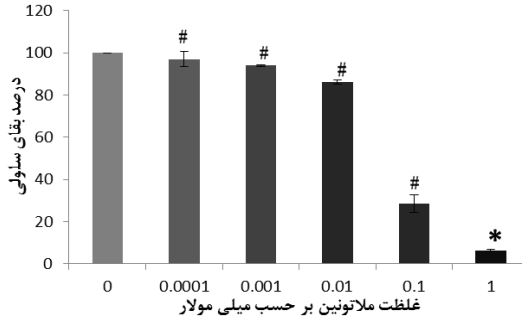
[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-29]



نمودار شماره ۳: اثر عصاره هیدروالکلی گل بنفشه (*Viola odorata*) بر تکثیر سلول MDA-MB-468 سرطان سینه. (p<0.05* : مقایسه غلظت ۲۰۰µg/ml عصاره با گروه کنترل، p<0.05 #: مقایسه غلظت ۲۰۰µg/ml عصاره با دیگر غلظت های عصاره)

اثر ملاتونین بر تکثیر سلولی

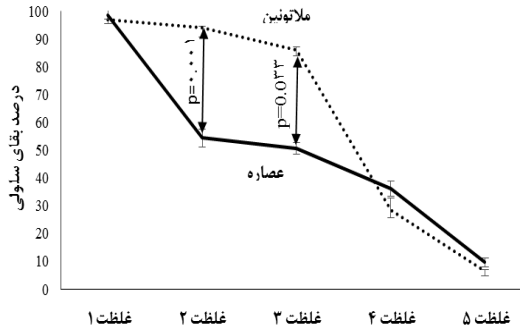
غلظت‌های ۰/۰۱، ۰/۱ و ۱ میلی‌مولار ملاتونین به ترتیب باعث کاهش معنی‌دار ۵۳/۰۸، ۶۵/۶۵ و ۹۳/۵۹ درصدی در بقای سلول‌های سرطانی شد. غلظت ۰/۰۰۱ و ۰/۰۰۰۱ میلی مولار کاهش معنی داری را نشان نداد(p <۰/۰۵) (نمودار شماره ۴).



نمودار شماره ۴: اثر دوزهای مختلف ملاتونین بر میزان تکثیر سلول‌های MDA-MB-468 سرطان سینه. (p<0.05* : مقایسه غلظت ۱mM ملاتونین با گروه کنترل، p<0.05#: مقایسه غلظت ۱mM ملاتونین ملاتونین با دیگر غلظت های ملاتونین)

مقایسه اثر ملاتونین و عصاره Viola odorata بر حسب میزان ملاتونین در عصاره

۵ غلظت مختلف ملاتونین و عصاره در نمودار شماره ۵ مورد مقایسه قرار گرفت. برای مقایسه بهتر تمام غلظت‌ها بر حسب µg/ml آورده شده است.



µg/ml	غلظت ۱	غلظت ۲	غلظت ۳	غلظت ۴	غلظت ۵
ملاتونین	۰/۰۲۳۲	۰/۲۳۲	۲/۳۲	۲۳/۲	۲۳۲
عصاره (غلظت ملاتونین در عصاره)	۵ (۰/۰۲۷)	۴۰ (۰/۲۲)	۱۰۰ (۰/۵۵)	۱۵۰ (۰/۸۲۵)	۲۰۰ (۰/۱)

نمودار شماره ۵: مقایسه اثر ملاتونین و عصاره *Viola odorata* بر حسب میزان ملاتونین در عصاره بر میزان تکثیر سلول های MDA-MB-468 سرطان سینه

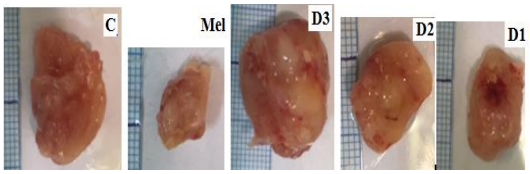
مقایسه غلظت‌های مختلف عصاره و ملاتونین نشان می‌دهد که اثر بازدارندگی ملاتونین در غلظت ۵ (معادل 1mM) تفاوت معنی‌داری با غلظت ۲۰۰µg/ml عصاره ندارد. در واقع اثر بازدارندگی هر دو تقریباً برابر است و درصد سلول‌های زنده را به کم‌تر از ۱۰ درصد کاهش داده‌اند. در غلظتی که مقدار ملاتونین با مقدار ملاتونین عصاره برابر می‌شود (غلظت ۲) درصد بازدارندگی عصاره بیش تر از ملاتونین است. در غلظت‌های پایین از هر دو ملاتونین و عصاره اثر بازدارندگی بر بقای سلولی بسیار ناچیز است.

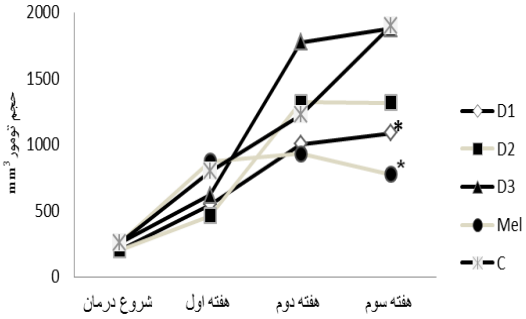
اثر عصاره هیدروالکلی Viola odorata بر وزن و حجم تومور 4T1

بررسی تغییرات حجم تومور در مدت سه هفته تیمار عموماً افزایش در حجم تومورها در هر گروه را نشان می‌دهد (نمودار شماره ۶). حجم اولیه هر گروه تقریباً حدود ۲۰۰mm^3 بوده این در حالی که حجم نهایی و هم‌چنین درصد تغییرات حجم تومور در گروه دوز ۲۵۰mg/kg از عصاره (D1) و گروه ملاتونین (1mM) یک اختلاف معنی‌داری را با گروه کنترل نشان می‌دهد. بعد از هفته دوم تیمار، تنها گروه ملاتونین روند کاهشی را در رشد تومور نشان داد. از طرفی، مقایسه وزن

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-29]

تومورها یک اختلاف معنی‌دار در گروه ملاتونین با گروه کنترل را نشان می‌دهد. وزن تومور در گروه های تیمار شده با عصاره گل بنفشه تفاوت معنی‌داری را با گروه کنترل نشان نمی‌دهند هر چند وزن نهایی در گروه D1 و D2 از گروه کنترل پایین‌تر است. تغییرات مشاهده شده در گروه حلال ملاتونین قابل توجه نبود و از ارائه داده‌های مربوط به این گروه صرف نظر شد. مقایسه درصد مهار رشد تومور در جدول شماره ۱ نشان می‌دهد که ملاتونین و دوز ۲۵۰mg/kg از عصاره به ترتیب باعث کاهش ۵۹/۴۵ درصدی و ۴۲/۵۶ درصدی در رشد تومور شده‌اند که این کاهش از لحاظ آماری معنی‌دار بود($p<۰/۰۵$).





نمودار شماره ۶: تغییرات میانگین حجم تومور در سه هفته تیمار. حجم نهایی تومور در گروه D1 و Mel تفاوت معنی‌داری را با گروه کنترل نشان می دهد($p<۰/۰۵$). (گروه D1، D2 و D3 به ترتیب دوزهای ۲۵۰، ۱۵۰ و ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم عصاره و گروه Mel دوز ۴۰ میلی گرم بر کیلوگرم ملاتونین)

مطالعه هیستوپاتولوژی

بافت تومور و بافت‌های ریه، کبد، طحال پس از جداسازی از نمونه‌ها در فرمالین ۱۰ درصد فیکس برای رنگ‌آمیزی H&E به آزمایشگاه پاتولوژی ارسال شد. بررسی بافت توموری نشان دهنده تراکم شدید سلولی همراه با نکروز بود. درگیری بافت های کبد، طحال و ریه با مشاهده سلول‌های متاستازی مورد تأیید قرار گرفت. سلول‌های متاستاتیک به صورت دسته‌های کوچک و بزرگ در بین سلو ل های کبدی مشاهده گردید(تصویر شماره ۲). در بررسی ماکروسکوپی، بزرگی بافت های طحال، کبد و ریه قابل تشخیص بود.

جدول شماره ۱: مقایسه درصد مهار رشد تومور 4T1 در روز ۲۱. بالاترین درصد مهار مربوط است به گروه ملاتونین (Mel) و D1 که با گروه کنترل (C) اختلاف معنی‌داری را نشان می‌دهد. (D1، D2 و D3 به ترتیب دوزهای ۱۵۰، ۲۵۰ و ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم عصاره و گروه Mel دوز ۴۰ میلی گرم بر کیلوگرم ملاتونین) ($p<۰/۰۵$*).

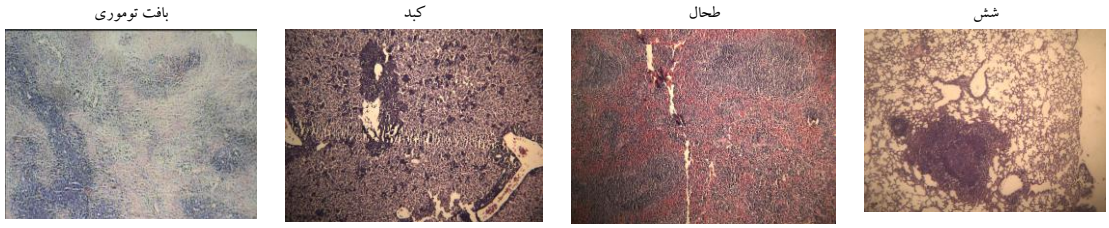
گروه	وزن تومور(gr)	میزان مهار رشد تومور(%)
C	۲/۹۶	-
Mel	۱/۲۰	۵۹/۴۵
D3	۲/۹۳	۱/۰۱
D2	۲/۰۵	۳۰/۴۷
D1	۱/۷۰	۴۲/۵۶

بحث

امروزه گیاهان دارویی به منظور پیدا کردن ماده مؤثری برای درمان سرطان یک منبع ارزشمند محسوب می‌شوند. مطالعات زیادی در محیط کشت و در مدل‌های حیوانی نشان داده است که گیاهان دارویی می‌توانند از طرق مختلفی اثرات ضد توموری خود را اعمال کنند. کمک به ترمیم DNA، افزایش ایمنی بدن و افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان از جمله این فعالیت‌ها است(۲۲).

حضور ملاتونین در گونه‌های گیاهی به روش‌های مختلفی مورد شناسایی قرار می‌گیرد. به عنوان مثال تکنیک HPLC حضور ملاتونین در گیاهان طب چینی را به خوبی مشخص کرده است. این دسته تحقیقات نشان داد که درصد ملاتونین در برخی گیاهان دارویی بالا است، به عنوان مثال در ۱۵ گونه گیاهان خوراکی حدود ۲ تا ۱۲۹ ng/g، در گیاه *Hypericum perforatum* تا ۴۰۰۰ nmol/g، و در ۱۰۸ گونه گیاهان طب چینی تا ۳۸۰۰ ng/g می‌رسد(۲۳) در مطالعه حاضر غلظت ملاتونین در گیاه *Viola odorata*

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-29]



تصویر شماره ۲: رنگ آمیزی H&E از بافت توموری و بافت های کبد، طحال و ریه. ناحیه نکروزی در بافت توموری در ناحیه مرکزی به خوبی مشخص است. سلول های متاستازی در بافت کبد به صورت دسته های کوچک و بزرگ و در اطراف عروق خونی قابل تشخیص است. متاستاز سلول های سرطانی به بافت ریه نیز به وضوح قابل مشاهده است.

با تکنیک HPTLC مورد ارزیابی قرار گرفت و مقدار ملاتونین حدود ۲/۳۶ µmol/g تخمین زده شد. در این در این مطالعه تکنیک MTT assay اثر معنی‌دار عصاره هیدروالکلی *Viola odorata* بر سلول‌های MDA-MB-468 را نشان داد. بررسی تکنیک MTT assay نشان داد عصاره هیدروالکلی گل بنفشه می‌تواند تکثیر سلول‌های سرطانی MDA-MB-468 را به‌طور معنی‌داری کاهش دهد. در واقع درصد بقای سلول‌های MDA-MB-468 با افزایش غلظت عصاره کاهش پیدا می‌کند. در این بین تاثیر مهاری غلظت ۲۰۰µg/ml از عصاره به طور معنی‌داری بیش‌تر از غلظت‌های دیگر بود.

مطالعات قبلی نشان داده که گونه دیگر بنفشه (*Viola tricolor*) نیز اثر مهاری قوی بر تکثیر سلول‌های سرطان گردن رحم دارد(۲۴). عصاره استونی *Viola odorata* نیز در سرطان پوست القاشده با DMBA (7,12-Dimethylbenz[a]anthracene) اثر حفاظتی از خود نشان می‌دهد(۲۵). مطالعات اخیر نیز نشان داده است که اثر سیتوتوکسیک بر رده‌های سلولی مختلفی توسط سیکلوتایدهای (varv A، varv F و cycloviolacin O2) استخراج شده از *Viola arvensis* و *Viola odorata* القاء می‌شود(۲۶). این مطلب قابل توجه است که cycloviolacin O2 دارای اثر توکسیک بر بیش از ۱۰ نوع رده سلولی سرطانی از قبیل سرطان پوست، سرطان خون، سرطان ریه و سرطان کلیه است. این ترکیب با IC_{50} برابر با ۰/۱ تا ۰/۳ میکرومولار نتایج بهتری را از داروهایی که در حال حاضر به صورت کلینیکی استفاده می‌شوند را نشان داده است(۲۷). مقایسه غلظت های ملاتونین با عصاره نشان داده که عصاره در غلظت‌های پایین‌تری موجب مهار رشد سلول‌های MDA-MB-468 در مقایسه با ملاتونین می‌شود. در غلظتی که مقدار ملاتونین با مقدار ملاتونین عصاره برابر می‌شود (غلظت ۲) درصد بازدارندگی عصاره بیش‌تر از ملاتونین است. این مطلب حاکی از آن است که به احتمال زیاد علاوه بر ملاتونین مواد مؤثر دیگری نیز (مانند فلاونوئیدها و سیکلوتایدها) در عصاره هیدروالکلی نقش بازدارندگی دارند. ت mM ۱ ملاتونین نیز به طور معنی‌داری از تکثیر سلول‌های سرطانی MDA-MB-468 جلوگیری کرده و تفاوت معنی داری را نیز با دیگر غلظت‌های ملاتونین نشان می‌دهد. مطالعات قبلی هم نشان داده است که ملاتونین توانایی مهار رشد سلول‌های سرطانی ER^+ مانند MCF-7 و بعضی رده‌های ER^- مانند MDA-MB-468 را دارد(۱۰). بیان افزایشی رسپتور MT1 ملاتونین در رده MCF-7 با مهار بیان mRNA آنزیم آروماتاز از تکثیر این رده سلولی جلوگیری می‌کند(۱۰). از طرفی آنتاگونیست‌های رسپتورهای MT1/MT2 می‌تواند اثرمهاری ملاتونین بر تکثیر سلول‌های سرطانی را کاهش دهند(۲۸). مطالعاتی از این قبیل نشان می‌دهد که ملاتونین به خوبی می‌تواند رشد سلول های سرطان سینه را مهار کند(۱۱).

بررسی تغییرات حجم و وزن تومور 4T1 در موش‌های Balb/c نشان داد که درصد افزایش حجم تومور در گروه D1 (دوز ۲۵۰mg/ml) به طور معنی‌داری

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-29]

کم‌تر از گروه کنترل است در حالی که گروه D2 و D3 تفاوتی را نشان ندادند. تزریق درون صفاقی ملاتونین نیز از افزایش حجم تومور جلوگیری کرد و درصد تغییرات حجم تومور در این گروه با گروه کنترل معنی دار بود. وزن نهایی تومورها در گروه ملاتونین به طور معنی‌داری کم‌تر از گروه کنترل بود. مطالعات قبلی نیز نشان داده است که ملاتونین در مدل‌های زنوگرافت سرطان سینه می‌تواند تکثیر سلولی رده‌های MDA-MB-431 و MCF-7 و هم‌چنین اندازه تومور را کاهش دهد. علاوه بر سرطان سینه ملاتونین می‌تواند حجم تومور را در سرطان معده نیز کاهش دهد(۳۰،۲۹). با توجه به مطالعات گذشته احتمال داده می‌شود که ملاتونین با کاهش تمایز سلولی، نگه داشتن سلول‌ها در فاز G_1/G_0 چرخه سلولی(۱۱)، افزایش طول چرخه سلولی، تنظیم افزایشی P53 و P21، کاهش حالت تهاجم سلول‌های سرطانی، افزایش gap junction ها، E-cadherin و اتصالات بین سلولی و نهایتاً کاهش تکثیر سلولی(۱۱) از رشد تومورهای 4T1 جلوگیری کرده است. مطالعه صادق نیا و همکاران نشان داد که عصاره گونه‌ای از گل بنفشه (*Viola tricolor*) می‌تواند نسبت Bax/Bcl2 را درسلول‌های سرطانی Neuro2a افزایش دهد و هم‌چنین از رگ‌زایی در غشای کاردیوآلانتوئیس جنین جوجه جلوگیری کند(۳۱). احتمالاً عصاره *Viola odorata* به واسطه ترکیبات اصلی خود هم‌چون سیکلوتایدها، فلاونوئیدها و شاید ملاتونین با تحریک آپوپتوز و مهار آنژیوژنز در سلول‌های سرطانی از افزایش حجم تومور جلوگیری می‌کند. فلاونوئیدها می‌توانند پروتئین‌های اصلی در مسیر رشد سلولی، آپوپتوز و آنژیوژنز از قبیل MMP، VEGF، HIF-alpha، P53، Bax و Bcl2 را تحت تأثیر قرار داده و رشد تومور را کاهش دهند(۸). به دنبال تغییر در بالانس Bax/Bcl-2 پتانسیل غشای میتوکندری تغییر کرده و موجب آزاد شدن سیتوکروم c از میتوکندری می‌شود. به دنبال آزاد شدن سیتوکروم c، پروتئین‌های caspase فعال شده و نهایتاً پدیده آپوپتوزیس را شاهد خواهیم بود. پروتئین P53 یکی از فاکتورهای مهم در مرگ برنامه‌ریزی شده سلول است. تنظیم افزایشی Bax و انتقال آن از سیتوپلاسم به میتوکندری موجب فعال شدن P53 می‌شود(۳۲). مطالعات گذشته نشان داده است که بیان HIF-α در مسیر تبدیل شدن بافت نرمال پستان به کارسینومای پستانی به تدریج افزایش می‌یابد. بیان HIF-α با افزایش تکثیر سلول‌های پستان و بیان رسپتورهای استروژن و فاکتور عروقی رشد اندوتلیالی (VEGF) مرتبط است(۳۳). VEGF به عنوان یک محرک رگ‌زایی و توسعه عوامل که این مسیر را هدف قرار می‌دهند، موجب اعتبار اصول درمانی ضد رگ‌زایی برای درمان سرطان شده است. رسپتور VEGFR2(KDR/FLK1) نقش اصلی را در پاسخ‌دهی به هورمون VEGF دارد و مستقیماً رگ زایی را در تومور کنترل می‌کند. به‌طوری که سیستم VEGF/VEGFR2 به عنوان یک سیستم اتوکرینی- پاراکرینی در تکثیر و حفظ سلول‌های سرطانی نقش دارند. علاوه بر این، سیگنالینگ VEGFR2 در نفوذپذیری عروق و تکثیر، بقا و مهاجرت سلول‌های اندوتلیالی نقش ایفا می‌کند(۳۴). همه این مسیرها می‌توانند جایگاهی برای اثرگذاری ترکیبات اصلی عصاره هیدروالکلی *Viola odorata* و یا فیتوملاتونین باشند که تأیید آن نیازمند تحقیق و بررسی بیش‌تری است. با توجه به این‌که غلظت ملاتونین در برخی داروهای گیاهی بیش‌تر از غلظت فیزیولوژیکی است که توسط غده پینئال تولید می‌شود(۳۵)، به نظر می‌رسد مصرف فیتوملاتونین توسط انسان موجب افزایش توان مقاومتی در برابر بیماری‌های مختلفی شود. علاوه بر خاصیت آنتی‌اکسیدانی، فیتوملاتونین می‌تواند با مهار پلیمریزاسیون توبولین و القای دپلیمریزاسیون میکروتوبول‌ها در انسان و حیوانات بر سیتواسکلت سلولی نیز تأثیر بگذارد(۲۳). از طرفی نشان داده شده است که رژیم غذایی حاوی فیتوملاتونین میزان جذب ملاتونین توسط سلول‌های توموری را افزایش داده و به دنبال آن موجب کاهش رشد تومور می‌شود(۳۶). احتمالاً عصاره هیدروالکلی

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-29]

گل بنفشه معطر نیز با مکانیسمی مشابه از افـزایش حجـم تومور جلوگیری کرده است. وجود فعالیت آنتی‌اکسـیدانی عصاره گل بنفشه نیز می‌تواند از عوامل دیگر در کنتـرل رشد تومور باشد. این احتمالات نیاز بـه بررسـی و مطالعـات مولکولی بیش‌تر داردکه درحال حاضر درگروه فیزیولـوژی دانشگاه شهید بهشتی در حال بررسی می‌باشد.

References

1. 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.
2. BesharatiSeidani A, Jabbari A, Yamini Y, Saharkhiz MJ. Rapid extractionand analysis of volatile organic compounds of Iranian feverfew (Tanacetum parthenium) using headspace solvent microextraction (HSME), and gas chromatography/mass spectrometry. Flavour and Fragrance Journal 2006; 21(3): 502-509.
3. Ansari M, Rafiee Kh, Yasa N, Vardasbi S, Naimi SM, Nowrouzi A. Measurement of melatonin in alcoholic and hot water extracts of Tanacetum parthenium, Tripleurospermum disciforme and Viola odorata. DARU Journal of Pharmaceutical Sciences 2010; 18(3): 173-178.
4. Elhassaneen Y, Sabry S, Musalum T, El-Eskafy A, El-Fatah AA. Effect of sweet violet (Viola odorata L.) blossoms powder on liver and kidney functions as well as serum lipid peroxidation of rats treated with carbon tetrachloride. J Am Sci 2013; 9(5): 88-95.
5. Barekat T, Otroshy M, Samsam-Zadeh B , Sadrarhami A, Mokhtari A. A novel approach for breaking seed dormancy and germination in Viola odorata (A medicinal plant). J Nov Appl Sci 2013; 2(10): 513-516.
6. Saether O, Craik DJ, Campbell ID, Sletten K, Juul J, Norman DG. Elucidation of the primary and three-dimensional structure of the uterotonic polypeptide kalata B1. Biochemistry 1995; 34(13): 4147-4158.
7. Gerlach SL, Rathinakumar R, Chakravarty G, Göransson U, Wimley WC, Darwin SP, et al. Anticancer and chemosensitizing abilities of cycloviolacin O2 from Viola odorata and psyle cyclotides from Psychotria leptothyrsa. Biopolymers 2010; 94(5): 617-625.
8. Batra P, Sharma AK. Anti-cancer potential of flavonoids: recent trends and future perspectives. 3 Biotech 2013; 3(6): 439-459.
9. Stojković D, Glamočlija J, Ćirić A, Šiljegović J, Nikolić M, Soković M. Free radical scavenging activity of Viola odorata water extracts. Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants 2011; 17(3): 285-290.
10. Oprea-Ilies G, Haus E, Sackett-Lundeen L, Liu Y, McLendon L, Busch R, et al. Expression of melatonin receptors in triple negative breast cancer (TNBC) in African American and Caucasian women: relation to survival. Breast cancer research and treatment 2013; 137(3): 677-687.
11. Cos S, González A, Martínez-Campa C, Mediavilla MD, Alonso-González C, Sánchez-Barceló EJ. Estrogen-signaling pathway: a link between breast cancer and melatonin oncostatic actions. Cancer Detect Prev 2006; 30(2): 118-128.
12. LeonBlanco MM, Guerrero JM, Reiter RJ, Calvo JR, Pozo D. Melatonin inhibits telomerase activity in the MCF7 tumor cell line both in vivo and in vitro. Journal of Pineal Research 2003; 35(3): 204-211.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-29]

13. Dai M, Cui P, Yu M, Han J, Li H, Xiu R. Melatonin modulates the expression of VEGF and HIF1α induced by CoCl2 in cultured cancer cells. Journal of Pineal Research 2008; 44(2): 121-126.
14. Mediavilla MD, Sanchez-Barcelo EJ, Tan DX, Manchester L, Reiter RJ. Basic mechanisms involved in the anti-cancer effects of melatonin. Curr Med Chem 2010; 17(36): 4462-4481.
15. Sørlie T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, Nobel A, et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. Proc Natl Acad Sci USA 2003; 100(14): 8418-8423.
16. Pulaski BA, OstrandRosenberg S. Mouse 4T1 breast tumor model. Curr Protoc Immunol 2001; Chapter 20: Unit 20.2.
17. Jonkers J, Derksen PW. Modeling metastatic breast cancer in mice. J Mammary Gland Biol Neoplasia 2007; 12(2-3): 191-203.
18. Holliday DL, Speirs V. Choosing the right cell line for breast cancer research. Breast Cancer Res 2011; 13(4): 215.
19. Oliveras-Ferraros C, Vazquez-Martin A, López-Bonet E, Martín-Castillo B, Del Barco S, Brunet J, et al. Growth and molecular interactions of the anti-EGFR antibody cetuximab and the DNA cross-linking agent cisplatin in gefitinib-resistant MDA-MB-468 cells: new prospects in the treatment of triple-negative/basal-like breast cancer. Int J Oncol 2008; 33(6): 1165-1176.
20. Reiter RJ, Tan DX, Manchester LC, Simopoulos AP, Maldonado MD, Flores LJ, et al. Melatonin in edible plants (phytomelatonin): identification, concentrations, bioavailability and proposed functions. World Rev Nutr Diet 2007; 97: 211-230.
21. Hardeland R. Atioxidative protection by melatonin: multiplicity of mechanisms from radical detoxification to radical avoidance. Endocrine 2005; 27(2): 119-130.
22. Sakarkar DM, Deshmukh VN. Ethnopharmacological review of traditional medicinal plants for anticancer activity. International Journal of PharmTech Research 2011; 3(1): 298-308.
23. Kolář J, Macháčková I. Melatonin in higher plants: occurrence and possible functions. Journal of Pineal Research 2005; 39(4): 333-341.
24. Mortazavian SGA, Ghorbani Hesari T. The effect of violet extract and its fractions on the proliferation of cervical cancer cells. Women, Gynecology and Infertility 1931; 15(22): 9-16.
25. Perwaiz S, Sultana S. Antitumorigenic effect of crude extract of Viola odorata on DMBA-induced two stage skin carcinogenesis in the Swiss albino mice. Asia Pacific Journal of Pharmacology 1998; 13(1): 43-50.
26. Lindholm P, Göransson U, Johansson S, Claeson P, Gullbo J, Larsson R, et al. Cyclotides: A Novel Type of Cytotoxic Agents. Molecular Cancer Therapeutics 2002; 1(6): 365-369.
27. Svangård E, Göransson U, Hocaoglu Z, Gullbo J, Larsson R, Claeson P,et al. Cytotoxic Cyclotides from Viola tricolor. J Nat Prod 2004; 67(2): 144-147.
28. González A, Martinez-Campa C, Mediavilla MD, Alonso-González C, Sánchez-Mateos S, Hill SM, et al. Effects of MT1 melatonin receptor overexpression on the aromatase-suppressive effect of melatoninin MCF-7 human breast cancer cells. Oncology Reports 2007; 17(4): 947-953.
29. Jardim-Perassi BV, Arbab AS, Ferreira LC, Borin TF, Varma NR, Iskander AS, et al.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-29]

Effect of melatonin on tumor growth and angiogenesis in xenograft model of breast cancer. PloS One 2014; 9(1): e85311.

30. Liu H, Xu L, Wei JE, Xie MR, Wang SE, Zhou RX. Role of CD4+ CD25+ Regulatory T Cells in MelatoninMediated Inhibition of Murine Gastric Cancer Cell Growth In Vivo and In Vitro. Anat Rec (Hoboken) 2011; 294(5): 781-788.
31. Sadeghnia HR, Ghorbani Hesari T, Mortazavian SM, Mousavi SH, Tayarani-Najaran Z, Ghorbani A. Viola tricolor induces apoptosis in cancer cells and exhibits antiangiogenic activity on chicken chorioallantoic membrane. BioMed Res int 2014; 2014: 625792.
32. Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, et al. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. Cell 1997; 91(4): 479-489.
33. Bos R, Zhong H, Hanrahan CF, Mommers ECM, Semenza GL, Pinedo HM, et al. Levels of hypoxia-inducible factor-1α during breast carcinogenesis. J Nati Cancer Inst (JNCI) 2001; 93(4): 309-314.
34. Guo S, Colbert LS, Fuller M, Zhang Y, Gonzalez-Perez RR. Vascular endothelial growth factor receptor-2 in breast cancer. Biochim Biophys Acta 2010; 1806(1): 108-121.
35. Chen G, Huo Y, Tan DX, Liang Z, Zhang W, Zhang Y. Melatonin in Chinese medicinal herbs. Life Sci 2003; 73(1): 19-26.
36. Blask DE, Dauchy RT, Sauer LA, Krause JA. Melatonin uptake and growth prevention in rat hepatoma 7288CTC in response to dietary melatonin: melatonin receptor-mediated inhibition of tumor linoleic acid metabolism to the growth signaling molecule 13-hydroxyoctadecadienoic acid and the potential role of phytomelatonin. Carcinogenesis 2004; 25(6): 951-960.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-29]