ارمغان دانش، مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی یاسوج
دوره ۲۶، شماره۱، فروردین و اردیبهشت۱۴۰۰(شماره پی در پی ۱۴۴)

اثر سیتوتوکسیک عصاره هیدروالکلی گیاه سنبله‌ای خاردار(*Stachys setifera*) بر رده سلول سرطانی MCF-7 پستان انسانی

اسماعیل پناهی کوخدان، هیبت الله صادقی، نازنین دانایی، حسین صادقی*

مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، یاسوج، ایران

تاریخ وصول: ۱۳۹۹/۰۹/۱۹ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۲/۲۵

چکیده

زمینه و هدف: سرطان پستان شایع‌ترین سرطان در بین زنان می‌باشد. امروزه ترکیبات مشتق شده از گیاهان دارویی در درمان سرطان مختلف کاربرد دارند. علی‌رغم گزارش‌های موجود در مورد اثرات ضد توموری برخی از گونه‌های گیاهان جنس سنبله، فعالیت عصاره سنبله‌ای خاردار(*Stachys setifera*) بر رده‌های سلول سرطانی پستان گزارش نشده است. لذا هدف از مطالعه حاضر تعیین و بررسی تأثیر عصاره هیدروالکلی گیاه سنبله‌ای خاردار بر تکثیر رده سلول‌های سرطانی MCF-7 بود.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی که در سال ۱۳۹۸ انجام شد، پس از کشت سلول‌های سرطانی MCF-7 ، سلول‌ها با غلظت‌های مختلف عصاره اتانولی سنبله‌ای خاردار و سیس پلاتین(به عنوان کنترل مثبت) به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. بقای سلول‌های سرطانی و غلظت مهاری ۵۰ درصد(IC50) با استفاده از روش رنگسنجی MTT ارزیابی شد. اثرات عصاره و سیس پلاتین بر مرگ و میر سلولی و توقف رشد سلولی به وسیله دستگاه فلوسیتومتری ارزیابی شد. داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از آزمون‌های آماری آنالیز واریانس یک طرفه و تست تعقیبی توکی تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: نتایج IC50 عصاره هیدروالکلی گیاه سنبله‌ای خاردار و سیس پلاتین بر روی سلول MCF-7 بعد از ۲۴ ساعت به ترتیب برابر۸۲۷/۵۲ و۴/۳۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. نتایج فلوسیتومتری نشان داد که عصاره سنبله‌ای خاردار و سیس پلاتین باعث توقف رشد سلول‌های MCF-7 در فازG_0/G_1 گردیده و درصد سلول‌ها در سلول‌های کنترل، عصاره و سیس پلاتین به ترتیب(۴۲/۹۴، ۵۰/۶۸ و ۵۹/۱۱) می‌شود. عصاره سنبله خاردار هم‌چنین باعث تغییرات مورفولوژیک از جمله گرانول دار شدن سیتوپلاسم، گرد شدن و بزرگ شدن سلول‌ها، ایجاد زواید بلند از غشاء در سلول‌های تحت تیمار شده است.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد که عصاره هیدروالکلی سنبله‌ای خاردار باعث مهار تکثیر سلول‌های سرطانی پستان MCF-7 شده و توانسته با تأثیر بر چرخه سلولی و تغییرات مورفولوژیک اثرات سیتوتوکسیک خود را اعمال کند. بنابراین این گیاه می‌تواند کاندیدای مناسبی جهت خالص سازی ترکیبات موجود در آن جهت بررسی بیشتر بر تکثیر سلول‌های سرطان پستان باشد.

واژه‌های کلیدی: سنبله‌ای خاردار، سیس پلاتین، ضد سرطان

***نویسنده مسئول: حسین صادقی**، یاسوج، دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی
Email: h_sadeghi_m@yahoo.com

مقدمه

سرطان پستان شایع‌ترین بدخیمی نئوپلاستیک در زنان بوده و به عنوان مهم‌ترین دلیل مرگ و میر ناشی از سرطان در زنان است(۳ـ۱). هر چند که شیوع سالانه این سرطان در دنیا رو به افزایش می‌باشد، ولی میزان شیوع آن در کشورها متفاوت گزارش شده است(٤). بیشترین فراوانی این سرطان مربوط به کشورهای توسعه یافته گزارش شده است، اما پژوهش‌ها نشان می‌دهد که شیب افزایش شیوع سرطان سینه در کشورهای در حال توسعه بیشتر بوده و متوسط عمر بیماران مبتلا در این کشورها نیز کمتر می‌باشد(۷ـ۵). طی پژوهش‌های انجام شده مشخص شده است که میزان شیوع سرطان پستان در کشور ایران نسبت به سایر کشورهای توسعه یافته کمتراست، اما با این حال، این بدخیمی هم‌چنان به عنوان شایع‌ترین سرطان در زنان ایرانی مطرح بوده و اطلاعات موجود، از افزایش شیوع این سرطان طی دو دهه گذشته در ایران حکایت دارد(۸). از جمله راهکارهای درمانی این بدخیمی می‌توان به جراحی، شیمی‌درمانی و رادیوتراپی اشاره کرد(۹). با این حال میزان مرگ و میر در این بیماران نسبتاً بالا است که خود حکایت از ناکارآمدی این راهکارهای درمانی دارد.

از جمله علل اصلی بروز سرطان‌ها می‌توان به تأثیر عوامل محیطی در ایجاد جهش و تغییرات ژنتیکی مسئول بروز بدخیمی‌ها اشاره کرد(۱۰). مشخص شده است که مصرف برخی فراورده‌های غذایی به دلیل دارا بودن خواص آنتی‌اکسیدان در جلوگیری از بروز سرطان نقش مؤثری دارند(۱۲ و۱۱).

گیاهان دارویی همواره جهت درمان بیماری مختلف از جمله سرطان‌ها از دیرباز مورد نظر محققان بوده است(۱۳). در پژوهش‌های مختلف گزارش شده است که یک سری از ترکیب‌های طبیعی از جمله گیاهان دارویی به دلیل داشتن ترکیبات مختلف فیتوشیمیایی از جمله آلکلوییدها، فلاونوییدها و فنل‌ها باعث القاء سمیت و مهار رشد در رده‌های مختلف سلول‌های سرطانی گردیده‌اند(١٤ و١١).

امروزه بسیاری از داروهای مورد استفاده در درمان و کنترل سرطان‌های مختلف(شیمی‌درمانی) از جمله تاکسان‌ها، وین کریستین و وین بلاستین از گیاهان دارویی مشتق شده‌اند(١٥). در پژوهش‌های متعددی اثرات مهار کننده رشد رده‌های مختلف سلول‌های سرطانی در شرایط درون‌تنی و برون‌تنی، به وسیله گونه‌های مختلف سنبله گزارش شده است(١٧ و١٦). سنبله‌ای خاردار(*Stachys setifera*) یکی از گیاهان غنی از ترکیب‌های فیتوشیمیایی مختلف، چند ساله، بسیار معطر و جز خانواده نعناعیان(*Lamiaceae*) است. این گیاه اغلب در دامنه ارتفاعات کوهستانی می‌روید و دارای ساقه‌ای کوتاه پوشیده از مو، برگ های ساده و باریک، گل‌های صورتی متمایل به سفید می‌باشد. بخش‌های هوایی این گیاه به صورت دمنوش گیاهی در درمان اختلالات

عفونی، تنفسی، روماتوئیدی والتهابی کاربرد دارند(۱۸). علاوه بر این اثرات ضد میکروبی، ضدتوموری و آنتی اکسیدانی، ضد التهابی، محافظت کلیوی و محافظت کبدی برخی گونه‌های سنبله‌ای خاردار در پژوهش‌های مختلفی گزارش شده است(۲۲-۱۸). بررسی فیتوشیمیایی برخی از گونه‌های *Stachys* نشان داده است که این گونه‌ها عمدتاً حاوی ترکیبات مختلفی ایریدوئیدها، فلاونوئیدها، اسیدهای فنولیک و دی‌ترپنوئیدها به عنوان متابولیت‌های ثانویه می‌باشند(۲۳). در مطالعه‌ای به بررسی تأثیر اسانس گیاه سنبله خاردار بر تکثیر سلول سرطانی MCF-7 پرداخته شده و نتایج بیانگر تأثیر مناسب اسانس این گیاه در این رده سلولی بوده است(۲۴). در مطالعه‌ای نشان داده شده که فراکشن کلروفرمی($CHCl_3$) سنبله خاردار تا حد زیادی باعث مهار تکثیر رده سلولی سرطان پستان(T-47D)می‌شود. پژوهش‌ها نشان داده است ترپنوییدها و فلاونوییدها از ترکیبات اصلی موجود در گیاه سنبله کرکدار است و همچنین، اوژنول به عنوان یکی از ترکیبات اصلی موجود در اسانس این گیاه گزارش شده است. اوژنول به دلیل تشکیل ترکیبات رادیکال فعال می‌تواند باعث سمیت سلولی شود(۲۵). بررسی مقالات منتشر شده نشان داد که گزارشی در مورد تأثیر عصاره هیدروالکلی سنبله‌ای خاردار(*Stachys setifera*) بر تکثیر رده‌های سلول سرطانی پستان MCF-7 گزارش نشده است، لذا هدف از مطالعه حاضر بررسی تأثیر عصاره هیدروالکلی گیاه سنبله‌ای خاردار بر تکثیر رده سلول سرطانی MCF-7 پستان انسانی بود.

روش بررسی

در این مطالعه تجربی که در سال ۱۳۹۸انجام شد، اندام هوایی گیاه سنبله‌ای خاردار(*Stachys setifera*) از ارتفاعات کوه دنا در استان کهگیلویه و بویراحمد در فصل بهار جمع‌آوری شد. بخش‌های هوایی گیاه در سایه و به دور از نور مستقیم خشک شد و پس از پودر شدن برای تهیه عصاره استفاده شد.

جهت استخراج عصاره هیدروالکلی از حلال اتانول و با روش ماسراسیون(خیساندن) استفاده شد. مقدار ۱۰۰ گرم از گیاه پودر شده در اتانول ۷۰ درصد به مدت ٤٨ ساعت خیسانده شد. سپس مخلوط به دست آمده از کاغذ صافی عبور داده شد و محلول به دست آمده به وسیله دستگاه روتاری تغلیظ شد. عصاره تغلیظ به دست آمده در انکوباتور در در دمای ۳۷ درجه خشک گردید و جهت پژوهش‌های بعدی در دمای ۲۰ــ درجه سانتی‌گراد در فریزر نگهداری شد(۲۸ ـ۲٦ و ۲۲ و۱۵).

رده سلولی سرطان پستان مورد استفاده (MCF-7) در این تحقیق از بانک سلولی انستیتو پاستور تهران، ایران به صورت ویال‌های منجمد خریداری شد. سلول‌ها مورد نظر در محیط کشت مایع(RPMI-1640) حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی، ۱۰۰ واحد بر میلی‌مول پنی‌سیلین و ۱۰۰ میلی‌گرم بر

میلی‌لیتر استرپتومایسین در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و در اتمسفر حاوی ۵ درصد دی اکسید کربن و ۹۵ درصد رطوبت و و در فلاسک‌های استریل کشت داده شدند.

برای ارزیابی اثرات سمیت سلولی عصاره اتانولی گیاه سنبله‌ای خاردار از آزمون رنگ سنجی MTT استفاده شد. MTT، نمک تترازولیوم محلول در آب است که بر اساس فعالیت آنزیم سوکسینات دهیدروزناز میتوکندریایی سلول‌های زنده استوار است و محلول زرد رنگ MTT را به کریستال‌های بنفش رنگ نامحلول فورمازان تبدیل می‌کند(چون محتوای دهیدروژناز سلول‌های یک نوع نسبتاً ثابت است، میزان فورمازان تولید شده متناسب با تعداد سلول است(که به وسیله دی‌متیل سولفوکساید به صورت محلول در می‌آید. رده سلولی MCF7 به طور تصادفی به گروه شاهد و گروه‌های تحت تیمار با دوزهای ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰، ۶۰۰، ۸۰۰، ۱۰۰۰ و ۱۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره تقسیم‌بندی شد. گروه شاهد تحت تأثیر هیچگونه تیماری قرار نگرفت، داروی سیس پلاتین به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. با درنظر گرفتن محیط کشت کافی برای سلول‌ها و همچنین در نظر گرفتن حداقل سه تکرار، عصاره‌ها به چاهک‌ها اضافه شدند و پلیت‌ها درون انکوباتور به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شدند. در این راستا، از پلیت ۹۶ خانه استفاده شد و سلول‌ها با تراکم سلولی 10^4سلول در هر چاهک در پلیت ۹۶ چاهکی جای گرفتند. به دنبال سپری شدن زمان مورد نظر، مایع موجود از پلیت تخلیه شد و ۱۰ میکرولیتر رنگ MTT و ۹۰ میکرولیتر محیط کشت اضافه گردید. بین ۴ ساعت پس از اضافه شدن رنگ، DMSO اضافه شد و پس از ۳۰ دقیقه با دستگاه الایزا ردیدر جذب در ۵۷۰ نانومتر خوانده شد.

برای بررسی تغییرات مورفولوژی پلیت کشت ۲۴تایی که در هرخانه ۲ میلی‌لیتر محیط کشت کامل دارای ۱۰ درصد سرم جنین گاوی و 10^5سلول رده MCF-7 بود در نظر گرفته شد. پس از ۲۴ ساعت، سلول‌های مورد مطالعه با ۶۵۰ میلی‌گرم وزن خشک بر میلی لیتر و ۲/۷ نانومولار سیس پلاتین تیمار شدند. پس از گذشت ۲۴ ساعت، تغییرات مورفولوژی سلول‌ها با کمک میکروسکوپ فاز معکوس در بزرگنمایی ۱۰ بررسی شد.

بررسی سلول‌های سرطانی کنترل و تحت تیمار با استفاده از دستگاه فلوسیتومتری انجام شد که در این آزمایش از ظروف پتری دیش استریل استفاده شد. ۸ میلی‌لیتر محیط کشت کامل و تعداد 5×10^5 سلول رده MCF-7 در هر پتری ریخته شد و سپس به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. بعد از این مدت دوزهای دارویی به ظروف کشت اضافه و پس از ۲۴ ساعت انکوبه شدن نهایی، سلول‌ها جمع‌آوری و سانتریفوژ شدند و در نهایت با بافر فسفات سالین شسته و شمارش شدند. سلول‌های هر پلیت را در ۲۰۰ میکرولیتر از PBS مخلوط کردیم و به آرامی به ۴ میلی‌لیتر اتانول ۷۰ درصد سرد اضافه شد تا سلول‌ها

فیکس شوند، سپس به مدت ۲ ساعت در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. نمونه‌های کنترل به همراه نمونه‌های گروه تیمار به مدت ۳۰ دقیقه با محلول ٤۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر PI حاوی ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر(RNase) رنگ شده و با دستگاه فلوسیتومتری مدل(BD FACSCalibur) آنالیز گردید و درصد سلول‌ها در فازهای G_0/G_1, S, G_2/M با استفاده ار نرم‌افزارهای دستگاه محاسبه شدند(۲٦).

داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزار SPSS و آزمون‌های آماری آنالیز واریانس یک طرفه، تست تعقیبی توکی تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها

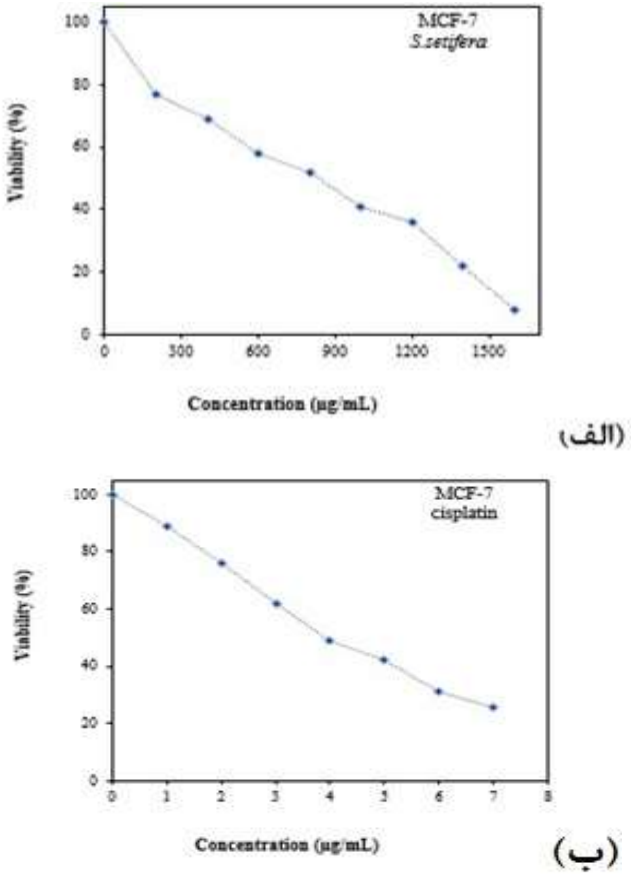
نتایج با استفاده از روش رنگ سنجی MTT پس از ۲٤ ساعت تیمار سلول‌ها با غلظت‌های مختلف عصاره (۱۴۰۰-۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر) در نمودار ۱ نشان داده شده است. چنانچه مشاهده می‌شود با افزایش غلظت عصاره سنبله‌ای خاردار جذب نوری(OD) حاصل از تست MTT کاهش یافت. نتایج نشان داده که ۵۰ درصد غلظت مهار کنندگی(IC_{50}) عصاره هیدروالکلی گیاه سنبله‌ای خاردار و سیس پلاتین بر روی سلول MCF-7 بعد از ۲۴ ساعت به ترتیب برابر ۸۲۷/۵۲ و ۴/۳۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود.

تغییرات مورفولوژیکی سلول‌های تحت تیمار با عصاره اتانولی گیاه سنبله‌ای خاردار و سیس پلاتین با یکدیگر مقایسه شد. از جمله تغییرات مورفولوژیک مشاهده شده در سلول‌های MCF-7 تحت تیمار با عصاره گیاه می‌توان به گرانول‌دار شدن سیتوپلاسم، گرد شدن و بزرگ شدن سلول‌ها، ایجاد زواید بلند از غشاء و به وجود آمدن برآمدگی‌های بسیار ریز در نزدیکی غشاء اشاره کرد، علاوه بر این کاهش گسترش سلول‌ها در کف پلیت نیز مشاهده می‌شود(شکل۱).

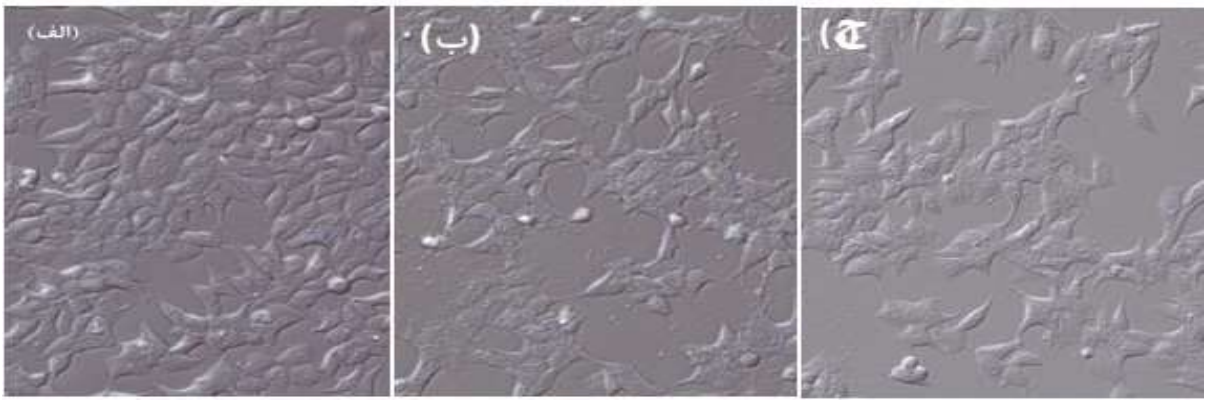
نتایج به دست آمده نشان داد که عصاره اتانولی سنبله خاردار به صورت معنی‌داری باعث توقف چرخه سلولی در فاز G0/G1 می‌شوند($p<۰/۰۱$). زیرا باعث افزایش درصد سلول‌ها در فاز G_1 و کاهش درصد در فاز S می‌گردند و بر فاز G2/M تأثیر چندانی ندارند(جدول۱). در این بین بشترین افزایش درصد در فاز G0/G1 مربوط به تیمار سیس پلاتین در رده MCF-7 است.

بحث

گیاهان دارویی همواره جهت درمان بیماری‌های مختلف از جمله سرطان‌ها از دیرباز مورد نظر محققان بوده است(۱۳). لذا هدف از مطالعه حاضر تعیین و بررسی تأثیر عصاره هیدروالکلی گیاه سنبله‌ای خاردار بر تکثیر رده سلول‌های سرطانی MCF-7 بود.



نمودار ۱: تأثیرعصاره هیدروالکلی سنبله‌ای خاردار(*Stachys setifera*) و سیس پلاتین پس از ۲۴ ساعت تیمار بر تکثیر سلول‌های رده MCF-7، (الف) تأثیرعصاره سنبله‌ای خاردار بر بقای سلولی، (ب) تأثیر داروی سیس پلاتین بر بقای سلولی. با افزایش مقدار دوز عصاره میزان مهار تکثیر سلولی نیز افزایش می‌یابد، بنابراین مهار تکثیرسلولی به صورت وابسته به دوز می‌باشد تمام تست‌ها با سه تکرار انجام شده و آنالیز داده‌ها بر اساس میانگین± خطای استاندارد گزارش شده است



شکل۱: تصویر سلول‌های رده MCF-7 (سرطان پستان) در زیر میکروسکوپ فاز معکوس ۲۴ ساعت پس از تیمار با عصاره هیدرو الکلی سنبله‌ای خاردار(*Stachys setifera*) و سیس پلاتین. (**الف**)سلول‌های کنترل (**ب**)سلول‌های تیماره شده با دوز مؤثر دارویی عصاره متانولی گیاه سنبله‌ای خاردار(*Stachys setifera*) و (ج) سلول‌های تیماره شده دوز مؤثر دارویی سیس پلاتین(عکس‌ها با میکروسکوپ فاز معکوس و بزرگنمایی ۲۰×

جدول ۱: تأثیر عصاره های گیاه سنبله‌ای خاردار(*Stachys setifera*) و سیس پلاتین تحت تأثیر دوزهای مؤثر بر چرخه سلولی، سلول‌های MCF-7 بر اساس میانگین ± انحراف‌معیار

گروه‌های مورد سنجش	(G_0 / G_1) (درصد)	(S)(درصد)	(G_2 / M) (درصد)
کنترل	۵۷/۲	۳۰/۲۹	۱۳/٤۷
سیس پلاتین	##٦۷/٦۹	##۲۰/۷۹	۱۲/٤٦
عصاره اتانولی	###۷۰/٦۸	##۱۸/۱۲	۱۲/۱۰

p<۰/۰۵، ## p<۰/۰۱ و ### p<۰/۰۰۱

نتایج این مطالعه نشان دادند که عصاره اتانولی گیاه سنبله‌ای خاردار دارای اثرات سمیت سلولی بر رده سلول‌های سرطانی MCF7 در محیط کشت سلولی است. در این راستا، یافته‌های نشان دادند که عصاره هیدروالکلی گیاه سنبله‌ای خاردار از طریق توقف رشد در فازهای G0/G1 و کاهش درصد در فاز S توانسته سبب القای آپوپتوز و توقف چرخه سلولی شود. نتایج این تحقیق نیز بیانگر آن است که اثرات سمیت سلولی عصاره هیدروالکلی گیاه سنبله‌ای خاردار وابسته به دوز می‌باشد و با افزایش غلظت عصاره اثرات سمیت سلولی نیز افزایش می‌یابد.

موافق با یافته‌های تحقیق حاضر، پژوهش‌های دیگر نیز نشان داده‌اند که گیاهان خانواده نعنائیان(*Lamiaceae*) از جمله جنس سنبله(*Stachys*) توانسته‌اند اثرات سمیت سلولی و مهار رشد بر ردهای مختلف سلول‌های سرطانی اعمال کنند. پناهی و همکاران در تحقیقی به بررسی اثرات سیتوتوکسیکی عصاره متانولی گیاه سنبله ای کرکدار (*Stachys pilifera*) و فراکشن‌های آلکالوییدی و ترپنوئیدی آن بر ردهای سلولی کولورکتال HT-29 پرداخته‌اند. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داده است عصاره متانولی سنبله کرکدار و فراکشن‌های آن از طریق مهار مسیرهای NF-kB، NO و فعال‌سازی آنزیم‌های کاسپاز-۸ و کاسپاز-۹ باعث القا آپوپتوز در سلول های سرطانی HT-29 کولورکتال شده است(۲۷). در مطالعه دیگری نشان داده شده است که اسانس گیاه *S.setifera* در مقایسه با داروی دوکسوروبیسین اثر سمیت سلولی قابل توجهی بر رده سلول سرطانی پستان انسانی MCF-7 دارد و اشاره کرده‌اند که بخشی از این سمیت احتمالا مربوط به آلکان‌های هیدروکربونی و ترکیبات ترپنوئیدی گیاه باشد(۲٤).

علاوه بر این در مطالعه دیگری به مقایسه فعالیت سیتوتوکسیک برخی از گونه‌های Stachys در ایران بر ردهای سلول‌های کانسری مختلف از جمله HT-29(کارسینوم روده بزرگ)، سلول‌های Caco-2 (آدنوکارسینوم روده بزرگ)، T-47D(سرطان مجرای پستان) و (NIH3T3 فیبروبلاست جنین موش سوئیسی) پرداخته است. نتایج به دست آمده در این مطالعه نشان داده است که فراکشن کلروفرم *S. setifera* دارای سیتوتوکسیک بالا در رده‌های سلولی سرطانی مورد مطالعه بود و می‌توان آن را برای اجزای فعال دارویی در پژوهش‌های آینده بررسی کرد. در این

مطالعه اشاره شده ترپنوییدها وفلاونوییدهااز ترکیبات اصلی موجود در گیاه سنبله کرکدار است و همچنین، اوژنول به عنوان یکی از ترکیبات اصلی موجود در اسانس این گیاه گزارش شده است. اوژنول به دلیل تشکیل ترکیبات رادیکال فعال می‌تواند باعث سمیت سلولی شود(۲۵).

در مطالعه‌ای دیگر خانوی و همکاران در مطالعه‌ای به بررسی اثرات سایتوتوکسیک چهار گونه از سنبله در ایران بر رده‌های سلولی سرطانی پرداخته اند . بر اساس مقادیر IC50 به دست آمده از این مطالعه رشد و تکثیر سلول‌های HT-29 و T47D به دلیل ترکیبات غیر قطبی موجود در فراکشن‌های کلروفرم و استات اتیل گیاهان *Stachys laxa* و *Stachys turcomanica* به طور قابل توجهی مهار شده است که این مهار رشد را به دلیل ترکیبات آنتی‌اکسیدانی نظیر کارواکرول و تیمول در ترکیبات عصاره گیاهان این جنس(*Stachys*) توجیه کرده است(۲۸).

برخی از داروهای مورد استفاده در شیمی‌درمانی باعث مهار یکی یا چند افاز چرخه سلولی می‌شوند. پژوهش‌های مختلف نشان می‌دهد که برخی از ترکیبات مؤثر گیاهی نیز بر چرخه سلولی رده‌های کانسری بر فاز خاصی از این چرخه تأثیر می گذارند. بعضی از ترکیبات از جمله آنتی‌متابولیت و مهار کننده‌های سنتز نوکلئوتیدها باعث توقف چرخه سلولی در فاز انتقالی G_1/S می‌شوند و بعضی نیز مانند مهارکننده‌های آنزیم‌های توپوایزومرازها چرخه سلولی را در نقطه کنترلی G2/M مهار می‌کنند. به این ترکیبات ضد سرطان، عوامل اختصاصی مهارکننده چرخه سلولی می‌گویند. برای بررسی تأثیر عوامل ضد سرطان بر فازهای چرخه سلولی عمدتاً از تکنیک فلوسیتومتری استفاده شد.. در سلول‌های سرطانی که سرعت تکثیر زیاد است؛ سلول‌ها تمایلی برای ورود به مرحله G_0ندارند. به عبارت دیگر، در سلول‌های سرطانی، تنظیم نقاط کنترل چرخه سلولی دچار اختلال می‌شود و در نتیجه درصد سلول‌ها، به ویژه سلول‌های موجود در فاز G_1/G_0 کاهش و درصد سلول‌های فازS افزایش می‌یابند. در سلول‌های تیمار شده با عصاره سنبله‌ای خاردار درصد سلول‌های موجود در فازهای G1/G0 نسبت به کنترل افزایش و درصد سلول‌های موجود در فاز S کاهش می‌یابد. با توجه به توضیحات ارایه شده و همچنین نتایج حاصل از آنالیز و بررسی‌های فلوسیتومتری، مشخص شد که عصاره سنبله‌ای خاردار نقش عوامل تأثیرگذار اختصاصی بر چرخه سلولی را ایفا می‌کنند. زیرا این عوامل فقط بر فازG1 چرخه سلولی تأثیر دارند و تغییرات مشاهده شده در فاز S به دلیل عدم ورود سلول‌ها به این فاز می‌باشد.

نتایج مربوط به مورفولوژی سلول‌های تحت تیمار یا عصاره سنبله خاردار نشان داد که سلول‌ها تغییراتی مورفولوژیکی از جمله گرانول‌دار شدن سیتوپلاسم، گرد شدن و بزرگ شدن ، ایجاد زوائد بلند از غشاء و به وجود آمدن برآمدگی‌های بسیار ریز در نزدیکی غشاء پیدا کرده‌اند که این اثرات بیان کننده احتمال بروز آپوپتوزیس در این سلول‌ها

مـی‌باشـد. دربـاره مکانیسـم‌هـای احتمـالی تـأثیر سیتوتوکسیک گونه‌هـای مختلـف سـنبله بـر رده‌هـای مختلف سلول‌های سرطانی مکانیسم‌های مختلفی بیـان شده است. چنانچه قبلاً اشاره شد، گیاه سنبله خـاردار حـاوی ترکیبـات فیتوشـیمیایی مختلـف از جملـه ترپنوییدها، فلاونوییدها و اوژنـول مـی‌باشـد(۲۵). بـه دلیل گزارش‌های متعدد در مورد ترکیبات اشاره شـده در گیاه سنبله کـرک‌دار ایـن احتمـال مـی‌رود کـه ایـن عوامل با تأثیر بر فعالیت آنزیم‌های مختلـف در مسـیر آپوپتوزیس و چرخه سـلولی توانسـته‌انـد بـه طریقـی باعث مهار چرخه سلولی درG1 و ورود سلو ل به فـاز G0 شده باشد. عـلاوه بـر ایـن بـه دلیـل گـزارش‌هـای موجود در مورد وجود ترکیباتی مربوط به آلکان‌هـای هیدروکربونی و ترپنوئیـده در ایـن گیـاه ایـن احتمـال وجود دارد که این ترکیبـات بـه طریقـی بـا تـداخل در سـنتز و رونویسـی DNA موجـب مهـار سـنتز DNA و RNAشده است(۲٤).

از محـدودیت‌هـای ایـن پـژوهش مـی‌تـوان بـه کمبود دستگاه‌هـا و امکانـات آنالیزهـای فیتوشـیمیایی گیـاه اشـاره کـرد. پیشـنهاد مـی‌شـود ترکیبـات مهـم سنبله‌ای خاردار جداسازی و تأثیر آنها بر روی سـایر رده‌های سلول سرطانی بررسی شود.

نتیجه گیری

نتـایج مطالعـه حاضـر نشـان داد کـه عصـاره اتانولی سـنبله خـاردار باعـث مهـار تکثیـر و تغییـرات مورفولوژیک و احتمالاً القا آپوپتـوزیس بـا تـأثیر بـر چرخه سلولی در رده سلول‌های سرطانی MCF-7 مـی شود و بنابراین می‌تواند به عنوان گیاه مناسـبی جهـت بررسی بیشتر جهت خالص‌سـازی ترکیبـات مـؤثره و هم‌چنین ارزیابی بر بقیه رده‌های سلول‌هـای سـرطانی در پژوهش‌های برون تنی و درون‌تنی باشد.

تقدیر و تشکر

این مقاله برگرفته طرح تحقیقاتی با کـد اخـلاق IR.YUMS.REC.1394.144 دانشگاه علوم پزشکی یاسوج می‌باشد که با حمایت مـالی ایـن دانشـگاه انجـام شـد. نویسندگان مقاله مراتب تشـکر و قـدردانی خـود را از معاونت پژوهشی دانشـگاه و مرکـز تحقیقـات گیاهـان دارویی که مراحل انجـام ایـن پـژوهش در ایـن مرکـز انجام گرفت، ابراز می‌دارند.

REFERENCES

1.Fisch T, Pury P, Probst N, Bordoni A, Bouchardy C, Frick H, et al. Variation in survival after diagnosis of breast cancer in Switzerland. Annals of Oncology 2005; 16(12): 1882-8.
2.Bray F, McCarron P, Parkin DM. The changing global patterns of female breast cancer incidence and mortality. Breast Cancer Research 2004; 6(6): 1-11.
3.McKinney SM, Sieniek M, Godbole V, Godwin J, Antropova N, Ashrafian H, et al. International evaluation of an AI system for breast cancer screening. Nature 2020; 577(7788): 89-94.
4.Farooq S, Coleman MP. Breast cancer survival in south asian women in england and wales. Journal of Epidemiology & Community Health 2005; 59(5): 402-6.
5.Shibuya K, Mathers CD, Boschi-Pinto C, Lopez AD, Murray CJ. Global and regional estimates of cancer mortality and incidence by site: II. Results for the global burden of disease 2000. BMC cancer 2002; 2(1): 37.
6.Carioli G, Malvezzi M, Rodriguez T, Bertuccio P, Negri E, La Vecchia C. Trends and predictions to 2020 in breast cancer mortality in Europe. The Breast 2017; 36: 89-95.
7.Waks AG, Winer EP. Breast cancer treatment: a review. Jama. 2019;321(3):288-300.
8.Harirchi I, Kolahdoozan S, Karbakhsh M, Chegini N, Mohseni S, Montazeri A, et al. Twenty years of breast cancer in Iran: downstaging without a formal screening program. Annals of Oncology 2011; 22(1): 93-7.
9.Carioli G, Malvezzi M, Rodriguez T, Bertuccio P, Negri E, La Vecchia C. Trends and predictions to 2020 in breast cancer mortality: Americas and Australasia. The Breast 2018; 37: 163-9.
10.Møller P, Wallin H, Knudsen LE. Oxidative stress associated with exercise, psychological stress and life-style factors. Chemico-Biological Interactions 1996; 102(1): 17-36.
11.Namiki M. Antioxidants/antimutagens in food. Critical Reviews in Food Science & Nutrition. 1990; 29(4): 273-300.
12.Oh DY, Bang YJ. HER2-targeted therapies—a role beyond breast cancer. Nature Reviews Clinical Oncology 2020; 17(1): 33-48.
13.Chhetri D, Parajuli P, Subba G. Antidiabetic plants used by Sikkim and darjeeling himalayan tribes, India. Journal of Ethnopharmacology 2005; 99(2): 199-202.
14.Mavaddat N, Michailidou K, Dennis J, Lush M, Fachal L, Lee A, et al. Polygenic risk scores for prediction of breast cancer and breast cancer subtypes. The American Journal of Human Genetics 2019; 104(1): 21-34.
15.Panahi Kokhdan E, Sadeghi H, Ghafoori H, Danaei N, Salaminia S, Aghamaali M. Apoptotic effect of the stachys pilifera bent plant extracts on colorectal cancer cell line(HT-29). Armaghane Danesh 2019; 24(1): 17-30.
16.Jassbi AR, Miri R, Asadollahi M, Javanmardi N, Firuzi O. Cytotoxic, antioxidant and antimicrobial effects of nine species of woundwort (Stachys) plants. Pharmaceutical Biology 2014; 52(1): 62-7.
17.Tomou EM, Barda C, Skaltsa H. Genus Stachys: A review of traditional uses, phytochemistry and bioactivity. Medicines 2020; 7(10): 63.
18.Javidnia K, Miri R, Azarpira A, Tabaei S. Composition of the essential oil of Stachys setifera CA Mey ssp. iranica growing in Iran. Flavour and Fragrance Journal 2003;18(4): 299-300.
19.Farjam MH, Khalili M, Rustayian A, Javidnia K, Izadi S. Biological activity of the n-butanolic extract of Stachys pilifera. African Journal of Microbiology Research 2011; 5(28): 5115-9.
20.Sadeghi H, Zarezade V, Sadeghi H, Toori MA, Barmak MJ, Azizi A, et al. Anti-inflammatory activity of stachys pilifera benth. Iranian Red Crescent Medical Journal 2014; 16(9): 20.
21.Sadeghi H, Mansourian M, Panahi kokhdan E, Salehpour Z, Sadati I, Abbaszadeh Goudarzi K, et al. Antioxidant and protective effect of Stachys pilifera Benth against nephrotoxicity induced by cisplatin in rats. Journal of Food Biochemistry 2020; 44(5): e13190.
22.Panahi Kokhdan E, Ahmadi K, Sadeghi H, Sadeghi H, Dadgary F, Danaei N, et al. Hepatoprotective effect of stachys pilifera ethanol extract in carbon tetrachloride-induce hepatotoxicity in rats. Pharmaceutical Biology 2017; 55(1): 1389-93.
23.Tundis R, Peruzzi L, Menichini F. Phytochemical and biological studies of Stachys species in relation to chemotaxonomy: a review. Phytochemistry 2014; 102: 7-39.
24. Sadeghi H, Azarmehr N, Mansourian M, Khalvati B, Kokhdan E, Salehpour Z, et al. The hydroalcoholic extract of rosmarinus officinalis attenuates liver damage after bile-duct ligation in rats. JAPS: Journal of Animal & Plant Sciences 2021; 31(2): 432-440.

25.Tahmasebi M, Sadeghi H, Nazem H, Panahi Kokhdan E, Omidifar N. Hepatoprotective Effects of Berberis Vulgaris Leaf Extract on Carbon Tetrachloride-Induced Hepatotoxicity in rats. Journal of Education and Health Promotion 2018; 7: 147.
26.Sadeghi H, Mansourian M, Panahi kokhdan E, Salehpour Z, Sadati I, Abbaszadeh-Goudarzi K, et al. Antioxidant and protective effect of Stachys pilifera Benth against nephrotoxicity induced by cisplatin in rats. Journal of Food Biochemistry 2020; 44(5): e13190.
27.Kokhdan EP, Sadeghi H, Ghafoori H, Sadeghi H, Danaei N, Javadian H, et al. Cytotoxic effect of methanolic extract, alkaloid and terpenoid fractions of Stachys pilifera against HT-29 cell line. Research in Pharmaceutical Sciences 2018;13(5): 404.
28.Tahmasebi M, Sadeghi H, Nazem H, Panahi Kokhdan E, Omidifar N, Khanavi M. Investigation of cytotoxic activity in four Stachys species from Iran. Iranian Journal of Pharmaceutical Research: IJPR 2012; 11(2): 589.

Armaghane-danesh, Yasuj University of Medical Sciences Journal (YUMSJ)

Original Article

Cytotoxic Effect of Hydroalcoholic Extract of *Stachys setifera* on MCF-7 Human Breast Cancer Cell Line

Panahi Kokhdan E, Sadeghi H, Danaei N, Sadeghi H*

Medicinal Plants Research Center, Yasuj University of Medical Sciences, Yasuj, Iran

Received: 09 Des 2020 Accepted: 15 Mars 2021

Abstract:

Background & aim: Breast cancer is the most common cancer among women. Today, compounds derived from medicinal plants are used in the treatment of various cancers. Despite reports of antitumor effects on some *Stachys* species, the activity of *Stachys setifera* extract on breast cancer cell lines has not been studied. Therefore, the aim of the present study was to investigate the effect of hydroalcoholic extract of *Stachys setifera* on MCF-7 cancer cell proliferation.

Methods: In the present experimental study conducted in 2019, after culturing MCF-7 cancer cells, the cells were incubated with different concentrations *Stachys setifera* extract and cisplatin (as positive control) for 24 hours. Cancer cell survival and inhibitory concentration of 50% (IC50) were assessed using MTT colorimetric method. The effects of extract and cisplatin on cell survival and cell cycle were evaluated by flow cytometry. The collected data were analyzed using one-way analysis of variance and Tukey's post hoc test. The significance level was considered $p < 0.05$.

Results: The IC50 results of hydroalcoholic extract of *Stachys setifera* and cisplatin on MCF-7 cells after 24 hours were 827.52 and 4.34 µg / ml, respectively. Flow cytometry results showed that *Stachys setifera* extract and cisplatin stopped the growth of MCF-7 cells in G0 / G1 phase and the percentage of cells in control cells, extract and cisplatin (42.94, 50.68 and 59.11), respectively. The *Stachys setifera* extract also caused some morphological changes such as granulation of the cytoplasm and rounding and enlargement of cells in the MCF-7 cancer cell

Conclusion: The results indicated that *Stachys setifera* hydroalcoholic extract inhibited the proliferation of MCF-7 breast cancer cells and was able to exert its cytotoxic effects by affecting cell cycle and induce morphological changes. Therefore, this plant can be a suitable candidate to purify its main compounds for further study on proliferation of breast cancer cells. The results also revealed that the hydroalcoholic extract of *Stachys setifera* inhibited the proliferation of MCF-7 breast cancer cells and was able to enter the cells in the apoptotic phase. Therefore, this plant can be a suitable candidate for further study to prevent the proliferation of breast cancer.

Keywords: *Cisplatin, Stachys Setifera,* Anticancer

***Corresponding author: Sadeghi H,** Medicinal Plants Research Center, Yasuj University of Medical Sciences, Yasuj, Iran.
Email: h_sadeghi_m@yahoo.com

Please cite this article as follows:
Panahi Kokhdan E, Sadeghi H, Danaei N, Sadeghi H. Cytotoxic Effect of Hydroalcoholic Extract of *Stachys setifera* on MCF-7 Human Breast Cancer Cell Line. Armaghane-danesh 2021; 26(1): 33-44.