

بررسی اثر ضد سرطانی عصاره هیدروالکلی دانه گیاه اسپند بر روی سلول های کارسینومای اپی تلیال گردن رحم انسان

فروزان فروزنده^{۱*}، سعیده سلیمی^۲، نوشین نقش^۱، نسیم زمانی^۱، سمیه جهانی^۳

^۱دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان، اصفهان، ایران؛ ^۲مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، زاهدان، ایران؛

^۳مرکز تحقیقات بیماری های عفونی و گرمسیری، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، زاهدان، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۲/۳/۴ تاریخ پذیرش: ۹۲/۱۰/۱۵

چکیده:

زمینه و هدف: سرطان دهانه رحم دومین سرطان شایع در زنان می باشد. اسپند گیاهی طبی بوده و یکی از فراورده های بومی به کار رفته جهت درمان سرطان در ایران می باشد. این گیاه دارای خواص ضد باکتریایی، ضد سرطانی، ضد قارچ، ضد زخم معده می باشد. این مطالعه با هدف بررسی اثر ضد سرطانی عصاره هیدروالکلی دانه گیاه اسپند انجام شده است.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی پس از کشت و تکثیر سلول های مشتق شده از بافت اپیتلیال گردن رحم انسان (HeLa)، این سلول ها در مجاورت دوزهای مختلف عصاره هیدروالکلی دانه اسپند (۱۲،۲۵،۵۰/۵ و ۱۰۰ $\mu\text{g/ml}$) قرار گرفتند و به مدت ۲۴،۴۸ و ۷۲ ساعت انکوبه شدند. پس از پایان مدت انکوباسیون، از روش تغییر یافته آزمون رنگ سنجی MTT (۳- (۴ و ۵ دی متیل تiazول ۲- ایل)-۲،۵- دی فنیل ترازولیوم برآمد) جهت تعیین سمیت سلولی عصاره استفاده شد.

یافته ها: نتایج حاصل از تست MTT نشان داد که این عصاره اثر ضد سرطانی وابسته به دوز و زمان بر سلول های HeLa دارد، به طوری که با افزایش غلظت عصاره و انکوباسیون ۷۲ ساعت بیشترین درصد مرگ سلولی مشاهده شد ($P < 0/001$). غلظت مهارکنندگی ۵۰ درصد رشد سلول ها (IC_{50}) برای سلول های سرطانی در زمان ۲۴ ساعت $12/5 \mu\text{g/ml}$ به دست آمد.

نتیجه گیری: عصاره اسپند با اثر وابسته به دوز و زمان بر سلول های سرطانی HeLa می تواند باعث مهار رشد این سلول ها شود؛ لذا به نظر می رسد با تحقیقات بیشتر در آینده، می توان از ترکیبات آن در درمان سرطان بهره جست.

واژه های کلیدی: عصاره هیدروالکلی، اسپند، سرطان گردن رحم.

مقدمه:

به علت همراه داشتن ترکیبات دیگری همراه با ترکیب با اثر دارویی خاص از عوارض جانبی کمتری نسبت به داروهای شیمیایی برخوردارند (۲). بسیاری از گیاهان و ادویه ها حاوی عواملی برای جلوگیری از سرطان هستند که می توانند اثرات خود را در مراحل مختلف شروع و رشد سلول های سرطانی اعمال کنند (۳). هدف اصلی در پیشگیری از سرطان توسط مواد طبیعی یا شیمیایی کند کردن و یا مهار فرآیند سرطان زایی می باشد. این نگرش به طور هدفمند روی مسیرهای داخل سلولی

پس از سرطان سینه، سرطان گردن رحم شایع ترین سرطان در زنان است. این سرطان بر اثر ابتلا به ویروس پاپیلومای انسانی ایجاد و از طریق تماس جنسی با فرد مبتلا منتقل می شود (۱). از آنجا که بسیاری از داروهای شیمیایی باعث اختلالات گوارشی، آسیب های کلیوی و ... می شوند، دانشمندان به دنبال یافتن داروهای هستند که عوارض جانبی کمتری نسبت به داروهای شیمیایی داشته باشند، در این راستا گیاهان دارویی مورد توجه بسیار قرار گرفته اند. گیاهان دارویی

غیر طبیعی که موجب عملکرد غیر طبیعی سلولی شده اند، متمرکز می باشد (۴).

کشت سلول یکی از روش های نوین مطالعه و تحقیق می باشد و تقریباً در همه رشته های علمی نشانه هایی از آن یافت می شود. یکی از اهداف کشت سلول مطالعه سلول ها از نظر نحوه رشد، نیازهای غذایی و علل توقف رشد آن ها است. بنابراین برای مطالعه چرخه سلولی، توسعه روش های کنترل رشد سلول های سرطانی و تعدیل بیان ژن ها نیاز به کشت این سلول ها در محیط خارج بدن است (۵).

در طب سنتی از عصاره های گیاهی اسپند جهت افزایش ترشح شیر، دفع کرم های روده، درمان روماتیسم، افزایش قدرت جنسی و نیز به عنوان یک مسکن جهت رفع درد معده استفاده می شد، و از طرفی یکی از فرآورده های گیاهی بومی به کار رفته جهت درمان سرطان در ایران است (۶). این گیاه با نام علمی *Pegauum harmala* L گیاهی پایا و بدون کرک از خانواده Zygophyllaceae است. این گیاه در مناطق مدیترانه ای شمال آفریقا، ترکیه، سوریه می روید. این گیاه معمولاً در اراضی بایر می روید. برگ های این گیاه به رنگ سبز روشن پر آب با تقسیمات باریک، دراز و نامنظم است. ساقه این گیاه زیگراگی، چوبی و حاوی شاخه های متعدد است. میوه آن به صورت کپسول سه خانه و به شکل کروی می باشد هر خانه کپسول حاوی تعداد زیادی دانه است. دانه های آن زاویه دار، قهوه ای تیره، با بوی کاملاً مشخص است (۶، ۷). مطالعات مختلف فعالیت

فارماکولوژیک متعددی برای اسپند در نظر گرفته اند که از این جمله اثرات ضد میکروبی، ضد تومور و مهار کننده فعالیت مونو آمینو اکسیدازی آن می باشد (۸). دانه های این گیاه غنی از کربوهیدرات، لیپید، پروتئین، املاح معدنی، آلکالوئیدها و اسیدهای آمینه می باشد، از جمله آلکالوئیدهای مهم آن می توان به هارمالین، هارمین، هارمالول و وازیسین اشاره کرد که دارای اهمیت فراوان صنعتی و پزشکی هستند (۹). تحقیقات نشان داده اند که دانه های اسپند اثرات ضد تشنج دارد. استریکنین از معمول ترین ماده تشنج زا است که در ایجاد صرع در حیوانات آزمایشگاهی کاربرد دارد. در یک مطالعه بر روی موش های

سوری تشنج در حیوانات دریافت کننده استریکنین مورد ارزیابی قرار گرفت و سپس تجویز عصاره متانولی اسپند به صورت خوراکی با دوزهای مختلف به مدت ۱۵ روز انجام شد. نتایج حاصل از این مطالعه بیانگر آن بود که دانه های اسپند اثرات مهاری بر روند تشنج داشته است (۱۰). همچنین دانه گیاه اسپند با وجود ترکیبات موثری چون آلکالوئیدهای هارمالین، هارمین و هارمالول دارای خواص ضد قارچی و ضد باکتری می باشد. به طوری که در یک مطالعه مشخص شده عصاره این گیاه بر روی گونه های کاندیدا پاراپسیلویزیس، کاندیدا کفیر، کاندیدا دوبلینسیس، کاندیدا تروپیکالیس و کاندیدا گلابراتا اثر مهارکنندگی دارد (۱۱). اثرات دارویی عصاره اسپند بر سرطان در مطالعات بالینی و سلولی مختلف مشاهده شده است، مطالعات قبلی نشان داده است که هارمالول و مشتقات آلکالوئیدی اسپند از طریق جلوگیری از ساخته شدن DNA و تقسیم سلولی مانع از رشد سلول های سرطانی می شوند (۱۲). سلول های Hela رده ای از سلول سرطانی انسانی است که در سال ۱۹۵۱ از سرطان گردن رحم جدا شد و اکنون در بسیاری از مطالعات بر روی سلول های سرطانی مورد استفاده قرار می گیرد (۱۳). مطالعه حاضر با هدف بررسی اثر ضد سرطانی عصاره ی هیدروالکلی اسپند بر تکثیر سلول های رده سرطان گردن رحم انجام شد.

روش بررسی:

در این مطالعه تجربی آزمایشگاهی، دانه اسپند از پژوهشکده گیاهان دارویی کرج تهیه و استخراج عصاره هیدروالکلی آن به روش روتاری انجام شد. برای عصاره گیری ابتدا دانه اسپند را که به صورت پودر در آمده بود، داخل استوانه ریخته و سپس حلال روی آن ریخته شد، حلال استفاده شده الکل اتانول ۹۰ درصد بود که همراه با آب مخلوط شده بود این حلال هیدروالکلی به اندازه ای استفاده شد که روی پودر اسپند را کاملاً پوشاند. سپس محلول حاصل در دستگاه آون که روی ۵۰ درجه تنظیم شده بود، قرار داده شد. پس از ۷۲ ساعت که محلول در دستگاه

آون ماند و مطمئن شدیم ماده موثر اسپند در حلال آزاد شده است، محلول را از دستگاه خارج کرده و از کاغذ صافی عبور داده شد. سپس محلول صاف شده کم کم و در چند نوبت در دستگاه روتاری استریک قرار داده شد. با روشن شدن دستگاه الکل از محلول جدا شده و مایعی به دست آمد که بعد از خشک شدن همان عصاره اسپند بود (۱۴). عصاره خشک شده برای تهیه غلظت های مختلف (۵/۱۲، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) در dimethylsulfoxide (DMSO، مرک آلمان) حل شد.

سلول های اپی تلیال گردن رحم (رده سلولی HeLa) از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه و در محیط (RPMI1640= Roswell Park Memorial Institute 1640) با ۱۰٪ FBS و همراه با آنتی بیوتیک های پنی سیلین و استرپتومایسین در انکوباتور حاوی ۵٪ CO₂ در فلاسک (T25) کشت داده شدند. بعد از طی سه پاساژ به منظور خالص سازی، از سلول ها برای انجام مراحل بعد استفاده شد. شمارش سلولی و تعداد سلول های زنده با لام هموسیتمتر با استفاده از تریپان بلو انجام شد.

بررسی اثر سیتوتوکسیک عصاره با استفاده از روش تغییر یافته آزمون رنگ سنجی MTT (۳- (۴ و ۵ دی متیل تiazول ۲- ایل) - ۲، ۵- دی فنیل تترازولیموم برماید) تعیین گردید. در این روش MTT که زرد رنگ است توسط آنزیم های دهیدروژناز موجود در میتوکندری سلول های فعال به ترکیب غیر محلول و ارغوانی رنگ فورمازان تبدیل می شود. جذب این ترکیب پس از حل شدن در ۵۷۰-۵۴۰ نانومتر قابل اندازه گیری است (۶).

پس از گذشت دو روز و پوشیده شدن بستر فلاسک از سلول، لایه سلول چسبنده به کف فلاسک به روش آنزیمی و با استفاده از تریپسین - EDTA (۵٪) (Ethylenediamine tetraacetic acid) جدا گردید و پس از انتقال به لوله های آزمایش استریل به مدت ۵ دقیقه با دور ۲۰۰۰rpm سانتریفیوژ شد. سپس سلول ها مجدداً با کمک پیپت پاستور در محیط کشت تازه معلق شده و از آن ها سوسپانسیون سلولی (۱۰۶ μg/ml) تهیه

گردید. ۴۰ میکرولیتر از این سوسپانسیون سلولی (معادل ۴×۱۰^۴ سلول) درون چاهک های پلیت ۹۶ خانه ای کف صاف (ویژه کشت سلول) ریخته شد. سپس حجم نهایی هر چاهک با محیط ۱۰ درصد FBS به ۲۰۰ میکرو لیتر رسید.

ردیف اول حاوی سوسپانسیون سلولی به عنوان کنترل منفی (شاهد) در نظر گرفته شد. به ردیف دوم دوکسورویسین با غلظت ۲۰۰ μg/ml اضافه کرده و این ردیف به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد. بعد از ۲۴-۱۸ ساعت انکوبه کردن جهت خارج شدن سلول ها از استرس ناشی از تریپسین شدن، به آرامی و با دقت محیط رویی خارج شد و به همه ردیف ها محیط جدید همراه با غلظت مختلف عصاره (به ردیف های کنترل منفی و مثبت تنها محیط جدید) اضافه گردید، به طوری که عصاره رقیق شده با غلظت های ۵/۵۰، ۲۵، ۱۲ و ۱۰۰ میکرو گرم بر میلی لیتر به ترتیب به ردیف های سوم تا ششم اضافه شد. پلیت به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در انکوباتور CO₂ قرار گرفت. بعد از طی زمان انکوباسیون، پلیت را از داخل انکوباتور بیرون آورده و به همه چاهک ها MTT (شرکت سیگما) با غلظت ۲۰ μl اضافه شد، و به مدت ۳ ساعت در انکوباتور قرار گرفت. سپس به آرامی محیط رویی را برداشته و ۱۰۰ μl DMSO به چاهک ها اضافه و پیتاژ شد تا کریستال های فورمازان حل شود.

میزان جذب نوری (OD) بر حسب شدت رنگ آبی فورمازان در طول موج ۵۴۰ نانومتر توسط Eliza reader خوانده شد. به منظور تبدیل OD به درصد سلول های زنده از فرمول زیر استفاده شد و درصد حیات سلول ها در مورد هر غلظت، پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت محاسبه گردید (۱۵).

OD × ۱۰۰ / OD شاهد = درصد توانایی زیستی
غلظتی از ترکیبات مورد آزمایش که درصد حیات سلولی را به نصف تقلیل دهد به عنوان

در انکوباسیون ۴۸ ساعته کاهش درصد زیستایی وابسته به دوز مشاهده شد. به طوری که درصد زیستایی از ۴۰/۴۲ درصد (در غلظت ۱۲/۵ میکروگرم بر میلی لیتر) به ۱۸/۸۲ درصد (در غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) کاهش یافت ($P < 0/001$)، نمودار و جدول شماره ۱). در انکوباسیون ۷۲ ساعته نیز کاهش درصد زیستایی مشاهده شد به طوری که درصد زیستایی از ۳۸/۳۳ درصد (در غلظت ۱۲/۵ میکروگرم بر میلی لیتر) به ۱۶/۷۲ درصد (در غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) کاهش یافت که از نظر آماری معنی دار بود ($P < 0/001$)، نمودار و جدول شماره ۱).

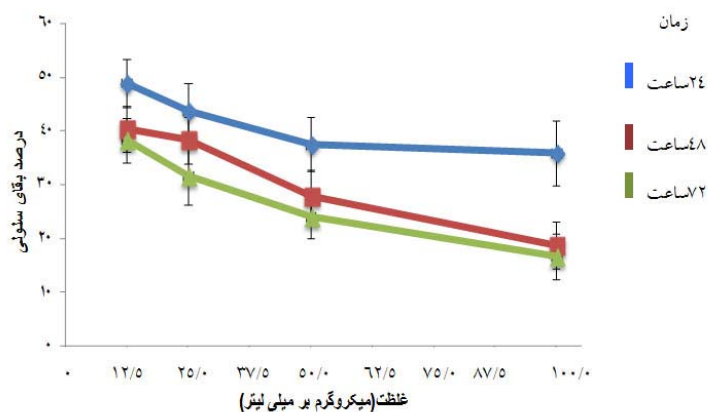
آنالیز نتایج با استفاده از تست ANOVA اختلاف معنی داری در تمام غلظت ها و در هر سه زمان در این رده سلولی نشان داد ($P < 0/001$)، جدول شماره ۱). غلظت مهارکنندگی ۵۰ درصد رشد سلول ها (IC_{50}) برای سلول های سرطانی ۱۲/۵ میکروگرم بر میلی لیتر به دست آمد. در زمان ۴۸ و ۷۲ ساعت با توجه به افزایش زمان انکوباسیون در تمامی غلظت ها، تعداد سلول های کشته شده بیش از ۵۰ درصد سلول های زنده بوده و در نتیجه برای این زمان IC_{50} مشاهده نگردید.

IC_{50} (The half maximal inhibitory concentration) در نظر گرفته شد. آنالیز آماری نتایج تجربی و تعیین IC_{50} با نرم افزار SPSS و آزمون آماری آنالیز واریانس یک راهه (ANOVA) انجام گردید.

یافته ها:

نتایج نشان داد، سلول های سرطانی (HeLa) تحت تأثیر عصاره تفاوت های بارز و وابسته به دوز عصاره را نشان دادند. به طوری که به تدریج و با افزایش دوز کمترین درصد زیستایی مشاهده شد؛ اما سلول های سرطانی بدون تأثیر عصاره تغییرات مشخصی را نشان ندادند.

آنالیز آماری نتایج نشان داد که در زمان انکوباسیون ۲۴ ساعته درصد زیستایی با افزایش دوز عصاره اسپند در رده سلولی HeLa کاهش یافت. به طوری که درصد زیستایی از ۴۸/۹۷ درصد (در غلظت ۱۲/۵ میکروگرم بر میلی لیتر) به ۳۵/۹۲ درصد (در غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) کاهش یافت که این اختلاف از نظر آماری معنی دار بود ($P = 0/016$)، نمودار و جدول شماره ۱).



نمودار شماره ۱: تأثیر غلظت های مختلف عصاره گیاه اسپند، بر تکثیر سلول های رده سرطان گردن رحم در

زمان های مختلف با استفاده روش MTT

جدول شماره ۱: تأثیر غلظت‌های مختلف عصاره گیاه اسپند، بر تکثیر سلول‌های رده سرطان گردن رحم در زمان‌های مختلف با استفاده روش MTT

غلظت عصاره*	زمان انکوباسیون	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت	P	کل
۱۲/۵	۴/۴۳±۴۸/۹۷	۴۰/۴۲±۴/۱۹	۳۸/۳۳±۴/۲۰	۰/۰۱۵	۴۲/۵۷±۶/۱۷	
۲۵	۴۳/۶۷±۵/۳۰	۳۸/۳۳±۴/۳۱	۳۱/۷۱±۵/۴۵	۰/۰۲۶	۳۷/۹۰±۶/۸۵	
۵۰	۳۷/۵۵±۵/۰۶	۲۷/۸۷±۴/۸۸	۲۴/۰۴±۳/۹۶	۰/۰۰۷	۲۹/۸۲±۷/۲۸	
۱۰۰	۳۵/۹۲±۶/۱۲	۱۸/۸۲±۴/۳۲	۱۶/۷۲±۴/۳۲	۰/۰۰۱	۲۳/۸۲±۱۰/۰۵	
P	۰/۰۱۶	<۰/۰۰۱	<۰/۰۰۱	<۰/۰۰۱**	<۰/۰۰۱	

مقادیر بر حسب میانگین \pm انحراف معیار گزارش شده است؛ *غلظت عصاره بر حسب میلی گرم بر میلی لیتر است، **مقایسه اثر متقابل زمان و غلظت.

بحث:

مختلف عصاره هیدرو الکلی اسپند و در دوره‌های زمانی متفاوت در مطالعات دیگری که در این زمینه انجام شده نیز نشان داده شده است. از جمله نتایج مطالعات Hussam و همکارانش در سال ۲۰۱۰ بر روی رده سلولی Hep-2 (سرطان حنجره) نشان داد که کاهش معنی‌داری در تعداد سلول‌های Hep-2 تیمار شده با عصاره اسپند مشاهده شد و با افزایش دوز و زمان عصاره تعداد سلول‌ها به تدریج کاهش بیشتری را نشان داد. بر طبق این نتایج Hussam و همکارانش پیشنهاد کردند که عصاره اسپند می‌تواند اثر سیتوتوکسیک بر سلول‌های Hep-2 داشته و می‌تواند به صورت وابسته به دوز و زمان بر روند تکثیر سلول‌ها تأثیر بگذارد (۱۸). نتایج حاصل از تحقیق حاضر نیز نشان داد عصاره اسپند به صورت وابسته به دوز و زمان موجب کاهش تعداد سلول‌های سرطانی در گروه‌های تیماری نسبت به گروه کنترل شد. Hamsa و همکارانش در سال ۲۰۱۱ توانایی زیستی سلول‌های ملانوم پوست B16F- (۱۰) را با دوزهای مختلف عصاره اسپند بررسی و به این نتیجه رسیدند که عصاره اسپند منجر به کاهش توانایی زیستی این سلول‌ها می‌گردد. بر اساس نتایج آزمون MTT نشانه اولیه در سمیت با عصاره اسپند بر پایه‌ی اختلال در

بسیاری از گیاهان و ادویه جات دارای خاصیت فارماکولوژیک و بیوشیمیایی شامل خاصیت آنتی اکسیدانی ضد التهاب بوده که به نظر می‌رسد در فعالیت‌های ضد بدخیمی و ضد جهش‌زایی سلولی دخالت دارند. با توجه به این که پیشرفت سرطان ارتباط بسیار نزدیکی با التهاب و استرس اکسیداتیو دارد، ترکیبی که خواص ضد التهابی یا آنتی اکسیدانی داشته باشد، می‌تواند یک عامل ضد بدخیمی سلولی باشد (۱۶). مطالعات نشان داده است که عصاره اسپند دارای اثرات سایتوتوکسیک بر روی سلول‌های جدا شده از سرطان به صورت *in vitro* می‌باشد. در واقع عصاره اسپند با تأثیر بر فرآیندهای متابولیکی مختلف در سلول مانند متابولیسم انرژی و سنتز پروتئین ممکن است به وسیله‌ی تداخل با مکانیسم‌های ژنتیکی بر فعالیت سلول تأثیر بگذارد (۱۷). ترکیبات فعال اسپند عمدتاً شامل آلکالوئیدهایی است که به ویژه در دانه و ریشه گیاه تجمع می‌یابند. بنا کاربولین‌ها نظیر هارمالین و هارمین به تنهایی بالغ بر ۶۰ درصد آلکالوئیدهای موجود در دانه را تشکیل می‌دهند. این آلکالوئیدها اثرات ضد سرطانی داشته و این اثر در چندین رده سلولی سرطانی گزارش شده است (۸). کاهش توانایی زیستی سلول‌ها در تیمار با دوزهای

مطالب ارائه شده در نتایج می توان ادعا کرد که این عصاره با اثرات سیتوتوکسیک (وابسته به دوز و زمان) بر سلول های سرطانی، سبب مرگ این سلول ها می شود. به طوری که با افزایش دوز و زمان عصاره، رشد سلول های سرطانی، بیشتر مهار گردید. با توجه به نتایج حاصل از این مطالعه و سایر مطالعات انجام شده بر روی عصاره اسپند، پیشنهاد می گردد مطالعات ضروری در موارد ذیل صورت گیرد: ۱- تعیین فعالیت بیولوژیکی ترکیبات آنالیز شده اسپند، ۲- تحقیق و بررسی بر روی مسیرهایی که خواص دارویی ضد سرطانی اسپند را اثبات می کند، ۳- بررسی اثرات عصاره های متانولی و استونی از این گیاه و مقایسه آن ها با عصاره هیدروالکلی، اسپند، ۴- به دست آوردن دوز داروی موثر از این گیاه برای درمان سرطان گردن رحم.

نتیجه گیری:

نتایج این مطالعه نشان می دهد که عصاره گیاه اسپند دارای اثر ضد سرطانی بوده که با اثر وابسته به دوز و زمان بر سلول های سرطانی HeLa می تواند باعث مهار رشد این سلول ها شود که این اثر مهاری با دوز و زمان تیمار این عصاره رابطه مستقیم دارد.

تشکر و قدردانی:

بدینوسیله از همکاران محترم در مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی زاهدان و همچنین دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان که در این طرح پژوهشی ما را یاری نمودند سپاسگزاری می گردد.

زنجیره تنفسی میتوکندری می باشد که باعث آزاد شدن فاکتورهای القا کننده آپوپتوزیس می گردد، این فاکتورها ممکن است باعث قطعه قطعه شدن DNA در هسته سلول شود. افزایش تولید آنزیم های پروتئازی نظیر کاسپاز ۳، ۸، ۹ منجر به تغییرات مختلفی در سلول به خصوص در متابولیسم سلول می گردد. در واقع مشخص شده که آنزیم های پروتئازی وظایف مهمی را در مراحل اولیه آپوپتوز بازی می کنند. طبق نتایج Hamsa و همکارانش عصاره اسپند فعالیت آنزیم های پروتئازی را در سلول های B16F-10 تحریک می کند، از طرفی آسیب DNA و فعال شدن کاسپازها به موازات هم هستند که به وسیله سمیت با عصاره اسپند ایجاد می شوند و در نهایت می توانند باعث کاهش توانایی زیستی سلول ها گردد (۱۹). احتمالاً در تحقیق حاضر نیز سمیت با عصاره اسپند باعث تحریک فعالیت آنزیم های پروتئازی و افزایش تولید گونه های فعال اکسیژن (Reactive Oxygen Species= ROS) شده و از طریق فعال کردن کاسپازها باعث آسیب شدید به سلول می شوند.

نتایج حاصل از تحقیقات دانشمندان دیگر نیز کاهش توانایی زیستی سلول های تحت تیمار با عصاره اسپند را تأیید کردند؛ از جمله در مطالعات Jimenez و همکارانش در سال ۲۰۰۸ معلوم شد که عصاره اسپند موجب کاهش معنی داری در توانایی زیستی سلول های HeLa (کارسینوما اپیتلیال گردن رحم)، C33A (کارسینوما گردن رحم) و SW480 (کارسینوما روده) می گردد. طبق مطالعات Jimenez و همکارانش سمیت با عصاره اسپند سبب کاهش توانایی زیستی سلول ها می گردد (۲۰). با نظر اجمالی به نمودارها و

منابع:

1. Cox J. Human papiloma virus testing in primary cervical screening and abnormal papaniculaou management. *Obstet Gynecol Surv.* 2006; 6(1): 515-25.
2. Lazhiry A, Vlaskovic J. Herb plants. Translated to Persian by: Zaman S. Tehran: Ghoghnoos Pub; 1993.
3. Abdullaev F. Plant-derived agents cancer. *J Pharmacol.* 2001; 15(3): 345-54.

4. Aggarwal BB, Sundaram C, Malani N, Ichikawa H. Curcumin: the Indian solid gold. *Adv Exp Med Biol.* 2007; 595: 1-75.
5. Khorrami zadeh M, Falak R. Principles of basic principles of cell culture techniques. 4th ed. Tehran: Tehran University of Medical Sciences Pub; 2009.
6. Sobhani AM, Ebrahimi SA, Mahmoudian M. An in vitro evaluation of human DNA topoisomerase I inhibition by Peganum harmala L. seeds extract and its beta-carboline alkaloids. *J Pharm Pharm Sci.* 2002; 5(1): 19-23.
7. Asgarpanah J, Ramezanloo F. Chemistry, pharmacology and medicinal properties of Peganum harmala L. *J African of Pharmacy and Pharmacology.* 2012; 6(22):1573-80.
8. Shahverdi AR, Ostad SN, Khodae S, Bitarafan L, Monsef-Esfahani HR, Jamalifar H, et al. Antimicrobial and cytotoxicity potential of Peganum harmala smoke. *J Pharmacognosy magazine.* 2008; 4(15): 236-40.
9. Sharbatkori M. Study of cidal effect of alcoholic extract of Peganum harmala seeds on *Echinococcus granulosus* protoscolex. *Tehran Univ Med J.* 2007; 7(2):101-8.
10. Hashemi A, Delazar A, Famarazi A, Nayebi A, Rezazadeh H. Study of the methanolic extract of Peganum seeds on convulsion induced by Strychnine in Swiss mice. *J Pharmaceut Sci.* 2009; 15(3): 257-62.
11. Diba K. Evaluation of inhibitory harmala seed alcoholic extract on *Candida* species and *aspergillus* peganum harmala in vitro. *Urmia Med J.* 2009; 20(4): 271-277.
12. Boeira J, Dasilva J, Erdtmann B, Henriques J. Genotoxic effect of alkaloid harmane and harmine asses by comet assay in mammalian cell in vitro. *J Pharmacol Toxicol.* 2001; 89(6): 287-94.
13. Ghorbani A, Ghorbanihesari T, Mortazavian M. Effect of aqueous extract - alcohol b and its fractions brtksyr cervical cancer cells. *Iran J Obstet Gynecol Infertil.* 2012; 15 (22): 9-16.
14. Samsamshriat H. Extraction and extraction of medicinal plants and methods for their identification. Tehran: Tehran Pub; 1993.
15. Zaker F. Anti tumoral and differentiation effects of alkaloids of harmine andharmaline on leukaemic cells treated with atra and G-CSF. *Razi J Med Sci.* 2004; 10(38):869-876.
16. Afshari J, Brook A, Moheghi N. The cytotoxic effect of zingiber afficinale in breast cancer (MCF7) cell line. *Ofogh-e-Danesh.* 2011; 4(17): 28-33.
17. Hicham B, Miguel L, Maria D. Cytotoxic activity of methanolic extract and two alkaloids extracted from seeds of Peganum harmala L. *J Nat Remedies.* 2005; 10(5):141-45.
18. Hussam Eden M, Maeda H, Zaid Abdul A. Cytotoxic Effect of Peganum harmala L. Extractand Induction of Apoptosis on Cancerous Cell Line. *Iraqi J Cancer Med Genet.* 2010; 15(3): 1-16.
19. Hamsa TP, Kuttan G. Harmine activates intrinsic and extrinsic pathways of apoptosis in B16F-10 melanoma. *J Chin Med.* 2011; 6(1): 11.
20. Jimenez J, Rivero n L, Rodriguez R. Cytotoxicity of the b-carboline alkaloids harmine and harmaline in human cell assays in vitro. *Exp Mol Pathol.* 2008; 60(4): 381-89.

Evaluation of anti-cancer effect of *Peganum harmala* L hydroalcoholic extract on human cervical carcinoma epithelial cell line

Forouzandeh F^{1*}, Salimi S², Naghsh N¹, Zamani N¹, Jahani S³

¹Islamic Azad University, Falavarjan Branch, Isfahan, I.R. Iran; ²Cellular and Molecular Research Center, Zahedan University of Medical Sciences, Zahedan, I.R. Iran; ³Infectious Diseases and Tropical Medicine Research Center, Zahedan University of Medical Sciences, Zahedan, I.R. Iran.

Received: 25/May/2013 Accepted: 5/Jan/2014

Background and aims: Cervix cancer is the second most common cancer in women. *Peganum harmala* L. is a native herb used in traditional medicine as an anticancer, antibacterial, fungicidal and antiulcer agent in Iran. The current study was designed to evaluate the anticancer effect of this herb on cervix cancer cell lines.

Methods: In this experimental study, the proliferated and cultured HeLa cells (human cervical epithelial- derived tissue) were used to determine the anticancer effect of harmala seed extract. The cells exposed to different doses of harmala seed extract (12, 25, 50.5 and 100 µg/ml) and were incubated for 24, 48 and 72 hours. After the incubation period, modified colorimetric MTT [(3-(4,5-dimethyl Thiazole-2yl)]-2,5-Diphenyl Tetrazolium Bromide) method was used to determine cytotoxicity. After collecting data, statistical analysis was performed using analysis of variance (ANOVA).

Results: The results of MTT assay showed that the HeLa extract anticancer effect is dependent to time and dose. The highest percentage of cell death was observed after 72 h incubation and increase in extract concentration (P<0.001). The 50% growth inhibitory concentration (IC₅₀) of harmala in 24 h was 12.5 micrograms per milliliter.

Conclusion: Harmala extract could have dose and time dependent for preventing growth on HeLa cancer cell line. It seems to come with further research, and utilizes its compound in cancer treatment.

Keywords: Hydroalcoholic extract, Harmala, HeLa cell line cancer.

Cite this article as: Forouzandeh F, Salimi S, Naghsh N, Zamani N, Jahani S. Evaluation of anti-cancer effect of *Peganum harmala* L hydroalcoholic extract on human cervical carcinoma epithelial cell line (HeLa). J Shahrekord Univ Med Sci. 2014; 16(4): 1-8.

*Corresponding author:

Islamic Azad University, Falavarjan Branch, Isfahan, I.R. Iran. Tel: 00989139834502,
E-mail: forouzan.forouzandeh@yahoo.com