بررسی اثرات مهاری عصاره هیدروالکلی گیاه تیمبرا اسپیکاتا بر رده سلول های سرطانی ریه SK-Mes-1

سمیه سبزعلی[۱]، آرمان رستم زاد[۲]، جعفر پناهی[۱]، محمدرضا هواسیان[۱]، کریمه حقانی[۳]، سالار بختیاری[۱،۳،۴*]

۱) کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام

۲) گروه میکروب شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه ایلام

۳) گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام

۴) مرکز تحقیقات میکروب شناسی بالینی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۵/۱۹ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۸/۲۵

چکیده

مقدمه: سرطان ریه مهم ترین عامل مرگ ناشی از سرطان در دنیا می باشد. از آن جایی که اغلب درمان های امروزی سرطان ناکارآمد و دارای عوارض جانبی زیادی هستند، لذا پیدا کردن درمان موثر و جایگزین ضروری به نظر می رسد. به این منظور در سال های اخیر گیاهان دارویی اهمیت ویژه ای پیدا کرده اند. هدف از انجام این مطالعه بررسی تاثیر مهاری عصاره هیدروالکلی گیاه تیمبرا اسپیکاتا بر رشد رده سلولی سرطان ریه SK-Mes-1 می باشد.

مواد و روش ها: پس از کشت سلول های SK-Mes-1 به منظور تعیین اثر سایتوتوکسیک عصاره هیدروالکلی گیاه آویشن زوفایی، این سلول ها با دوزهای مختلف عصاره قرار گرفتند و به مدت ۲۴، ۴۸، ۷۲ ساعت تیمار شدند. پس از پایان تیمار، MTT انجام شد. هم چنین به منظور بررسی شکست DNA پس از ۲۴ ساعت تیمار سلول های SK-Mes-1 با عصاره، DNA استخراج و بر روی ژل آگاروز ۱ درصد الکتروفورز گردید.

یافته های پژوهش: نتایج حاصل از تست MTT نشان داد که این عصاره، اثر سایتوتوکسیک وابسته به دوز بر سلول های SK-Mes-1 دارد. IC50 این عصاره برای سلول های SK-Mes-1 غلظت ۱۱۰ میکروگرم بر میلی لیتر به دست آمد. نتایج MTT در مدت زمان ۴۸ و ۷۲ ساعت تفاوت معنی داری با ۲۴ ساعت نداشت. هم چنین تیمار با این عصاره تاثیری بر قطعه قطعه شدن DNA نداشت.

بحث و نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان می دهد که عصاره هیدروالکلی گیاه تیمبرا با اثر سایتوتوکسیک مستقیم بر سلول های توموری ریهSK-Mes-1 می تواند باعث مهار رشد این سلول ها شود. پیشنهاد می شود که به منظور شناسایی مکانیزم مولکولی این اثر مهاری مطالعات بیشتری بر مسیرهای رشد سلولی صورت گیرد.

واژه های کلیدی: عصاره هیدروالکلی، تیمبرا، سرطان ریه، SK-Mes-1

* **نویسنده مسئول:** کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام، مرکز تحقیقات میکروب شناسی بالینی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام

Email: *bakhtiyari-s@medilam.ac.ir*

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-12]

مقدمه

سرطان دومین عامل مرگ و میر بعد از بیماری های قلبی است سرطان ریه شایع ترین سرطان در دنیاست وبه عنوان یک اپیدمی در نظر گرفته می شود، در سال ۲۰۰۲ میلادی بیش از ۱/۳ میلیون نفر مبتلا به این بیماری بودند، ۲۹درصد از کل مرگ های ناشی از سرطان مربوط به سرطان ریه می باشد،(۳-۱). سرطان دومین عامل مرگ و میر بعد از بیماری های قلبی است. بسیاری از مردم هنوز از گیاهان دارویی به عنوان درمان جایگزین در درمان این بیماری استفاده می کنند. پزشکان از گیاهان زیادی برای تولید دارو استفاده می کنند،(۶). استفاده از گیاهان در درمان بیماری ها سابقه طولانی دارد،(۴،۵). در طب سنتی به طور معمول به وسیله جوشاندن در آب یا خیساندن در الکل موادگیاه را استخراج می کنند،(۷). هدف از این مطالعه بررسی خاصیت ضدسرطانی عصاره هیدروالکلی گیاه تیمبرا بر سلول های سرطانی SK-Mes-1 از رده سلول های سرطان ریه می باشد. آویشن زوفایی(Thymbra spicata) از خانواده لابیاسه(Labiaceae)، گیاهی است پایا که ترجیحاً در مناطق خشک و آفتابی تپه ها و مرغزارهای خشک می روید. ارتفاع این گیاه متفاوت و حدود ۴۰-۱۵ سانتی متر است و دارای گل های ارغوانی زیباست،(شکل شماره ۱)(۸). ماه های اردیبهشت تا خرداد فصل شکوفایی و باروری تیمبرا است. به خاطر وجود تیمول و کارواکرول به میزانی که برای فعالیت های بیولوژیک و دارویی مهم است گیاه شهرت زیادی دارد. اسانس موجود در قسمت های مختلف گیاه منبع خوبی از خواص ضدباکتریایی و آنتی اکسیدان است،(۹). این گیاه در طب سنتی ترکیه، یونان، مصر و روم برای درمان آسم و برونشیت استفاده می شده، در حال حاضر نیز برای بهبود طعم غذا استفاده می شود. این گیاه بومی استان ایلام بوده که مصارف سنتی فراوانی داشته و در بین اهالی منطقه از توجه و اهمیت خاصی برخوردار است،(۱۰). هدف این مطالعه بررسی خواص ضد سرطانی عصاره هیدروالکلی تیمبرا اسپیکاتای بومی استان ایلام بر روی رده سلولی سرطان ریه است.

مواد و روش ها

بخش های هوایی گیاه تیمبرا در اواخر اردیبهشت و اوایل خرداد ماه از رشته کوه های زاگرس در اطراف شهر ایلام جمع آوری شدند. این گیاه پس از نامگذاری و شناسایی توسط کارشناسان گیاه شناسی دانشکده کشاورزی دانشگاه ایلام در دمای اتاق و در سایه خشک شد. بخش - های هوایی گیاه توسط آسیاب خرد شدند. مقدار ۲۰۰ گرم از پودر آسیاب شده را در یک لیتر حلال(آب مقطر- اتانول مرک آلمان) با نسبت ۵۰-۵۰ ریخته و به مدت ۱۰ روز در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد و در تاریکی انکوبه شد. سپس عصاره از کاغذ صافی واتمن شماره ۴۲ عبور داده شد. مقدار ۲۴۰ میلی لیتر عصاره قهوه ای تیره با pH=6.1 جداسازی شد. محلول حاصل به منظور تبخیر حلال های موجود در آن در دمای ۴۵ درجه سانتی گراد به مدت ۴ روز قرار داده شد.(۱۱)

تیمار سلول ها: ابتدا از سلول های سرطانی مورد استفاده، سوسپانسیون سلولی حاوی ۲×۱۰^{۴}cells/ml تهیه شد و به هر کدام از چاهک های پلیت کشت سلولی ۹۶ حفره ای، ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی اضافه شد. به منظور چسبیدن سلول ها به کف پلیت، پلیت به مدت یک شب در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، رطوبت ۹۵ درصد و دی اکسید کربن ۵ درصد قرار گرفت. روز بعد ابتدا هر کدام از غلظت های موردنظر از استوک عصاره، در یک ویال جداگانه تهیه شدند. پلیت جهت مجاورت با غلظت ها به صورت سه تایی(triplicate) طراحی گردید. ضمناً چاهک هایی نیز به عنوان کنترل، شامل موارد زیر در نظر گرفته شد:

سلول تیمار نشده به همراه عصاره، سلول تیمار شده به همراه حلال مورد استفاده که در این آزمایش محیط کشت می باشد و برای عصاره، محیط کشت به تنهایی به عنوان نمونه کنترل مثبت، آب مقطر به عنوان نمونه کنترل منفی، غلظت مورد نظر از عصاره یا اسانس به همراه محیط کشت بدون سلول.(همان رقتی از غلظت مورد نظر که روی سلول ریخته شد) بعد از تهیه غلظت ها محیط کشت رویی حفرات، تخلیه شد و حفرات با غلظت های موردنظر از عصاره ها پر شدند. سپس پلیت به ترتیب به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در انکوباتور قرار گرفت. پس از انکوباسیون سلول ها با عصاره، با استفاده از سمپلر، حفرات سلول دار به طور کامل تخلیه شدند و به هر یک از آن ها، ۱۵۰ میکرولیتر محیط کشت اضافه شد. سپس به هر یک از حفرات، ۵۰ میکرولیتر از محلول آماده شده MTT اضافه گردید و پلیت، به مدت ۴ ساعت در انکوباتور قرار گرفت. سپس محتویات رویی هر چاهک خارج شد و به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر محلول DMSO برای حل شدن بلورهای فورمازون اضافه شد. پس از انجام MTT مقدار جذب نوری محتویات حفرات پلیت با استفاده ازmicrotiter plate reader در

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-12]

طول موج ۵۵۰ الی ۵۷۰ نانومتر قرائت شد و مقدار جذب نوری چاهک های حاوی عصاره، با چاهک های حاوی سلول های تیمار نشده، مقایسه گردید،(۱۲). در مرحله بعد، با قرار دادن OD ها در فرمول درصد کشندگی که در ذیل آمده است، میزان(درصد) کشندگی هر غلظت محاسبه گردید:

$$\%Cytotoxicity=1-T/C\times100$$

استخراج DNA: به منظور بررسی آپوپتوز از طریق شکستن DNA، یک فلاسک سلول را به مدت ۲۴ ساعت با غلظتی از عصاره که باعث مرگ ۵۰ درصد سلول ها شده بود، تیمار شدند، سپس سلول ها استخراج شده و DNA آن ها با استفاده از کیت کیاژن استخراج شد. DNA استخراج شده بر روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز شد.

آنالیز آماری: برای تعیین معنی دار بودن اختلاف گروه ها از آنالیز(Anova) استفاده شد، و برای مقایسه معنی دار بودن گروه ها با هم، آزمون Post-Hoc Tukey انجام گردید.

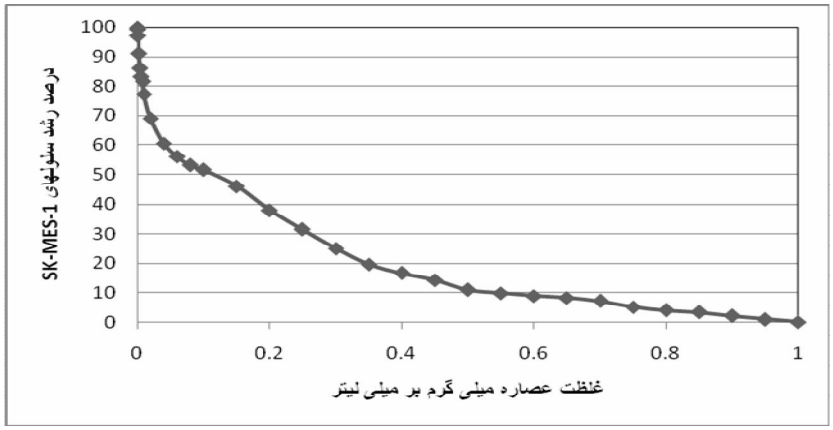
یافته های پژوهش

نتایج حاصل از آزمایش های فوق نشان داد که میزان IC50 در غلظت ۱۱۰ میکروگرم بر میلی لیتر در ۲۴ ساعت دیده شد. آنالیز آماری نتایج نشان داد که در زمان انکوباسیون ۲۴ ساعته، درصد مرگ سلولی با افزایش دوز عصاره هیدروالکلی تیمبرا افزایش یافته بود. هم چنان که در شکل شماره ۲ مشاهده می شود. افزایش درصد مرگ سلولی وابسته به دوز، در انکوباسیون ۴۸ ساعته نیز دیده شد و این میزان در مقایسه با زمان ۲۴ ساعت انکوباسیون سلول ها افزایش داشت، ولی این افزایش از نظر آماری معنی دار نبود. نتایج انکوباسیون ۷۲ ساعته نیز به همین صورت بود. هم چنین آزمایش ها نشان دادند که با کاهش غلظت، تاثیر ضدسرطانی عصاره تیمبرا کاهش می یابد.($P<0.05$) به عنوان اختلاف معنی دار در نظر گرفته شد. درصد و نمودار سایتوتوکسیته پس از ۲۴ ساعت در ثبت و طراحی شد. هم چنین نتایج آزمون استخراج DNA و مقایسه آن با نتایج سلول کنترل نشان داد که شکستی در DNA سلول های سرطانی اتفاق نیفتاده است.(شکل شماره ۳)

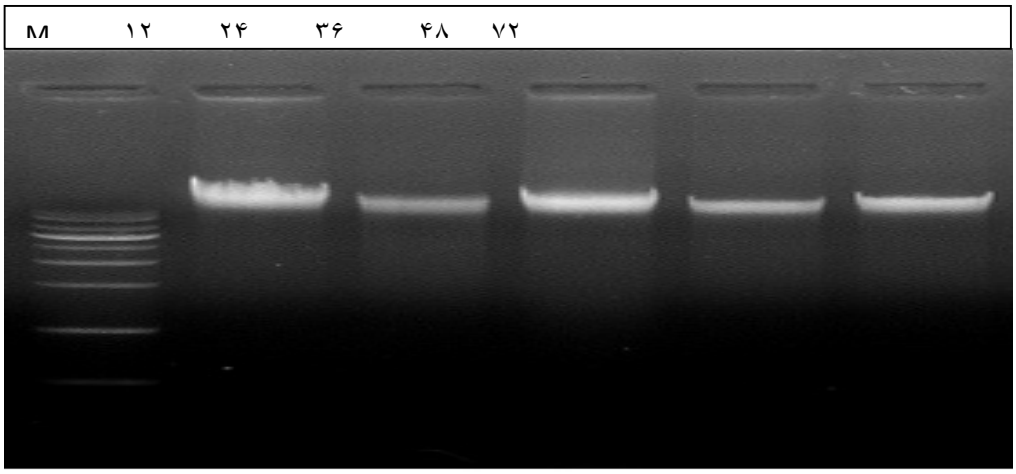


شکل شماره ۱. گیاه تیمبرا اسپیکاتا جمع آوری شده از ایلام

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-12]



شکل شماره ۲. درصد مهار رشد سلول SK-Mes-1 توسط عصاره تیمبرا اسپیکاتا پس از ٢٤ ساعت تیمار



شکل شماره ۳. DNA استخراج شده از سلول های SK-MES-1 در شرایط تیمار با غلظت ۱۱۰ میکروگرم بر میلی لیتر عصاره در زمان های ۱۲، ٢٤، ٣٦، ٤٨ و ۷۲ ساعت. M: مارکر وزن مولکولی 1 kb

بحث و نتیجه گیری

هدف از انجام این مطالعه بررسی اثر مهاری عصاره هیدروالکلی گیاه تیمبرا اسپکیتا بر رشد سلول های سرطانی SK-Mes-1 می باشد. نتایج حاصل از این مطالعه نشان دهنده اثر مهاری چشم گیر این عصاره بر رشد سلول های مذکور می باشد. خانواده اویشن به دلیل داشتن تیمول و کارواکرول دارای اثرات دارویی می باشد و مورد استقبال مردم است. تاکنون مطالعه ای در مورد بررسی خواص ضد سرطانی عصاره هیدروالکلی گیاه تیمبرا صورت نگرفته است لذا مطالعه حاضر اولین مطالعه در این زمینه می باشد و نتایج به دست آمده با نتایج دیگری قابل مقایسه نیستند، اما مطالعات دیگری در این خانواده انجام شده است از جمله مطالعه رحیمی فرد و همکاران بر روی بررسی اثرات عصاره و اسانس آویشن باغی، آویشن شیرازی و میخک بر روی سلول های Vero, Hela و Hep2 در محیط کشت سلولی برای روشMTT نشان داد که تمام اسانس ها و عصاره های مورد بررسی در غلظت های خاصی اثر سایتوپاتولوژیک بر روی هر سه رده سلول دارند، این غلظت ها از حداقل ۰/۰۴ تا حداکثر ۳ میکروگرم بر میلی لیتر را شامل می شود، از این رو توجه به ایمنی در کاربرد این اسانس و عصاره ها اهمیت بیشتری پیدا می کند(۱۳). مطالعه کرامتی نیز نشان داد که عصاره هیدروالکلی آویشن باغی رشد غیر طبیعی ضایعات پیش سرطانی و کارسینوم ناشی از DMBA را در پروستات موش صحرایی مهار و

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-12]

درمان می کند که این نتایج نیز با نتایج به دست آمده از این مطالعه هم خوانی دارد،(۱۴). یک تحقیق دیگر به منظور بررسی اثر ده اسانس گیاهی از جمله آویشن باغی بر سلول های حاصل از سه نوع سرطان انسان در شرایط آزمایشگاهی نشان داد که قدرت مسموم کنندگی آویشن باغی در سلول های کارسینوم غده پروستات به مراتب بیشتر از سلول های کارسینوم ریه و پستان بود،(۱۵). مطالعات دیگری نیز بر روی گونه های مختلف آویشن انجام شده است که از این بین می توان به مطالعه داداش پور و همکاران بر روی فعالیت ضد میکروبی، رادیکال زدایی نیتریک اکساید و سمیت سلولی اسانس آویشن دنایی اشاره کرد که نتایج حاصل از این آزمایش نشان داد که سمیت اسانس آویشن دنایی بر روی سلول های طبیعی انسانی و سلول های سرطانی به صورت ۵۰ درصد ممانعت به ترتیب ۱۴۵۵ و ۴/۹۵ بود که تاثیر غلظت کم اسانس روی سلول های سرطانی بدون تاثیر منفی بر سلول های طبیعی را نشان می دهد که این امر با مطالعه حاضر هم خوانی دارد،(۱۶). اما همان گونه که ذکر شد بررسی های انجام شده نشان می دهد که عصاره هیدروالکلی گیاه تیمبرا اسپکیتا دارای خاصیت کشندگی بر سلول های SK-Mes-1 می باشد. هم چنین نتایج به دست آمده نشان داد که شکستی در DNA سلول های سرطانی رخ نداده، این نتیجه به معنای عدم تاثیر عصاره گیاه فوق بر DNA می باشد. با توجه به نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر و مطالعات انجام شده بر روی این خانواده گیاهی می توان استنباط کرد که این خانواده گیاهی اثر مهاری بر رشد سلول های سرطانی داشته و می توانند در درمان آن ها استفاده شوند. بنا بر این امید است در آینده با فراهم آمدن زمینه، تحقیقات بیشتری بر روی خواص ضد سرطانی این خانواده گیاهی انجام شده و با خالص سازی و استخراج ترکیبات تشکیل دهنده عصاره، موثرترین ترکیب گیاه شناسایی و مکانیسم اثر آن بر مرگ سلول ها بررسی شود. نتایج به دست آمده از این مطالعه نشان داد که عصاره هیدروالکلی گیاه تیمبرا اسپکیتا دارای اثر مهاری چشم گیری بر رشد سلول های سرطانی می باشد. لذا پیشنهاد می شود در مطالعات بعدی ترکیبات موثره این گیاه شناسایی و استخراج شود.

References

1.1-Silvestri GA, Alberg AJ, Ravenel J. The changing epidemiology of lung cancer with a focus on screening. Brit Med J 2009; 339:451-54.

2.Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics. 2002.

3.Fauci AS, Braunwald E, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, J JL, et al. Har-rison's Principles of internalmedicine. 17th ed. Philadelphia: Mc Graw Hill 2008; 551-62.

4.Ljubuncic P, Dakwar S, Portnaya I, Cogan U, Azaizeh H, Bomzon A. Aqueous extracts of Teucriumpolium possess remarkable antioxidant activity in vitro. Evid Bas Complement Alternat Med 2006; 3: 329-8.

5.Said O, Khalil K, Fulder S, Azaizeh H. Ethnopharmacological survey of medicinal herbs in Israel, the Golan Heights and the West Bank region. J Ethnopharmacol 2002; 83:251-65.

6.Subchareon P. Handbook of Anticancer: Thai Traditional Medicine: New Concept for Treated Cancer. Thai Traditional Medicine Institute, Bangkok; 1998.P. 3.

7.Itharat A, Singchangchai P, Ratanasuwan P. Wisdom of Southern Thai Traditional Doctors. Prince of Songkla University, Songkla; 1998.P.126.

8.Dorman HJ, Deans SG. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. J Appl Microbiol 2000; 88:308-16.

9.Ali-Shtayeh MS, Yaniv Z, Mahajna J. Ethnobotanical survey in the Palestinian area: A classification of the healing potential of medicinal plants. J Ethnopharmacol 2000; 73:221-7.

10.Tümen G, Ermin N, Özek T, Kürkçüoğlu M, Başer KHC. Compositions of Essential Oils From Two Varietes of Thymbraspicata L. J Essential Oil Res 1994; 6: 463-95.

11.Rashan LJ, Franke K, MyintKhine M, Kelter G, Fiebig HH, Neumann J, et al. Characterization of the anticancer properties of monoglycosidiccardenolides isolated from Nerium oleander and Streptocaulontomentosum. J Ethnopharmacol 2011; 13:781-8.

12.Maines MD, Lawrence DA. Assessment of Cell Toxicity. Curr Protocol Toxicol 2011;47:201-3.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-12]

13.Rahimifard N, Pakzad SR, Shoaibi S, Hedayati MH, Haji Mahdi H, Motaharinia V, Mehrafshan L, et al. Study of effect of extract and essential oil of Thymus vulgaris and zataria multiflora and eugenia caryophlata on Vero, Hela and Hep2 cell by MTT methods. J Med Plant 2010;30:157-63.
14.Keramati K, Sanai K, Babakhani A, Rakhshan M, Vaezi Gh, Haeri A. Effect of hydroalcoholic extract Thymus vulgaris induced prostate cancer injection DMBA in Wistar Rats. J Pazhuhesh 2011; 35:135-40.
15.Zu Y, Yu H, Liang L, Fu Y, Efferth T, Liu X, et al. Activities of ten essential oils towards Propionibacterium acnesand PC-3, A-549 and MCF-7 cancer cells. Molecules 2010; 15:3200-10.
16.Dadashpor M, Rasoli I, Sarvari Zanjani R, Sefid kan F, Taqi zade M, Darvish Alipor , et al. Study of antibacterial activity of antimicrobial activity and radical re-moval of nitric oxide and cytotoxicity of essential oil of Thymus daenensis Celak. J Modares Med Sci 2012:14:37-43.

Investigation on the Inhibitory Effects of Hydro-alcoholic Extract of Thymbra spicata on the Growth of Lung Cancer Cell Line SK-Mes-1

Sabzali S[1], Arman R[2], Panahi J[1], Havasian M R[1], Haghani K[3], Bakhtiyari S[1,3,4]*

(Recived: August 10, 2013 Accepted: November 16, 2013)

Abstract

Introduction: Lung cancer is one of the main causes of death among cancers worldwide. Since ~~the~~ most of current treatments for cancer are inefficient and have several side effects, finding an effective and alternative treatment has a great importance. To this end, medicinal plants have gained a special significance in recent years. The aim of this study was to examine the inhibitory effects of hydro-alcoholic extract of Thymbra spicata on the growth of lung cancer cell line SK-Mes-1.

Materials & Methods: After cultivation of SK-MES-1 cells, these cells were treated with the several doses of hydro-alcoholic extract of Thymbra spicata for 24, 48, 72 hours to quantify IC50 value. After treatment, MTT was performed. Furthermore, to evaluate DNA fragmentation, DNA was extracted 24 hours after treatment and electrophoresis was done on agarose 1%.

Findings: The results of MTT indicated that this extract has a dose-dependent cytotoxic effect on SSK-MES-1 cells. IC50 of this extract was determined as 110 microgram/ml for SK-MES-1 cells. MTT results at 48 and 72 hours had ~~a~~ no significant difference with 24 hours. Also, treatment with this extract had no ~~any~~ effect on DNA fragmentation.

Discussion & Conclusion: Results of this study indicated that hydro-alcoholic extract of Thymbra spicata could inhibit the growth of lung cancer cell SK-MES-1 through direct cytotoxic effects. Further studies are suggested to be conducted on cell growth pathways to determine the molecular mechanisms of this inhibitory effect.

Keywords: hydro alcoholic extract, Thymbra spicata, SK-Mes-1, lung cancer

1. Student Research Committee, Ilam University of Medical Sciences, Ilam, Iran.
2. Dept of Clinical Microbiology, Faculty of Medicine, Ilam University, Ilam, Iran.
3. Dept of Clinical Biochemistry, Faculty of Medicine, Ilam University of Medical Sciences, Ilam, Iran
4. Clinical Microbiology Research Center, Ilam University of Medical Sciences, Ilam, Iran.
** Correspondin author*

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-12]