

بررسی خواص ضدسرطانی اسانس گیاه زیره سبز روی سلول‌های سرطانی روده (رده سلولی SW742)

ستاره فیاض فر¹، مونا زمانیان عضدی¹، سعید حیدری کشل¹، فرید عزیز جلیلیان^{2*}

(1) مرکز تحقیقات پروتئومیکس، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تهران

(2) دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام، ایلام، ایران

تاریخ پذیرش:

تاریخ دریافت:

چکیده

مقدمه: از آنجاییکه سرطان کولون یکی از عوامل شایع مرگ و میر در جهان است و این بیماری دومین عامل مرگ و میر ناشی از سرطان در میان بزرگسالان شناسایی شده است، بنابراین نیاز مبرمی به مهار این بدخیمی با بکارگیری روشهایی که حداقل عوارض جانبی را دارد، احساس می‌شود. یکی از این روش‌ها استفاده از منابع طبیعی مانند گیاهان است. در این تحقیق اثر اسانس گیاه زیره سبز بر سلول‌های سرطانی روده در مقایسه با سلول‌های فیبروبلاست بررسی شده است.

مواد و روش‌ها: به هدف بررسی خواص سایتوتوکسیتی اسانس گیاه روش MTT assay بکار برده شد. بدین ترتیب که سلول‌های کشت داده شده شامل سلول‌های سرطانی روده و سلول‌های نرمال فیبروبلاست در مجاورت دوزهای مختلف از اسانس گیاه قرار گرفتند و میزان بقای آنها با استفاده از روش‌های آماری مناسب مقایسه و بررسی شد. **یافته‌های پژوهش:** براساس نتایج بدست آمده، فاز گازی (رایحه) هم روی رشد سلول‌های سرطانی و فیبروبلاست اثر مهاری دارد. اما فاز محلول علاوه بر اثر مهاری رشد سلول‌های سرطانی روی فیبروبلاست اثرات محرک رشد نشان می‌دهد.

بحث و نتیجه‌گیری: از آنجایی که اسانس گیاه زیره سبز می‌تواند جایگاه ویژه‌ای در کاهش علائم بدخیمی-های سرطانی در آینده داشته باشد بنابراین تحقیقات بیشتری برای شناسایی ترکیبات موثر این گیاه و همچنین بررسی آن در شرایط *in vivo* پیشنهاد می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: رده سلولی SW742، اسانس گیاهی، سرطان کولون، بقای سلولی

*نویسنده مسئول: دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام

مقدمه

و خصوصیات بیمار متفاوت است (3-5). بنابراین پژوهش در رابطه با سایر منابع در جهت بکارگیری منابعی با حداقل عوارض جانبی دارای اهمیت است. استفاده از گیاهان دارویی به منظور درمان با تاریخ زندگی انسان هم زمان بوده است (6-8). زیره سبز از زمانهای بسیار قدیم در مناطقی از روم باستان و ایران در درمان بسیاری از بیماری‌ها استفاده شده است (9). این گیاه دارای خواص درمانی بسیاری زیادی است از آن جمله می‌توان به خواص هورمونی آن اشاره کرد (10). در این تحقیق اثر اسانس این گیاه بر بقای سلول‌های سرطانی کولون مورد بررسی قرار می‌گیرد. سلول‌های فیروبلاست نیز به دو دلیل داشتن توانایی تکثیر بالا و در دسترس بودن، همراه با سلول‌های سرطانی به عنوان شاهد، مورد مطالعه و بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

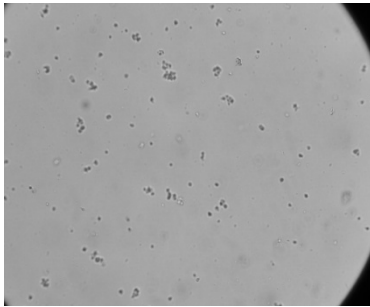
گیاه زیره سبز از مزرعه تحقیقاتی باغ گیاه‌شناسی ملی ایران جمع‌آوری شد. گیاه مورد مطالعه در این تحقیق به روش خشک کردن طبیعی به مدت 2 روز در دمای اتاق خشک گشته و استخراج اسانس به دو روش تقطیر با آب، طرح جایمند-رضایی و تقطیر با بخار، طرح جایمند-رضایی انجام شد. اسانس بدست آمده تا زمان استفاده در یخچال (4 درجه) نگهداری شد. سلول‌های نرمال فیروبلاستی از سلول‌های مرکز تحقیقات پروتئومیکس دانشکده علوم پزشکی شهید بهشتی تهیه گشت. سلول‌های SW742 کشت داده شده از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران (NCBI) تهیه و پس از رشد و ازدیاد سلول‌های کشت داده شده و در محیط RPMI، سلول‌های چسبنده به کمک تریپسین % 0/25 از کف فلاسک جدا و پس از شمارش به میزان 10000 سلول به چاهک‌های پلیت 96 حفره ای انتقال داده شدند. سپس حجم‌های مختلف از اسانس (صفر به عنوان کنترل درونی در داخل پلیت-های 96 حفره ای، 1، 5، 10، 20، 40 و 60 ماکرولیتر) هر کدام با سه تکرار به سلول‌ها اضافه شدند. پس از 48 ساعت انکوباسیون، برای تعیین بقای سلولی، 50 µg/ml محلول MTT به اندازه 20 میکرولیتر به هر چاهک اضافه و بعد از سه ساعت انکوباسیون با این ماده (MTT نباید در معرض تابش نور قرار بگیرد)

هر ساله 160000 مورد از سرطان Colorectal در ایالات متحده امریکا گزارش می‌شود که از این تعداد افراد 57000 از آنها فوت می‌کنند. این آمار این بیماری را به دومین عامل مرگ و میر ناشی از سرطان در میان بزرگسالان مبدل کرده است (1). این بیماری در ابتدا بصورت توده‌ای پولیپی خوش خیم ظاهر پیدا می‌کند و بعد به شکل adenoma پیشرفته با dysplasia بالا ادامه یافته تا اینکه در نهایت به بافت توموری تهاجمی تبدیل می‌گردد. بافت‌های توموری که داخل کولون محدود شده‌اند (tumor-node-metastasis stages I and II) قابل درمان اند. اما اگر درمان نشوند وارد گره‌های لنفاوی شده (stage III) و در نهایت به نواحی مختلف متاستاز می‌کنند. (Stage IV) تومورهای stages I and II با جراحی قابل درمان است. و تا 73% از مواردی که بیماری در stage III هست قابل درمان با جراحی همراه با شیمیوتراپی می‌باشد. پیشرفت‌های اخیر در زمینه شیمیوتراپی شانس نجات بیماران سرطانی را افزایش داده است. اما با این وجود بیمارانی که به مرحله (stage IV) می‌رسند معمولاً غیرقابل درمان بوده و شانس بقای پایینی دارند (2). عوارض راه‌های درمانی مختلف نظیر شیمی‌درمانی، رادیوتراپی و جراحی به اشکال مختلفی هست. عوارض حاصل از شیمی‌درمانی بر حسب نوع دارو متفاوت است و عکس العمل افرادی که شیمی‌درمانی می‌شوند نیز کم و بیش تفاوت دارد. عوارض شایع ناشی از شیمی‌درمانی عبارتند از: ریزش مو، التهاب و زخم مخاط دهان و لثه، خستگی، تهوع، استفراغ، اسهال و گاهی یبوست، بی‌اشتهایی، تشنگی، دفع زیاد ادرار، تغییر رنگ و خونریزی و غیره است. پلاکتها، مسئول ساختن لخته خون به هنگام خونریزی هستند. در طی شیمی‌درمانی چون مغز استخوان آسیب می‌بیند تعداد پلاکتها کم می‌شود. این شرایط ممکن است باعث کمبودی، خونریزی از بینی و دهان، پیدایش دانه‌های کوچک و نقطه‌های قرمز شود. لازم به ذکر است که تمام عوارض ذکر شده در یک بیمار تحت شیمی‌درمانی به وجود نمی‌آید و شدت و نوع آنها بر حسب انواع داروهای انتخابی، مدت درمان

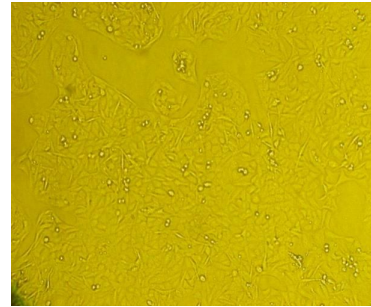
یافته های پژوهش

تصاویر میکروسکوپی تغییرات مورفولوژیک سلول های سرطانی روده و نرمال فیبروبلاست در غیاب و حضور فاز محلول اسانس گیاه زیره سبز در شکل 1 و 2 نشان داده شده است.

محتویات داخل چاهک ها دور ریخته و 100 میکرولیتر ماده سمی (DMSO) به آن اضافه شد و بعد از مدت پانزده دقیقه قرار گرفتن در انکوباتور، جذب مربوط به آن به وسیله نرم افزار RAYTO دستگاه الایزا ریدر در طول موج 570 نانومتر خوانده شد (11). با استفاده از روش های آماری نرم افزار SPSS، میانگین ها و انحراف معیارها بدست آمدند و نمودارهای مربوطه ترسیم شدند.



ب

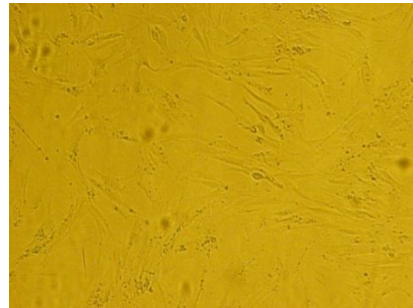


الف

شکل شماره 1. الف-سلول های سرطانی کلون در غیاب رایحه ب-سلول های سرطانی کلون در حضور فاز محلول



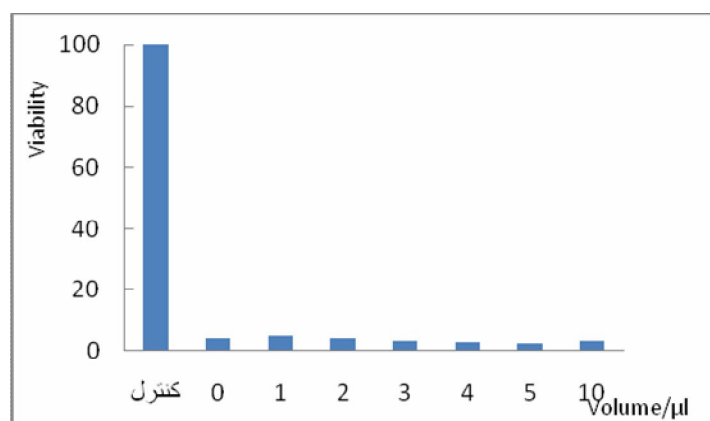
ب



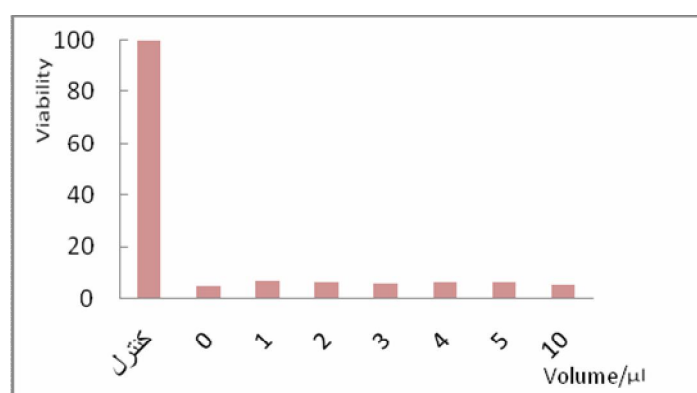
الف

شکل شماره 2. الف-سلول های نرمال فیبروبلاست ب- سلول های فیبروبلاست تحت اثر فاز محلول اسانس

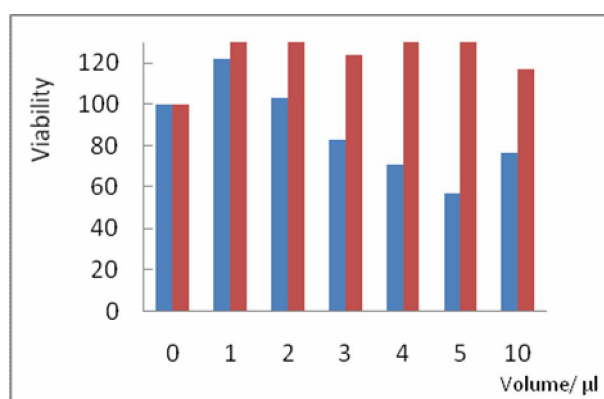
بقای سلول های سرطانی کلون و نرمال فیبروبلاست در مجاورت اسانس گیاه زیره سبز بوسیله روش MTT assay محاسبه شد. (شکل 3 و 2)



شکل شماره 3. منحنی بقاء سلول‌های سرطانی کولون تحت تاثیر رایحه اسانس گیاه زیره سبز بقا در همه حجم‌ها 5, 10, 4 و 3 و 2 و 1 و صفر میکرولیتر با P Value کمتر از 0/001 از کنترل متفاوت بود. (کنترل: نمونه سلول‌های بدون اسانس کشت داده شده در خارج از ظرف)



شکل شماره 4. منحنی بقاء سلول‌های نرمال فیبروبلاست تحت تاثیر رایحه اسانس گیاه زیره سبز بقا در همه حجم‌ها 5, 10, 4 و 3 و 2 و 1 و صفر میکرولیتر با P Value کمتر از 0/001 از کنترل متفاوت است. (کنترل: نمونه سلول‌های بدون اسانس کشت داده شده در خارج از ظرف)



شکل شماره 5. مقایسه درصد بقاء سلول‌های فیبروبلاست (قرمز) و سرطانی (آبی) در حضور حجم‌های مختلف از اسانس ناشی از بخش محلول در آب اسانس

بحث و نتیجه گیری

گردیده است. بر اساس نتایج حاصله ملاحظه می‌گردد بقای کلیه سلول‌ها نسبت به کنترل بیرونی (سلول‌های سرطانی کولون و سلول‌های فیروبلاست، انتخاب شده به عنوان شاهد بیرونی) به شدت کاهش یافته است. با توجه به شکل 5 جمعیت سلول‌های سرطانی با افزایش حجم فاز محلول کاهش یافته اما همین فاز با افزایش حجم اثر تحریک رشد روی سلول‌های فیروبلاست نشان داد. اینطور به نظر می‌رسد با افزایش حجم اسانس جمعیت سلولی فیروبلاست بیشتر تحت تأثیر قسمت محلول در آب اسانس قرار گیرد و افزایش یابد. با استناد به یافته‌های ترسیم شده چنین استنتاج شد که تأثیر اسانس در دو فاز قابل بررسی باشد: الف - فاز گازی یا رایحه ب - فاز محلول در آب. پس می‌توان چنین نتیجه گرفت که اسانس دارای دو اثر متفاوت بر سلول‌های فیروبلاست است. فاز گازی که به شدت مهارکننده رشد است و فاز محلول در آب به ملایمت محرک رشد است. در حالیکه این اسانس روی رشد سلول‌های سرطانی اثر مهاری مطلق دارد. در واقع فاز محلول با توجه به داشتن خواص توام ضدسرطانی و محرک رشد سلول‌های نرمال انتخاب مناسبی برای پژوهش‌های بیشتر در زمینه درمان سرطان می‌تواند باشد.

سپاسگزاری

بدینوسیله بر خود واجب می‌داند تشکرات صمیمانه خود را نسبت به پیشگاه محترم استاد گرانمایه، جناب آقای دکتر مصطفی رضایی طاویرانی ریاست محترم مرکز تحقیقات پروتئومیکس که در تهیه این مقاله، اینجانب را مورد حمایت‌های ارزشمند خود قرار داده اند، تقدیم دارد.

تحقیق و پژوهش در زمینه منابع گیاهی همواره در دستور کار محققان جهان بوده است (12). در حال حاضر طیف وسیعی از داروهای مشتق شده از منابع گیاهی در پزشکی مورد استفاده است که خواص مهار رشدی، التیام بخشی و آنتی‌بیوتیکی موثری از خود نشان داده‌اند (13). بدین منظور مراحل مختلفی مورد نیاز است تا ماده موثر یک گیاه به عنوان یک داروی استاندارد با کمترین خطرات اثر جانبی معرفی شود که این فرآیند از روش‌های مختلف عصاره‌گیری آغاز شده و با انجام آزمایشات بر روی سلول‌ها و باکتریها در محیط آزمایشگاه ادامه یافته و در نهایت با انجام آزمایشات مختلف روی انواع حیوانات آزمایشگاهی و بهینه‌سازی روش انتقال دارو جهت آزمایش روی انسان گسترش می‌یابد. زیره سبز از جمله گیاهانی است که براساس تحقیقات گذشته خواص مختلف دارویی از جمله ضد میکروبی، ضد دیابتی، حشره‌کشی و مهار رشد سلولی از خود نشان داده است (14-18). روش‌های مشاهدات میکروسکوپی به منظور مشاهدات تغییرات مورفولوژی و تایید نتایج آزمون‌های تست بقا انجام می‌گیرد (19). در شکل 1 کاهش جمعیت و تغییرات مورفولوژی سلول‌های سرطانی کولون مجاور فاز محلول اسانس مشهود است. در شکل 2 نیز جمعیت سلول‌های فیروبلاست با قرارگرفتن در مجاورت فاز محلول اسانس افزایش یافت. روش MTT assay به منظور اندازه‌گیری میزان بقای سلول‌های اثر داده شده با دارو صورت گرفت (11, 20). بدین منظور در شکل 3 و 4 بقای سلول‌های سرطانی کولون (SW742) و سلول‌های فیروبلاست در حضور حجم‌های مختلف فاز گازی اسانس نسبت به شاهد بیرونی محاسبه و ترسیم

References

1-Rezaie-Tavirani M, Heydari-Keshel S, Bagher-Rezaee M, Zamanian-Azodi M, Rezaei-Tavirani M, Khodarahmi R. Effect of essential oil of Rosa Damascena on human colon cancer cell line SW742. Gastroenterol Hepatol Bed Bench 2013;6:25-31.

2-Markowitz SD, Bertagnolli MM. Molecular basis of colorectal cancer. N Engl J Med 2009;361:2449-60.

3-Bomken S, Fišer K, Heidenreich O, Vormoor J. Understanding the cancer stem cell. Brit J Cancer 2010;103:439-45.

4-Köhne CH, Lenz HJ. Chemotherapy with targeted agents for the treatment of

- metastatic colorectal cancer. *Oncologist* 2009;14:478-88.
- 5-Dimitroulis D, Nikiteas N, Troupis T, Patsouras D, Skandalakis P, Kouraklis G. Role of surgery in colorectal liver metastases: Too early or too late? *WJG* 2010;16:34-84.
- 6-Armstrong JS. Mitochondrial membrane permeabilization: the sine qua non for cell death. *Bioessays* 2006;28:253-60.
- 7-Kashani MS, Tavirani MR, Talaei SA, Salami M. Aqueous extract of lavender (*Lavandula angustifolia*) improves the spatial performance of a rat model of Alzheimer's disease. *Neurosci bull* 2011;27:99-106.
- 8-Ardeshiri-Lagimi A, Barzegar M, Rezaei-Tavirani M, Hashemi M, Heidari-Kashal S, Moghaddamnia S, et al. Effects of *Scrophularia striata* extract on human fibroblast cells. *Med Sci J Islamic Azad Uni* 2009;19:Pe168-Pe72.
- 9-Ucko PJ, Dumbleby GW. The domestication and exploitation of plants and animals: Aldine De Gruyter; 2007.
- 10-Singh K, Goswami T. Physical properties of cumin seed. *J Agricul Engin Res* 1996;64:93-8.
- 11-Zamanian-Azodi M, Rezaie-Tavirani M, Heydari-Kashal S, Kalantari S, Dailian S, Zali H. Proteomics analysis of MKN45 cell line before and after treatment with Lavender aqueous extract. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench* 2011;5:11-8.
- 12-Pourahmad J, Eskandari MR, Daraei B. A comparison of hepatocyte cytotoxic mechanisms for thallium (I) and thallium (III). *Environ Toxicol* 2010;25:456-67.
- 13-Zamanian-Azodi M, Lajimi AA, Ahmadi N, Bagher M. Antibacterial effects of *Scrophularia striata* seed aqueous extract on *staphylococcus aureus*. *JPS* 2013;4:2008-4978.
- 14-Iacobellis NS, Cantore PL, Capasso F, Senatore F. Antibacterial activity of *Cuminum cyminum* L. and *Carum carvi* L. essential oils. *J Agricul Food Chem* 2005;53:57-61.
- 15-Gachkar L, Yadegari D, Rezaei MB, Taghizadeh M, Astaneh SA, Rasooli I. Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. *Food Chem* 2007;102:898-904.
- 16-Willatgamuwa S, Platel K, Saraswathi G, Srinivasan K. Antidiabetic influence of dietary cumin seeds (*Cuminum cyminum*) in streptozotocin induced diabetic rats. *Nut Res* 1998;18:131-42.
- 17-Purohit P, Mustafa M, Osmani Z. Insecticidal properties of plant-extract of *Cuminum cyminum* Linn. *Sci Cult* 1983;49:46-9.
- 18-Nostro A, Cellini L, Bartolomeo SD, Campi ED, Grande R, Cannatelli M, et al. Antibacterial effect of plant extracts against *Helicobacter pylori*. *Phytother Res* 2005;19:198-202.
- 19-Rezaie-Tavirani M, Fayazfar S, Heydari-Keshel S, Rezaei MB, Zamanian-Azodi M, Rezaei-Tavirani M, et al. Effect of essential oil of *Rosa Damascena* on human colon cancer cell line SW742. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench* 2013;6:48-52.
- 20-Ferrari M, Fornasiero MC, Isetta AM. MTT colorimetric assay for testing macrophage cytotoxic activity in vitro. *J Immunol Meth* 1990;131:165-72.

Evaluation of the Cytotoxic Effect of Cuminum cyminum essential oils on Human Colon Cancer cell line SW742

Fayazfar S¹, Zamanian Azodi M¹, Heydari Keshel S¹, Azizi Jalilian F^{2*}

(Received:

Accepted:)

Abstract

Introduction: Colon cancer is the second lethal cancer after lung cancer. Due to the existence of many side effects and problems in the ways of cancer treatment arising from surgery, chemotherapy or radiotherapy at the present, the need for such ways to be replaced and new drugs is prominent. Usage of herbal essential oils as drug contributes to a major part of traditional and Islamic medicine. This project aims at studying of anticancer activity of Cuminum cyminum essential oils on human colon cancer cell line (SW742).

Materials and Methods: Essential oils are provided by distillation method and their cytotoxicity effects on SW742 cell line were investigated. Human fibroblast cell was used as healthy and control cells. The cells were cultured and different concentrations of each essential oil were induced to cells. After 48 h incubation, cell survival with MTT assay was studied via

the statistical methods (software SPSS), averages and standard deviations were achieved and diagrams were drawn.

Findings: Findings indicate that essential oil affects on cell survival by two different ways; evaporation part reduces the cell growth enormously of both cancer and fibroblast cells. Soluble part, on the other hand, stimulates cell growth of fibroblast cells, while reduces cell growth of cancer cells.

Discussion & Conclusion: Analytical data provide considerable information about pharmaceutical properties of this plant. Even though, more evaluations are needed to investigate the exact effects of this plant.

Keywords: Essential oils, Colon cancer (SW742), Herbal drug, Cuminum cyminum, Cell survival, Anti cancer

1. Proteomics Research Center, Faculty of Paramedical Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

2. Dept of clinical Microbiology, Faculty of Medicine, Ilam University of Medical Sciences, Ilam, Iran

*(corresponding author)