

مقایسه خواص سیتوتوکسیک اسانس و عصاره سرشاخه‌های *Juniperus excelsa* در دو

منطقه البرز بر رده سلولی سرطان ریه A549

سیده مهدخت مداح*، فرهنگ مراقبی و ستاره سرحدی

ایران، تهران، دانشگاه آزاد اسلامی واحد یادگار امام خمینی (ره) شهری، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۸/۰۹ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۶/۲۷

چکیده

سرطان ریه یکی از شایع‌ترین انواع سرطان در جهان و ایران، است. گیاهان منابعی از انواع ترکیبات آنتی‌اکسیدان هستند که می‌توانند در جهت تولید داروهای ضد سرطانی استفاده شوند. در تحقیق حاضر اثر سمیت سلولی اسانس و عصاره‌ی هیدروالکلی گیاه *Juniperus excelsa*، بر روی سلول‌های سرطان ریه رده A549 بررسی شد. سرشاخه‌های پایه‌های نر گیاه ارس از دو منطقه‌ی چهل چشمه در فیروزکوه و سیراچال در کرج جمع‌آوری شده و اسانس و عصاره به ترتیب با روش کلونجر و خیساندن تهیه گردید. میزان سمیت سلولی، غلظت‌های مختلف، اسانس و عصاره سرشاخه‌های گیاه ارس دو منطقه، بر روی سلول‌های رده A549 در سه زمان ۲۴، ۴۸، و ۷۲ ساعت با استفاده از روش MTT ارزیابی شد. از روش فلوسایتومتری برای بررسی مرگ سلولی و چرخه‌ی سلولی در سلول‌های تحت تیمار ۷۲ ساعته با ۱۰ $\mu\text{g/ml}$ اسانس و عصاره دو منطقه استفاده گردید. نتایج بررسی میزان سمیت سلولی نشان داد قدرت کشندگی عصاره‌ها از اسانس‌ها به طور معنی‌داری بیشتر بود ولی بین مناطق مختلف تفاوت معنی‌داری از نظر میزان سمیت سلول وجود نداشت ($P < 0.01$). همچنین کاهش بیشتر تعداد سلول‌های زنده و افزایش ورود سلول‌ها به فاز Sub G1 و در نتیجه افزایش آپوپتوز تحت تیمار با عصاره پایه‌های نر ثابت شد. به این ترتیب عصاره سرشاخه‌های این گیاه با توقف چرخه سلولی در مرحله G2/M خواص ضد سرطانی دارد.

واژه‌های کلیدی: *Juniperus excelsa*، آپوپتوز، چرخه سلولی، سرطان ریه، سمیت سلولی

* نویسنده مسئول، تلفن ۰۹۱۲۲۱۲۳۷۱۲، پست الکترونیکی: s.m.maddah@iausr.ac.ir

مقدمه

حدود ۸۵ الی ۹۰ درصد سرطان‌های ریه تشخیص داده شده از نوع سرطان سلول غیر کوچک هستند (۳۴).

درمان‌های مرسوم سرطان‌ها باعث اثرهای جانبی جدی می‌شود به طوری که دسترسی به دارویی با اثربخشی بالا، سمیت کم، که به طور اختصاصی بر سلول‌ها تاثیر گذاشته و ارزان باشد یکی از دغدغه‌های مهم جوامع دارویی دنیا و حوزه درمان می‌باشد. در این زمینه درمان با گیاهان دارویی می‌تواند یکی از پایه‌های اصلی کنترل و درمان سرطان باشد (۳۱). خواص ضد توموری و مکانیزم عمل ترکیبات

در سراسر دنیا، سرطان ریه از جمله مهم‌ترین سرطان‌های تشخیص داده شده می‌باشد و به عنوان یکی از محتمل‌ترین علت مرگ و میرهای ناشی از سرطان به شمار می‌رود. سرطان ریه در ایران جز یکی از پنج سرطان شایع است و میزان بروز آن روندی افزایشی دارد (۱۵ و ۲۴). دو نوع اصلی سرطان ریه وجود دارد: سرطان ریه سلول کوچک و سرطان ریه سلول غیر کوچک. در صورتی که سرطانی ویژگی‌های هر دو نوع را داشته باشد به عنوان یک کارسینوم سلول کوچک و بزرگ (آمیخته) شناخته می‌شود.

بیولوژیکی و فارماکولوژیکی فراوانی دارد (۱، ۷، ۲۶ و ۳۰).

فعالیت ضد میکروبی، ضد قارچی و آنتی‌اکسیدانی اسانس گیاه ارس (۲۱) و رابطه بین محتویات بالقوه آنتی‌اکسیدانی و فنولی میوه ارس (۲۲) و همچنین فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس بخش‌های مختلف دو زیر گونه گیاه ارس (۱۲) نشان داده شده است. تاکنون اثر سیتوتوکسیتی عصاره بخش‌های هوایی گیاه ارس بر لوسمی لنفوبلاستیک حاد رده‌های Nalm-6 و Reh (۱۰ و ۹) و عصاره‌ی سرشاخه‌های نر و ماده و میوه دو زیر گونه *J. excelsa* بر سلول‌های MDA-MB-468، HeLa و KB (۲۸)، همچنین اثر سمیت عصاره گیاه ارس بر رده سلولی سرطان مری KYSE-30 و سلول‌های فیروبلست معمولی HU02 (۱۱) و رده سلولی MCF-7 سرطان سینه (۸) مورد ارزیابی قرار گرفت و میزان توانایی خواص ضد سرطانی آنها تعیین گردیده است.

در این تحقیق ضمن بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی عصاره و اسانس سرشاخه‌های پایه‌های نر گیاهان ارس دامنه‌های جنوبی البرز، خواص ضد سرطانی آنها و چگونگی تاثیر آنها بر چرخه سلولی سلول‌های سرطان ریه A549 مورد سنجش قرار گرفت.

مواد و روشها

تهیه گیاه: نمونه برداری از سرشاخه‌های پایه‌ی نر گیاه ارس از دو منطقه‌ی کرج - منطقه حفاظت شده‌ی سیراچال - (منطقه ۱) و فیروزکوه - چهل چشمه - (منطقه ۲) انجام شد. گونه‌های جمع‌آوری شده با استفاده از کلیدهای شناسایی گونه‌های ارس در موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع مورد تایید قرار گرفت. پس از انتقال نمونه‌ها به آزمایشگاه و شستشوی آنها با آب مقطر، سرشاخه‌ها بر روی یک پارچه‌ی تمیز قرار داده شدند تا در دمای اتاق خشک شوند.

عصاره گیاه ارس: عصاره‌گیری به روش خیساندن، به طور

اپی‌گلوکاتکین-۳-گالات (EGCG) (-Epigallocatechin-3 galate) در گیاه چای سبز، ایزوتیوسیانات‌ها (Isothiocyanate) در گیاهان تیره کلم و ایزوفلاون‌ها (Isoflavone) که دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی قوی هستند و نیز تیموکادروئینون (TQ) (Thymoquinone) که یک ترکیب فعال زیستی در اسانس سیاه دانه است ثابت و مشخص شده است همچنین تاکسول نیز که از پوست درخت سرخدار به دست می‌آید امروزه به عنوان داروی ضد سرطانی استفاده می‌شود (۱۶). بسیاری از اسانس‌های گیاهی دارای خواص ضد باکتریایی، ضد قارچی و ضد توموری هستند. در سلول‌های سرطانی، اسانس‌ها از طریق القاء آپوپتوز در سلول‌های سرطانی در درمان آنها نقش دارند. از طرف دیگر اسانس‌ها متاستاز را مهار می‌کنند در حالی که داروهای شیمی‌درمانی قادر به مهار متاستاز نیستند (۳۷).

از جنس گیاه ارس (*Juniperus*) گونه‌هایی مانند *J. excelsa*، *J. communis*، *J. oblonga*، *J. sabina* و *J. foetidissima* در ایران موجود است و گسترش آنها به صورت لکه‌ای و در استان‌های مختلف می‌باشد (۱۹). گیاه ارس (*Juniperus excelsa*)، یک درخت یا درختچه‌ای همیشه سبز از خانواده Cupressaceae می‌باشد که در ایران در شیب‌های شمالی و جنوبی رشته‌کوه البرز از ارتفاع ۱۹۰۰ تا ۲۸۵۰ متر و به مقدار کمتر در رشته‌کوه زاگرس پراکنش دارد (۱۴). شیب جنوبی البرز که از لحاظ وضعیت آب و هوایی منطقه‌ای نیمه خشک است، رویشگاه اصلی درختان ارس می‌باشد که به علت تابش فراوان، خاک قلیایی و خشکی هوا خود به عنوان عوامل اصلی و موثر در تغییر متابولیسم ثانویه در این درختان نقش بازی می‌کند (۲۵). وجود ترکیبات آنتی‌اکسیدانت در انواع ارس‌ها نوید مناسبی است زیرا آنتی‌اکسیدان‌ها به عنوان ترکیبات جلوگیری کننده از سرطان که در مراحل اولیه از بین برنده تومور می‌باشند شناخته شده‌اند. اسانس و عصاره میوه و سرشاخه‌های این گیاه خواص

بسیار کمی (Dimethyl sulfoxide) DMSO حل شد. در هر سه پلیت ۹۶ خانه برای هر غلظت سه تکرار در نظر گرفته شد. پلیت اول ۲۴ ساعت بعد از انکوباتور خارج شد و پس از خروج مایه رویی، در تاریکی به هر چاهک ۵۰ میکرولیتر محلول MTT ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر زرد رنگ، اضافه و به مدت ۴ ساعت در انکوباتور انکوبه گردید. سپس رنگ MTT خالی و به هر چاهک ۵۰ میکرولیتر DMSO اضافه شد و پلیت با فویل آلومینیومی پیچیده شد؛ سپس حدود ۱ ساعت در انکوباتور انکوبه شد تا کریستال‌های ارغوانی رنگ حاصل از احیاء MTT در آن حل شود و در نهایت جذب نوری هر نمونه در طول موج ۵۷۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفوتومتر نانودراپ (Milton Roy Spectronic 21D- USA) اندازه‌گیری شد. شدت رنگ ارغوانی حاصله معرف نسبت سلول‌های زنده در هر چاهک است. این مراحل ۴۸ ساعت بعد برای پلیت دوم و ۷۲ ساعت بعد برای پلیت سوم تکرار شد (۲۹ و ۴).

ارزیابی نوع مرگ سلولی با تکنیک فلوسایتومتری: میزان آپوپتوز و نکروز سلول‌های A549 که با غلظت ۱۰ $\mu\text{g/ml}$ از اسانس‌ها و عصاره‌ها تیمار شده بودند، با استفاده از روش فلوسایتومتری ارزیابی شد. به این منظور در پلیت ۲۴ خانه‌ای در هر چاهک به طور متوسط 10^4 سلول تحت تیمار کشت شدند. پس از ۷۲ ساعت، سلول‌ها با PBS شستشو و با یک واحد آنزیم تریپسین از پلیت جدا و سانتریفیوژ شدند. سپس رسوب سلولی با محلول ۱۰٪ بافر باندینگ شسته شده و ۱۵ دقیقه در ۱۵۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شدند. محلول FITS (Fluorescein Isothiocyanate) متصل به Annexin-V به میزان ۵ میکرولیتر به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و محیط انکوبه شدند. رنگ Annexin-V به فسفاتیدیل سرین‌های موجود در غشای سلول آپوپتوز یافته چسبیده و آن‌ها را نشان‌دار می‌کند. سپس با استفاده از ۵ میکرولیتر محلول PI (Propidium Iodide Ebioscience) آماده‌ی شمارش توسط دستگاه فلوسایتومتری (FACS-Calibur) شدند. PI در سلول‌های نکروز شده به DNA

جداگانه از پایه‌های نر گیاهان ارس مربوط به دو منطقه کرج و فیروزکوه انجام شد. ابتدا ۱۰ گرم از پودر گیاه خشک شده به ظرف شیشه‌ای دردار دارای ۱۰۰ میلی‌لیتر متانول ۷۰٪ اضافه شد. ظرف در انکوباتور شیکردار (innova42) در دمای ۴۵-۴۰ درجه سانتی‌گراد با دور ۱۰۰ rpm به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد. عصاره با کاغذ صافی واتمن صاف شد و با دستگاه روتاری (Heidolph Laborata Rotary Evaporator, WB eco, Germany) با دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد، فشار ۱۸۰-۱۵۰ و دور ۴۰ rpm، تغلیظ گردید (۶).

استخراج اسانس: اسانس‌گیری از ۱۵۰ گرم سرشاخه‌های خشک شده پایه‌ی نر گیاه ارس دو منطقه، به طور جداگانه و به روش کلونجر (تقطیر با آب) به مدت ۴ ساعت انجام شد. در صورت وجود قطرات آب در اسانس جدا شده، آب به کمک سولفات سدیم از اسانس حذف گردید و اسانس در ظرف تیره و در دار در یخچال نگهداری شد (۲).

کشت سلول: رده سلولی A549 سرطان ریه از انستیتو پاستور ایران خریداری گردید. سلول‌ها در فلاسک حاوی محیط کشت DMEM به همراه سرم ۱۰ درصد FBS و $100 \mu\text{g/ml}$ پنی‌سیلین و استرپتومایسین کشت داده شدند. فلاسک در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در داخل انکوباتور حاوی ۵ درصد CO_2 و رطوبت ۹۵٪ قرار داده شد (۲۹).

بررسی سمیت سلولی: پس از رشد و تکثیر مناسب سلول‌ها در فلاسک، سلول‌ها در ۳ پلیت ۹۶ خانه‌ای توزیع گردیدند (10^4 سلول در هر چاهک) و به مدت ۲۴ ساعت در داخل انکوباتور ۳۷ درجه نگهداری شدند. سپس محیط کشت هر چاهک به آرامی خارج شد و به منظور تیماردهی، از هر یک از عصاره‌ها و اسانس‌ها با استفاده از آب استوک ۱۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تهیه و از آن غلظت‌های ۲۵۰، ۱۲۵، ۶۰، ۳۰، ۱۰ و صفر میکروگرم بر میلی‌لیتر تهیه شد. برای بهتر حل شدن اسانس ابتدا اسانس در مقدار

کشت فاقد اسانس و عصاره به عنوان کنترل استفاده شد. نمونه‌های کنترل بیشترین تعداد سلول‌های زنده نزدیک به ۱۰۰ درصد را داشتند که ضمن نرمال سازی داده‌ها، ۱۰۰ درصد در نظر گرفته شد. در شکل ۱-الف، نمودار درصد زنده مانی سلول‌ها، ۲۴ ساعت پس از تاثیر اسانس‌ها و عصاره‌ها، نشان داده شده است. تحت تیمار غلظت‌های مختلف اسانس‌ها و عصاره‌ها درصد بسیار کمی از سلول‌ها (زیر ۲۰٪) زنده ماندند. این کاهش تعداد سلول‌های زنده نسبت به نمونه کنترل در هر سه زمان ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در تمام غلظت‌ها، تفاوت معنی‌دار داشتند ($P < 0.001$). پس از ۴۸ ساعت، میزان زنده‌مانی سلول‌ها باز هم کاهش یافت و بین ۱۲ تا ۰٫۲۴ درصد در تیمارهای مختلف متغیر بود. البته به جز تیمار با اسانس منطقه فیروزکوه که خطای آزمایش در اعمال تیماردهی مشاهده شد (شکل ۱-ب). بر اساس نمودار ج شکل ۱ پس از ۷۲ ساعت بیشترین درصد زنده‌مانی سلول‌ها تحت اثر $10 \mu\text{g/ml}$ اسانس فیروزکوه به میزان $22,98 \pm 1,21$ مشاهده شد و کمترین درصد زنده مانی سلول‌های مربوط تحت تیمار با عصاره کرج با غلظت $125 \mu\text{g/ml}$ به میزان $0,67 \pm 0,15$ درصد مشاهده گردید. پس از ۷۲ ساعت، IC_{50} برای عصاره کرج $0,172$ میکروگرم، عصاره فیروزکوه $0,426$ ، اسانس کرج $1,937$ و اسانس فیروزکوه $0,690$ میکروگرم بدست آمد (شکل ۱-د). همچنین در هر سه زمان یک اثر نسبی وابسته به غلظت نیز مشاهده شد که با افزایش غلظت اسانس‌ها و عصاره‌ها، اثر سیتوتوکسیک آن‌ها افزایش پیدا کرد و در غلظت‌های پایین‌تر، زنده‌مانی سلول‌ها بیشتر بود (شکل ۱).

نتایج سنجش نوع مرگ سلولی: پس از ۷۲ ساعت، درصد سلول‌های زنده، نکروزه و آپوپتوز تحت تاثیر $10 \mu\text{g/ml}$ از هر یک از اسانس و عصاره دو منطقه به کمک دستگاه فلوسایتمتری مورد سنجش قرار گرفت. پروتئین مزدوج شده با Annexin V-FITC به سطوح سلولی که فسفاتیدین سرین در آنها به لایه خارجی دو لایه فسفولیپیدی غشا آمده است متصل شده که نشانگر آپوپتوز اولیه است.

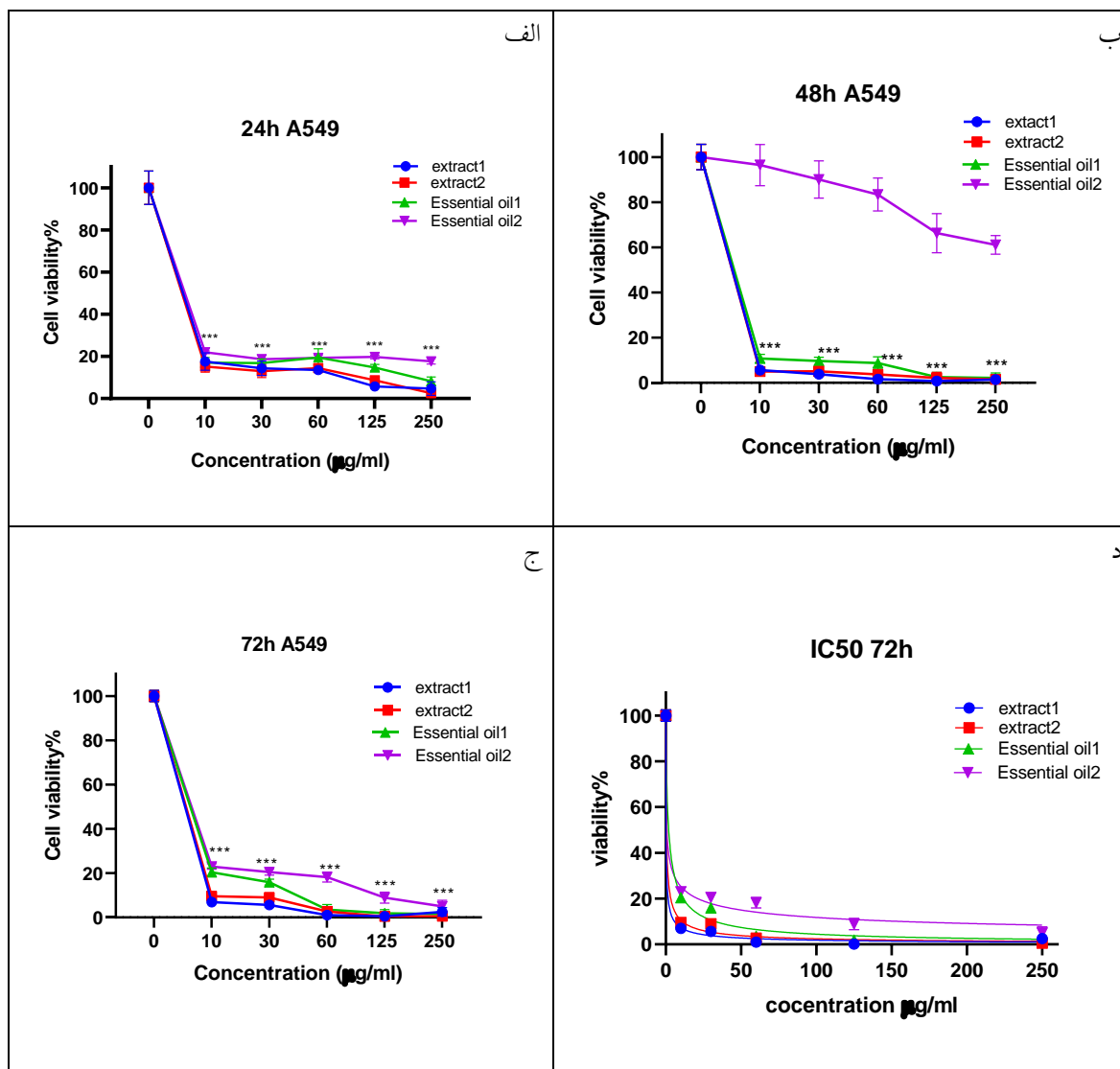
هسته متصل شده و تعداد سلول‌های نکروز شده را نشان می‌دهد. در این آزمون از محیط کشت فاقد اسانس و عصاره به عنوان کنترل منفی استفاده شد (۵ و ۱۷).

ارزیابی چرخه سلولی با تکنیک فلوسایتمتری: به منظور تعیین اینکه سلول‌ها در چه مرحله‌ای از چرخه سلولی هستند، سلول‌های A549 در پلیت ۲۴ خانه کشت شدند، پس از ۲۴ ساعت تحت تیمار با غلظت $10 \mu\text{g/ml}$ از اسانس‌ها و عصاره‌های دو منطقه قرار داده شدند. ۷۲ ساعت پس از تیماردهی، سلول‌ها از کف پلیت جدا شده و در 800 سانتریفوژ شدند. پس از شستشو با PBS سرد با اتانول ۷۰ درصد تثبیت شدند. برای بررسی فازهای چرخه سلولی، نمونه‌های کنترل و تیمار شده، به مدت ۳۰ دقیقه با 20 میکروگرم پروپیدوم ایوید PI و 20 میکروگرم RNase (حل شده در یک میلی‌لیتر PBS) مخلوط شدند و توسط دستگاه فلوسایتمتری (FACS-Calibur) مورد سنجش قرار گرفتند. با استفاده از نرم افزار Flowjo، درصد جمعیت سلولی در مراحل مختلف چرخه سلولی تعیین شد (۳).

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها: آزمایش بررسی اثر سیتوتوکسیک و بررسی چرخه و مرگ سلولی در قالب طرح کاملاً تصادفی و با سه تکرار انجام شد. پس از نرمال کردن داده‌ها آنالیز تجزیه واریانس دو طرفه (Two way ANOVA) اجرا شد. مقایسه میانگین‌ها (انحراف معیار \pm میانگین) با آزمون توکی با سطح احتمال $P < 0.05$ و رسم نمودارها با استفاده از نرم افزارهای SPSS 22 و GraphPad Prism 8 انجام شد.

نتایج

نتایج سمیت سلولی: اثر سمیت سلولی عصاره تهیه شده از پایه‌های نر کرج (extract1) و فیروزکوه (extract2) و اسانس‌های تهیه شده از پایه‌های نر کرج (Essential oil1) و فیروزکوه (Essential oil2) در سه زمان ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بر روی سلول‌های A549 بررسی شد. از محیط

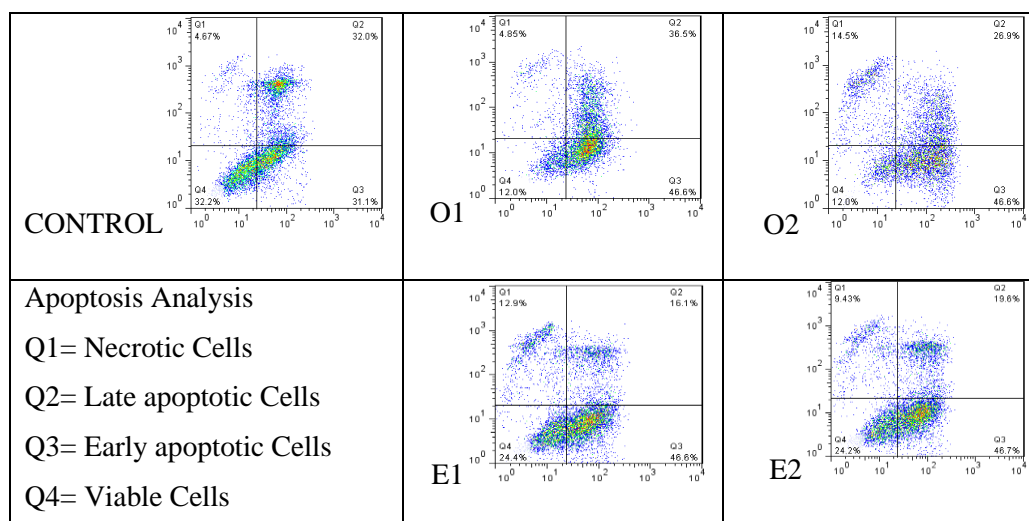


شکل ۱- الف) نمودار درصد زنده‌مانی سلول‌های سرطان ریه A549، پس از ۲۴ ساعت، ب) نمودار درصد زنده‌مانی سلول‌ها پس از ۴۸ ساعت، ج) نمودار درصد زنده‌مانی سلول‌های زنده پس از ۷۲ ساعت، د) نمودار IC_{50} ۷۲ ساعت پس از تیمار دهی.

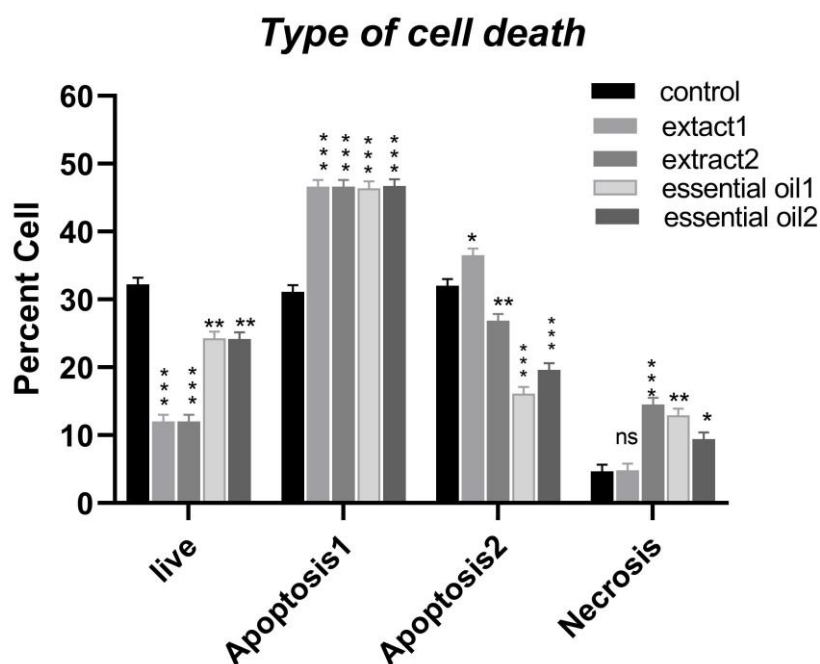
اختلاف میانگین درصد زنده‌مانی نمونه شاهد با سایر غلظت‌های تیمار در هر سه زمان در سطح $0/0001$ درصد معنی دار شد به جز غلظت‌های تیمار اسانس فیروزکوه در ۴۸ ساعت که خطا داشت. اعداد به صورت میانگین \pm انحراف معیار مقایسه شدند. extract1 = عصاره سرشاخه‌های ارس کرج، extract2 = عصاره سرشاخه‌های ارس کرج، Essential oil1 = اسانس سرشاخه‌های ارس کرج، Essential oil2 = اسانس سرشاخه‌های ارس فیروزکوه است. $P < 0.001 = ***$.

نشان داده شده است. بر اساس نمودار شکل ۳، درصد تعداد سلول‌های زنده تحت تاثیر کلیه تیمارها نسبت به نمونه شاهد کاهش معنی داری داشت. برعکس تعداد سلول‌های نکروتیک و نیز سلول‌های آپوپتوزی تاخیری تحت اثر اسانس‌ها و عصاره‌ها نسبت به نمونه کنترل افزایش معناداری را نشان داد ($P < 0.05$).

سلول‌هایی که توسط PI که رنگ غیر قابل نفوذ به DNA است رنگ شده‌اند در حقیقت سلول‌های نکروتیک هستند. سلول‌های رنگ شده با هر دو رنگ نشان دهنده فاز انتهایی آپوپتوز و فاز اولیه نکروز می‌باشند. در شکل ۲ نمودارهای حاصل از فلوسایتومتری سلول‌های نمونه شاهد و نمونه‌های تحت تیمار اسانس‌ها و عصاره‌های دو منطقه



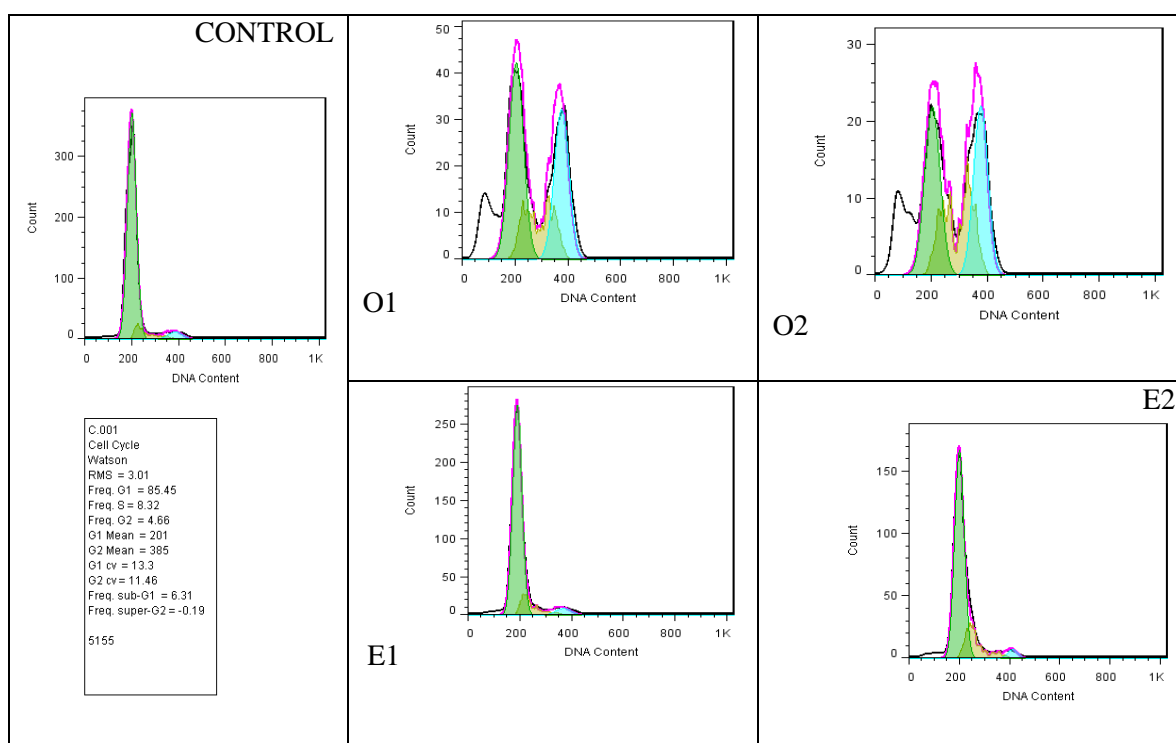
شکل ۲- نمودارهای حاصل از فلوسایتومتری در تعیین نوع مرگ سلولی: پس از ۷۲ ساعت، درصد سلول‌های زنده، نکروزه و آپوپتوز تحت تاثیر ۱۰ μg/ml از هریک از اسانس و عصاره دو منطقه به کمک دستگاه فلوسایتومتری مورد سنجش قرار گرفت. CONTROL = شاهد، O1 = عصاره سرشاخه های کرج، O2 = عصاره سرشاخه های فیروزکوه، E1 = اسانس سرشاخه های کرج، E2 = اسانس سرشاخه های فیروزکوه. Q1 = درصد سلول‌های نکروزه، Q2 = درصد سلول‌های آپوپتوز تاخیری، Q3 = درصد سلول‌های آپوپتوز اولیه، Q4 = درصد سلول‌های زنده



شکل ۳- نمودار نوع مرگ سلولی: نمودار بر اساس داده‌های حاصل از دستگاه فلوسایتومتری در شکل ۲ رسم شده است. بیشترین کاهش تعداد سلول‌های زنده مربوط به تیمار با عصاره‌های گیاهان هر دو منطقه بود. تحت تیمار این عصاره‌ها، درصد آپوپتوز اولیه به طور معنی داری بیش از نمونه‌های شاهد بوده است؛ اما فقط تحت تاثیر عصاره گیاهان کرج درصد سلول‌های آپوپتوز تاخیری نسبت به شاهد افزایش داشته است ($P < 0.05$). extract1 = عصاره سرشاخه‌های ارس کرج، extract2 = عصاره سرشاخه‌های ارس فیروزکوه، Essential oil1 = اسانس سرشاخه‌های ارس کرج، Essential oil2 = اسانس سرشاخه‌های ارس فیروزکوه است. live = سلول‌های زنده، Apoptosis1 = آپوپتوز اولیه، Apoptosis2 = آپوپتوز تاخیری و Necrosis = سلول‌های نکروزه را نشان می‌دهد. $*** (P < 0.001)$ ، $** (P < 0.01)$ ، $* (P < 0.05)$ ، ns بی معنی.

به طور معناداری نسبت به نمونه کنترل کاهش داشته ($P < 0.001$) و در مقابل فراوانی آن‌ها در مراحل S, G2, sub G1 چرخه‌ی سلولی افزایش معناداری داشته است ($P < 0.001$). در رابطه با اثر اسانس‌ها بر چرخه‌ی سلولی، هر دو اسانس مانند عصاره‌ها فراوانی سلول‌ها در مرحله‌ی G1 به طور معنی‌داری نسبت به شاهد کاهش دادند و در مرحله S به طور معنی‌داری افزایش دادند اما در سایر مراحل اثر معنی‌داری نداشتند.

نتایج بررسی وضعیت چرخه سلولی: وضعیت چرخه‌ی سلولی سلول‌های A549 تحت تیمار ۷۲ ساعته با غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر اسانس‌های به دست آمده از پایه‌های نر کرج (اسانس ۱) و فیروزکوه (اسانس ۲) و نیز عصاره‌های به دست آمده از پایه‌های نر کرج (عصاره ۱) و فیروزکوه (عصاره ۲)، با استفاده از روش فلوسایتومتری بررسی شد (شکل ۴). داده‌های حاصل همان‌طور که در نمودار شکل ۵ نیز نشان داده شده است حاکی از آن بود که تحت اثر هر دو عصاره، فراوانی سلول‌ها در مرحله‌ی G1



شکل ۴- نمودارهای حاصل از فلوسایتومتری که درصد سلول‌ها را در مراحل چرخه سلولی نشان می‌دهد. CONTROL = شاهد، O1 = عصاره سرشاخه‌های کرج، O2 = عصاره سرشاخه‌های فیروزکوه، E1 = اسانس سرشاخه‌های کرج، E2 = اسانس سرشاخه‌های فیروزکوه.

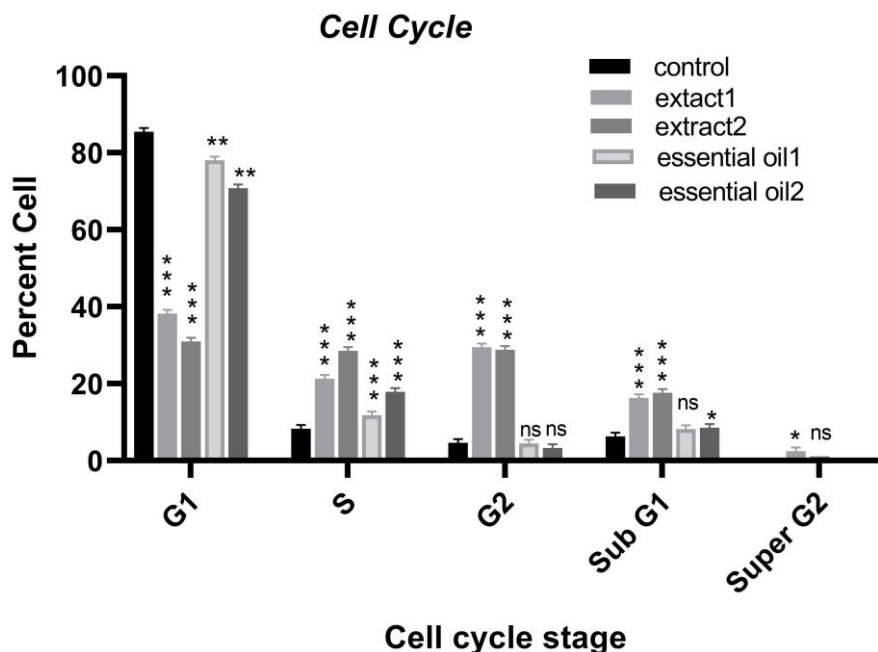
ارس یا *Juniperus excelsa* به طور سنتی برای دیسمنوره، سرفه، برونشیت و سرماخوردگی، زردی و سل استفاده می‌شد (۳۶). در مطالعات نپی و همکاران (۲۰۱۲) عصاره متانولی ارس فعالیت ضد توموری شدید را با مهار ۸۶/۶ درصد و فرکشن دی اتیل اتر آن کمترین فعالیت ضد توموری را با مهار ۴۶/۶ درصد نشان داد. بررسی‌های

بحث

استفاده درمانی از گیاهان بخشی از تاریخ جهانی بشر است و محصولات مشتق شده از گیاهان به طور مکرر برای درمان یا پیشگیری از بیماری‌ها استفاده می‌شود. در سال‌های اخیر، چندین محصول گیاهی با اثرات ضد سرطانی در سیستم آزمایش‌های مختلف شناسایی شده است (۲۰).

گزارشی از اثر عصاره این گیاه بر روی رده سلولی A549 سرطانی ریه ارائه ندادند (۱۳ و ۲۳).

بعدی اسماعیلی و همکاران (۲۰۱۴) بر روی خواص ضد سرطانی ۲۷ گیاه دارویی از جنوب کشور بر چند رده سلول سرطانی نیز خواص ضد توموری ارس را تایید کرد ولی



شکل ۵- نمودار درصد سلول‌ها در هر یک از مراحل چرخه سلولی: مقایسه هر یک از عصاره‌ها و اسانس‌ها با نمونه شاهد اختلاف معنی‌دار آنها ($P < 0.001$) را در مرحله S و G1 نشان داد. در مرحله G2 هر دو عصاره موجب افزایش معنی‌دار درصد سلول‌ها نسبت شاهد شدند ($P < 0.001$) ولی تغییرات درصد سلول‌ها تحت تاثیر اسانس‌ها در مرحله G2 و SuperG2 معنی‌دار نبود. در مرحله SubG1 افزایش معنی‌دار درصد سلول‌ها تحت تاثیر هر دو عصاره نسبت به شاهد مشاهده شد ($P < 0.001$) = extract1 = عصاره سرشاخه‌های ارس کرچ، = extract2 = عصاره سرشاخه‌های ارس فیروزکوه، = Essential oil1 = اسانس سرشاخه‌های ارس کرچ، = Essential oil2 = اسانس سرشاخه‌های ارس فیروزکوه است. *** ($P < 0.001$)، ** ($P < 0.01$)، * ($P < 0.05$)، ns = بی معنی.

دادند عصاره این گیاه باعث کاهش ATP سلول به دلیل مهار تنفس میتوکندری شد این کاهش ATP وابسته به زمان و غلظت عصاره بود ولی به احتمال زیاد مکانیزم سمیت سلولی این عصاره استرس اکسیداتیو نبوده است (۲۰). در تحقیق حاضر با افزایش غلظت اسانس‌ها و عصاره‌ها سمیت آنها بیشتر شد. در چند پروژه تحقیقاتی خواص ضد سرطانی عصاره گیاه ارس جمع آوری شده، از مناطق دیگر بر روی چندین رده سلولی دیگر نشان داده شده است که با نتایج تحقیق حاضر همسو است (۱۳ و ۲۷ و ۲۸). سمیت سلولی اسانس گیاه ارس نیز توسط توپکو و همکارانش بر روی چندین رده سلول سرطانی از جمله سلول‌های

بررسی اثر سمیت سلولی عصاره‌ها و اسانس‌ها بر زنده مانی سلول‌های سرطانی A549 نشان داد، سمیت عصاره‌ها گیاهان ارس هر دو منطقه از دامنه جنوبی البرز، از اسانس‌های این گیاه بیشتر بود ولی از نظر خواص سمیت سلولی اختلافی بین اسانس‌ها و عصاره‌های دو منطقه وجود نداشت. در مجموع هم اسانس‌ها و هم عصاره‌ها اثر سمیت سلولی شدیدی داشتند به طوری که مقادیر زنده مانی همه آنها از IC50 کمتر بود و کاهش شدید تعداد سلول‌ها ۲۴ ساعت بعد از تاثیر آنها مشاهده شد. خباز آذر و همکاران (۲۰۱۲) نیز سمیت زیاد عصاره *Juniperus excelsa* را بر سلول‌های سرطان HepG2 گزارش کردند همچنین نشان

سرطان ریه رده‌ی LU1 مورد مطالعه قرار گرفت و قدرت سمیت سلولی بالای آن مشخص گردید (۳۳).

بررسی میزان مرگ سلولی تحت اثر تیمار ۷۲ ساعته‌ی سلول‌های A549 با غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر اسانس‌ها و عصاره‌های پایه‌های نر دو منطقه با استفاده از روش فلوسایتومتری کاهش تعداد سلول‌های زنده نسبت به نمونه‌های شاهد را تایید کرد و تعداد سلول‌های زنده تحت تیمار عصاره‌ها کمتر از تعداد آنها تحت تیمار اسانس‌ها بود که نتایج سنجش درصد زنده مانی با تست MTT را تایید کرد. درصد سلول‌هایی که در مرحله آپوپتوز اولیه بودند تحت تاثیر همه تیمارها به طور مشابه هم و بیشتر از نمونه شاهد بودند ولی تعداد سلول‌هایی که در مرحله آپوپتوز تاخیری بودند تحت تاثیر عصاره‌ها بیشتر از اسانس‌ها بود که نشان می‌دهد توان عصاره سرشاخه‌های این گیاه به ویژه عصاره حاصل از گیاهان ارس کرج برای القای مرگ برنامه‌ریزی شده سلول یا همان آپوپتوز بیشتر از اسانس آن است و با نتایج درویشی و همکاران (۲۰۱۷) در مورد اثر عصاره ارس بر روی رده‌های سلولی Nalm-6 و Reh همسو می‌باشد (۱۰). بیشتر بودن آپوپتوز تاخیری نسبت به آپوپتوز اولیه نشان دهنده شکسته شدن DNA و تغییرات غشایی است. در تحقیق حاضر آپوپتوز اولیه بیشتر است که نشان می‌دهد عصاره و اسانس این گیاه بر روی غشا بیشتر از شکست DNA تاثیر گذاشته است. اختلال در فرآیند آپوپتوز عامل بسیار مهمی در ایجاد سرطان و گسترش آن به شمار می‌رود و مقاومت به آپوپتوز از دلایل اصلی مقاومت دارویی سلول‌های سرطانی در برابر شیمی‌درمانی است (۱۸و۵).

بررسی وضعیت چرخه سلولی، سلول‌های تحت تیمار ۷۲ ساعته با اسانس‌ها و عصاره‌های با غلظت ۱۰ میکروگرم نشان داد، تعداد سلول‌هایی که در مرحله G1 چرخه سلولی بودند تحت تاثیر عصاره‌های دو منطقه بویژه منطقه فیروزکوه کاهش معنی‌داری نسبت به شاهد داشت و بر

عکس تحت تاثیر عصاره‌ها تعداد سلول‌هایی که در سایر مراحل چرخه بودند نسبت به شاهد افزایش یافت و مجدد این افزایش در سلول‌های تحت تیمار عصاره‌ها بیشتر از اسانس‌ها بود. به این ترتیب به طور ویژه در اثر تیمار با عصاره سرشاخه‌های ارس کاهش رشد و تجمع سلول‌ها در نقاط کنترل چرخه سلولی مشاهده شد. مقایسه نمودارهای حاصل نشان داد که چرخه سلولی سلول‌های تحت تیمار عصاره‌ها در مقایسه با شاهد در مرحله G2/M متوقف شدند در حالیکه سلول‌های تحت تیمار اسانس‌ها در مرحله G0/G1 متوقف گردید. این نتایج با یافته‌های زنگ و همکاران (۲۰۱۵) همسو است (۳۸).

تین و همکاران (۲۰۱۲) نشان دادن ترکیب گیاهی آرتمیسینین متعلق به برخی گیاهان خانواده کمپوزیته با تنظیم پایین بیان CDK2، CDK4، سیکلین E، سیکلین D1 و E2F1، و افزایش بیان p16، باعث توقف شدید چرخه سلولی G1 در سلول‌های سرطانی پروستات، سلول‌های سرطانی پستان انسان و سلول‌های سرطانی مری می‌شود (۳۲). اوریدونین ترکیب گیاهی دیگری متعلق به برخی گیاهان تیره لامیاسه می‌تواند چرخه سلولی را در مرحله G2/M در سلول‌های کارسینومای کبد HepG2 متوقف کند (۳۵).

نتیجه‌گیری کلی

بررسی‌ها نشان داد عصاره‌ها و اسانس‌های گیاهان ارس منطقه معتدله دامنه‌های جنوبی البرز نیز سمیت سلولی زیادی دارند، ولی تفاوت معنی‌داری بین دو منطقه کرج و فیروزکوه نبود. در مجموع سمیت عصاره‌ها از اسانس‌ها به طور معنی‌داری بیشتر بود. علی‌رغم برابر بودن درصد سلول‌های آپوپتوز اولیه تحت تاثیر عصاره‌ها و اسانس‌ها اما درصد تعداد سلول‌هایی که تحت تاثیر عصاره‌ها دچار آپوپتوز تاخیری و نکروز شده بودند بیشتر بود. تحت تیمار با عصاره‌ها توقف درصد سلول‌هایی که در مرحله G2 و Sub G1 و تا حدودی S متوقف شدند بیشتر از شاهد و

خود را از کارشناسان محترم آزمایشگاه تحقیقات زیست‌شناسی دانشگاه آزاد واحد یادگار امام خمینی (ره) شهری و نیز آزمایشگاه ژنیران به سبب مساعدت‌هایشان جهت انجام پروژه حاضر اعلام نمایند.

سلول‌های تحت تیمار با اسانس بود و در گروه اخیر اکثر سلول‌ها در G1 متوقف شدند.

تشکر و قدردانی

نویسندگان بر خود لازم می‌دانند مراتب تشکر و قدردانی

منابع

۱. امامزاده هاشمی، س. ۱۳۸۸. بررسی و مقایسه تانن‌های حاصل از دو گونه سرو کوهی *Juniperus communis* و *Juniperus polycarpus* از استان گلستان. گیاهان دارویی، ۹: ۳۳-۸۳.
۲. جایمند، ک. رضایی، م. ۱۳۸۵. اسانس، دستگاه‌های تقطیر، روش‌های آزمون و شاخص‌های بازداری در تجزیه اسانس. انجمن گیاهان دارویی ایران. ۳۵۰ صفحه.
۳. رجب‌نیات، مشکینی آ. ۱۳۹۶. کاهش رشد سلولی و القای آپوپتوز در سلول‌های سرطان استخوان توسط نانو ذره نقره، مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی بیرجند، ۲۴، ویژه نامه تابستان، ۵۰-۶۱.
۴. زاهدی، ا. ناجی، ط. احمدی، ر. ۱۳۹۸. بررسی اثرات عصاره هیدروالکلی جلبک *Sargassum ciliforium* بر رده سلولی سرطان کولون HT-29 و ارزیابی بیان ژنهای P23 و APC با of *Juniperus Excelsa* Extract on Esophageal Cancer Cell Line KYSE-30 and Normal Fibroblast Cell Line HU02. *Medical Laboratory Journal*, 13(5), 13-18.
5. Emami S.A., B. F. Abedindo, M. Hassanzadeh-Khayyat. 2011. Antioxidant Activity of the Essential Oils of Different Parts of *Juniperus excelsa* M. Bieb. subsp. *excelsa* and *J. excelsa* M. Bieb. subsp. *polycarpus* (K. Koch) Takhtajan (Cupressaceae). *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 10 (4): 799-810
6. Esmaili, S., Hamzeloo-Moghadam, M., Ghaffari, S., Mosaddegh, M. 2014. Cytotoxic activity screening of some medicinal plants from south of Iran. *Res. J. Pharmacogn.* 1 (4), 19-25.
7. Fatemi, S. S., Rahimi, M., Tarkesh, M., & Ravanbakhsh, H. 2018. Predicting the impacts of climate change on the distribution of *Juniperus excelsa* M. Bieb. in the central and eastern Alborz Mountains, Iran. *iForest-Biogeosciences and Forestry*, 11(5), 643.
۵. صادقی، ا. بهمنش، م. شریفی، م. محمد سلطانی، ب. و احمدیان چاشمی، ن. ۱۳۹۳. القای آپوپتوز رده سلولی کارسینومای مثانه ۵۶۳۷ در اثر تیمار با پودوفیلوتوکسین، مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی، جلد ۳: ۲۷، ۳۹۹-۴۰۵.
۶. میر اولیایی، م. چلونگر، ر. امین جعفری، ا. طالبی، ا. غیاث، م. ۱۳۹۶. بررسی هیستوپاتولوژی ترمیم زخم‌های عمیق پوستی غیر عفونی با عصاره هیدروالکلی گیاهان مرزه کوهی، بادرنجبویه، سدر، گل ختمی و حنا. مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی، ۳۰: ۲-۲۲۲-۲۱۲.
۷. میرجلیلی، س. ع. ۱۳۹۲. شناخت گیاهان دارویی و معطر. موسسه آموزش عالی علمی-کاربردی جهاد دانشگاهی. ص ۲۱۵.
8. Andalib, A., Jafarian-Dehkordi, A., Shokouhi-Shourmasti, R., & Abdollah-Kohpayeh-Esfahani, S. 2016. The effect of Persian *Juniperus excelsa* extracts on cell-cycle phases of MCF-7 breast cancer cell line. *Journal of Isfahan Medical School*, 33(360), 2004-2012.
9. Darvishi, M., Esmaili, S., Dehghan-nayeri, N., Mashati, P., & Gharehbaghian, A. 2016. The effect of extract from aerial parts of *Juniperus excelsa* plant on proliferation and apoptosis of acute lymphoblastic leukemia cell lines, Nalm-6 and Reh. *Scientific Journal of Iran Blood Transfus Organ*, 13(4), 304-313.
10. Darvishi, M., Esmaili, S., Dehghan-Nayeri, N., Mashati, P., & Gharehbaghian, A. 2017. Anticancer effect and enhancement of therapeutic potential of Vincristine by extract from aerial parts of *Juniperus excelsa* on pre-B acute lymphoblastic leukemia cell lines. *Journal of Applied Biomedicine*, 15(3), 219-226.
11. Elikaei, A., Vazini, H., Javani Jouni, F., & Zafari, J. 2019. Investigating Cytotoxic Effects

15. Ghasemi, N., Azadi, N.-A., Pourmokhtar, M., Abolghasemi, J., Ashouri, A., Mobaderi, T., & Rasouli, M. **2018**. Parametric and semi-parametric survival analysis of patients with lung cancer. *Koomesh*, 20(1), 152-160 .
16. Huang, M.-Y., Zhang, L.-L., Ding, J., & Lu, J.-J. **2018**. Anticancer drug discovery from Chinese medicinal herbs. *Chinese medicine*, 13(1), 35 .
17. Jenner, D., Chong, D., Walker, N., & Green, A. C. **2018**. An imaging flow cytometry method to assess ricin trafficking in A549 human lung epithelial cells. *Methods*, 134, 41-49 .
18. Johnstone RW, Ruefli AA, Lowe SW. **2002**. Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy. *Cell* 108: 153-64.
19. Kasaian, J., Behravan, J., Hassany, M., Emami, S., Shahriari, F., & Khayyat, M. **2011**. Molecular characterization and RAPD analysis of Juniperus species from Iran. *Genetics and Molecular Research*, 10(2), 1069-1074
20. Khabbaz Azara, S., Moeena, M. R., Niknahad H. **2012**, Cytotoxicity of Juniperus excels and Salvia mirzayanii Extracts against HepG2 Cells. *Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences*, Autumn 2012: 8(4): 241-247.
21. Moein, M., Ghasemi, Y., Moein, S., & Nejati, M. **2010**. Analysis of antimicrobial, antifungal and antioxidant activities of Juniperus excelsa M. B subsp. Polycarpus (K. Koch) Takhtajan essential oil. *Pharmacognosy research*. 2(3), 128 .
22. Moein, M. R., Moein, S., & Mousavi, F. **2014**. Study the relationship between antioxidant potential and phenolic contents of Juniperus Excelsa fruit. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*.
23. Nabi S, Ahmed N, Khan MJ, Bazai Z, Yasinzai M, Al-Kahraman Yasser MSA. **2012**. *In vitro* Antileishmanial, antitumor activities and phytochemical studies of methanolic extract and its fractions of *Juniperus excelsa* berries. *World Applied Sci J*; 19 (10): 1495-1500.
24. Nikoumanesh, S., & Asgharian, A. M. **2017**. The Antioxidant and cytotoxic Effects of nettle-leaves (*Urtica dioica* L.) Ethanolic extract on the A549 cell line. *New Cellular and Molecular Biotechnology Journal*, 7(26), 27-34 .
25. Pirani, A., Moazzeni, H., Mirinejad, S., Naghibi, F., & Mosaddegh, M. **2011**. Ethnobotany of *Juniperus excelsa* M. Bieb. (Cupressaceae) in Iran. *Ethnobotany research and applications*, 9, 335-341 .
26. Russo, E. B. **2011**. Taming THC: potential cannabis synergy and phytocannabinoid-terpenoid entourage effects. *British journal of pharmacology*, 163(7), 1344-1364 .
27. Saab, A.M., Guerrini, A., Sacchetti, G., Maietti, S., Zeino, M., Arend, J., Gambari, R., Bernardi, F., Efferth, T., **2012**. Phytochemical analysis and cyto-toxicity towards multidrug-resistant leukemia cells of essential oils de-rived from lebanese medicinal plants. *Planta Med.* 78 (18).
28. Sadeghi-aliabadi, H., Emami, A., Sadeghi, B., Jafarian, A., **2009**. In vitro cytotoxicity of two subspecies of *Juniperus excelsa* on cancer cells. *Iran. J. Basic Med. Sci.* 11 (4), 250-253.
29. Sak, K., Lust H., Kase M., Jall, J., **2018**. Cytotoxic action of methylquercetins in human lung adenocarcinoma cells. *Oncol Lett.* 15(2)-1973-1978.
30. Shekari, M., Gorgi, S., Rahimi Tesiye, M., Valizadegan, F., & Oryan, S. **2019**. Antinociceptive and Anti-inflammatory Effects of Hydroalcoholic Extract of Female Cones of Juniper (*Juniperus excelsa*) and *Plantago ovata* in Male Wistar Rats. *Qom University of Medical Sciences Journal*, 13(7), 62-71
31. Tewari, D., Rawat, P., & Singh, P. K. **2019**. Adverse drug reactions of anticancer drugs derived from natural sources. *Food and chemical toxicology*, 123, 522-535 .
32. Tin AS, Sundar SN, Tran KQ, Park AH, Poindexter KM, Firestone GL. **2012** . Antiproliferative effects of artemisinin on human breast cancer cells requires the downregulated expression of the E2F1 transcription factor and loss of E2F1-target cell cycle genes. *Anticancer Drugs*; 23(4):370-9.
33. Topçu, G., Gören, A. C., Bilsel, G., Bilsel, M., Çakmak, O., Schilling, J., & Kingston, D. G. **2005**. Cytotoxic Activity and Essential Oil Composition of Leaves and
34. Torre, L. A., Siegel, R. L., & Jemal, A. **2016**. Lung cancer statistics. In *Lung cancer and personalized medicine* (pp. 1-19): Springer.
35. Wang H, Ye Y, Pan SY, Zhu GY, Li YW, Fong DW, Yu ZL. **2011**. Proteomic identification of

- proteins involved in the anticancer activities of oridonin in HepG2 cells. *Phytomedicine*. 18(2-3):163-9.
36. Yesilada E, Honda G, Sezik E, Tabata T, Fujita T, Tanaka T. **1995**. Traditional medicine in Turkey V. Folk medicine in the inner Taurus Mountains. *J Ethnopharmacol*. 46: 133-152.
37. Zhang, Y., Liang, Y., & He, C. **2017**. Anticancer activities and mechanisms of heat-clearing and detoxicating traditional Chinese herbal medicine. *Chinese medicine*, 12(1), 20 .
38. Zhang, Z., Guo, S., Liu, X., & Gao, X. **2015**. Synergistic antitumor effect of α -pinene and β -pinene with paclitaxel against non-small-cell lung carcinoma (NSCLC). *Drug research*, 65(04), 214-218 .
37. Zhang, Y., Liang, Y., & He, C. **2017**. Anticancer activities and mechanisms of heat-clearing and

Comparison of cytotoxic properties of essential oil and extract of *Juniperus excelsa* branches of Alborz region on lung cancer cell line A549

Maddah S.M.*, Moraghbi F. and Sarhadi S.

Dept. of Biology, Yadegar-e-Imam Khomeini (RAH) Shahre Rey Branch, Islamic Azad University, Tehran, I.R. of Iran

Abstract

Lung cancer is one of the most common types of cancer in the world and Iran. Herbs are a source of a variety of antioxidant compounds that can be used to produce anti-cancer drugs. In the present study, the effect of cytotoxicity of essential oil and hydroalcoholic extract of *Juniperus excelsa* on A549 lung cancer cells was investigated. The branches of male rootstocks of Aras plant were collected from Chehel Cheshmeh in Firoozkooh and Sirachal in Karaj and the essential oil and extract were prepared by Clevenger and soaking methods, respectively. The degree of cytotoxicity, different concentrations of essential oil and extract of the two regions, on A549 cells in three times of 24, 48, and 72 hours Was evaluated using MTT method. Flow cytometry was used to evaluate cell death and cell cycle in cells treated for 72 hours with 10 $\mu\text{g/ml}$ of essential oil and extract of two regions. The results of cytotoxicity showed that the lethal power of extracts was significantly higher than essential oils, but there was no significant difference between different regions ($P < 0.01$). Also, a further decrease in the number of viable cells and an increase in cell entry into the Sub G1 phase, resulting in an increase in apoptosis treated with male root extract, was proven. Thus, the extract of the branches of this plant has anti-cancer properties by stopping the cell cycle in the G2 / M stage.

Keywords: *Juniperus excelsa*, Apoptosis, Cell Cycle, Lung cancer, Cytotoxicity