Cytotoxic and Antiproliferative Effects of Methanolic Extract of *Lavandula Angustifolia* on MCF-7 Breast Cancer Cell Line

Mitra Javanmardi[1], Mohammad-Karim Khosropanah[2], Mohammad-Nazir Menbari[3], Nikoo Darvishi[4], Sabrieh Amini[5], Nahid Haghnazari[6], Mohammad Abdi[7,8]

1. Ph.D. Candidate, Department of Biology, Sanandaj Branch, Islamic Azad University, Sanandaj, Iran. ORCID ID: 0000-0002-3854-5191

2. Assistant Professor, Department of Biology, Sanandaj Branch, Islamic Azad University, Sanandaj, Iran., (Corresponding Author), Tel: 087-33288661, Email: khosropanah.mk@iausdj.ac.ir. ORCID ID: 0000-0003-2683-1585

3. Assistant Professor, Cellular and Molecular Research Center, Research Institute for Health Development, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran. ORCID ID: 0000-0001-8668-2281

4. Assistant Professor, Cellular and Molecular Research Center, Research Institute for Health Development, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran. ORCID ID: 0000-0002-9132-9164

5. Assistant Professor, Department of Biology, Sanandaj Branch, Islamic Azad University, Sanandaj, Iran. ORCID ID: 0000-0002-9978-5455

6. Assistant Professor, Department of Biology, Sanandaj Branch, Islamic Azad University, Sanandaj, Iran. ORCID ID: 0000-0002-4717-5153

7. Associate Professor, Cellular and Molecular Research Center, Research Institute for Health Development, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran. ORCID ID: 0000-0002-4766-0423

8. Associate Professor, Department of Clinical Biochemistry, Faculty of Medicine, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran., (Corresponding Author), Tel: 087-33664674, E-mail: abdi@muk.ac.ir. ORCID ID: 0000-0002-4766-0423

ABSTRACT

Background and Aim: In recent years, special attention has been paid to the use of complementary drugs in the treatment of breast cancer. Previous studies have shown that lavender (*Lavandula angustifolia*) has antiproliferative properties. In the present study, the possible antiproliferative effects of methanolic extract of lavender in MCF-7 breast cancer cell line were investigated.

Materials and Methods: In this experimental study, MCF-7 breast cancer cell line was treated with different concentrations of methanol extract of lavender. Cell survival was assessed using MTT assay. The cell cycle was analyzed using flow cytometry. The ability of breast cancer cells to form a colony after treatment with plant extract was also investigated. The main components of the methanol extract were identified by GC/MS method. The T-test, ANOVA and Tukey statistical methods were used for data analysis.

Results: The results showed that the methanolic extract has significant cytotoxicity on MCF-7 cells, the G0/G1 phase arrest after treatment with methanolic extract in the breast cancer cell line increased significantly. The main contents of the MetOH extract were determined as Coumarin (59.44%), Tricosane (15.22%), 7-methoxy Coumarin (12.69%), and 2-Furancarboxaldehyde (6.7%).

Conclusion: In conclusion, according to the results of this study, the lavender methanolic extract has a cytotoxic effect on MCF-7 cells; therefore, lavender can be considered as a potential therapeutic supplement in future studies of breast cancer.

Keywords: Cytotoxicity, Breast cancer, *Lavandula angustifolia*, Methanolic extract, MCF-7

Received: Nov 8, 2020 **Accepted:** Dec 1, 2020

How to cite the article: Mitra Javanmardi, Mohammad-Karim Khosropanah, Mohammad-Nazir Menbari, Nikoo Darvishi, Sabrieh Amini, Nahid Haghnazari, Mohammad Abdi. Cytotoxic and Antiproliferative Effects of Methanolic Extract of *Lavandula Angustifolia* on MCF-7 Breast Cancer Cell Line. SJKU. 2021;26(1):86-97.

Copyright © 2018 the Author (s). Published by Kurdistan University of Medical Sciences. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Non Commercial License 4.0 (CCBYNC), where it is permissible to download, share, remix, transform, and buildup the work provided it is properly cited. The work cannot be used commercially without permission from the journal

اثرات سمیت سلولی و ضد تکثیری عصاره متانولی اسطوخودوس (*Lavandula angustifolia*) روی رده‌ی سلولی MCF-7 سرطان پستان

میترا جوانمردی[۱]، محمد کریم خسروپناه[۲]، محمد نظیر منبری[۳]، نیکو درویشی[۴]، صبریه امینی[۵]، ناهید حق نظری[۶]، محمد عبدی[۷و۸]

۱. دانشجوی دکتری بیوشیمی، گروه زیست‌شناسی، واحد سنندج، دانشگاه آزاد اسلامی، سنندج، ایران. کد ارکید: ۵۱۹۱-۳۸۵۴-۰۰۰۲-۰۰۰۰

۲. استادیار گروه زیست‌شناسی، واحد سنندج، دانشگاه آزاد اسلامی، سنندج، ایران (نویسنده مسئول)، تلفن: ۳۳۲۸۸۶۶۱-۰۸۷، پست الکترونیک: rkhosropanah.mk@iausdj.ac.i، کد ارکید: ۱۵۸۵-۲۶۸۳-۰۰۰۳-۰۰۰۰

۳. استادیار مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، پژوهشکده توسعه سلامت، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران. کد ارکید: ۲۲۸۱-۸۶۶۸-۰۰۰۱-۰۰۰۰

۴. استادیار مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، پژوهشکده توسعه سلامت، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران. کد ارکید: ۹۱۶۴-۹۱۳۲-۰۰۰۲-۰۰۰۰

۵. استادیار گروه زیست‌شناسی، واحد سنندج، دانشگاه آزاد اسلامی، سنندج، ایران. کد ارکید: ۵۴۵۵-۹۹۷۸-۰۰۰۲-۰۰۰۰

۶. استادیار گروه زیست‌شناسی، واحد سنندج، دانشگاه آزاد اسلامی، سنندج، ایران. کد ارکید: ۵۱۵۳-۴۷۱۷-۰۰۰۲-۰۰۰۰

۷. مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، پژوهشکده توسعه سلامت، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران. کد ارکید: ۰۴۲۳-۴۷۶۶-۰۰۰۲-۰۰۰۰

۸. دانشیار گروه بیوشیمی بالینی، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران (نویسنده مسئول)، تلفن: ۳۳۶۶۴۶۷۴۰-۰۸۷، پست الکترونیک: abdi@muk.ac.ir، کد ارکید: ۰۴۲۳-۴۷۶۶-۰۰۰۲-۰۰۰۰

چکیده

زمینه و هدف: در سال‌های اخیر توجه ویژه‌ای به استفاده از داروهای مکمل در درمان سرطان پستان شده است. در مطالعات پیشین بیان شده است که گیاه اسطوخودوس (*Lavandula angustifolia*) دارای خواص ضد تکثیر سلولی است. در مطالعه حاضر اثرات ضد تکثیری احتمالی عصاره‌ی متانولی گیاه اسطوخودوس در رده سلولی MCF-7 سرطان پستان مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، رده سلولی MCF-7 سرطان پستان با غلظت‌های مختلف عصاره‌ی متانولی گیاه اسطوخودوس تیمار شد. بقای سلولی با استفاده از روش MTT بررسی گردید. چرخه سلولی با استفاده از فلوسیتومتری مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. همچنین توانایی رده سلولی سرطان پستان در تشکیل کلنی پس از تیمار با عصاره گیاه بررسی شد. شناسایی ترکیبات اصلی عصاره گیاهی نیز به روش GC/MS انجام گرفت. از روش‌های آماری t-test، ANOVA و Tukey جهت آنالیز نتایج استفاده شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که عصاره متانولی این گیاه، سمیت سلولی قابل توجهی روی سلول‌های MCF-7 دارد. توقف فاز G0/G1 پس از تیمار با عصاره متانولی در رده سلولی سرطان پستان به طور قابل‌توجهی افزایش یافت. محتویات اصلی عصاره متانولی به‌ترتیب کومارین (۵۹/۴۴ درصد)، تری کوزان (۱۵/۲۲ درصد)، ۷-متوکسی کومارین (۱۲/۶۹ درصد) و ۲- فورانکربوکسالدئید (۶/۷ درصد) تعیین شد.

نتیجه‌گیری: در مجموع، بر اساس نتایج این تحقیق، عصاره متانولی اسطوخودوس روی سلول‌های MCF-7 اثر سمیت سلولی دارد؛ بنابراین، اسطوخودوس می‌تواند به‌عنوان یک مکمل درمانی بالقوه در مطالعات آینده سرطان پستان در نظر گرفته شود.

واژه های کلیدی: سمیت سلولی، سرطان پستان، اسطوخودوس، عصاره متانولی، MCF-7

وصول مقاله:۹۹/۸/۱۲ اصلاحیه نهایی:۹۹/۹/۶ پذیرش:۹۹/۹/۱۱

مقدمه

سرطان پستان به‌عنوان شایع‌ترین سرطان در بین زنان در نظر گرفته می‌شود و ۶۲۷۰۰۰ مرگ ناشی از سرطان در سال ۲۰۱۸ در سراسر جهان را تشکیل می‌دهد. میزان شیوع بررسی شده بر اساس سن سرطان پستان در ایران ۲۳/۱ در ۱۰۰۰۰۰ است(۲ ,۱). متداول‌ترین راهکارهای درمانی سرطان پستان شامل شیمی درمانی، جراحی، رادیوتراپی، هورمون درمانی و درمان هدفمند است. با این وجود، عوارض جانبی کوتاه مدت و طولانی مدت ناشی از مداخلات درمانی مانند یائسگی، ناباروری زودرس، اختلال عملکرد قلب، سرطان خون و اختلال عملکرد شناختی به - طور مکرر اتفاق افتاده است(۴ ,۳). بررسی‌های اخیر نشان داده است که داروهای مکمل، مانند ترکیبات طبیعی، می‌توانند در بسیاری از بیماران سرطانی با حداقل عوارض جانبی، درمان را بهبود ببخشند(۷-۵).

اسطوخودوس *(Lavandula angustifolia)* از گیاهان خانواده نعناع بوده و بومی غرب مدیترانه می‌باشد. از مدت‌ها قبل، عصاره روغنی گل و برگ اسطوخودوس به‌عنوان داروی گیاهی استفاده شده است(۸). اخیراً به خواص سیتوتوکسیک عصاره‌های اسطوخودوس توجه بیشتری شده و فعالیت‌های ضد باکتریایی، آنتی‌اکسیدانی و ضد سرطانی این عصاره‌ها در بسیاری از مطالعات گزارش شده است(۱۰ ,۹). علاوه بر این، عصاره اسطوخودوس خواص درمانی را در برابر بیماری‌های روماتیسمی(۱۱)، اختلالات عصبی(۱۲) و بیماری‌های دستگاه گوارش نشان داده است(۱۳). خواص ضد توموری عصاره آبی اسطوخودوس نیز روی سرطان پروستات(۱۴)، رده‌های سلولی MCF-7 و HeLa نشان داده شده است(۱۵).

عصاره آبی اسطوخودوس عمدتاً حاوی لینالول (۲۶٪ تا ۴۹٪) و لینالیل استات (۱۷/۶٪ تا ۵۳٪) است و خواص درمانی گیاه به این ترکیبات نسبت داده شده است(۱۶). در مقابل، اجزای اصلی عصاره اتانولی شامل ۱و۸-سینئول، اپی-α-کادینول و z-فیتول هستند، در حالی‌که عصاره ان-هگزانی عمدتاً حاوی ۱و۸-سینئول، کافور و بورنئول است(۱۷). به‌علاوه، اسانس اسطوخودوس مخلوطی از ۱و۸-سینئول و بورنئول است(۱۴). با وجود مشاهدات قبلی در مورد خواص سیتوتوکسیک گیاه اسطوخودوس، نتایج بسیار متناقض است. هرچند مطالعاتی وجود دارد که اثرات ضد تکثیری عصاره‌های آبی اسطوخودوس را نشان می‌دهد(۱۹ , ۱۸ ,۱۵). با این وجود پژوهش‌هایی با نتایج متفاوت هم گزارش شده است(۱۶). همچنین در مطالعه ای دیگر مشخص شده است که عصاره اتانولی این گیاه نیز توانایی افزایش آپوپتوز را در سلول های سرطان پستان داشته، لذا سبب مهار رشد این نوع از سلول‌های سرطانی می‌شود(۱۷). ازآن‌جا که حلال متانول برای استخراج ترکیبات قطبی است و بر اساس علم فارماکوگنوزی، ابتدا ترکیبات غیرقطبی، سپس نیمه قطبی و در نهایت قطبی را استخراج می‌کنند، در این مطالعه، ترکیبات غیرقطبی و نیمه قطبی به‌ترتیب با حلال‌های ان هگزان و اتیل استات استخراج شده و در نهایت با استفاده از حلال متانول ترکیبات قطبی جدا سازی شده است.

با توجه به اینکه اثرات سمیت سلولی *L. angustifolia* روی سلول‌های سرطانی پستان به‌خوبی درک نشده است، به‌علاوه اینکه اثر عصاره متانولی این گیاه روی این دسته از سلول‌های سرطانی تاکنون مورد مطالعه قرار نگرفته است، بنابراین در این مطالعه، خواص سیتوتوکسیک و ضد تکثیری عصاره‌ی متانولی اسطوخودوس بر رده سلولی MCF-7 سرطان پستان بررسی گردید.

مواد و روش‌ها

تهیه عصاره اسطوخودوس

اندام هوایی اسطوخودوس از نمونه‌های کشت شده در گلخانه دانشکده کشاورزی دانشگاه آزاد واحد سنندج، در تابستان سال ۱۳۹۷ جمع‌آوری شد. سپس این نمونه‌ها در سایه و دمای محیط خشک گردید و به وسیله آسیاب برقی

به‌صورت پودر درآمد. عصاره‌ی متانولی اسطوخودوس با خیساندن ۵۰ گرم نمونه گیاه پودر شده در ۵۰۰ میلی‌لیتر متانول خالص و در مدت ۴۸ ساعت تهیه شد. عصاره حاصل، پس از عبور دادن از فیلتر ۴۵ میکرون، با دستگاه روتاری تحت فشار کم و در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد تغلیظ و خشک گردید. سپس عصاره‌ی حاصل، توزین شده و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد برای آزمایشات بعدی نگهداری شد.

آماده‌سازی نمونه‌ها:

برای تهیه محلول عصاره، ۰/۱ میلی‌گرم از پودر عصاره در یک میلی‌لیتر از متانول حل شد. در مرحله بعد غلظت ۱۵-۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر عصاره، با رقیق کردن محلول اصلی به‌وسیله محیط کشت RPMI-1640 آماده گردید. محلول‌های مذکور قبل از هر آزمایش به‌صورت تازه تهیه شدند.

کشت سلول:

در این مطالعه رده سلولی MCF-7 سرطانی پستان از مرکز بین‌المللی مهندسی ژنتیک و بیوتکنولوژی (ICGEB) خریداری شد. سپس این سلول‌ها در محیط کشت RPMI-1640 حاوی FBS ده درصد، پنی سیلین، استرپتومایسین و گلوتامین کشت شده و سپس در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و CO_2 پنج درصد انکوبه شدند.

سنجش تکثیر سلولی:

آنالیز بقای سلولی با استفاده از کیت سنجشی-تجاری ۳-۲ و ۵-دی فنیل تترازولیوم بروماید (MTT) شرکت سیگما (Cat No: 11465007001)، بر اساس پروتکل شرکت سازنده بررسی گردید. به این ترتیب که رده‌ی سلولی سرطان پستان در یک پلیت ۹۶ چاهکی با تراکم ۵۰۰۰ سلول در هر چاهک کشت داده شد و سپس با استفاده از غلظت‌های مختلف عصاره‌ی متانول (15-500 µg/mL) در دوره‌های مختلف انکوباسیون(۲۴، ۴۸ و۷۲ ساعت) تیمار شدند(۱۷) و تعدادی سلول تیمار نشده نیز به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شد. علاوه براین تعدادی سلول نیز فقط با حلال متانول تیمار شد که به‌عنوان کنترل حلال از آن‌ها استفاده شد. سپس میزان جذب هر گروه آزمایشی از نظر نور سنجی در طول موج ۵۷۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. درصد بقای سلولی با فرمول زیر محاسبه شد:

$$OD\ treated/OD\ control \times 100$$

آنالیز چرخه سلولی:

رده سلولی MCF-7 را در پلیت ۶ چاهکی کشت داده شد و هنگامیکه به تراکم ۹۰-۸۰٪ رسید، سلول‌ها در معرض محیط کشت تیمار قرارگرفتند. به این ترتیب که ابتدا سلول‌ها به مدت ۷۲ ساعت باغلظت ۵۰۰ µg/ml عصاره متانولی (دوز موثره به‌دست آمده از مرحله قبل) تیمار شدند. همین روش برای گروه‌های کنترل سلول و کنترل حلال نیز انجام شد. سپس همه گروه‌های آزمایش را تریپسینه کرده و پس از جداشدن سلول‌ها از کف پلیت با دور RPM ۱۴۰۰ به‌مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ و مایع رویی را خارج کرده و به رسوب حاصله اتانول ۷۰ درصد اضافه و به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد فیکس شدند. پس از آن، سلول‌های فیکس شده بار دیگر با دور RPM ۱۴۰۰ و به-مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژشدند. پس از خارج‌کردن محلول رویی، سلول‌ها به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق با PI master mix که حاوی یدید پروپیدیوم (سیگما-آلدریچ)، RNase و PBS بود انکوبه شدند. برای ارزیابی چرخه سلولی از دستگاه فلوسیتومتر BD FACScalibur flow cytometer (BD Biosciences, Mountain View, CA) استفاده گردید. از نسخه ۱۰,۶,۲ نرم افزار FlowJo (شرکت، سانکارلوس، کالیفرنیا، ایالات متحده) برای ارزیابی میزان سلول‌های موجود در مراحل مختلف چرخه سلولی استفاده شد.

روش تشکیل کلنی:

سلول‌های MCF-7 باتراکم ۵۰۰ سلول در پلیت‌های ۶ چاهکی با استفاده از ۲ میلی‌لیتر محیط‌کشت،کشت داده شدند. سپس گروه‌های آزمایش با عصاره متانولی µg/ml ۵۰۰ به مدت ۱۴ روز در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و CO_2

پنج درصد تحت تیمار قرار گرفتند. سپس سلول‌ها با PBS شسته شده و با حلال متانول ۳:۱ اسید استیک تثبیت شدند. سلول‌های ثابت به‌مدت ۴۰ دقیقه باکریستال ویوله ۰/۴ درصد رنگ‌آمیزی شدند. کلنی‌های رنگ آمیزی شده در نهایت با PBS شسته و شمارش شدند(۲۱ ,۲۰).

تعیین ترکیبات موجود در عصاره متانولی اسطوخودوس به روش کروماتوگرافی گازی/ طیف‌سنجی جرمی

عصاره متانولی اسطوخودوس با استفاده از دستگاه GC/MS شرکت Agilent مورد بررسی قرارگرفت. تجهیزات GC/ MS شامل یک ستون HP-5ms (۳۰m*۰/۲۵mm*۰/۲۵µm) با آشکارساز جرمی چهار قطبی بود. داده‌ها توسط رایانه ای مجهز به کتابخانه Wileyبه‌دست آمده و پردازش شدند. شرایط جداسازی به روش کروماتوگرافی و طیف‌سنجی جرمی و تجزیه و تحلیل به این شرح بود که دمای آون ۶۰ درجه سانتی‌گراد (۱ دقیقه)، سپس ۶۰ درجه سانتی‌گراد تا ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد (با روند افزایش ۵ درجه سانتی‌گراد در دقیقه)، ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد (۳۸ دقیقه)، دمای انژکتور ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد؛ حجم تزریق ۰/۱ میکرولیتر؛ نسبت جداسازی ۱:۵۰؛ گاز حامل هلیوم با شدت جریان یک میلی‌لیتر در دقیقه؛ پتانسیل یونیزاسیون ۷۰ ولت، جریان یونیزاسیون ۱۵۰ میکروآمپر؛ دمای منبع یون ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد؛ دامنه جرم ۳۵ تا ۴۶۵ میکروگرم تنظیم گردید. طیف جرمی و شاخص‌های بازداری (RI) هر جزء با نمونه‌های معتبر و متون قبلی برای تعیین ترکیبات مجزا مقایسه شد(۱۶). مقادیر مربوطه برای هر ترکیب با محاسبه درصد سطح زیر منحنی به‌دست آمد.

تحلیل آماری:

تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶، انجام گرفت. نتایج به‌صورت میانگین و انحراف معیار از سه آزمایش مستقل بیان شد و سطح احتمال کمتر از ۰/۰۵ به‌عنوان نتایج آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد. ازآزمون t برای مقایسه میانگین‌هایی استفاده شد که تعداد گروه‌های مستقل دو گروه بود و اهمیت تفاوت بین دو گروه توسط آنالیز واریانس یک طرفه مورد ارزیابی قرار گرفت. در مواردی که نتایج ANOVA یک‌طرفه قابل توجه بود، از آزمون تعقیبی TukeyHSD برای تشخیص تفاوت درون گروه‌ها استفاده شد. رابطه بین متغیرها با استفاده از آزمون همبستگی اسپیرمن بررسی شد.

یافته‌ها

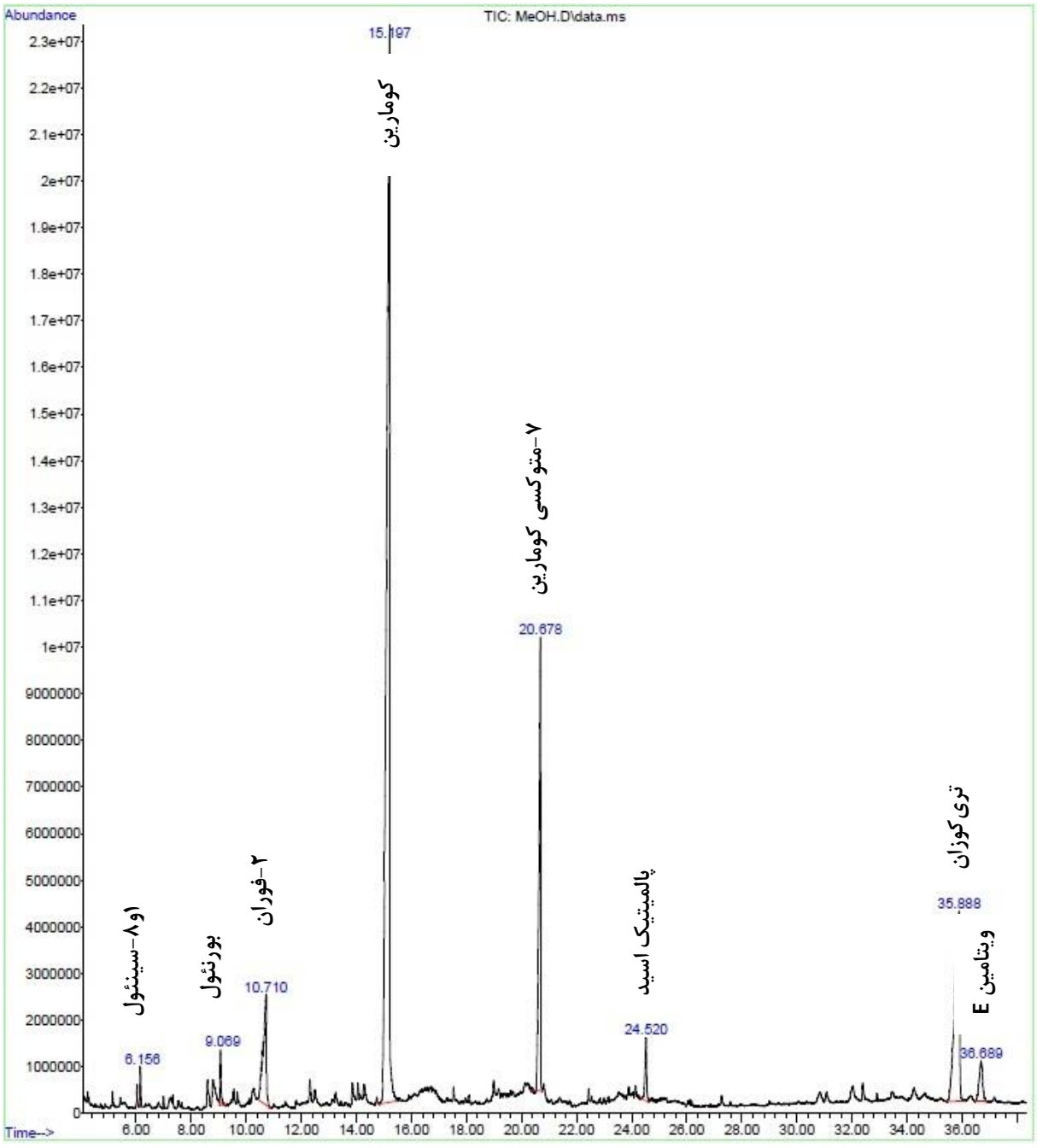
ترکیب شیمیایی عصاره:

بررسی ترکیبات اصلی به روش GC/MS نشان داد که عصاره‌ی متانولی اسطوخودوس در مجموع از ۸ ترکیب فرار تشکیل شده است. در نهایت محتوای اصلی عصاره متانولی به‌ترتیب کومارین (۵۹/۴۴ درصد)، تریکوزان (۱۵/۲۲ درصد)، ۷-متوکسی کومارین (۱۲/۶۹ درصد) و ۲-فوران کربوکسالدئید (۶/۷ درصد) تعیین شد. ترکیبات شیمیایی عصاره و مقدار آن‌ها در عصاره‌های مختلف در جدول ۱ نشان داده شده است.

جدول ۱. ترکیبات شیمیایی و فرار عصاره متانولی به‌دست آمده از اندام هوایی *Lavandula angustifolia*

	نام ترکیب	زمان بازداری (دقیقه)	عصاره متانولی (درصد)
۱	۱و۸-سینئول	۶/۲۵۷	۰/۵۴
۲	بورنئول ال	۹/۱۷۲	۱/۰۵
۳	۲-فوران کربوکسالدئید	۱۰/۷۱۰	۶/۸۰
۴	کومارین	۱۵/۱۹۷	۵۹/۴۴
۵	۷-متوکسی کومارین	۲۰/۶۷۸	۱۲/۷۰
۶	پالمیتیک اسید	۲۴/۵۲۰	۱/۷۱

۷	تریکوسان	۳۵/۸۸۸	۱۵/۲۲
۸	ویتامین E	۳۶/۶۸۹	۲/۵۵



شکل ۱. کروماتوگرام ترکیبات عصاره متانولی اندام هوایی *Lavandula angustifolia* به‌روش GC-MS. زمان بازداری بر حسب دقیقه و نام ترکیبات جدا شده نمایش داده شده است.

اثرات عصاره‌ی متانولی اسطوخودوس بر تکثیر رده سلولی سرطان پستان:

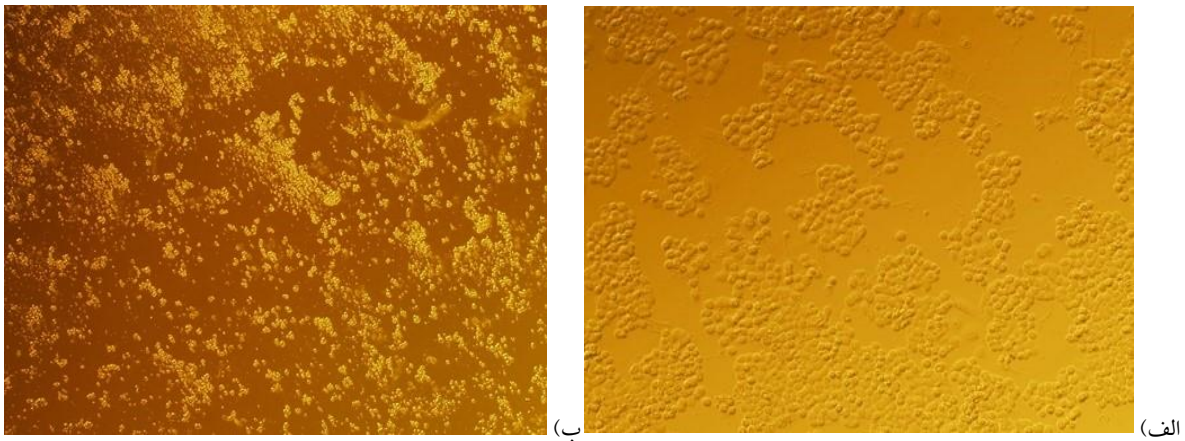
رده سلولی سرطان پستان با غلظت‌های مختلف عصاره‌ی متانولی اسطوخودوس (۱۵ تا ۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) برای سه روز متوالی تحت تیمار قرار گرفت. شکل ۱ مورفولوژی این رده سلولی را قبل و بعد از درمان با عصاره متانولی اسطوخودوس نشان می‌دهد. نتایج مشخص کرد که زنده ماندن رده‌های سلولی MCF-7 پس از تیمار با عصاره متانولی به‌طور قابل توجهی کاهش می‌یابد (شکل ۲). علاوه بر این، داده‌های به‌دست آمده به‌وضوح نشان داد که در هیچ یک از آزمایش‌ها حلال متانول مورد مطالعه در دامنه غلظت‌های به‌کار رفته اثر سمیت سلولی ندارد. در ادامه غلظت مهارکننده رشد ۵۰ درصدی سلولی (IC50) تعیین گردید. بر اساس نتایج به‌دست آمده IC50 برای عصاره متانولی ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود (شکل ۳).

اثر عصاره متانولی روی چرخه سلولی در رده‌های سلولی سرطان پستان:

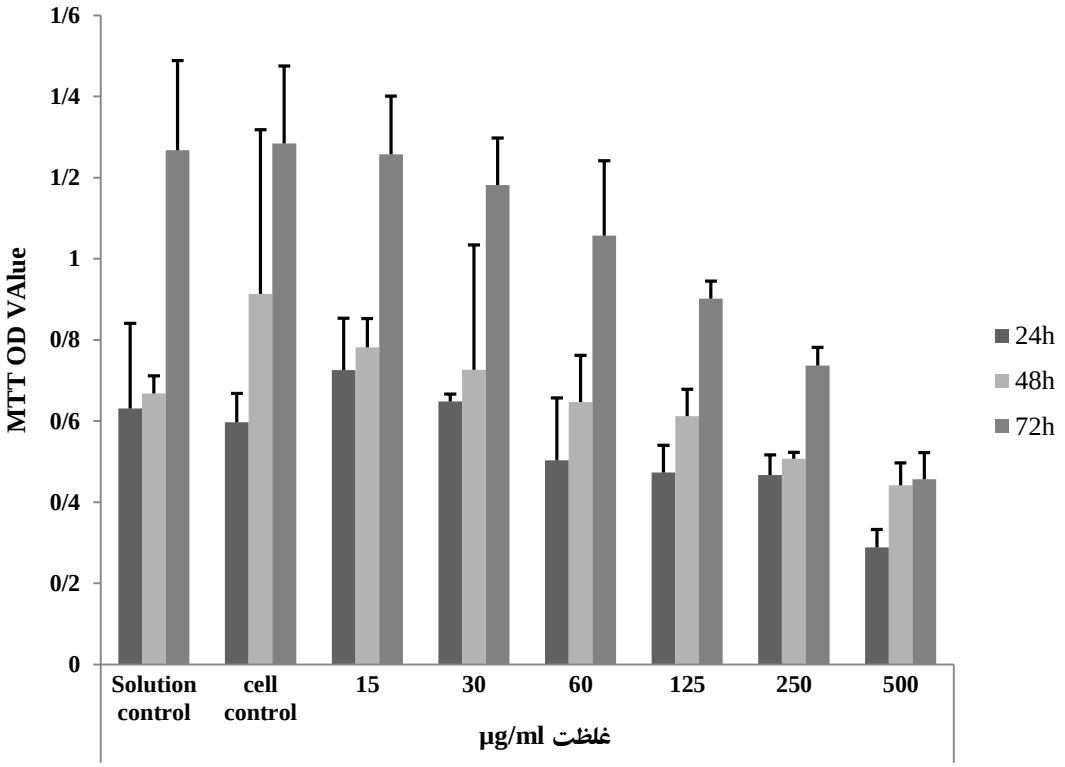
در ادامه، خصوصیات مهاری عصاره متانولی اسطوخودوس روی سلول‌های MCF-7 با بررسی اثر بر چرخه سلولی به میزان بیشتری مورد بررسی قرار گرفت. مشاهده گردید که توقف فاز G0/G1 پس از تیمار با عصاره متانولی در رده سلولی MCF-7 به‌طور قابل توجهی افزایش می‌یابد، در حالیکه فاز S در گروه‌های کنترل منفی افزایش یافته است (شکل ۴). علاوه بر این، تجزیه و تحلیل ANOVA نیز نشان داد که غلظت ۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر عصاره به‌طور قابل توجهی باعث افزایش چرخه سلولی در مرحله G0/G1در مقایسه با گروه کنترل در رده سلول سرطانی پستان شد (P= ۰/۰۰۵).

توانایی تشکیل کلنی:

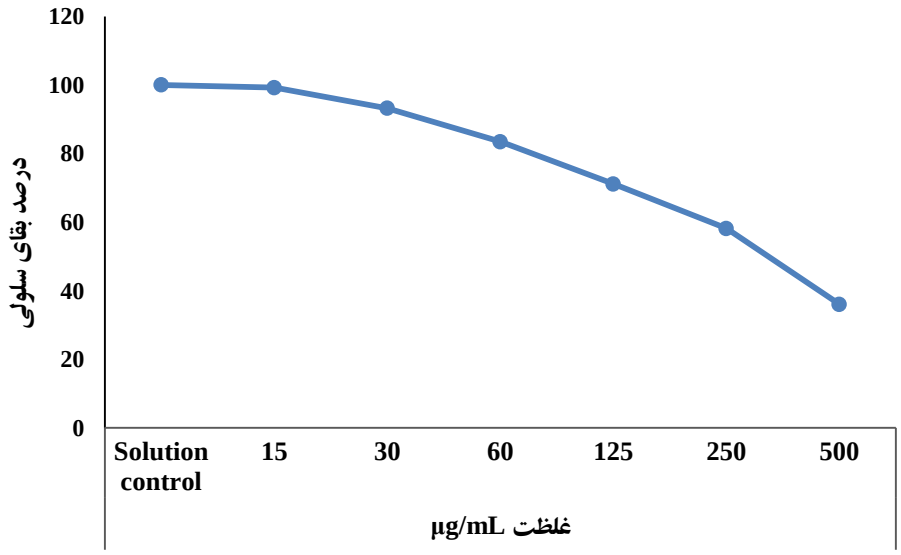
رده سلولی سرطان پستان با عصاره متانولی (۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) تحت تیمار قرار گرفتند و برای تغییر توانایی تشکیل کلنی مورد مطالعه قرار گرفتند. مشاهده شد که پس از تیمار با عصاره متانولی اسطوخودوس، تشکیل کلنی در سلول‌های MCF-7 به طور قابل توجهی در مقایسه با گروه کنترل منفی،کاهش یافته است (شکل ۵).


الف) ب)

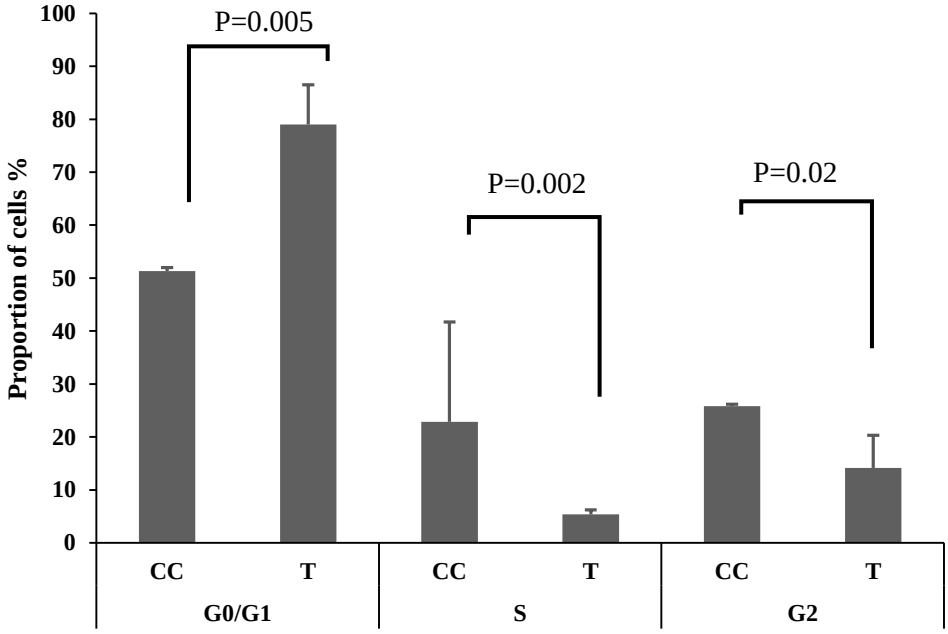
شکل ۲. مشخصات مورفولوژیکی سلول‌های سرطانی پستانMCF-7. الف) سلول‌های MCF-7 قبل از تیمار و ب) بعد از تیمار ۷۲ ساعته با غلظت µg/mL ۵۰۰ عصاره متانولی *Lavandula angustifolia* (بزرگنمایی ۲۰۰ ×).



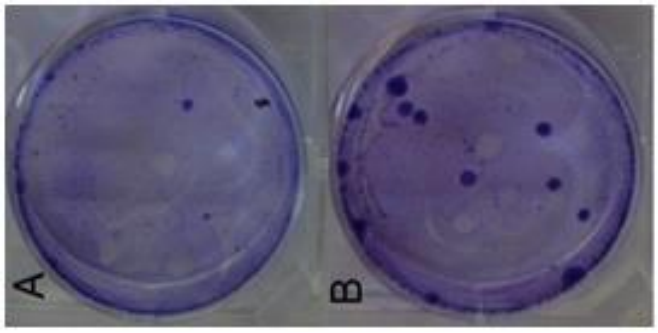
نمودار ۱. بررسی میزان تکثیر سلول‌های سرطانی پستان به‌روش MTT. عصاره متانولی *L. angustifolia* در غلظت ۵۰۰µg/ml توانسته است رشد سلول‌های رده MCF-7 را نسبت به گروه‌های کنترل به‌صورت معنی‌دار (P< ۰/۰۵) کاهش دهد.



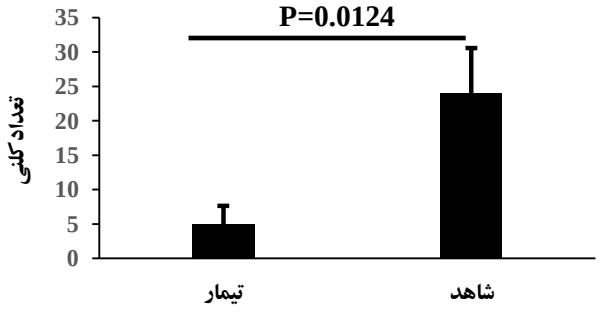
نمودار ۲. درصد بقای سلولی در سلول‌های مورد بررسی. در سلول‌های تیمار شده با ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره متانولی *L. angustifolia* در رده‌ی سلولی MCF-7 سرطان پستان.



نمودار۳. نتایج فلوسایتومتری عصاره متانولی اسطوخودوس. سرکوب انتقال فاز چرخه سلولی از G0/G1 به S در رده سلول‌های سرطانی پستان MCF-7، ۷۲ ساعت پس از تیمار با غلظت ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره متانولی اسطوخودوس.



الف)



ب)

شکل۳. کلنی‌های تشکیل شده MCF-7. تیمار با غلظت ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره متانولی اسطوخودوس به طور قابل توجهی سبب کاهش تعداد کلنی‌های تشکیل شده توسط سلول‌های MCF-7 گردید، الف) شکل پلیت‌های حاوی کلنی‌های تشکیل شده گروه تیمار (B) و گروه شاهد (A)، ب) نمودار کلنی‌های تشکیل شده (P=۰/۰۱۲٤).

بحث

امروزه نقش طب مکمل به‌عنوان ابزار کمک درمانی مفید همراه با درمان‌های اصلی و شناخته شده بسیار حائز اهمیت است. در این میان طب گیاهی یعنی استفاده از گیاهان دارویی در درمان بیماری‌های مختلف از جمله بیماری‌هایی با درمان سخت و گاهی لاعلاج مورد توجه قرار گرفته است. از جمله این گیاهان می‌توان به گیاه اسطوخودوس اشاره کرد که ترکیبات آن اثربخشی زیادی را در مهار رشد سلول‌های سرطانی نشان داده است(۱۵). بر اساس مطالعات کتابخانه‌ای، در این تحقیق برای اولین بار مشخص شد که عصاره متانولی اسطوخودوس می‌تواند رشد و تکثیر سلول-های سرطانی پستان را سرکوب کند. هر چند اثرات سیتوتوکسیک عصاره‌های مختلف گیاه اسطوخودوس در مطالعات دیگر نیز مورد بررسی قرار گرفته است. برای مثال، در مطالعه Berrington و همکاران (۲۰۱۲)، اثرات ضد سرطانی عصاره استونی چندین گیاه مختلف از جمله اسطوخودوس بر روی سلول‌های HELA مورد بررسی قرار گرفته است. آن‌ها دریافتند که عصاره استونی اسطوخودوس فاقد فعالیت ضد سرطانی بر روی این دسته از سلول‌ها می-باشد(۲۲). در مطالعه دیگری که توسط Dalilian و همکاران (۲۰۱۳) انجام گرفته است ویژگی‌های ضدسرطانی عصاره آبی گیاه اسطوخودوس بر روی لنفوسیت‌های به-دست آمده از بیماران مبتلا به لنفوم هوچکین مورد بررسی قرار گرفته است. نتایج این مطالعه حاکی از فعالیت ضد سرطانی عصاره آبی اسطوخودوس بر روی این نوع از سلول‌ها در غلظت µg/mL ۱۰۰ بود(۱۸). همچنین Tayrani-Najaran و همکاران (۲۰۱۴) مطالعه‌ای جهت بررسی اثرات سیتوتوکسیک سه عصاره مختلف از بخش-های هوایی گیاه اسطوخودوس بر روی سلول‌های HELA و MCF-7 انجام دادند(۱۵). در این مطالعه، اثر عصاره های ان-هگزانی، اتانولی (۷۰٪)، آبی و نیز روغنی، بر روی مکانیسم‌های مولکولی سرطانی نظیر آپوپتوز و بقای سلولی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصله بیانگر اثرات ضد سلولی عصاره‌های اتانولی، ان-هگزانی و روغنی بر روی هر دو نوع سلول سرطانی بود اگر چه عصاره آبی در هیچ غلظتی توانایی از بین بردن سلول‌های سرطانی را نشان نداد. این محققین نتیجه‌گیری کردند که اثرات ضد تکثیری اسطوخودوس از طریق افزایش آپوپتوز صورت می-گیرد(۱۵). در مطالعه دیگری اثرات ضد توموری گیاه اسطوخودوس بر روی رده‌های سلولی سرطان پروستات شامل PC3 و DU145 و در هر دو محیط in vivo و in vitro مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. در این مطالعه از عصاره روغنی استفاده شد و مشاهده گردید که علاوه بر مهار رشد و تکثیر سلول‌های سرطانی در محیط in vitro، این ترکیب توانایی مهار تومور و آپوپتوز را در محیط in vivo نیز دارا است(۷). با توجه به مطالب ذکر شده، اگرچه اثرات ضد توموری گیاه اسطوخودوس تا حدودی مشخص شده است، برخی از نتایج در زمینه اثرات عصاره‌های مختلف آن تناقضاتی را نشان می‌دهند. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که عصاره متانولی اسطوخودوس در غلظت µg/mL ۵۰۰، دارای خواص سیتوتوکسیک بر روی رده سلولی MCF-7 سرطان پستان است. اگرچه مطالعه حاضر موید نتایج Tayrani-Najaran و همکاران (۲۰۱۴) است ولی تفاوت‌هایی نیز با آن دارد. در مطالعه حاضر برخلاف مطالعات پیشین از عصاره متانولی استفاده شد. به‌علاوه، بر اساس نتایج GC-MS، بیشترین ترکیب موجود در عصاره متانولی، کومارین بود در حالیکه در مطالعه Tayrani-Najaran و همکاران (۲۰۱۴)، در عصاره الکلی بیشترین مقدار ترکیبات به کادینول و فیتول اختصاص داشت(۱۵). همچنین دوز موثره در این مطالعه بسیار پائین تر از دوز مورد استفاده برای عصاره متانولی بوده و IC50 به‌دست آمده برای عصاره اتانولی در ۷۲ ساعت معادل µg/mL ۸۲/۸۶ برای سلول‌های MCF-7 تعیین شده بود.

اجزای اصلی عصاره متانولی به‌صورت ترکیبات کومارین، تریکوسان، ۷-متوکسی کومارین و ۲-فوران کربوکسالدئید شناسایی شد و اثرات ضد توموری عصاره *L.*

angustifolia روی سلول‌های MCF-7، می‌تواند مربوط به وجود این ترکیبات باشد. علاوه بر این، نتایج فلوسایتومتری افزایش توقف چرخه سلولی را پس از در معرض قرار دادن رده‌های سلولی سرطان پستان با عصاره متانولی اسطوخودوس نشان داد. اگرچه تاکنون اثرات این عصاره روی چرخه سلولی در سرطان پستان بررسی نشده است، با این وجود نتایج بررسی‌ها بر روی سایر سرطان‌ها حاکی از مهار چرخه سلولی در فاز G0/G1 در لنفوم هوچکین(۱۸) و فاز G2/M در سرطان پروستات(۷) است.

نتیجه‌گیری

در مجموع، نتایج مطالعه حاضر نشان داد که عصاره متانولی گیاه اسطوخودوس می‌تواند در غلظت ۵۰۰ µg/mL دارای خواص ضد توموری بر علیه رده سلول‌های MCF-7 سرطان پستان باشد. همچنین مشخص شد که عصاره متانولی گیاه اسطوخودوس باعث مهار تکثیر سلول‌های MCF-7 می‌شود و این اثر از طریق القای مهار رشد و همچنین مهار چرخه سلولی در فاز G0/G1 اعمال می‌شود؛ بنابراین، استفاده از عصاره‌ی اسطوخودوس می‌تواند به‌عنوان یک داروی مکمل بالقوه در مطالعات بعدی در نظرگرفته شود.

تشکر و قدردانی

این طرح به‌صورت مشترک توسط دانشگاه آزاد اسلامی واحد سنندج و دانشگاه علوم پزشکی کردستان اجرا شده و توسط کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی کردستان با کد اخلاق (IR.MUK.REC.1397/98) مورد تائید قرار گرفته است. منابع مالی این طرح توسط مولفین فراهم شده و همچنین نویسندگان مایلند از دانشگاه علوم پزشکی کردستان برای در اختیار قرار دادن امکانات آزمایشگاهی تشکر و قدردانی نمایند.

منابع

1. Taghavi A, Fazeli Z, Vahedi M, Baghestani AR, Pourhoseingholi A, Barzegar F, et al. Increased trend of breast cancer mortality in Iran. Asian Pac J Cancer Prev. 2012; 13(1):367-70.
2. Sharifian A, Pourhoseingholi MA, Emadedin M, Rostami Nejad M, Ashtari S, Hajizadeh N, et al. Burden of Breast Cancer in Iranian Women is Increasing. Asian Pac J Cancer Prev. 2015; 6(12):5049-52.
3. Odle TG. Adverse effects of breast cancer treatment. Radiol Technol. 2014; Jan-Feb;85(3):297M-319M; quiz 20M-23M.
4. Lovelace DL, McDaniel LR, Golden D. Long-Term Effects of Breast Cancer Surgery, Treatment, and Survivor Care. J Midwifery Womens Health. 2019;64(6):713-24.
5. Lin بSR, Chang CH, Hsu CF, Tsai MJ, Cheng H, Leong MK, et al. Natural compounds as potential adjuvants to cancer therapy: preclinical evidence. Br J Pharmacol. 2020; 177(6):1409-23.
6. Wang S, Lin H, Cong W. Chinese Medicines Improve Perimenopausal Symptoms Induced by Surgery, Chemoradiotherapy, or Endocrine Treatment for Breast Cancer. Front Pharmacol. 2019; 10:174.
7. Zhu L, Li L, Li Y, Wang J, Wang Q. Chinese Herbal Medicine as an Adjunctive Therapy for Breast Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. Evid Based Complement Alternat Med. 2016;9469276.
8. Lesage-Meessen L, Bou M, Sigoillot JC, Faulds CB, Lomascolo A. Essential oils and distilled straws of lavender and lavandin: a review of current use and potential application in white biotechnology. Appl Microbiol Biotechnol. 2015;99(8):3375-85.

9. Giovannini D, Gismondi A, Basso A, Canuti L, Braglia R, Canini A, et al. *Lavandula angustifolia* Mill. Essential Oil Exerts Antibacterial and Anti-Inflammatory Effect in Macrophage Mediated Immune Response to Staphylococcus aureus. Immunol Invest. 2016; 45(1):11-28.
10. Carrasco A, Martinez-Gutierrez R, Tomas V, Tudela J. *Lavandula angustifolia* and Lavandula latifolia Essential Oils from Spain: Aromatic Profile and Bioactivities. Planta Med. 2016; 82(1-2):163-70.
11. Nasiri A, Mahmodi MA. Aromatherapy massage with lavender essential oil and the prevention of disability in ADL in patients with osteoarthritis of the knee: A randomized controlled clinical trial. Complement Ther Clin Pract. 2018; 30:116-21.
12. Ayaz M, Sadiq A, Junaid M, Ullah F, Subhan F, Ahmed J. Neuroprotective and Anti-Aging Potentials of Essential Oils from Aromatic and Medicinal Plants. Front Aging Neurosci. 2017; 9:168.
13. Mahady GB, Pendland SL, Stoia A, Hamill FA, Fabricant D, Dietz BM, et al. In vitro susceptibility of Helicobacter pylori to botanical extracts used traditionally for the treatment of gastrointestinal disorders. Phytother Res. 2005; 19(11):988-91.
14. Zhao Y, Chen R, Wang Y, Qing C, Wang W, Yang Y.In Vitro and In Vivo Efficacy Studies of *Lavender angustifolia* Essential Oil and Its Active Constituents on the Proliferation of Human Prostate Cancer. Integr Cancer Ther. 2017; 16(2):215-26.
15. Tayarani-Najaran Z, Amiri A, Karimi G, Emami SA, Asili J, Mousavi SH. Comparative studies of cytotoxic and apoptotic properties of different extracts and the essential oil of *Lavandula angustifolia* on malignant and normal cells. Nutr Cancer. 2014; 66(3):424-34.
16. Prusinowska R, Śmigielski KB. Composition, biological properties and therapeutic effects of lavender (*Lavandula angustifolia* L). A review. Herba polonica. 2014; 60(2):56-66.
17. Soheili M, Salami M. Lavandula angustifolia biological characteristics: An in vitro study. J Cell Physiol. 2019;234(9):16424-30.
18. Dalilan S, Rezaei-Tavirani M, Nabiuni M, Heidari-Keshel S, Zamanian Azodi M, Zali H. Aqueous Extract of Lavender angustifolia Inhibits Lymphocytes Proliferation of Hodgkin's Lymphoma Patients. Iran J Cancer Prev. 2013; 6(4):201-8.
19. Buyukokuroglu ME, Gepdiremen A, Hacimuftuoglu A, Oktay M. The effects of aqueous extract of *Lavandula angustifolia* flowers in glutamate-induced neurotoxicity of cerebellar granular cell culture of rat pups. J Ethnopharmacol. 2003; 84(1):91-4.
20. Menbari MN, Rahimi K, Ahmadi A, Elyasi A, Darvishi N, Hosseini V, et al. MiR-216b-5p inhibits cell proliferation in human breast cancer by down-regulating HDAC8 expression. Life Sci. 2019; 15;237:116945.
21. Menbari MN, Rahimi K, Ahmadi A, Mohammadi-Yeganeh S, Elyasi A, Darvishi N, et al. miR-483-3p suppresses the proliferation and progression of human triple negative breast cancer cells by targeting the HDAC8>oncogene. J Cell Physiol. 2020; 235(3):2631-42.
22. Berrington D, Lall N, Anticancer Activity Of certain Herbs and Spices on the cervical epithelial carcinoma (Hela) cell line.Europe PMC.2012; 564927.