Journal of North Khorasan
University of Medical Sciences
Vol.1, No: 1, P: 47-58
Autumn 2008

مجله دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی
شماره ۱، سال اول
پاییز ۱۳۸۷ ، صفحه ۵۸-۴۷

دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی خراسان شمالی

بررسی اثر عصاره آبی قسط شیرین(.Alpiniagalanga L) بر مهار رده های سلول سرطانی روده بزرگ انسان(HT- 29) و رده سلول غیر سرطانی فیبروبلاست موش(L929)

* جلیل توکل افشاری [۱]، موسی الرضا حاج زاده [۲]، مینا براتی [۳]

[۱] دانشیار گروه ایمونولوژی، پژوهشکده بوعلی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، [۲] دانشیار گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، [۳] کارشناس ارشد فیزیولوژی، دانشگاه پیام نور مرکز اصفهان

تاریخ دریافت: ۸۷/۴/۱۸ – تاریخ پذیرش: ۸۷/۸/۱۷

خلاصه

مقدمه: در مطالعات ترکیبات ضد سرطانی متعددی در گیاه قسط شیرین (.Alpinia galanga L) معرفی شده است. اثرات ضد سرطانی این ترکیبات در نتیجه حذف رادیکال های آزاد، تعدیل و مهار فعالیت های آنزیمی و سمیت سلولی است. هدف از این پژوهش بررسی اثر عصاره آبی ریزوم های گیاه قسط شیرین بر رشد و تکثیر رده سلول های سرطان روده بزرگ انسان (HT-29) و فیبروبلاست موش (L929) در محیط کشت می باشد.

روش کار: عصاره آبی تهیه شده از ریزوم های گیاه قسط شیرین به روش سوکسله با غلظت های معادل ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۱۵۰۰، ۲۰۰۰ و ۲۵۰۰ میکروگرم از پودر خشک ریزومها بر میلی لیتر در مجاورت سلول های کشت داده شده در پلیت ها اثر داده شد. با مشاهده مستقیم توسط میکروسکوپ معکوس و عکس برداری، اطلاعات مورفولوژیک (شکل سلولی، میزان گرانولوسیتی سلول و میزان چسبیدگی به سطح) برای هر دو رده سلول های HT-29 و L929 در محیط کشت جمع آوری گردید. در بخش دیگر از پژوهش سلول های کشت شده از هر دو رده مذکور با روش MTT در سه روز متوالی مورد بررسی قرار گرفت و درصد سلولهای زنده در هر یک از دو رده سلولی و برای هر یک از غلظت های مورد استفاده از عصاره بصورت Mean±SD محاسبه و ثبت شد. یافته ها با استفاده از نرم افزارهای Instat و SPSS و با روش One-way ANOVA و متعاقبا" تست Tukey-Kramer و یا student t-test مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و هر جا که $p<0.05$ بود تفاوت ها معنی دار تلقی گردید.

نتایج: عصاره آبی ریزوم های قسط شیرین در غلظت های مورد استفاده موجب مهار رشد سلول های هر دو رده می شود. اثرات مهاری این عصاره بر رده سلول های سالم L929 نیز در حد اثرات مهاری بر رده سلول های سرطان کولون و یا از آن بیشتر است.IC_{50} برای رده سرطانی و سلول های سالم ۱۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر می باشد. در هر دو رده درصد سلول های زنده با افزایش غلظت کاهش می یابد.

نتیجه گیری: در این پژوهش مشخص گردید که عصاره آبی گیاه قسط شیرین هم بر سلول های سرطانی (HT-29) و هم بر سلول های سالم (L929) اثر سیتوتوکسیک دارد. بنابراین در زمینه استفاده از عصاره آبی قسط شیرین به عنوان درمان کننده سرطان بهتر است از انواع دیگری از عصاره های قسط شیرین که تنها بر سلول های سرطانی اثر سیتوتوکسیک داشته باشند، استفاده گردد.

کلمات کلیدی: قسط شیرین، عصاره آبی، سرطان روده بزرگ، سلول های HT-29، سلولهای L929، تکثیر سلولی.

* مشهد، بخش ایمونوژنتیک و کشت سلولی مرکز تحقیقات ایمونولوژی، پژوهشکده بوعلی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد

تلفن: ۰۵۱۱-۷۱۱۲۴۷۱ email: Jtavakkol@yahoo.com

مقدمه

گیاه قسطی شیرین با نام علمی .Alpinia galanga L گیاهی است چند ساله و پایا، کوتاه و اغلب خزنده، ساقه هوایی آن از ریزوم ضخیم، گوشت دار ومنشعب که مواد معطر در بر دارد منشا گرفته است و طعمی تند و سوزاننده دارد. برگ ها متناوب، دراز، نوک تیز، بی کرک با پهنک های نسبتاً بزرگ و منتهی به غلاف می باشد. این گیاه متعلق به خانواده زنجبیل (Zingiberaceae) و بومی هندوستان، تایلند، مالزی و نواحی جنوب آسیا می باشد، اما در نواحی گرمسیری و استوایی نیز به خوبی رشد می کند(۲و۱).

از ترکیبات شیمیایی شناسایی شده در قسط شیرین متیل سینامات، گالانگولف آلپی نین و کمپرفید می باشد(۶و۲). همچنین ترکیبات آنتی اکسیدان فراوانی از جمله فنیل پروپانوئید ۵- فلورویوراسیل، دی آریل هپتانوئید، گالانژین، ۱ و ۱ دی فنیل ۲ پیکریل هیدروزیل و... در این گیاه شناسایی شده است (۱۱-۷).

در کتب گیاهان دارویی و معارف گیاهی اثرات درمانی متعددی برای قسط شیرین ذکر شده است که عبارتند از : دافع سموم و پادزهر سم مار و سایر حشرات موذی، ضد التهاب و تاول، ضد درد دندان و سردرد، معالج کننده ی وبا، سوء هاضمه و اسهال خونی، مسمومیت غذایی و تشنج. همچنین گزارشاتی دال بر مفید و موثر بودن این گیاه در درمان سرطان معده وجود دارد (۲ و۱).

قسط شیرین علاوه بر اثرات مذکور دارای اثرات کاهش دهنده قند خون، محافظت نورونی، جلوگیری کننده از بیوسنتز پروستاگلاندین ها و لوکوترین ها است. این گیاه دارای اثرات ضد درد و حشره کشی است و فعالیت آنزیم ۵ آلفا ردوکتاز را نیز مهار می کند (۱۵-۱۲).

برخی از گیاهان خانواده ی Zingiberaceae شامل Alpinia galanga ؛ Alpinia officinarum و چند گونه دیگر دارای اثرات ضد سرطانی با فعالیت مهار رشد سلولی بر رده های مختلف سلولهای سرطانی در حیوانات تجربی و بر چندین رده سلولی شامل سلولهای سرطانی ریه و پستان در انسان اند. با توجه به شیوع نسبتاً فراوان سرطان های دستگاه گوارش، مطالعه ای که نشان دهنده اثرات قسط شیرین بر سرطانهای دستگاه گوارش باشد وجود نداشت و لذا در این مطالعه تصمیم گرفتیم تا اثرات احتمالی این گیاه را بر رده سلولهای سرطانی روده بزرگ انسان (HT-29) در محیط کشت بررسی نمائیم. در این پژوهش اثرات مهاری عصاره آبی گیاه قسط شیرین بر رشد و تکثیر رده سلولهای سرطانی روده بزرگ انسان (HT-29) و سلولهای سالم فیبروبلاست موش (L929) (گروه کنترل) مورد بررسی قرار گرفت.

روش کار

عصاره گیری: ریزوم های گیاه مورد استفاده در این پژوهش از نوع قسط شیرین هندی می باشد که پس از تهیه و تائید در دانشکده داروسازی دانشگاه تهران مورد استفاده قرار گرفت. پس از نرم و آسیاب نمودن ریزومها ، از ۲۰g پودر تهیه شده با استفاده از ۴۰۰ml آب مقطر در دستگاه سوکسله به مدت ۲۴ ساعت عصاره گیری انجام شد. سپس حجم عصاره حاصل را با دستگاه حذف حلال به حدود ۱۰۰ml رسانده و این حجم عصاره از فیلتر سرنگی ۰/۲ میکرون عبور داده شد تا استریل گردد. برای تعیین وزن خشک عصاره استریل، ۱۰ml از آن را در پلیت با وزن معلوم ریخته و روی بن ماری ۷۰ درجه خشک گردید. وزن خشک عصاره آبی ۰/۵۶ گرم بود که بازده آن ۲۸٪ خواهد بود (۶).

بررسی مورفولوژیک: ابتدا هر دو رده سلولی از تانک ازت خارج و مرحله یخ زدایی سلول ها انجام شد. پس از انجام یک دوره پاساژ سلولی و تعیین قدرت زنده مانی سلول ها با استفاده از تست تریپان بلو، یک پلیت ۶ خانه برای سلول های HT-29 و یک پلیت مشابه نیز برای سلول های L929 در نظر گرفته و در هر خانه تعداد ۵×۱۰^{۵} سلول سرطانی و ۲×۱۰^{۵} سلول سالم ریخته شد. محیط کشت پلیت ها از نوع (Roswell Park RPMI-1640 Memorial Institute)، ۱ درصد پنی سیلین-استرپتومایسین و حاوی ۱۰ درصد FCS (Fetal Calf Serum) بود. پلیت ها در انکوباتور ۳۷ درجه با ۵ درصد CO_2 قرار داده شد و پس از ۲۴ ساعت که سلول ها به کف پلیت چسبیدند مرحله اثر دادن عصاره بر سلول ها به این ترتیب انجام شد: ابتدا محیط کشت تازه با ویژگی قبلی اضافه شد. سپس با استفاده از محیط کشت، غلظتهای معادل ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۱۵۰۰، ۲۰۰۰ و ۲۵۰۰ میکروگرم از پودر خشک ریزومها بر میلی لیتر از عصارهء تهیه شده به چاهک های مورد نظر برای سلول های L929 و HT-29 اضافه گردید. به چاهک

اول از هر رده سلولی که چاهک کنترل محسوب می شد، عصاره اضافه نشد. به این ترتیب برای هر رده سلولی ۶ چاهک حاوی غلظت های مورد نظر یعنی ۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۱۵۰۰، ۲۰۰۰ و ۲۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر تهیه گردید. سپس پلیت ها در انکوباتور ۳۷ درجه با ۵ درصد CO_2 قرار داده شد و پس از گذشت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، مورفولوژی سلول ها با میکروسکوپ معکوس بررسی و مشاهدات ثبت گردید. اینگونه ارزیابی مورفولوژیک سلولی، برای هر غلظت از عصاره ۳ بار تکرار شد تا اطمینان کافی از نتایج به دست آمده حاصل گردد(۵ و۴).

بررسی کمی با استفاده از آزمون MTT

(3-(4,5-dimethyl thizol-2yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) : از هر دو رده سلولی پس از انجام پاساژ و تعیین قدرت زنده مانی سلول ها، ۲۰۰۰ سلول سالم و ۵۰۰۰ سلول سرطانی در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه کشت داده شد (در این آزمون ۳ پلیت ۹۶ خانه در نظر گرفته شد) در هر پلیت، گروه های سه تایی از چاهک ها برای هر غلظت از عصاره مشخص شد و شماره خانه های هر گروه یادداشت گردید. یک گروه سه تایی نیز برای هر رده سلولی به عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شد. پلیت ها ۲۴ ساعت در انکوباتور قرار داده شدند تا سلول ها به بستر خود بچسبند پس از طی این مدت، مرحله مجاور کردن سلول ها با عصاره به این ترتیب انجام شد; نخست محیط کشت های هر سه پلیت خالی و ۲۰۰ میکرولیتر محیط تازه در چاهک ها ریخته شد. سپس از ۵ غلظت مختلف از عصاره که در بخش بررسی مورفولوژیک با محیط کشت تهیه شده بود به گروه های سه تایی از چاهک های حاوی سلول های L929 و گروه های سه تایی از چاهک های حاوی سلول های HT-29 اضافه گردید. به چاهک های سه تایی گروه کنترل از هر رده سلولی عصاره اضافه نشد. پلیت ها در انکوباتور CO_2 دار قرار گرفت و پس از ۲۴ ساعت یکی از پلیت ها به صورت تصادفی برداشته و محیط کشت آن خالی شد و در عوض به هر چاهک ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت تازه و ۲۵ میکرولیتر MTT (با غلظت5mg/ml) اضافه شد. پلیت سریعاً در ورقه آلومینیومی پیچیده شد و به مدت ۳ الی ۴ ساعت در انکوباتور قرار گرفت. پس از آن محیط کشت حاوی رنگ MTT خالی و ۲۰۰ میکرولیتر DMSO و ۲۵ میکرولیتر بافرگلیسین جایگزین آن شد و جذب نوری هر خانه توسط دستگاه ELIZA reader، در طول موج ۵۷۰ نانومتر اندازه گیری گردید.

مراحل اخیر برای پلیت دوم پس از ۴۸ ساعت و برای پلیت سوم پس از ۷۲ ساعت از هنگام مجاورت دادن سلول ها با عصاره انجام شد(۵و۴).

آزمون های آماری

تجزیه و تحلیل نتایج با استفاده از نرم افزارهای Instat و SPSS ، آنالیز واریانس یکطرفه و آزمون تعقیبی Tukey و آنالیز همبستگی انجام شد.برای اطمینان از نرمال بودن توزیع داده ها آزمون Kolomogorov-Smirnov انجام شد و تفاوتها با $P<0.05$ معنی دار تلقی گردید.

نتایج

نتایج بررسی مورفولوژیک

الف) رده سلولی L929

پس از ٢٤ ساعت در چاهک کنترل سلول ها دوکی، چسبیده به سطح پلیت و غیر گرانوله و تعداد سلول ها افزایش یافته بودند. سلول ها در چاهک های با غلظت ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۱۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر نسبت به چاهک کنترل سطح کمتری از فلاسک را پوشانده و تعداد سلول های موجود در محیط کشت کمتر شده بودند. در چاهک های با غلظت ۲۰۰۰ و ۲۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر سیتوپلاسم سلول ها شفافیت خود را از دست داده و اندکی گرانوله شده بودن. پر شدگی چاهک ها از سلول نیز بسیار کم بود.

بعد از ٤٨ ساعت، در چاهک کنترل سلول ها کاملاً سطح پلیت را پوشانده و وضعیت سلول ها نرمال بود. در چاهک های با غلظت ۵۰۰ ، ۱۰۰۰ و ۱۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر تعداد سلول ها از روز قبل بیشتر شده بود ولی نسبت به کنترل کمتر بودند و تعداد سلول های شناور در محیط کشت بیشتر بود.

چاهک های با غلظت ۲۰۰۰ و ۲۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر دارای سلول هایی بودند که تعداد زیادی از حالت دوکی خارج شده و سطح پلیت از تعداد کمی سلول پوشیده شده بود و فاصله زیادی بین سلول ها وجود داشت.

پس از ۷۲ ساعت، شکل سلول ها در چاهک کنترل (غلظت عصاره صفر) طبیعی و دوکی شکل بود و سطح کاملاً از سلول پوشیده شده بود. در چاهک ها با غلظت ۵۰۰ ، ۱۰۰۰ و ۱۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر نیز تعداد سلول ها افزایش یافته بود ولی در سلول ها کمی گرانول تشکیل شده بود و تعداد بیشتری از سلول ها نیز در محیط کشت شناور بودند.

در چاهک های غلظت های ۲۰۰۰ و ۲۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر نسبت به بقیه چاهک ها تعداد کمی سلول به سطح چسبیده بودند، تعداد زیادی سلول گرانوله بود و یا در محیط کشت شناور بودند(شکل ۱).

ب)رده سلولی HT-29

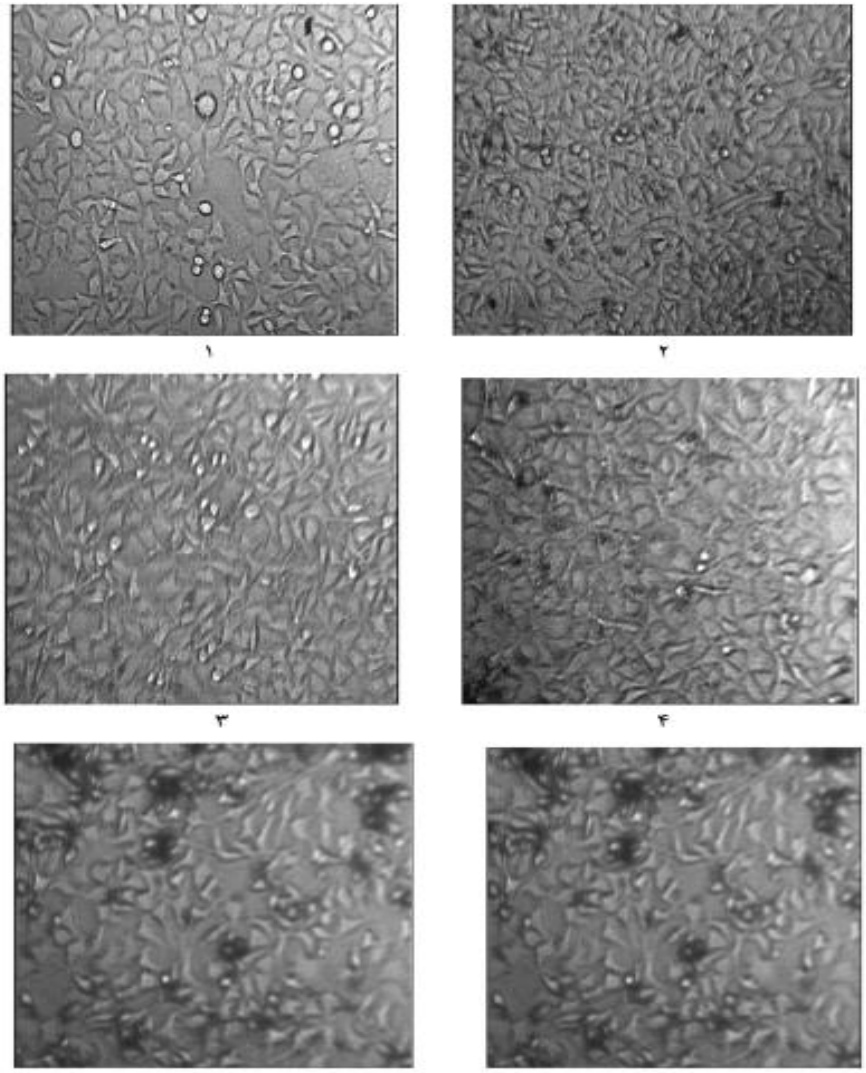
پس از ۲٤ ساعت، در چاهک کنترل سلول ها شکل طبیعی خود را داشتند، سلول ها به صورت کشیده و یکنواخت رشد کرده و سیتوپلاسم آنها شفاف بود. سلول ها در چاهک های با غلظت ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۱۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر مشابه وضعیت چاهک کنترل را داشت ولی میزان پرشدگی پلیت ها (رشد سلولی) کمتر از چاهک کنترل بود. در چاهک های با غلظت ۲۰۰۰ و ۲۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر با زیاد شدن غلظت عصاره کاهش زیادی در رشد سلول ها و پر شدگی پلیت مشاهده شد و شکل سلول ها اندکی تغییر کرده بود.

پس از ٤٨ ساعت، در چاهک کنترل تعداد سلول ها زیاد شده و فضای بیشتری در پلیت را اشغال کرده بودند. در چاهک های با غلظت ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۱۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر نیز مشابه چاهک کنترل تعداد سلول ها در حال افزایش بود اما در این چاهک ها میزان پرشدگی پلیت کمتر شد بود و تعداد سلول های جدا شده از بستر در حال افزایش بودند.

در چاهک های با غلظت ۲۰۰۰ و ۲۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر تعداد بسیار زیادی از سلول ها از سطح جدا و ابر سلولی در محیط کشت ایجاد شده بود و تعداد سلوله های چسبیده به بستر کم بود.

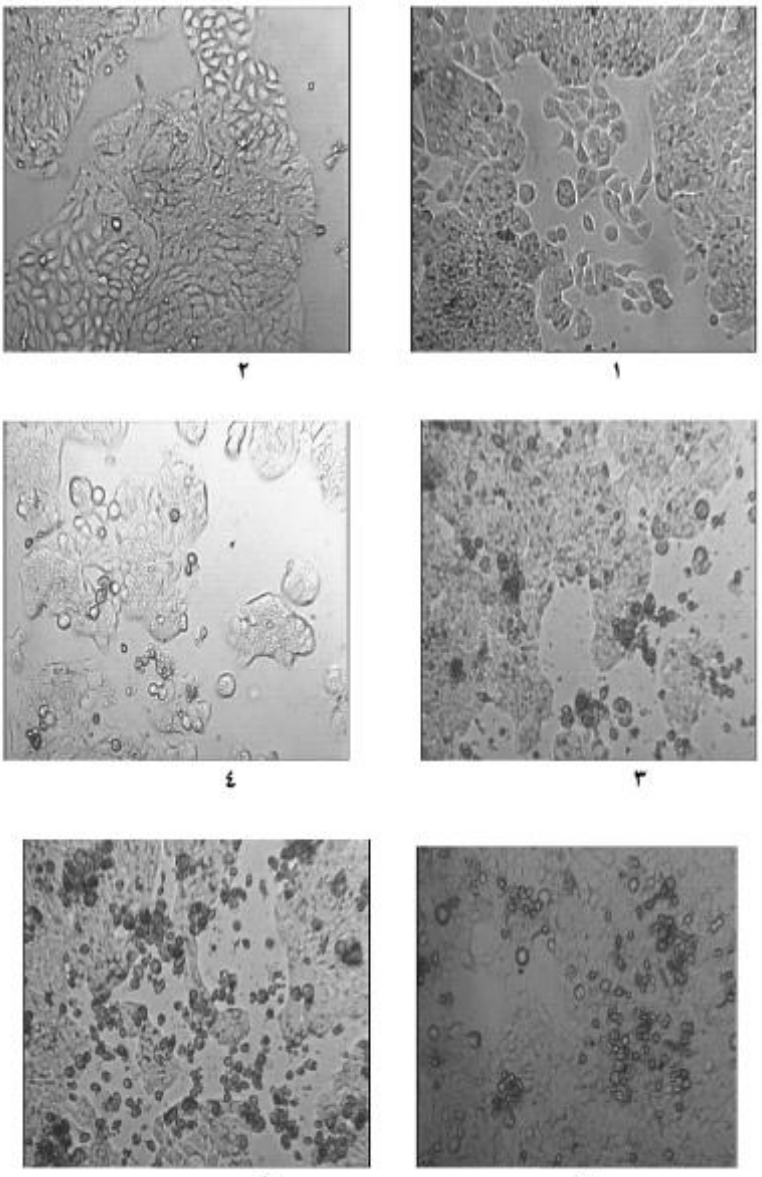
پس از ۷۲ ساعت، فضای چاهک کنترل نسبت به روز قبل بیشتر از سلول پوشیده شده بود به طوری که سطح پلیت را کاملاً پوشانده و شکل سلول ها طبیعی بود. در چاهک های با غلظت ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر نیز چاهک ها از سلول ها پر بود و تعداد سلول های شناور در محیط کشت بیشتر شده بودند.

در چاهک های با غلظت های ۱۵۰۰ ، ۲۰۰۰ و ۲۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر با افزایش غلظت عصاره میزان پر شدگی سلول ها کم تر شده بود و بین تجمع های سلولی فاصله ایجاد شده و تعداد سلول های شناور در محیط کشت بسیار افزایش یافته بود (شکل ۲).



شکل ۱ : تصویر اثرات عصاره آبی کوشنه بر سلول های سالم (L929) در زیر میکروسکوپ ۷۲ ساعت پس از مجاورت با غلظت های مختلف عصاره آبی، بزرگنمایی ۱۰ ×

۱: غلظت ۰ (سلول کنترل)
۲: غلظت ۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر
۳: غلظت ۱۰۰۰ میکرو گرم بر میلی لیتر
۴: غلظت ۱۵۰۰میکروگرم بر میلی لیتر
۵: غلظت ۲۰۰۰میکروگرم بر میلی لیتر
۶: غلظت ۲۵۰۰میکروگرم بر میلی لیتر



شکل ۲ : تصویر اثرات عصاره آبی کوشته بر سلول های سرطانی روده بزرگ انسان (HT-29) در زیر میکروسکوپ ۷۲ ساعت پس از مجاورت با غلظت های مختلف عصاره آبی، بزرگنمایی ۱۰ ×

۱: غلظت ۰ (سلول کنترل)
۲: غلظت ۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر
۳: غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر
۴: غلظت ۱۵۰۰میکروگرم بر میلی لیتر
۵: غلظت ۲۰۰۰میکروگرم بر میلی لیتر
۶: غلظت ۲۵۰۰میکروگرم بر میلی لیتر

نتایج بررسی آزمون MTT

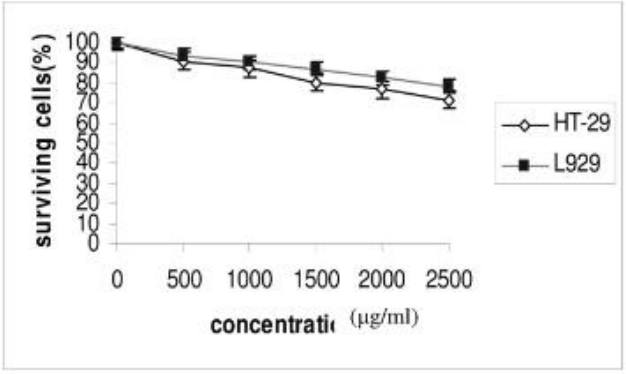
میانگین جذب نوری به دست آمده از سلول هایی که تحت تاثیر غلظت های مختلف عصاره قسط شیرین قرار گرفتند با میانگین جذب نوری سلول هایی که تحت تاثیر عصاره نبودند (کنترل) مقایسه شد و درصد سلول های زنده پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت ، با استفاده از فرمول :

۱۰۰× (جذب نوری سلول های کنترل/ جذب نوری سلول های تحت تاثیر عصاره در هر خانه) = درصد سلول های زنده محاسبه گردید..

پس از ٢٤ ساعت: کاهش سلول ها در هر دو رده سلولی متناسب با غلظت بود، ولی کاهش در درصد سلول های زنده L929 از کاهش درصد سلول های زند HT-29 بیشتر بود . تجزیه و تحلیل آماری با آزمون ANOVA نشان می دهد که بین غلظت تغییر معنی داری وجود دارد ($P<0.05$). اما کاهش درصد سلول های زنده L929بیشتر از کاهش درصد سلول های زنده HT-29 است و بین افزایش غلظت در هر دو رده و کاهش درصد سلول های زنده همبستگی وجود دارد (برای رده سلولی L929 $R=0.38$ و برای رده سلولی $R=-0.42$) (شکل۳).

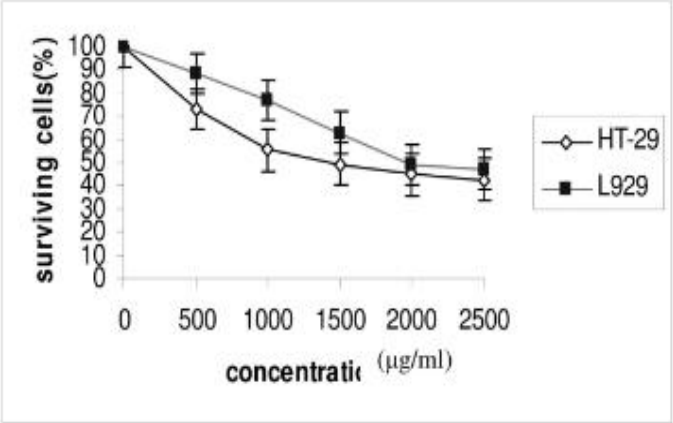
پس از ٤٨ ساعت: در هر دو رده سلولی کاهش زیادی در درصد سلول های زنده وجود دارد به طوری که IC_{50} برای رده سرطانی ۱۵۰۰ میکروگرم بر ملی لیتر می باشد و IC_{50} سلول های سالم نزدیک به آن می باشد. شیب کاهش تعداد سلول ها برای رده HT-29 تا رسیدن IC_{50} بیشتر از سلول های سالم می باشد ولی بعد از آن نمودار این رده تمایل به خطی شدن دارد. در هر دو رده بین درصد سلول های زنده با افزایش غلظت همبستگی معنی داری دارد (برای رده سلولی , $R=-0.37$ L929 و برای رده سلولی HT-29 , $R=-0.39$) (شکل ۴).

پس از ۷۲ ساعت: نتایج مشابه ۴۸ ساعت است که نشان میدهد بهترین اثر عصاره بعد از ۴۸ ساعت می باشد. آزمون آماری نیز نتایج مشابهی را نشان می دهد (شکل۵).



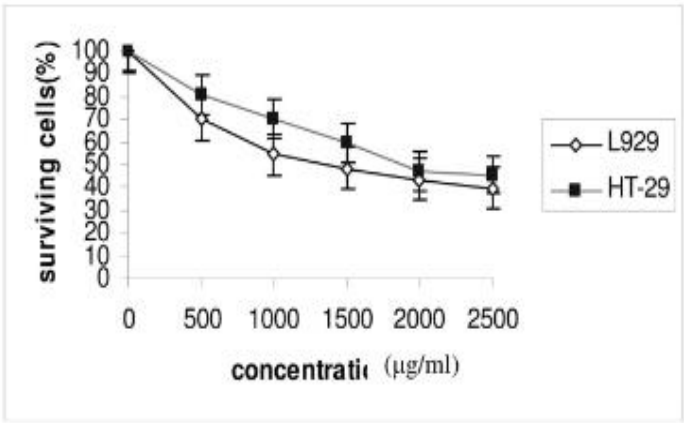
شکل ۳ : بررسی اثرات عصاره آبی کوشه بر سلول های L929 و HT-29 بعد از ۲۴ ساعت با روش MTT

نتایج آزمون MTT که اثرات غلظتهای مختلف عصارهٔ آبی کوشه بر درصد سلولهای زندهٔ HT-29 و L929 پس از ۲۴ ساعت را نشان میدهد. هر نقطه بیانگر Mean ± SD است. با توجه به آزمون آماری در غلظت های ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۱۵۰۰، ۲۰۰۰ و ۲۵۰۰ کاهش درصد سلولهای زنده HT-29 در مقایسه با رده سلولی L929 معنی دار نیست ($P>0.05$) . در هر دو رده سلولی درصد سلول های زنده با افزایش غلظت کاهش می یابد.



شکل ٤ : بررسی اثرات عصاره آبی کوشنه بر سلول های L929 و HT-29 ، بعد از ۴۸ ساعت با روش MTT

نتایج آزمون MTT که اثرات غلظتهای مختلف عصارهٔ آبی کوشنه بر درصد سلولهای زندهٔ HT-29 و L929 پس از ۴۸ ساعت را نشان میدهد. هر نقطه بیانگر Mean ± SD است. با توجه به آزمون آماری در غلظت های ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۱۵۰۰، ۲۰۰۰ و ۲۵۰۰ کاهش درصد سلولهای زنده HT-29 در مقایسه با رده سلولی L929 معنی دار نیست (P>0.05) . در هر دو رده سلولی درصد سلول های زنده با افزایش غلظت کاهش می یابد.



شکل ٥ : بررسی اثرات عصاره آبی کوشنه بر سلول های L929 و HT-29 ، بعد از ۷۲ ساعت با روش MTT

نتایج آزمون MTT که اثرات غلظتهای مختلف عصارهٔ آبی کوشنه بر درصد سلولهای زندهٔ HT-29 و L929 پس از ۷۲ ساعت را نشان میدهد. هر نقطه بیانگر Mean ± SD است. با توجه به آزمون آماری در غلظت های ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۱۵۰۰، ۲۰۰۰ و ۲۵۰۰ کاهش درصد سلولهای زنده HT-29 در مقایسه با رده سلولی L929 معنی دار نیست (P>0.05) . در هر دو رده سلولی درصد سلول های زنده با افزایش غلظت کاهش می یابد.

بحث

تاکنون راه اصلی درمان سرطانهای دستگاه گوارش تشخیص زودرس توده سرطانی و حذف جراحی آنها بوده است و درمان های طبی شامل شیمی درمانی و رادیوتراپی معمولا در مراحل انتهایی صورت می گیرد که اثر چندانی بر طول عمر بیماران ندارد. لذا پژوهشهایی که احیاناً امکان دسترسی به داروها و مواد موثر در درمان کانسرها را فراهم سازند، دارای اهمیت فوق العاده خواهند بود.

مهمترین و اصلی ترین هدف این پژوهش، بررسی اثرات سیتوتوکسیک عصاره آبی ریزومهای گیاه قسط شیرین بر رده سلولهای سرطانی کولون و سلول های غیر سرطانی فیبروبلاست است که برای اولین بار گزارش میشود. همانطور که نتایج بررسی مورفولوژیک و نتایج حاصل از آزمون MTT نشان می دهند، عصاره آبی ریزوم های قسط شیرین در غلظت های مورد استفاده موجب مهار رشد سلول های هر دو رده میشود. اثرات مهاری این عصاره بر رده سلول های سالم L929 نیز در حد اثارت مهاری بر رده سلول های سرطان کولون و یا از آن بیشتر است ، اگر چه سلول های سالم L929 مورد استفاده در این پژوهش سلول های سالم فیبرو بلاست موش هستند اما چنانچه عصاره آبی بر سلولهای سالم انسان نیز چنین اثراتی نشان دهد، شاید استفاده از این عصاره در موارد انسانی مناسب نباشد و نمی توان استفاده از عصاره آبی را در مصرف انسانی توصیه نمود.

در این پژوهش مشخص گردید که عصاره آبی گیاه قسط شیرین بر سلول های سرطانی (HT_29) و هم بر سلول های سالم (L929) اثر سیتوتوکسیک دارد.

اگر چه بر حسب اطلاعات ما تا کنون مطالعه ای از اثرات عصاره آبی گیاه قسط شیرین را بر روی سلول های سرطانی HT_29 بررسی کرده باشد وجود ندارد، اما برای توجیح اثرات ضد سرطانی قسط شیرین و ترکیبات آنمکانیسم های مختلفی پیشنهاد شده است که برخی از آنها عبارت اند از : شکار رادیکالای آزاد، تعدیل ومهار فعالیت های آنزیمی، مهار ژنوتوکسیسیتی، اثرات مهاری بر پرولیفراسیون سلولی، اثرات ضد اکسیدان واثرات سیتوتوکسیک(۱۰-۸).

در بخشهای مختلف گیاهان خانواده زنجبیل (Zingiberaceae) مواد شیمیایی متعددی وجود دارد که به طور طبیعی اثرات مهاری و اثرات به تاخیر انداختن و یا معکوس کردن مراحل چندگانه کانسر زایی دارند (۱۶).

در مطالعه ای که توسط Yoshikawa و هکاران انجام شد آنها از عصاره آبی – استونی ریزومهای گیاه قسط شیرین (Alpinia galangal) علاوه بر ده ماده شناخته شده قبلی کهاز خانواده فلاونوئید ها هستند و دارای اثرات ضد سرطانی می باشند، ۴ ماده جدید شامل galanganol B، galanganol A، galanganol و galanganol C را جدا کردند و نشان دادند که این مواد جدید دارای اثرات مهای بر تولید NO در اثر لیپوپلی ساکارید در سلول های ماکروفاژ صفاق موش سوری بودند (۱۷). در روغن فرار از بخش های مختلف گیاه کوشنه شامل ریزومها نیز چندین ماده از جمله ترکیبات مونوترپن، سزکویی ترپن و (E)-methylcinemate وجود دارند (۱۸). ماده Capsacio که در نوعی فلفل تند (hot chili pepper) وجود دارد، اثرات حفاظتی بر موتاژنیسیته ایجاد شده تجربی دارد و از تومورزایی تجربی نیز جلوگیری می کند (۱۹).

از عصاره اتانولی دانه های نوعی قسط (Alpinia belpharocalyx) نیز ۴۵ ترکیب Diarytheptanoid جدا شده است که اثرات معنی داری در مهار رشد سلول های HT-1080 (فیبرو سارکوم انسانی) و سلول های L5-26(کارسینوم کولون Marine) نشان داده اند. در این مطالعه برخی از ترکیبات موجود در عصاره در مقایسه با داروی ضد سرطانی 5-Fluorouracil اثرات مهاری موثر تری بر سلولهای HT-1080 نشان دادند(۲۰).

بخش عمده ای از مواد فنولی موجود در گیاهان خانواده زنجبیل اثرات ضد التهاب و ضد اکسیدان دارند . Capsaicin موجود در فلفل اثر محافظتی بر علیه تومور زایی و موتاژن زایی ایجاد شده تجربی دارد و در مطالعه ای بر روی چندین رده از سلول های سرطانی ایجاد آپوپتوز می کند. Yakachinon A و B که در گیاه Alpinia oxyphylla Miquel وجود دارند اثرات مهاری بر التهاب ایجاد شده در اثر فوربل استر و مواد کانسرزای پوست در موش سوری دارند این مواد که diarylheptanoid می باشند تولید TNFa و IL-1a و بیان mRNA آنها را متوقف می کنند و هر دو در سلولهای HL-60(رده سلولهای سرطانی لوسمی پرومیولوستیک انسانی) با ایجاد آپوپتوز موجب مرگ سلولی می شوند (۲۱و۱۹).

در پژوهش حاضر ممکن است مرگ برنامه ریزی شده سلولی در شرایط فیزیولوژیکی موجود در سلول های سالم نیز اتفاق افتاده و موجب اثر مهری بر این رده شده باشد.

Galangin که از خانواده فلاونوئیدها است و در گیاهان خانواده زنجبیل مثل Alpinia officinarum در غلظت های بالا یافت می شود، فعالیت های ضد اکسیدانی و شکار کنندگی رادیکالهای آزاد و تعدیل فعالیت های آنزیمی و اثرات مهار ژنوتوکسیتی مواد شیمیایی دارد و پیشنهاد شد که ممکن است در درمان کانسرها مفید باشد(۲۲).

در ریزوم هی زنجبیل مواد مهار کننده سنتز آنزیم پروستاگلاندین سنتتاز مشخص شده است. در بین این مواد Gingrolو diarylheptanoid ها فعالترین مواد شناخته شده در مهار آنزیم پروستاگلاندین سنتتاز و نیز در مهار فعالیت آنزیم Arachidonate 5-lipoxygenase که یک آنزیم دخیل در بیوسنتز لکوترین هاست، می باشند(۲۰).

در مطالعه دیگری که توسط Leeو Hougton (2005) انجام شد، آنها نشان دادند که Alpinia galangal و Alpinia officinarum بر روی رده سلولهای سرطانی ریه (CORL23) و کانسر پستان (MCF7) انسان اثرات سیتوتوکسیک داشتند و ضمناً ماده شیمیایی 1- acetoxychavicol acetate به عنوان ماده اصلی سیتوتوکسیک گونه Alpinia مشخص گردید(۲۴). با توجه به اینکه اثرا مهاری معنی داری در پژوهش حاضر بر روی سلولهای HT-29 توسط عصاره قسط شیرین دیده می شود، شاید بخشی از مکانیسم اثرات مهاری مشابه مطالعه یاد شده مربوط به وجود ترکیبات شیمیایی مذکور در عصاره های قسط باشد.

تجویز موضعی 2-6µg از diarylheptanoidها (yakuchinone A,B) که از ترکیبات موجود در Alpinia oxyphylla هستند قبل از تجوز موضعی ماده سرطانزا در موش کوچک، بطور معنی داری تشکیل تومور پوست را تخفیف داد و از ایجاد تومور جلوگیری نمود. تجویز موضعی یاکوکینون A و B بطور بارزی موجب مهار فعالیت آنزیم اورنتین دکربوکسیلاز ODC در اثر ماده کانسروژن و نیز مهار ODC mRNA گردید. در این مطالعات نشان داده شد که دی آریل هپاتونیدهای موجود در Alpinia oxyphylla دارای فعالیت ضد توموری بودند که ممکن است با ویژگیهای ضد التهابی آنها مرتبط باشد(۲۵).

در مطالعه ای که توسط ویلن و همکارانش (۲۰۰۳) صورت گرفت، مقادیر نسبتا بالا از ماده شیمیایی ۱ و ۱- دی فینیل- ۲- پیکریل هیدروزیل در Alpinia وجود داشت و این برنامه دارای فعالیت شکار رادیکال های آزاد در سلول های سرطانی است و همچنین سبب افزایش فعالیت آنزیم های سوپر اکسید دسموتاز، کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز در سلول های سرطانی می شود (۱۲و۱۱). اگر چه در پژوهش حاضر اثرات مواد شیمیایی موجود در قسط شیرین را به صورت مجزا بر روی سلول های سرطانی کولون بررسی نکرده ایم، اما این احتمال وجود دارد که اثرات مشاده شده در مهار رشد هر دو رده سلولی مورد آزمایش را به یک یا چند ماده شیمیایی از ترکیبات شیمیایی موجود در ریزومهای گیاه بتوان نسبت داد.

نتیجه گیری

همانطور که نتایج پژوهش حاضر نشان می دهد عصاره آبی سوکسله قسط شیرین در غلظت های ۱۵۰۰µg/ml و بالاتر موجب کاهش درصد سلول های زنده و مهار رشد هر دو رده سلول های سرطانی HT-29 و سلول های سالم L929 می شود و تفاوت اندکی در کاهش تعداد سلول های این دو رده سلولی وجود دارد. لذا به نظر می رسد که عصاره آبی قسط شیرین برای مطالعات in vivo و یا مصارف درمانی سرطان روده بزرگ انسان چندان مناسب نیست ومی بایست از عصاره های دیگر مثل عصاره اتانولی استفاده شود.

تقدیر و تشکر

بخشی از هزینه های این پژوهش توسط معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مشهد تامین شد که بدین وسیله تشکر و قدردانی می نمائیم.

References:

۱. زرگری ع. گیاهان داروئی. جلد چهارم، چاپ چهارم، تهران، انتشارات دانشگاه تهران، ۱۳۶۹؛ صفحه ۵۶۰-۵۵۹.

۲.میرحیدر ح. معارف گیاهی. جلد سوم، چاپ اول، تهران، انتشارات دفتر نشر فرهنگ اسلامی تهران، ۱۳۷۳؛ صفحه ۵۰-۴۹.

۳. صمصام شریعت، سید هادی. عصاره گیری و استخراج مواد موثره گیاهان داروئی و روشهای شناسایی و ارزشیابی آنها. چاپ اول، اصفهان، انتشارات مانی، ۱۳۷۱؛ صفحه ۲۰ – ۵.

۴. قربانی، احمد. بررسی اثر مهاری عصاره آبی و الکلی سیر (Allium sativum) بر رشد سلول های سرطان حنجره (H.EP.2). پایان نامه کارشناسی ارشد فیزیولوژی پزشکی، مشهد، دانشگاه پزشکی، ۱۳۸۲.

۵. نژاد شاهرخ آبادی، خدیجه. بررسی اثرات سیتوتوکسیسیتی عصاره تام زعفران (Crocus sativus L.) بر سلول های هپاتوکارسینومای کبد انسان (H.EP.2). پایان نامه کارشناسی ارشد ژنتیک، تهران، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، ۱۳۸۲.

6. Jirovetz L, Buchbauer G, Shafi MP, Leela NK. Analysis of the essential oils of the leaves, stems, rhizomes and roots of the medicinal plant Alpinia galangal from southern India. Acta Pharm 2003; 53(2): 73-81.

7. Heo MY, Sohn SJ, AuWW. Anti-genotoxicity of galangal as a cancer chemoprevaentive agent candidate. Mutat.Res. 2001; 488(2): 135-50.

8. LeeSE, Hwang HJ, Ha JS, Jeong HS, KimJH. Screening of medicinal plant exteacts for antioxidant activity. Life Sci 2003; 73(2): 167 -79.

9. Ly TN, Shimoyamada M, Kato K, Yamauchi R. Isolation and characterization of some antioxidative compounds from the rhizomes of smaller galangal (Alpinia officinarum Hance). J Agric. Food chem. 2003; 51(17): 924-9.

10. Ruffa MJ, Ferraro G, Wagner ML, Calcagno ML, Campos RH, Cavallaro L. Cytotoxic effect of Argentine medicinal plant extracts on human hepatocellular carcinoma cell line. J Ethnopharmacol 2002; 79(3): 335.

11. Whelan LC, Ryan MF. Ethanolic extracts of euphorbia and other ethnobo tanical species as inhibitors of human tumour cell growth. Phytomed 2003; 10(1): 53-58.

12. AltmanRD, Marcussen KC. Effects of a ginger extrat on knee pain in patients with osteoarthritis. Arthritis Rheum 2001; 44(11): 2531-8.

13. Akhtar MS, Khan MA, Malik MT. Hypoglycaemic activity of Alpinia galangal rhizome and its extracts in rabbits. Fitoterapa 2002; 73(7-8): 623-8.

14. Kiuchi F, Iwakami S, Shibuya M, Hanaoka F, Sankawa U. Inhibition of prostaglandin and Leukotriene biosynthesis by gingerols and diarylheptanoids. Chem.pharm.Bull. 1992;40(2): 387-91.

15. Miyazawa M, NakamuraY, IshikawaY. Insecticidal diarylheptanoid from Alpinia oxyphlla against Larvae of Drosophila melanogaster. Nat Prod Lett 2001; 15(1): 75-9.

16. Shawka M, ArjunH A, Tezuka Y, Saiki I. Antiproliferative Activity of Diarylheptanoids from the Seeds of Alpinia blepharocalyx. Biol Pharm 2001; 24(5): 525-528.

17. Morikawa T, Ando S, Matsuda H, Kataoka S, Muraoka O, Yoshikawa M. Inhibitors of nitric oxide production from the rhizomes of Alpinia galanga: structures of new 8-9' linked neolignans and sesquineolignan. Chem Pharm 2005; 53(6): 625-630.

18. Jirovetz L, Buchbauer G, Shafi MP, Leela NK. Analysis of the essential oils of the leaves, stems, rhizomes and roots of the medicinal plant Alpinia galangal from southern India. Acta Pharm 2003; 53(2) 73-81.

19. Chun KS, Sohn Y, Kim HS, Kim OH, Park KK, Lee JM, Moon A, Lee SS, Surh YJ. Anti-tumor promoting potential of naturally occurring diarylheptanoids structurally related to curcumin. Cancer lett.2000:49-57.

20. Kiuchi F, Iwakami S, ShibuyaM, Hanaoka F, Sankawa A. Inhibition of prostaglandin and Leukotriene biosynthesis by gingerols and diarylheptanoids. Chem..pharm.Bull. 1992; 40(2): 387-91.
21. Surch Y. Molecular mechanisms of chemopreventive effects of selected dietary and medicinal phenolic substsnces. Mutat Res 1999; 428(1-2): 305-27.
22. Heo MY, Sohn SJ, AuWW. Anti-genotoxicity of galangal as a cancer chemoprevaentive agent candidate. Mutat.Res. 2001; 488(2): 135-50.
23. Lee E, Park KK, Lee JM, Chun KS, Kang HY, Lee SS, Surh YJ. Suppression of mouse skin tumor promotion and induction of apoptosis in HL-60 cells by Alpinia oxyphylla Miquel (Zingiberaceae).carcinogenesis. 1998; 19(8): 1377-81.
24. Lee CC, Houghton P. Cytotoxicity of plants form Malaysia and Thailand used traditionally to treat cancer .J Ethnopharmacol 2005.
25. Chun KS, Park KK, Lee J, Kang M, Surh YJ. Inhibition of monse skin tumor promotion by anti-inflammatory diarylheptanoids derived form Alpinia oxyphylla Miquel (Zingiberaceae). Oncol Res 2002; 13(1): 37-45.