Original Article

Investigating the cytotoxic effects of ethanolic extract of *Ferula assa-foetida* resin on $HepG_2$ cell line

Sadooghi SD*, Nezhad-Shahrokh-Abadi Kh, Zafar-Balanezhad S, Baharara J

Department of Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, I. R. Iran.

Received 3 March, 2013; Accepted 6 July, 2013

Abstract:

Background: Resin of *Ferula assa-foetida* has medicinal properties and various studies have shown its antioxidant and anticancer effects. The aim of this study was to evaluate the cytotoxic effect of ethanolic extract of *Ferula assa-foetida* resin on $HepG_2$ cell line.

Materials and Methods: In this experimental study, the effect of ethanolic extract of *Ferula assa-foetida* resin on $HepG_2$ cell line and L929 normal cell line was investigated. The RPMI medium contains L-glutamine, penicillin, streptomycin and 10% FBS. Morphological changes were evaluated using an inverted microscope 24, 48, 72, 96 hours after adding the resin of *Ferula assa-foetida* extract (10, 50, 100, 200 μg/ml). Cell viability was determined using MTT assay.

Results: Ethanolic extract of *Ferula assa-foetida* resin (50, 100, 200 μg/ml) were induced morphological changes in HepG2 cells after 24 hours which were prominent after 48, 72 and 96 hours. At concentrations of 100 and 200 μg/ml, morphological changes were observed in normal cells. Results of MTT assay showed a significant decrease in viability of $HepG_2$ cells at concentrations of 50, 100, 200 μg/ml. Concentrations of 100 and 200 μg/ml significantly reduced the viability of L929 cell ($P<0.05$).

Conclusion: Although *Ferula assa-foetida* resin (50 μg/ml) has cytotoxic effects on $HepG_2$ cell line, but at this concentration the extract have no cytotoxic effect on normal cells. Therefore, this concentration can destroy cancer cells with minimal damage to normal cells.

Keywords: $HepG_2$, Resin of *Ferula assa-foetida*, Cytotoxic

* **Corresponding Author.**
Email: Damoon.Sadughi@Gmail.com
Tel: 0098 915 302 6313
Fax: 0098 511 501 3950

Conflict of Interests: ***No***

Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences Septamber, 2013; Vol. 17, No 4, Pages 323-330

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-08-13]

Please cite this article as: Sadooghi SD, Nezhad-Shahrokh-Abadi Kh, Zafar Balanezhad S, Baharara J. Investigating the cytotoxic effects of ethanolic extract of Ferula assa-foetida resin on HepG2 cell line. ***Feyz*** 2013; 17(4): 323-30.

بررسی اثرات سایتوتوکسیک عصاره اتانولی صمغ آنغوزه (*Ferula assa-foetida*) بر سلول‌های کارسینومای کبد انسان ($HepG_2$)

سید دامون صدوقی[1*]، خدیجه نژاد شاهرخ آبادی[1]، سعیده ظفربالانژاد[1]، جواد بهارآرا[1]

خلاصه:

سابقه و هدف: صمغ آنغوزه دارای خواص دارویی بوده و مطالعات اثرات ضد سرطانی و آنتی‌اکسیدانی آن را اثبات کرده است. این مطالعه با هدف بررسی اثرات سایتوتوکسیک عصاره صمغ آنغوزه بر سلول‌های کارسینومای کبد انسان انجام شد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعهٔ تجربی عصاره صمغ آنغوزه بر سلول‌های سرطانی $HepG_2$ و طبیعی L929 اثر داده شد. محیط کشت RPMI حاوی L-گلوتامین، پنی‌سیلین، استرپتومایسین و ۱۰ درصد FBS بوده و ۲۴، ۴۸، ۷۲، و ۹۶ ساعت پس از اضافه نمودن عصاره با غلظت‌های µg/ml ۱۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ تغییرات مورفولوژیک ایجاد شده با میکروسکوپ معکوس بررسی شد. درصد زنده ماندن هر دو رده سلولی نیز توسط آزمون MTT بررسی گردید.

نتایج: غلظت‌های µg/ml ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، پس از ۲۴ ساعت موجب تغییرات مورفولوژیک در سلول‌های $HepG_2$ گردید و این تغییرات پس از ۴۸، ۷۲، ۹۶ ساعت تشدید شد. هم‌چنین، غلظت‌های µg/ml ۱۰۰ و ۲۰۰ موجب تغییرات مورفولوژیک در سلول‌های L929 شد. نتایج آزمون MTT نشان‌دهندهٔ کاهش معنی‌داری در میزان زنده ماندن سلول‌های $HepG_2$ در غلظت‌های µg/ml ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ می‌باشد. غلظت‌های µg/ml ۱۰۰ و ۲۰۰ موجب کاهش معنی‌دار در میزان زنده ماندن سلول‌های L929 شد ($P<0/05$).

نتیجه‌گیری: اگرچه صمغ آنغوزه در غلظت µg/ml ۵۰ دارای اثرات سایتوتوکسیک بر سلول‌های سرطانی $HepG_2$ می‌باشد، ولی در این غلظت اثر سایتوتوکسیک بر سلول‌های طبیعی L929 ندارد. بنابراین، غلظت مذکور می‌تواند با کمترین آسیب به سلول‌های طبیعی، سلول‌های سرطانی را تخریب کند.

واژگان کلیدی: کارسینومای کبد، صمغ آنغوزه، سایتوتوکسیک

دو ماه‌نامه علمی– پژوهشی فیض، دوره هفدهم، شماره ٤، مهر و آبان ۱۳۹۲، صفحات ۳۳۰-۳۲۳

مقدمه

هپاتوسل کارسینوم (HCC) رایج‌ترین شکل سرطان کبد می‌باشد که در هپاتوسیت‌ها ایجاد می‌شود و در بیشتر مواقع پس از ابتلاء فرد به هپاتیت ویروسی B، C و یا سیروز رخ می‌دهد. هپاتوسل کارسینوم مانند بیشتر سرطان‌های دیگر زمانی که یک جهش در چرخه تقسیم سلولی رخ دهد و منجر به تکثیر بیش از حد سلول‌ها شود و یا زمانی‌که مکانیسم آپوپتوز در سلول‌ها مهار می‌شود، به‌وجود می‌آید [۱]. تولید رادیکال‌های فعال اکسیژن از جمله رادیکال آنیون سوپراکساید (O^{-})، رادیکال هیدروکسیل (OH) و پراکسید هیدروژن (H_2O_2)، فاکتورهای مهمی در شرایط پاتولوژیکی مختلف، از جمله سرطان‌ها محسوب می‌شوند که در آنها موتاسیون ناشی از مواد سرطان‌زا و پیشرفت توموری نقش مهمی دارد [۲].

ترکیبات آنتی‌اکسیدان به‌عنوان دفاع اصلی علیه توکسیسیتی ناشی از تولید رادیکال‌های آزاد محسوب می‌شوند و این عمل را از طریق محافظت در برابر آسیب‌های ناشی از رادیکال‌های آزاد اعمال می‌کنند. بنابراین، ترکیبات مهارکنندهٔ تولید رادیکال‌های آزاد و یا مهارکننده تاثیر آنها می‌توانند از ایجاد سرطان جلوگیری کنند [۳]. در این زمینه گیاهان دارویی از اهمیت خاصی برخوردار می‌باشند؛ زیرا آنها دارای منابع غنی از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی هستند که هم می‌توانند از ایجاد سرطان پیشگیری کرده و هم یک ترکیب مفید برای کند کردن روند پیشرفت سرطان باشند. این ترکیبات می‌توانند اثرات خود را در مراحل مختلف شروع و رشد سلول‌های سرطانی اعمال کنند [٤]. گیاه آنغوزه با نام علمی *Ferula assa-foetida* گیاهی علفی است که دارای ساقه‌ای قوی، ضخیم و فیبری می‌باشد. قسمت مورد استفاده این گیاه رزینی است که از آن به‌دست می‌آید و تحت عنوان صمغ آنغوزه مورد استفاده قرار می‌گیرد [۵]. در طب سنتی اثرات ضد تشنج، ضد انگل، رفع بیماری‌های عصبی، اشتها آور، رفع تنبلی روده، رفع درد کلیه، تقویت حافظه، ضد روماتیسم، ضد گرفتگی عضلات و تاثیر بر فشار خون برای صمغ گیاه آنغوزه ذکر شده است [٦] مهم‌ترین اثرات فارماکولوژیکی صمغ آنغوزه اثرات ضد انگلی [۷]، پیشگیری از

[1] دانشگاه آزاد اسلامی، واحد مشهد، گروه زیست شناسی، مشهد، ایران

* نشانی نویسنده مسئول:
مشهد، خیابان راهنمایی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد، گروه زیست شناسی

تلفن: ۰۹۱۵۳۰۲۶۳۱۳ دورنویس: ۰۵۱۱ ۵۰۱۳۹۵۰

پست الکترونیک: Damoon.Sadughi@Gmail.com

تاریخ دریافت: ۹۱/۱۲/۱۳ تاریخ پذیرش نهایی: ۹۲/۴/۱۵

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-08-13]

زخم معده [۸]، اثرات ضد حاملگی [۹]، اثر ضد دیابتی [۱۰]، کاهش فشار خون [۱۱] و ضد سرطان [۱۰] می‌باشد. امروزه مشخص شده است که مصرف صمغ گیاه آنغوزه خطر بروز سرطان کولون را به‌طور معنی‌داری کاهش می‌دهد [۱۲]. برخی مطالعات اپیدمیولوژیک نشان داده است که ارتباط معکوسی میان مصرف صمغ گیاه آنغوزه و بروز سرطان وجود دارد. هم‌چنین، اثرات ضد سرطانی ترکیبات موجود در صمغ آنغوزه مربوط به اثرات مهاری و سایتوتوکسیک مستقیم آن است و این ویژگی‌ها با استفاده از مدل‌های سرطانی در حیوانات مختلف و در مطالعات برون‌تنی، با کشت رده‌های سلول‌های سرطانی نشان داده شده است [۱۳]. استفاده از عصارهٔ اتانولی برگ گیاه آنغوزه علیه سلول‌های سرطانی رودهٔ بزرگ انسانی نشان‌دهنده خاصیت ضد تکثیری و سایتوتوکسیک عصاره برگ این گیاه می‌باشد [۱٤]. از آنجایی که برای صمغ آنغوزه اثرات سیتوتوکسیک و ضد سرطانی پیشنهاد شده است، این مطالعه به منظور بررسی اثر عصاره اتانولی صمغ گیاه آنغوزه بر ردهٔ سلولی سرطانی $HepG_2$ انجام شد.

مواد و روش‌ها

رده سلول‌های سرطانی $HepG_2$ و طبیعی L929 در محیط کشت RPMI حاوی L-گلوتامین، پنی‌سیلین (۱۰۰ واحد بر میلی‌لیتر)، استرپتومایسین (۱۰۰ µg/ml) و ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (FBS) کشت شدند. سلول‌ها در انکوباتور ۳۷ درجهٔ سانتی گراد، رطوبت ۹۰ درصد و دی اکسید کربن ۵ درصد قرار گرفتند [۱۵]. در بررسی مورفولوژی، غلظت‌های ۱۰ µg/ml، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ عصارهٔ اتانولی صمغ آنغوزه بر سلول‌های کشت داده شده (۵×۱۰^۵) در فلاسک‌های با درب فیلتردار استریل ۵۰cc (ساخت شرکت JET BIOFIL کانادا)، که حاوی ۵ میلی‌لیتر محیط کشت بودند، اثر داده شدند و نتایج در ۲٤، ٤۸، ۷۲، و ۹٦ ساعت بعد از تیمار کردن سلول‌ها با عصاره، توسط میکروسکوپ معکوس مجهز به دوربین (Nikon,Japan)، عکس برداری شد. به‌منظور بررسی میزان سمیت عصاره اتانولی صمغ آنغوزه بر هر دو ردهٔ سلولی $HepG_2$ و L929 از روش رنگ‌سنجی MTT استفاده شد. این روش یک تست متابولیک رقابتی میتوکندریایی می‌باشد و بر اساس شکستن نمک ترازولیوم توسط آنزیم سوکسینات دهیدروژناز میتوکندریایی سلول‌های زنده استوار است. از هر ردهٔ سلولی، پس از انجام پاساژ، یک سوسپانسیون سلولی در محیط کشت تهیه شد. بدین صورت که در هر خانه از پلیت ۹٦ خانه‌ای ۵۰۰۰ سلول موجود باشد. برای این آزمون ۳ پلیت ۹٦ خانه‌ای در نظر گرفته شد و ۳۰ خانه از هر پلیت انتخاب گردید. سپس ۵ گروه سه‌تایی از خانه‌ها به سلول‌های $HepG_2$ و ۵ گروه سه‌تایی از خانه‌ها به سلول‌های L929 اختصاص داده شد. پلیت‌ها ۲٤ ساعت در انکوباتور قرار داده شدند تا سلول‌ها به بستر خود بچسبند. پس از طی این مدت، نخست، محیط کشت‌های هر سه پلیت خالی و ۱۸۰ میکرولیتر محیط کشت تازه در هر خانه ریخته شد. سپس غلظت‌های ۱۰ µg/ml، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ عصاره استریل شده آنغوزه به ٤ گروه سه‌تایی از خانه‌های مربوط به $HepG_2$ و L929 اضافه گردید و به خانه‌های مربوط به گروه شاهد به اندازه حجم عصاره، آب مقطر استریل اضافه شد. بنابراین، ۳ پلیت با این مشخصات به‌دست آمد. ۵ گروه سه خانه‌ای از هر پلیت حاوی غلظت‌های ۰µg/ml، ۱۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ برای سلول‌های $HepG_2$ و ۵ گروه سه خانه‌ای هم حاوی این غلظت‌ها برای سلول‌های L929 در نظر گرفته شد. این پلیت‌ها در انکوباتور قرار گرفتند و پس از ۲٤ ساعت یکی از پلیت‌ها به‌صورت تصادفی برداشته شده و محیط کشت خانه‌های آن خالی شد و در عوض ۱۸۰ میکرولیتر محیط تازه همراه با ۲۰ میکرولیتر رنگ MTT (۳، ٤، ۵ دی متیل تیازول ۲ یل ۲،۵ دی فنیل تترازولیوم) اضافه و ٤ ساعت در انکوباتور گذاشته شد. پس از آن محیط کشت حاوی رنگ MTT خالی و ۲۰۰ میکرولیتر DMSO و ۲۵ میکرولیتر بافر گلایسین جایگزین آن شد و جذب نوری خانه‌ها توسط دستگاه (Stat Fax 303 Plus) Elisa reader در طول موج ۵۷۰ نانومتر اندازه‌گیری شد [۱۷-۱۵]. مراحل اخیر برای پلیت دوم پس از ٤۸ ساعت و برای پلیت سوم ۷۲ ساعت پس از تیمار کردن سلول‌ها با عصارهٔ آنغوزه انجام شد.

روش تجزیه و تحلیل داده‌ها

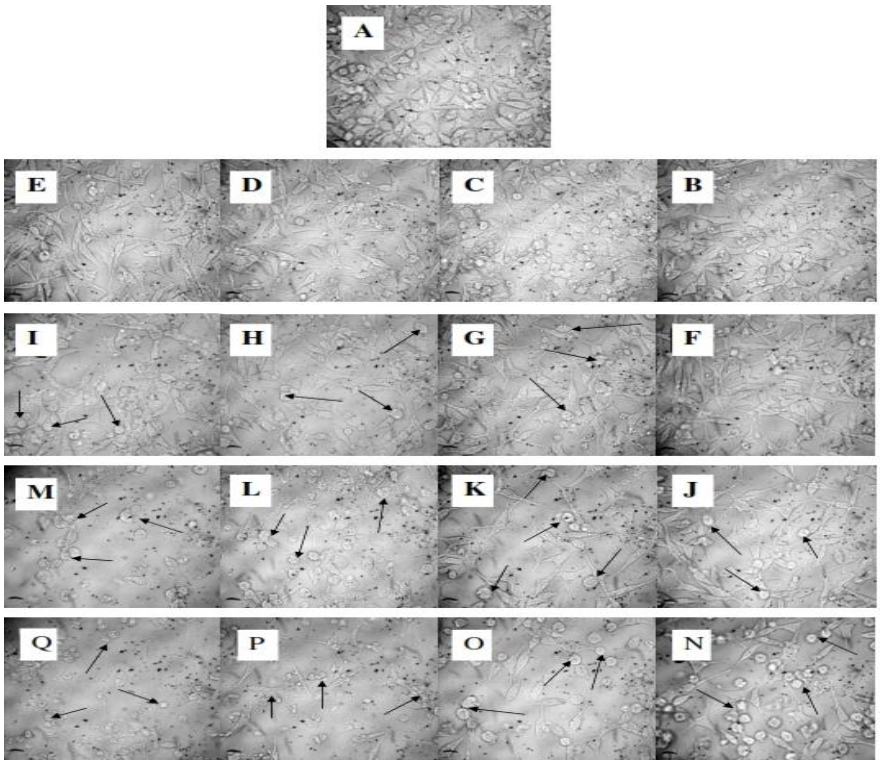
اطلاعات به‌دست آمده توسط نرم افزار آماری SPSS (ویرایش ۲۰) به کمک آزمون واریانس یک طرفه (ANOVA) تجزیه و تحلیل شدند. در صورت وجود اختلاف معنی‌دار میان گروه‌ها و به‌منظور تفکیک گروه‌هایی که با یکدیگر اختلاف معنی‌دار داشتند، از آزمون تعقیبی Tukey در سطح معنی‌داری $P<۰/۰۵$ استفاده شد.

نتایج بررسی مورفولوژی

در ارزیابی مورفولوژیک سلول‌های $HepG_2$ مشخص گردید که ۲٤ ساعت پس از اضافه نمودن عصارهٔ صمغ آنغوزه با غلظت ۱۰ µg/ml در مقایسه با سلول‌های گروه شاهد، تغییر محسوسی در آنها مشاهده نشد. اما، در غلظت‌های ۵۰ µg/ml، ۱۰۰ و ۲۰۰، سلول‌ها از بستر خود جدا شده و از حالت دوکی

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-08-13]

شکل به‌صورت گرد درآمده و گرانولاسیون سلولی در آنها مشاهده شد. شدت میزان کشندگی عصاره صمغ آنغوزه وابسته به غلظت بوده و با افزایش آن اثر کشندگی بیشتر می‌شود و با افزایش غلظت، تعداد سلول‌های تخریب شدهٔ بیشتری در فلاسک‌های کشت دیده شد (۵۰ <۱۰۰ <۲۰۰). ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت پس از اضافه کردن عصارهٔ صمغ آنغوزه با غلظت µg/ml ۱۰ در مقایسه با سلول‌های فلاسک گروه شاهد، تغییر محسوسی در آنها مشاهده نشد، اما در غلظت‌های µg/ml ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰، تغییرات مورفولوژیک قابل توجه بود و این تغییرات با افزایش زمان شدیدتر گردید. در هر یک از غلظت‌های µg/ml ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ اثر داده شده به سلول‌ها، با افزایش زمان اثرات سایتوتوکسیک در سلول‌ها (سرطانی و طبیعی) بیشتر شد و تعداد سلول‌های کشته شده افزایش یافت (۴۸ <۷۲ <۹۶). در ارزیابی مورفولوژیک سلول‌های طبیعی L929 نیز پس از گذشت ۲۴ ساعت از اضافه کردن عصارهٔ آنغوزه در غلظت‌های µg/ml ۱۰۰ و ۲۰۰، کاهش تقسیم و گرانولاسیون سلولی مشاهده شد. اما، در غلظت‌های µg/ml۵۰ و ۱۰ سلول‌ها به بستر فلاسک چسبیده، شکل طبیعی خود را حفظ کرده و گرانولاسیون سلولی در آن‌ها مشاهده نشد. پس از گذشت ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت، اثرات عصاره در غلظت‌های µg/ml ۱۰۰ و ۲۰۰ تشدید گردید.



تصویر شماره ۱- سلول‌های سرطانی ردهٔ $HepG_2$ ۲۴، ۴۸، ۷۲ و۹۶ ساعت پس از تیمار با عصاره اتانولی صمغ آنغوزه (۲۰×)

A) شاهد، B) غلظت µg/ml ۱۰ پس از ۲۴ ساعت، C) غلظت µg/ml ۱۰ پس از ۴۸ ساعت، D) غلظت µg/ml ۱۰ پس از ۷۲ ساعت، E) غلظت µg/ml ۱۰ پس از ۹۶ ساعت، F) غلظت µg/ml ۵۰ پس از ۲۴ ساعت، G) غلظت µg/ml ۵۰ پس از ۴۸ ساعت، H) غلظت µg/ml ۵۰ پس از ۷۲ ساعت، I) غلظت µg/ml ۵۰ پس از ۹۶ ساعت، J) غلظت µg/ml ۱۰۰ پس از ۲۴ ساعت، K) غلظت µg/ml ۱۰۰ **پس از ۴۸ ساعت**، L) غلظت µg/ml ۱۰۰ پس از ۷۲ ساعت، M) غلظت µg/ml ۱۰۰ پس از ۹۶ ساعت، N) غلظت µg/ml ۲۰۰ پس از ۲۴ ساعت، O) غلظت µg/ml۲۰۰ پس از ۴۸ ساعت، P) غلظت µg/ml ۲۰۰ پس از ۷۲ ساعت، Q) غلظت µg/ml ۲۰۰ پس از ۹۶ ساعت. در تصاویر فوق فلش‌ها نشان دهنده تغییرات مورفولوژیک می‌باشد که در آن سلول‌ها از حالت طبیعی (دوکی شکل)، به حالت کروی درآمده و کوچک شده‌اند. هم‌چنین، گرانولاسیون سلولی در آن‌ها مشاهده گردید که تمامی این شرایط نشانه‌ای از مرگ سلول‌هاست.

نتایج آزمون MTT

جذب نوری به‌دست آمده از خانه‌های حاوی سلول‌های تیمار شده با عصارهٔ آنغوزه با جذب نوری خانه‌های حاوی گروه شاهد مقایسه شد و درصد سلول‌های زنده مانده با فرمول زیر محاسبه گردید [۱۸].

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-08-13]

$$\text{درصد سلول‌های زنده} = \frac{\text{میانگین جذب نوری خانه‌های حاوی گروه‌های تیمار شده با عصارهٔ صمغ آنغوزه}}{\text{میانگین جذب نوری خانه‌های حاوی گروه شاهد}} \times ۱۰۰$$

نتایج نشان داد عصارهٔ صمغ آنغوزه با غلظت‌های ۵۰ µg/ml، ۱۰۰، ۲۰۰ در مقایسه با گروه شاهد، موجب کاهش معنی‌داری در میزان درصد زنده ماندن سلول‌های سرطانی رده $HepG_2$ شد (جدول شماره ۱). در غلظت ۱۰ µg/ml عصارهٔ صمغ آنغوزه، کاهش درصد زنده ماندن سلول‌های سرطانی $HepG_2$ در مقایسه با گروه شاهد معنی‌دار نبود ($P>۰/۰۵$). در مقایسه با گروه شاهد، غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ µg/ml عصارهٔ صمغ آنغوزه، موجب کاهش معنی‌داری در میزان درصد زنده ماندن سلول‌های طبیعی L929 گردید ($P<۰/۰۵$) و در غلظت‌های ۱۰ و ۵۰ µg/ml عصاره صمغ آنغوزه، کاهش درصد زنده ماندن سلول‌های طبیعی L929 نسبت به گروه شاهد معنی‌دار نبود (جدول شماره ۲).

جدول شماره ۱- درصد زنده ماندن سلول‌های $HepG_2$ در ۲۴، ۴۸، ۷۲ ساعت پس از تیمار با عصارهٔ اتانولی صمغ آنغوزه با غلظت‌های ۱۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر

	۲۴ ساعت	*P*	۴۸ ساعت	*P*	۷۲ ساعت	*P*
شاهد	٪۱۰۰	———	٪۱۰۰	———	٪۱۰۰	———
غلظت ۱۰	٪۹۵/۱۹	۰/۴۰۳	٪۹۴/۹۵	۰/۳۹۱	٪۸۸/۵۳	۰/۳۶۹
غلظت ۵۰	٪۴۱/۴۸	۰/۰۴۱	٪۳۸/۲۳	۰/۰۳۶	٪۳۱/۷۳	۰/۰۲۹
غلظت ۱۰۰	٪۳۴/۴۹	۰/۰۲۳	٪۲۶/۸۹	۰/۰۱۸	٪۲۲/۱۳	۰/۰۱۳
غلظت ۲۰۰	٪۱۸/۷۷	۰/۰۱۲	٪۱۵/۹۶	۰/۰۰۸	٪۱۲/۶۴	۰/۰۰۳

جدول شماره ۲- درصد زنده ماندن سلول‌های L929 در ۲۴، ۴۸، ۷۲ ساعت پس از تیمار با عصارهٔ اتانولی صمغ آنغوزه با غلظت‌های ۱۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر

	۲۴ ساعت	*P*	۴۸ ساعت	*P*	۷۲ ساعت	*P*
شاهد	٪۱۰۰	———	٪۱۰۰	———	٪۱۰۰	———
غلظت ۱۰	٪۹۸/۷۵	۰/۵۹۱	٪۹۶/۱۷	۰/۵۸۷	٪۹۴/۵۶	۰/۵۷۱
غلظت ۵۰	٪۹۰/۸۷	۰/۴۲۱	٪۹۳/۸۹	۰/۴۹۳	٪۹۳/۴۴	۰/۴۷۸
غلظت ۱۰۰	٪۳۳/۶۰	۰/۰۳۱	٪۳۲/۳۴	۰/۰۲۹	٪۳۱/۱۲	۰/۰۲۳
غلظت ۲۰۰	٪۲۰/۷۴	۰/۰۱۸	٪۲۲/۹۵	۰/۰۲۶	٪۱۸/۳۴	۰/۰۱۱

بحث

هدف اصلی این پژوهش بررسی اثرات سیتوتوکسیک عصارهٔ اتانولی صمغ گیاه آنغوزه بر ردهٔ سلول‌های سرطانی $HepG_2$ در مقایسه با سلول‌های طبیعی L929 بود. بر اساس مشاهدات مورفولوژیک، ۲۴ ساعت پس از تیمار سلول‌های سرطانی و طبیعی با عصارهٔ صمغ آنغوزه با غلظت ۱۰ µg/ml تغییرات مورفولوژیک محسوسی در مقایسه با نمونه‌های گروه شاهد مشاهده نشد و سلول‌های سرطانی و طبیعی از نظر شکل و اندازه تقریبا مشابه با سلول‌های گروه شاهد بودند. ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از اینکه سلول‌های سرطانی و طبیعی تحت اثر عصاره با غلظت ۱۰ µg/ml قرار گرفتند، تغییرات مورفولوژیک ایجاد شده در آنها در مقایسه با گروه شاهد بسیار نامحسوس بود. بر اساس نتایج آزمون MTT، کاهش درصد زنده ماندن ردهٔ سلول‌های سرطانی $HepG_2$ و سلول‌های طبیعی L929، در ۲۴ ساعت پس از تیمار سلول‌ها با غلظت ۱۰ µg/ml از عصاره، در مقایسه با درصد زنده ماندن نمونه‌های گروه شاهد دارای اختلاف معنی‌داری نبود ($P>۰/۰۵$). با افزایش زمان میزان درصد زنده ماندن سلول‌های سرطانی و طبیعی کاهش یافت، ولی این کاهش معنی‌دار نبود ($P>۰/۰۵$). بنابراین، افزایش زمان نسبت به ۲۴ ساعت، کاهش معنی‌داری در میزان درصد زنده ماندن سلول‌هایی که تحت اثر عصاره با غلظت ۱۰ µg/ml قرار داشتند، ایجاد نکرد. طبق مشاهدات مورفولوژیک، ۲۴ ساعت پس از تیمار سلول‌های

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-08-13]

سرطانی $HepG_2$ با عصارهٔ صمغ آنغوزه با غلظت µg/ml ۵۰، تغییرات مورفولوژیک قابل ملاحظه‌ای در مقایسه با نمونه‌های گروه شاهد در سلول‌ها مشاهده شد و این تغییرات در ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از تیمار سلول‌ها با عصارهٔ آنغوزه با غلظت µg/ml ۵۰ تشدید گردید. بر اساس نتایج آزمون MTT، درصد زنده ماندن سلول‌های سرطانی $HepG_2$ در ۲۴ ساعت پس از تیمار با عصاره صمغ آنغوزه با غلظت µg/ml ۵۰ نسبت به گروه شاهد به‌طور معنی‌داری کاهش یافت ($P<۰/۰۵$). هم‌چنین، این کاهش با افزایش زمان نسبت به ۲۴ ساعت، به‌طور معنی‌داری تشدید شد. بنابراین، می‌توان گفت علاوه بر اینکه غلظت عصارهٔ صمغ آنغوزه بر مورفولوژی و درصد زنده ماندن سلول‌های سرطانی موثر است، مدت زمانی که سلول‌ها تحت اثر عصاره قرار می‌گیرند، می‌تواند اثرگذار باشد. در مقایسه با نمونه‌های گروه شاهد، تغییرات مورفولوژیک قابل توجهی در ۲۴ ساعت پس از تیمار سلول‌های طبیعی L929 با عصاره صمغ آنغوزه با غلظت µg/ml ۵۰، مشاهده نشد و آزمون MTT این نتایج را تایید نمود. کاهش درصد زنده ماندن سلول‌های طبیعی L929 در ۲۴ ساعت پس از تیمار سلول‌ها با عصاره با غلظت µg/ml ۵۰ در مقایسه با گروه شاهد معنی‌دار نبود ($P>۰/۰۵$). هم‌چنین، افزایش زمان نسبت به ۲۴ ساعت نتوانست اثرات قابل توجهی بر مورفولوژی و درصد زنده ماندن سلول‌های طبیعی در غلظت µg/ml ۵۰ بگذارد. بنابراین، می‌توان گفت عصارهٔ صمغ آنغوزه در این غلظت می‌تواند درصد زنده ماندن سلول‌های سرطانی را در مقایسه با گروه شاهد به‌طور معنی‌داری کاهش دهد، ولی این کاهش در سلول‌های طبیعی مشاهده نشد. با توجه به روش تحقیق این پژوهش، نمی‌توان از نظر مولکولی تفاوت‌های بین سلول‌های سرطانی و طبیعی که منجر به پاسخ متفاوت این دو ردهٔ سلولی نسبت به عصارهٔ صمغ آنغوزه در غلظت µg/ml ۵۰ شده است، را بررسی و ردیابی نمود. اما، می‌توان گفت سلول‌های سرطانی و طبیعی از نظر مسیرهای بیان ژنی، گیرنده‌های موجود در خارج و داخل غشا و هم‌چنین مسیر-های سیگنال‌دهی سلولی متفاوت‌اند، که این امر ممکن است منجر به پاسخ متفاوت سلول‌های طبیعی نسبت به سلول‌های سرطانی در غلظت µg/ml ۵۰ شده باشد. این تفاوت در مسیرهای سیگنال‌دهی در سلول‌های سرطانی و طبیعی، ممکن است منجر به فعال شدن آپوپتوز و عوامل مهار کنندهٔ نسخه‌برداری از DNA و یا منجر به مهار نمودن یک ژن خاص که نقش تنظیمی در چرخه تقسیم سلولی دارد، در سلول‌های سرطانی شود. تغییرات مورفولوژیک در غلظت‌های ۱۰۰µg/ml و ۲۰۰ با افزایش غلظت نسبت به گروه شاهد افزایش یافت و افزایش زمان نسبت به ۲۴ ساعت پس از تیمار با عصاره، توانست منجر به تشدید اثرات سایتوتوکسیک در سلول‌های سرطانی و طبیعی شود. بر اساس نتایج آزمون MTT، درصد زنده ماندن سلول‌های سرطانی و طبیعی در غلظت‌های ۱۰۰µg/ml و ۲۰۰ در مقایسه با گروه شاهد به‌طور معنی‌داری کاهش یافت ($P<۰/۰۵$). هم‌چنین، درصد زنده ماندن سلول‌های سرطانی و طبیعی در غلظت‌های µg/ml ۱۰۰ و ۲۰۰ وابسته به غلظت و زمان می‌باشد؛ یعنی با افزایش این فاکتورها، میزان مرگ و میر سلول‌های سرطانی و طبیعی به‌طور معنی‌داری افزایش می-یابد. تاکنون گزارشی از اثرات سیتوتوکسیک عصارهٔ اتانولی صمغ آنغوزه بر سلول‌های سرطانی رده $HepG_2$ و سلول‌های طبیعی L929 در دست نیست. بنابراین، وجود اثرات سایتوتوکسیک عصارهٔ اتانولی صمغ آنغوزه بر سلول‌های طبیعی نیز می‌بایست مدنظر قرار گیرد و تحقیقات بیشتری در این زمینه انجام شود تا چنانچه فرآورده‌های صمغ آنغوزه بر سلول‌های سالم انسانی اثرات مهاری و سیتوتوکسیک داشته باشند، در هنگام استفاده از غلظت-های متفاوت این گیاه دارویی، به آن توجه شود. برای توجیه اثرات ضد سرطانی عصارهٔ اتانولی صمغ آنغوزه و ترکیبات ارگانو-سولفوره موجود در آن، مکانیسم‌های مختلفی پیشنهاد شده است که بخشی از این موارد شامل: مهار جهش ژنی، اثر بر فعالیت آنزیم‌ها، مهار تخریب DNA، اثر بر دفع رادیکال‌های آزاد، اثر بر پرولیفراسیون سلولی و تغییر در فعالیت آنزیم‌ها می‌باشند [۱۷]. Nakagawa و همکاران در سال ۲۰۰۱ گزارش کردند، القای مرگ برنامه ریزی شدهٔ سلولی از مهمترین مکانیسم‌های اثرات ضد سرطانی صمغ آنغوزه می‌باشد [۱۸]. Abdullaev و همکاران در طی مطالعه‌ای دریافتند که آنغوزه حاوی ترکیباتی است که فعالیت-های سه فرآیند مهم متابولیکی یعنی ساخت RNA، DNA و پروتئین را در سلول‌های سرطانی انسانی متوقف و مهار می‌کند [۱۹]. هم‌چنین، Abdullaev و همکاران در سال ۲۰۰۳ در طی مطالعه‌ای مشابه دریافتند، اثر بازدارندگی صمغ آنغوزه روی سنتز نوکلئیک اسید می‌تواند یک اساس بیوشیمیایی برای اثر بازدارندگی آن روی تکثیر سلول‌های توموری باشد. این نکته توسط آزمایش اثرات آنغوزه روی ساخت RNA و DNA در یک سیستم بدون سلول که هسته‌ها ایزوله شده بودند، بررسی شد [۲۰]. بر اساس مطالعات Dufresene و همکارانش مشاهده شد صمغ آنغوزه، اثر مستقیم روی واکنش‌های سنتزی ندارد و مکانیسم‌های ضد سرطانی آنغوزه را به‌طور خلاصه این‌گونه بیان نمودند: ۱) اثر مهار کنندگی بر سنتز RNA و DNA دارد، اما بر سنتز پروتئین اثر مهاری ندارد؛ ۲) اثر مهار کنندگی آنغوزه، روی فعل و انفعالات زنجیرهٔ رادیکال‌های آزاد و به خواص آنتی‌اکسیدانی آن نیز ارتباط پیدا

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-08-13]

می‌کند؛ ۳) اثر ضد سرطانی آنغوزه، به‌صورت طبیعی کارتنوئیدها را به رتنوئید تبدیل می‌کند [۲۱]. Escribano و همکارانش دریافتند، تیمار سلول‌های توموری با صمغ آنغوزه، کاهشی را در سطح ترکیبات سولفیدریلی داخل سلولی ایجاد می‌کند که این کاهش می‌تواند یکی از توضیحات، برای اثرات سایتوتوکسیسیتی صمغ آنغوزه باشد [۲۲]. Lee و همکارانش در سال ۲۰۱۰ دریافتند تجویز فارنسی-فرول که یکی از ترکیبات مهم صمغ آنغوزه است، می‌تواند در مهار فاکتور رشد آندوتلیوم عروقی موثر باشد. مهار این فاکتور رشد، موجب مهار تکثیر، مهاجرت، تهاجم، تشکیل عروق و تولید بافت همبند در اطراف سلول‌های سرطانی می‌شود. هم‌چنین تجویز خوراکی صمغ آنغوزه موجب مهار رشد سرطان پستان ناشی از تجویز نیتروز اوره (N-methyl-N-nitrosourea) گردید. در این مطالعه گزارش شد که تجویز آنغوزه، موجب تحریک در فعالیت گلوتاتیون ترانسفراز، سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز شده است. هم‌چنین صمغ آنغوزه موجب بازسازی سیستم آنتی‌اکسیدانی ناشی از تجویز نیتروز اوره می‌شود [۷]. در یک مطالعه مشخص شد تجویز صمغ آنغوزه از رشد سلول‌های سرطانی ناشی از تجویز نیتروز اوره پیشگیری و زمان نهان تا ظهور سرطان را به تاخیر می‌اندازد [۸]. Shahverdi و همکارانش در سال ۲۰۰۶ دریافتند آنزیم متالوپروتیناز تولیدی توسط سلول‌های سرطانی نقش مهمی در تحریک تهاجم سلول‌های سرطانی و ایجاد التهاب دارد و تجویز صمغ آنغوزه موجب مهار فعالیت این آنزیم و در نتیجه مهار تهاجم سلول‌های سرطانی می‌شود [۲۳]. اپی-سزکویی‌ترپن‌ها و کومارین‌ها از ترکیبات آنتی‌اکسیدانی صمغ آنغوزه می‌باشند و خاصیت آنتی‌اکسیدانی قابل توجهی دارند. این ترکیبات از رشد سلول‌های سرطان کولون انسان جلوگیری کرده و موجب کاهش پیشرفت تومور می‌گردند [۲۴]. Abul-Nasr و همکارانش برای توجیه اثرات سایتوتوکسیک صمغ آنغوزه و ترکیبات موجود در آن مکانیسم‌های مختلفی پیشنهاد کردند که بخشی از آن نیز القا آپوپتوزیس در سلول‌های سرطانی از طریق مسیرهای وابسته به P53 و مسیر غیر وابسته به P53 می‌باشند [۲۵]. به‌طور کلی می‌توان گفت عصارهٔ تام صمغ گیاه آنغوزه حاوی ترکیباتی است که می‌تواند روتد تکثیر و تقسیم سلولی را کاهش دهد و با فعال کردن روند آپوپتوز در سلول‌ها و هم‌چنین با آسیب رساندن به DNA و اختلال در روندهای سیگنال‌دهی سلولی منجر به تخریب و مرگ سلولی می‌شود. تمامی مطالب ذکر شده ممکن است هم در سلول‌های سرطانی و هم در سلول‌های طبیعی رخ بدهد. البته لازم به‌ذکر است تمامی اثراتی که عصاره آنغوزه می-تواند روی سلول‌ها (سرطانی و طبیعی) داشته باشد، رابطه مستقیم با غلظت مصرفی دارد. مطابق با نتایج به‌دست آمده در این پژوهش عصاره صمغ گیاه آنغوزه در غلظت ۵۰ µg/ml بدون اینکه منجر به آسیب معنی‌داری در سلول‌های طبیعی شود، قادر به کشتن سلول‌های سرطانی است. امید است این مطالعه زمینه‌ای را برای دست‌یابی به ترکیباتی از صمغ آنغوزه که بتوانند به‌طور اختصاصی سلول‌های سرطانی را مورد هدف قرار دهند، فراهم آورد.

نتیجه‌گیری

در این مطالعه مشخص گردید که عصارهٔ اتانولی صمغ آنغوزه در غلظت‌های ۵۰ µg/ml، ۱۰۰ و ۲۰۰ اثر سایتوتوکسیک بر سلول‌های کارسینومای کبد انسان ($HepG_2$) داشته و منجر به تغییرات مورفولوژی (افزایش اندازهٔ واکوئل‌ها، کاهش سیتوپلاسم و پیگمانه شدن هسته) در سلول‌های سرطانی می‌شود؛ در صورتی که اثر سایتوتوکسیک در سلول‌های طبیعی L929 فقط در غلظت-های ۱۰۰ µg/ml و ۲۰۰ مشاهده شد و در غلظت‌های ۱۰ µg/ml و ۵۰ این تغییرات مشاهده نشد. بنابراین، می‌توان از غلظت ۵۰µg/ml عصاره اتانولی صمغ آنغوزه بدون آسیب رساندن به سلول‌های طبیعی، جهت کشتن سلول‌های سرطانی $HepG_2$ استفاده کرد.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از تمامی اساتید محترمی که در انجام این پژوهش مرا یاری نموده‌اند، به‌ویژه دوستان و همکاران آزمایشگاه تحقیقاتی تکوین سلولی، تشکر و قدردانی می‌شود.

References:

[1] Calvisi DF, Ladu S, Gorden A, Farina M, Conner EA, Lee JS, et al. Ubiquitous Activation of Ras and Jak/Stat Pathways in Human HCC. ***Gastroenterology*** 2006; 130(4): 1117-28.

[2] Clayson DB, Mehta R, Iversin F. International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens. Oxidative DNA damage--the effects of certain genotoxic and operationally non-genotoxic carcinogens. ***Mutat Res*** 1994; 317(6): 25-42.

[3] Troll W, Lim JS, Frenkel K. Prevention of cancer by agents that suppress production of oxidants. In: Ho CT, Osawa T, Huang MT, Rosen RT, Editors. Food phytochemicals for cancer prevention II, teas, spices, and herbs. ***Am Chem Soc*** 2000; 117(88): 116-21.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-08-13]

[4] Rao PS, Kalva S, Yerramilli A, Mamidi S. Free Radicals and Tissue Damage: Role of Antioxidants. ***Free Radicals and Antioxidants*** 2011; 1(4): 2-7.
[5] Behpour M, Ghoreishi S, Khayatkashani M, Soltani N. The effect of two oleo-gum resin exudate from Ferula assa-foetida and Dorema ammoniacum on mild steel corrosion in acidic media. ***Corrosion Sci*** 2011; 53(8): 2489-501.
[6] Khajeh M, Yamini Y, Bahramifar N, Sefidkon F, Pirmoradei MR. Comparison of essential oils compositions of Ferula assa-foetida obtained by supercritical carbon dioxide extraction and hydrodistillation methods. ***Food Chem*** 2005; 91(1): 639-44.
[7] Lee JH, Choi S, Lee Y, Lee HJ, Kim KH, Ahn KS, et al. Herbal compound farnesiferol C exerts antiangiogenic and antitumor activity and targets multiple aspects of VEGFR1 (Flt1) or VEGFR2 (Flk1) signaling cascades. ***Mol Cancer Ther*** 2010; 9(2): 389-99.
[8] Dehpour A, Ebrahimzadeh N, Fazeland S, Mohammad NS. Antioxidant activity of the methanol extract of Ferula assafoetida and its essential oil composition**.** ***Grasas Y Aceites*** 2009; 60: 405-12.
[9] Saleem M, Alam A, Sultana S. Asafoetida inhibits early events of carcinogenesis: achemopreventive study. ***Life Sci*** 2001; 68(16): 1913-21.
[10] Shahverdi AR, Saadat F, Khorramizadeh MR, Iranshahi M, Khoshayand MR. Two matrix metalloproteinases inhibitors from Ferula persica var. persica. ***Phytomedicine*** 2006; 13(9-10): 712-7.
[11] Noroozi S, Mosaffa F, Soltani F, Iranshahi M, Karimi G, Malekaneh M, et al. Antigenotoxic effects of the disulfide compound persica sulfide A (PSA) on rat lymphocytes exposed to oxidative stress. ***Planta Med*** 2009; 75(1): 32-6.
[12] Guo C, Yang J. Antioxidant activities of Ferula assa-foetida as determined by FRAP assay. ***Nutr Res*** 2003; 23(12): 1719-26.
[13] Iranshahy M, Iranshahi M. Traditional uses, phytochemistry and pharmacology of asafoetida (Ferula assa-foetida oleo-gum-resin)- a review. ***J Ethnopharmacol*** 2011; 134(1): 1-10.
[14] Huang Y, De Bruyne T, Apers S, Ma Y, Claeys M, Vanden D, et al. Complementinhibiting cucurbitacin glycosides from Ferula. ***J Nat Prod*** 2006; 61(11): 757-61.
[15] Durmaz R, Deliorman S, Isiksoy S, Uyar R, Erol K, Tel E. Antiproliferative properties of the Lazaroids U-83836E and U-74389G on Glioma Cells in vitro. ***Pathol Oncol Res*** 2008; 5(3): 223-8.
[16] Nezhad Shahrokhabadi KH, Tavakol Afshari J, Rakhshandeh H, Borouk A. Study of cytotoxicity effect of total saffron extract on hepatocarcinoma cell line ($HepG_2$). ***Med Sci J Islamic Azad Univ Tehran Med Branch*** 2009; 19(3): 154-9.
[17] Hofbauer R, Frass M, Gmeiner B, Kaye AD, Frost EA. Effects of Ferula assa-foetida extract on neutrophil migration at the cellular level. ***Heart Dis*** 2001; 3(1): 14-7.
[18] Nakagawa H, Tsuta K, Kiuchi K, Senzaki H, Tanaka K, Hioki K, et al. Growth inhibitory effects of diallyl disulfide on human breast cancer cell lines. ***Carcinogenesis*** 2001; 22(14): 891-7.
[19] Abdullaev FI, Frenkle GD. Effect of Ferula assa-foetida on cell colony formation and cellular nucleic acid and protein syntheses. ***Biofactor*** 1992; 3(3): 201-4.
[20] Abdullaev FI, Macvicar C, Frenkel GD. Inhibition by selenium of DNA and RNA synthesis in normal and malignant cells in vitro. ***Cancer Lett*** 2003; 65(1): 43-9.
[21] Dufresene C, Cormier F, Dorion S. In vitro formation of crocetin glucosyl esters by Ferula assa-foetida callas extract. ***Plant Med*** 1997; 63(5): 1525-30.
[22] Escribano J, Alonso GL. Crocin, sofranol and picocrocine from Ferula assa-foetida inhibit the growth of human cancer cell in vitro. ***Cancer Lett*** 1996; 100(12): 23-30.
[23] Shahverdi AR, Saadat F, Khorramizadeh MR, Iranshahi M, Khoshayand MR. Two matrix metalloproteinases inhibitors from Ferula persica var. persica. ***Phytomedicine*** 2006; 13(9-10): 712-7.
[24] Bode A. Ferula asa-foetida is an effective inhibitor of HCT116 human colorectal carcinoma in vivo. Paper presented at the frontiers in cancer prevention research conference. ***Phoenix AZ*** 2003; 11(4): 26-30.
[25] Abul-Nasr SM, EI-Shafey MD, Osfor MM. Amelioration by Ferula asa-foetida of methotrexate-indused toxicity in mail albino rate: a biochemical hematological and histological study. ***Scintia Agricul Bohem*** 2001; 32(5): 123-60.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-08-13]