# بررسی ترکیبات شیمیایی، اثرات آنتی‌اکسیدانی، ضد باکتریایی، سیتوتوکسیک و آپوپتوزی عصاره گیاه به‌لیمو بر روی رده سلولی سرطان کولون

امیر میرزایی[1*]
سید عطاالله سادات شاندیز[1]
حسن نوربازرگان[2]
الهه علی عسگری[3]

۱- باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شرق، تهران، ایران.
۲- گروه بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.
۳- گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شرق، تهران، ایران.

[*] نویسنده مسئول: تهران، جاده خاوران، شهرک قیامدشت، انتهای خیابان شهید باهنر، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شرق. تلفن: ۳۳۵۹۴۹۵۰-۰۲۱
E-mail: amir_mirzaie92@yahoo.com

## چکیده

دریافت: ۱۳۹٤/۱۲/۲٦ ویرایش: ۱۳۹۵/۰۳/۱٦ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۵/۰۵ آنلاین: ۱۳۹۵/۰۵/۱۰

***زمینه و هدف:*** گیاه به‌لیمو (Aloysia citrodora) از نظر طب سنتی در ایران حایز اهمیت می‌باشد. هدف این مطالعه بررسی ترکیبات شیمیایی، اثرات آنتی‌اکسیدانی، ضد باکتریایی، سمیت سلولی و آپوپتوزی عصاره گیاه به‌لیمو بر روی رده سلولی سرطان کولون می‌باشد.

***روش بررسی:*** این مطالعه تجربی از فروردین تا شهریور ۱۳۹٤ در دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شرق انجام گرفت. ترکیبات شیمیایی عصاره گیاه به‌لیمو با استفاده از روش Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) آنالیز شد. اثرات آنتی‌اکسیدانی، ضد باکتریایی و سمیت سلولی عصاره به‌ترتیب از طریق روش DPPH، دیسک دیفیوژن و MTT تعیین شد. مولکول RNA استخراج شد و سپس cDNA ساخته شد. در نهایت، بیان ژن‌های آپوپتوزی *Bax* و *Bcl2* با روش Real-Time PCR ارزیابی شد و القای آپوپتوز توسط روش فلوسایتومتری مشخص شد.

***یافته‌ها:*** آنالیز فیتوشیمیایی عصاره، تعداد ۳۷ ترکیب را نشان داد که بیشترین میزان مربوط به Spathulenol (۱۷/۵۷٪) و Caryophyllene oxide (۱۵/۱۵٪) بود. همچنین، عصاره مورد مطالعه دارای $IC_{50}$= ۰/٦±۰/۰۳ mg/ml خاصیت آنتی‌اکسیدانی بود. این عصاره بیشترین اثر را بر روی باکتری گرم منفی و کمترین اثر را بر روی گرم مثبت داشت. افزایش بیان ژن *Bax* وکاهش بیان *Bcl2* به‌ترتیب به‌میزان ۳/٤۷±۰/۷۲ (P<۰/۰۵) و ۰/٤۳±۰/۳۵ (P<۰/۰۵) نشان دادند. همچنین، نتایج فلوسایتومتری میزان آپوپتوز ۳۸/٦٦ درصدی را نشان داد.

***نتیجه‌گیری:*** به‌نظر می‌رسد که عصاره گیاه به‌لیمو به‌عنوان گیاهان بومی کشورمان پتانسیل آنتی‌اکسیدانتی، ضد باکتریایی و ضد سرطانی بالایی دارد و پیشنهاد می‌شود که مطالعات بیشتر در مورد اهمیت دارویی این گیاه انجام شود.

***کلمات کلیدی:*** گیاه به‌لیمو، اثرات آنتی‌اکسیدانی، سمیت سلولی، آپوپتوز، فلوسایتومتری.

## مقدمه

سرطان اولین علت مرگ و میر در کشورهای توسعه‌یافته و دومین علت مرگ در کشورهای در حال توسعه است.[1-3] تنوع و گستردگی شیوع سرطان در طول سال‌های گذشته موجب ایجاد روش‌های متنوع درمانی شده است اما با وجود تلاش‌های فراوان در زمینه پیشگیری و درمان سرطان، این بیماری رشد فزاینده‌ای داشته و همچنان یک عامل کشنده جهانی محسوب می‌شود.[4و5] سرطان کولون یکی از رایج‌ترین بدخیمی‌ها به‌شمار می‌رود که سالانه باعث مرگ بسیاری از افراد در کل جهان می‌شود و این نوع سرطان در مردان پس از سرطان ریه به‌عنوان شایع‌ترین نوع سرطان است.[6-8] امروزه از روش‌های مختلف جراحی، شیمی‌درمانی و اشعه درمانی جهت درمان سرطان استفاده می‌شود ولی یکی از معایب و عوارض جانبی این روش‌ها از بین بردن سلول‌های سالم می‌باشد که این امر باعث شده است که پژوهش‌گران به سمت روش‌های جدید درمان با کاهش عوارض جانبی پیش روند.[9و10] یکی از روش‌هایی که به‌تازگی پژوهش‌های



[ Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-07-18 ]

زیادی بر روی آن‌ها انجام شده است، استفاده از گیاهان و عصاره‌های آن‌ها برای درمان سرطان است. از دیرباز گیاهان به‌عنوان یکی از منابع درمان مورد نظر بودند و از نظر پزشکی حایز اهمیت بودند. به‌تازگی پژوهش‌گران در حال یافتن ترکیبات دارویی با منشای گیاهی هستند که دارای اثرات جانبی نباشند.[۱۱-۱۳] گیاهان دارای ترکیبات ثانویه هستند که در سازش آن با شرایط محیطی رشد خود نقش به‌سزایی دارند. همچنین مطالعات نشان داده است که گیاهان دارای ترکیبات دارویی فعالی هستند که در شرایط آزمایشگاهی می‌توان این ترکیبات را استخراج و به‌عنوان دارو جهت مطالعات ضد سرطان مورد استفاده قرار داد.[۱۴و۱۵] گیاه به‌لیمو با نام علمی *Aloysia citrodora* یکی از گیاهان بومی کشور ایران می‌باشد که امروزه در شمال کشور ایران کشت می‌گردد. علاوه برآن، گونه‌های بومی‌ای نیز از جنس Lippia در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری کشورمان نیز وجود دارند. این گیاه از خانواده شاهپسند (Verbenaceae) می‌باشد و این خانواده دارای ۲۰۰ گونه است.[۱۶] این گیاه از نظر طب سنتی حایز اهمیت بالایی است و از دیرباز برای درمان بیماری‌های گوارشی و تنفسی استفاده می‌شد. همچنین برخی از گونه‌های آن دارای خاصیت ضد مالاریایی و ضد ویروسی می‌باشند.[۱۷-۱۹] تاکنون مطالعه‌ای در زمینه بررسی ترکیبات شیمیایی، اثرات بیوشیمیایی و بیولوژیک در گونه *A. citrodora* انجام نشده است. پژوهش کنونی با هدف بررسی ترکیبات شیمیایی، اثرات آنتی‌اکسیدانی، ضد باکتریایی، سمیت سلولی و آپوپتوزی عصاره گیاه به‌لیمو بر روی رده سلولی سرطان کولون با استفاده از روش‌های Real Time PCR و فلوسایتومتری انجام گردید.

## روش بررسی

این مطالعه تجربی از فروردین تا شهریور ۱۳۹٤ در دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شرق انجام گرفت. گیاه به‌لیمو از مرکز ذخایر زیستی ایران تهیه شد. مواد گیاهی جمع‌آوری شده پس از تمیز نمودن، در سایه خشک شده و توسط آسیاب پودر گردید و در شرایط بهینه و مناسب نگهداری شد. برای تهیه عصاره اتانولی، میزان ٤۰ g از گیاه را به ۱۰۰ ml از اتانول اضافه نموده و به‌مدت ۱۵ دقیقه جوشانده شد. عصاره به‌دست‌آمده توسط کاغذ صافی فیلتر شده و وارد دستگاه روتاری شد. آنالیز گاز کروماتوگرافی متصل به طیف نگار جرمی Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) عصاره هگزانی گیاه به‌لیمو با دستگاه Agilent 6890 (Agilent Technologies Inc., Clara, CA, USA) انجام گرفت. نوع ستون DB-5، طول ستون ۳۰ m و قطر داخلی ۰/۲۵ mm بود و برای ردیابی از سامانه پونیزاسیون الکترونی با انرژی ۷۰ eV استفاده شد. برنامه‌ریزی حرارتی ستون از ۵۰ تا ۲۵۰ °C با سرعت افزایش دمای ٦ °C در دقیقه انجام گرفت. گاز حامل هلیوم ۹۹/۹۹٪ و مقدار تزریق ۱ µl و سرعت جریان گاز ۱۵ ml در دقیقه تنظیم شده بود. حجم ۱ µl از عصاره گیاه به دستگاه GC/MS تزریق شد و سپس نتایج به‌دست‌آمده از دستگاه بر اساس اندیس کواتس و مراجعه به فرهنگ طبیعی ترکیبات طبیعی مورد شناسایی قرار گرفت.

تفسیر طیف‌های GC-MS با استفاده از دیتابیس‌های National institute standard and technology (NIST) که بیش از ٦۲۰۰۰ الگو دارد، انجام شد. طیف‌های جرمی ناشناخته با طیف‌های شناخته شده موجود در کتابخانه NIST مقایسه شد. نام، وزن مولکولی و ساختار ترکیب مواد جداسازی شده تایید شد. به‌منظور بررسی اثرات آنتی‌اکسیدانی عصاره گیاه به‌لیمو، روش مهار رادیکال آزاد DPPH -2,2) (diphenyl-1-picrylhydrazyl انجام شد. محلول عصاره با غلظت‌های ۰/۲۵ mg/ml، ۱، ۱/۲۵، ۱/۵، ۲ ساخته شد و سپس عصاره با حجم برابر از محلول DPPH (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) با غلظت ۱ mg/ml مخلوط و پس از خواندن جذب محلول‌ها توسط دستگاه اسپکتروفتومتر Spectrophotometer, NanoDrop™ 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, USA) درصد مهار رادیکال DPPH بر اساس فرمول زیر محاسبه گردید:

Inhibition (%)= [Ab-As/Ab]×100 :Ab جذب شاهد، As: جذب نمونه

میزان فعالیت ضد میکروبی از طریق اندازه‌گیری هاله عدم رشد بر روی باکتری‌های *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442، 23857 *Bacillus subtilis* ATCC و *Escherichia coli* ATCC 25922 به‌روش دیسک دیفیوژن با استفاده از دیسک‌های استاندارد در محیط کشت مولر هینتون آگار انجام شد. سویه‌های مورد بررسی از بانک میکروبی انستیتو پاستور ایران تهیه شد. لازم به یادآوری است دیسک آنتی‌بیوتیکی آمپی‌سیلین به‌عنوان کنترل مثبت مورد استفاده قرار گرفت.

رده سلولی سرطان کولون (HT29 cell line) از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران خریداری شد. ابتدا سلول‌ها در محیط کشت



[ Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-07-18 ]

RPMI1640 (Biosera, USA) غنی شده با ۱٪ (v/v) پنی‌سیلین- استرپتومایسین و ۱۰٪ سرم جنین گاوی (Fetal bovine serum, FBS) کشت داده شدند و در دمای ۳۷ °C و ۵٪ رطوبت قرار داده شدند. به‌منظور بررسی اثرات کشندگی سلولی عصاره گیاه بهلیمو از روش رنگ‌سنجی Microculture Tetrazolium Test, MTT (Sigma Aldrich, Steinheim, Germany) استفاده شد. غلظت‌های ۷/۸، ۱۵/٦، ۳۱/۲۵، ٦۲/۵، ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ mg/ml از عصاره گیاه بهلیمو در فاصله زمانی ۲٤ ساعت بر روی رده سلولی سرطانی کولون (HT29) تیمار شد. پس از گذشت زمان فوق، محتوای چاهک‌های پلیت ۹٦ خانه‌ای به‌دقت خارج شد و به آن رنگ MTT اضافه شد و به‌مدت چهار ساعت تحت شرایط $CO_2$ ۵٪ و دمای ۳۷ °C نگه داشته شد. سپس رنگ MTT، جداسازی شد و کریستال‌های فورمازان تولید شده توسط سلول‌های زنده در ایزوپروپانول حل گردید. در نهایت جذب نمونه‌ها با استفاده از دستگاه خوانشگر الایزا ELISA reader (Organon Teknika, Boxtel, Belgium) در طول موج ۵۷۰ nm خوانده شد و میزان کشندگی سلول توسط فرمول زیر محاسبه شد:

۱۰۰× (جذب نوری سلول‌های کنترل/ جذب نوری سلول‌های تیمار شده)= میزان بقای سلولی

همچنین میزان دوز ۵۰٪ کشندگی (IC50) نیز محاسبه شد. میزان بیان ژن‌های آپوپتوزی *Bax* و *Bcl2* با استفاده از روش Real Time PCR سنجیده شد. در ابتدا کل RNA سلول‌های تیمار شده و نشده با استفاده از کیت استخراج RNA (Qiagen RNeasy Plus Mini Kit 50, USA) بر اساس دستورکار آن استخراج شد و غلظت آن توسط دستگاه Nanophotometer (Implen GmbH, Munich, Germany) اندازه‌گیری شد. ساخت مولکول‌های DNA مکمل با کیت Revert Aid$^{TM}$ fist strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, Hanover, MD, USA) انجام گرفت که در آن مخلوط واکنش حاوی ۵ µl بافر واکنش ۵x، ۱ µg RNA، ۰/۵ µl آغازگر شش نوکلئوتیدی تصادفی، ۰/۵ µl آغازگر الیگو dT، ۲ µl مخلوط داکسی نوکلئوتید تری فسفات (۱۰ میلی‌مولار)، ۱ µl مهارکننده آنزیم RNase (۲۰ U/µl)، ۱ µl آنزیم رونوشت بردار معکوس و آب مقطر دو بار تقطیر (تا حجم نهایی ۲۰ µl) بود. برنامه دمایی- زمانی به‌صورت ۲۵ °C به‌مدت پنج دقیقه (برای اتصال آغازگر)، ٤۲ °C به‌مدت ٦۰ دقیقه (ساخت cDNA)، ۷۰ °C به‌مدت پنج دقیقه (غیر فعال شدن رونوشت بردار معکوس) و ٤ °C به‌مدت پنج دقیقه انجام گرفت. پرایمرهای مورد استفاده برای ژن‌های هدف *Bax*، *Bcl2* بوده و ژن *GAPDH* به‌عنوان کنترل داخلی مورد استفاده قرار گرفت. توالی آغازگرهای جلویی و برگشتی ژن هدف *Bax* به‌صورت '5'-TTGCTTCAGGGTTTCATCCAG-3' جلویی، دمای ٦۸ °C و '5'-AGCTTCTTGGTGGACGCATC-3' برگشتی، دمای ٦۵/۳ °C بود. توالی آغازگرهای جلویی و برگشتی ژن هدف *Bcl2* به‌صورت '5'-TGTGGATGACTGAGTACCTGAACC-3' جلویی، دمای ٦۷ °C و '5'-CAGCCAGGAGAAATCAAACAGAG-3' برگشتی، دمای ٦٦/۳ °C و برای ژن مرجع *GAPDH* به‌صورت '5'-CGTCTGCCCTATCAACTTTCG-3' جلویی، دمای ٦٦/۹ °C و '5'-CGTTTCTCAGGCTCCCTCT-3' برگشتی، دمای ٦۳/٤ °C است.

برای درستی توالی آغازگرها و اطمینان از عدم اتصال آن‌ها به توالی‌های غیر اختصاصی در بخش‌های دیگر ژنوم، BLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) شدند. در نهایت واکنش Real-Time PCR با استفاده از Light Cycler (Bioneer, Seongnam, Korea) با شرایط دمایی ۹۵ °C: یک دقیقه، ۹۵ °C: ۱۵ ثانیه، ٦۰ °C: ٦۰ ثانیه انجام گرفت. به‌منظور بررسی میزان القای آپوپتوز در سلول‌های کولون (HT29) تیمار شده با عصاره بهلیمو، این سلول‌ها با استفاده از روش AnnexinV/propidium iodide (PI) (Apoptosis detection kit, Roch, Germany) و دستگاه فلوسایتومتری بر اساس دستورکار مربوطه مورد مطالعه قرار گرفتند. سلول‌های سرطانی کولون ($۱\times۱۰^{۵}$ سلول/ چاهک) با غلظت IC50 عصاره به‌مدت ۲٤ ساعت تیمار شده و سلول‌های تیمار نشده کولون به‌عنوان کنترل مورد استفاده قرار گرفتند. در نهایت میزان سلول‌های نکروز/ آپوپتوز شده توسط دستگاه فلوسایتومتری مورد مطالعه قرار گرفتند.

در این مطالعه تمامی تست‌ها به‌صورت سه بار تکرار انجام شد و نتایج توسط SPSS software, version 20 (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA) آنالیز گردید. نتایج تجربی به‌صورت انحراف از معیار ±SEM نشان داده شد. $P<۰/۰۵$ معنادار در نظر گرفته شد.

## یافته‌ها

آنالیز کروماتوگرام GC-MS عصاره هگزانی گیاه بهلیمو تعداد ۳۷ پیک را نشان داد که نشان‌دهنده وجود ترکیبات فیتوشیمیایی موجود



[ Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-07-18 ]

**جدول ۱: فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره گیاه به‌لیمو با استفاده از روش DPPH**

| | | جذب در هر غلظت (mg/ml) | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **ترکیب** | جذب | ۰/۲۵ | ۱ | ۱/۲۵ | ۱/۵ | ۲ | $IC_{50}$ (mg/ml) |
| **کنترل** | جذب کنترل | ۱/۰۵٤±۰/۰۳ | ۱/۰۵٤±۰/۰۳ | ۱/۰۵٤±۰/۰۳ | ۱/۰۵٤±۰/۰۳ | ۱/۰۵٤±۰/۰۳ | |
| **عصاره** | جذب نمونه | ۰/۰±۹٤۷/۰۲ | ۰/۰±٦٦۹/۰۱ | ۰/۰±۵۷۵/۰۷ | ۰/۰±٤٦۸/۰۲ | ۰/۰±۲۸۸/۰۱ | ۰/۰±٦۷٤/۰۳ |
| | SA% | ۱۰/۱۵ | ۳٦/۵۲ | ٤۵/٤٤ | ٤۵/۷۱ | ۵۵/۵۹ | |
| **ویتامین C** | جذب نمونه | ۰/۰±۸۱۱/۰۳ | ۰/۰±٦۰/۰۵ | ۰/۰±٤۱۲/۰۷ | ۰/۰±۲٤۱/۰۱ | ۱/۰±۰٦۲/۰۳ | ۰/۰±۰۲/۰۱ |
| | SA% | ۲۳/۰۵ | ٤۳/۰۷ | ٦۰/۹۱ | ۷۷/۱۳ | ۹٤/۱۱ | |

SA%: Scavenging Activity

**جدول ۲: نتایج تست اثر ضد باکتریایی عصاره گیاه به‌لیمو علیه برخی باکتری‌های پاتوژن**

| | اندازه مهار بر علیه باکتری‌های پاتوژن (mm± انحراف‌معیار) | | |
|---|---|---|---|
| غلظت (mg/mL) | *B. subtilis* | *E. coli* | *P. aeroginosa* |
| ۰ | ۰ | ۰ | ۰ |
| ۱۰ | ۳/۵±۰/۸۹ | ٤/۲±۰/۲۲ | ٤/۸±۰/۲۸ |
| ۲۰ | ٤/۵±۰/۷۲ | ٤/۹±۰/٦٤ | ۵/٤±۰/۷۲ |
| ۳۰ | ۵/۸±۰/۷۹ | ٦/۳±۰/۳۸ | ۹/۸±۰/۵٦ |
| ٤۰ | ۷/۱±۰/٤۹ | ۱۰/٤±۰/٦۵ | ۱۳/۷±۰/٦٦ |
| **آمپی‌سیلین** | ۱٤/۲±۰/۹۸ | ۱۵/۳±۰/۷۱ | ۱۵/٦±۰/۳۲ |

در گیاه می‌باشد. با مقایسه طیف‌ها با داده‌های کتابخانه NIST، ۳۷ ترکیب شیمیایی شناسایی شد. از میان ترکیبات شناسایی شده Spathulenol (۱۷/۵۷٪) و Caryophyllene oxide (۱۵/۱۵٪) دارای بیشترین درصد مواد تشکیل‌دهنده بودند.

نتایج اثرات آنتی‌اکسیدانی عصاره گیاه به‌لیمو نشان داد که عصاره مد نظر دارای $IC_{50}$= 0.674±0.03 mg/mL اثر آنتی‌اکسیدانی بود در صورتی که نمونه استاندارد آسکوربیک اسید دارای $IC_{50}$= 0.03±0.0001 mg/mL اثر آنتی‌اکسیدانی بود (جدول ۱).

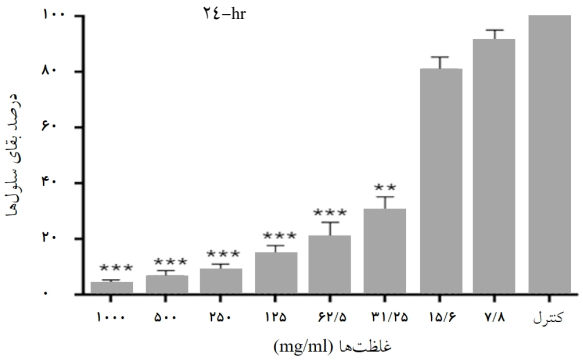
نتایج حاصل از سنجش میزان اثرات ضد باکتریایی بر روی سویه‌های باکتریایی شامل *E. coli*، *P. aeroginosa* و *B. subtilis* نشان داد که عصاره مورد نظر دارای اثرات ضد باکتریایی چشمگیری می‌باشد (جدول ۲). همچنین این عصاره بیشترین اثر را بر روی باکتری *P. aeroginosa* و کمترین اثر را بر روی *B. subtilis* داشت. تیمار سلول‌های سرطانی کولون (HT29) با غلظت‌های مختلف از عصاره با استفاده از تست MTT طی مدت ۲٤ ساعت انجام شد. تیمار سلول‌های سرزان کولون با غلظت‌های ۷/۸، ۱۵/٦، ۳۱/۲۵، ٦۲/۵، ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ mg/ml از عصاره طی مدت ۲٤ ساعت به‌ترتیب سبب کاهش بقای سلول‌ها به‌میزان ۹۱/۲۵±۰/۹۱ (P>۰/۰۵)، ۸۰/۷۵±۰/۹۸ (P>۰/۰۵)، ۳۰/۲۵±۱/۳ (P<۰/۰۱) و ۲۱±۱/۱ (P<۰/۰۰۱)، ۱٤/۷۵±۰/۸۲ (P<۰/۰۰۱)، ۹/۰۷±۰/٦۹ (P<۰/۰۰۱)، ٦/۷۲±۰/۷۵ (P<۰/۰۰۱) و ٤/۰۲±۰/٦۳ (P<۰/۰۰۱) درصد شد.

این نتایج در نمودار ۱ نشان داده شده است. بنابراین نتایج نشان داد که عصاره گیاه به‌لیمو در غلظت ۱۰۰۰ mg/ml بیشترین مهار تکثیر سلولی را داشتند که از لحاظ آماری معنادار بود (P<۰/۰۰۱). در حالی‌که غلظت‌های ۷/۸ و ۱۵/٦ mg/ml نسبت به گروه کنترل اختلاف معناداری را نشان ندادند و از نظر آماری معنادار نبود (P=۰/۹۹). همچنین میزان $IC_{50}$ برای عصاره در زمان ۲٤ ساعت در رده سلولی سرطانی کولون، ۲۰/۱±۰/۷۸ mg/ml محاسبه شد.

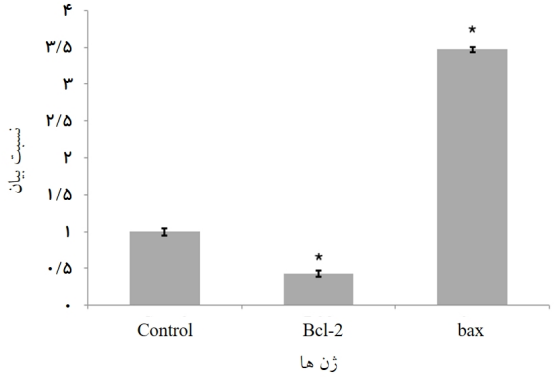
تغییر در بیان ژن‌های آپوپتوزی *Bax* و *Bcl2* در سلول‌های سرطانی کولون (HT29) تیمار شده با غلظت $IC_{50}$ عصاره با استفاده از روش Real-Time PCR پس از ۲٤ ساعت ارزیابی شد. تکثیر اختصاصی قطعات ژنی مورد نظر، عدم جفت شدن آغازگرها و عدم تکثیر قطعات غیر اختصاصی برای هر ژن با استفاده از منحنی ذوب تعیین شد. همچنین، نسبت بیان ژن‌های *Bcl2* و *Bax*، به ژن مرجع در رده سلولی سرطانی کولون تیمار شده به‌میزان (P<۰/۰۵) ۴۳/۳۵±۰/۰ کاهش و (P<۰/۰۵) ۳/٤۷±۰/۷۲ افزایش طی ۲٤ ساعت مشاهده شد (نمودار ۲).



[ Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-07-18 ]

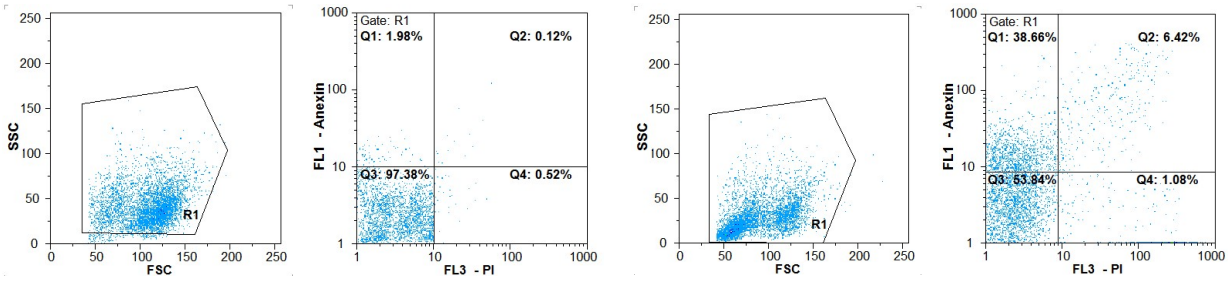



**نمودار ۱: درصد بقای سلول‌های کولون (HT29) در برابر غلظت‌های مختلف عصاره بەلیمو در مدت زمان ۲٤ ساعت** نتایج به‌صورت درصد بقا در مقایسه با نمونه‌های کنترل گزارش شده است (* P<۰/۰۵، ** P<۰/۰۱، *** P<۰/۰۰۱ ۳ =n).




**نمودار ۲: میزان بیان ژن‌های *Bax* و *Bcl2* نسبت به کنترل**

نسبت بیان ژن‌های Bcl2 و Bax به ژن مرجع در رده سلولی سرطانی کولون تیمار شده به‌میزان ۰/۴۳±۰/۳۵ (P<۰/۰۵) کاهش و ۳/۴۷±۰/۷۲ (P<۰/۰۵) افزایش طی ۲٤ ساعت مشاهده شد.




**نمودار ۳: نتایج آنالیز فلوسایتومتری تاثیر عصاره بەلیمو بر روی رده سلولی سرطان کولون**

(a) نمونه کنترل تیمار نشده، (b) نمونه تحت تیمار عصاره

مربع سمت چپ پایین: سلول‌های زنده، مربع سمت چپ بالا: آپوپتوز اولیه، مربع سمت راست پایین: نکروز، مربع سمت راست بالا: آپوپتوز تاخیری. در نمونه‌های تحت تیمار عصاره سلول‌ها وارد آپوپتوز اولیه ٦/٤٢٪ اولیه و ۳۸/٦٦٪ ثانویه شده‌اند.

به‌منظور تعیین میزان آپوپتوز القا شده در سلول‌های کولون تیمار شده با عصاره بەلیمو، این سلول‌ها با FITC Annexin V/ PI رنگ‌آمیزی‌شده و توسط دستگاه فلوسایتومتری مطالعه شدند. در طی فاز اولیه آپوپتوز، فسفاتیدیل سرین به خارج از غشا سلولی منتقل شده و توسط Annexin V رنگ می‌شود و رنگ PI به هسته سلول در زمان نکروز متصل می‌شود. نتایج فلوسایتومتری در نمودار ۳ نشان داده شده است که طی آن مربع سمت چپ بالا (Q1) بیانگر درصد سلول‌های آپوپتوز تاخیری، مربع بالا سمت راست (Q2) نشان‌دهنده سلول‌های دچار آپوپتوز اولیه می‌باشد. همان‌طوری که نتایج نشان می‌دهد عصاره بەلیمو سلول را ٦/٤٢٪ به‌سمت آپوپتوز اولیه و ۳۸/٦٦٪ به‌سمت آپوپتوز تاخیری هدایت نموده است (نمودار ۳).

## بحث

با توجه به گسترش بیماری‌ها در سال‌های اخیر، دستیابی به روش‌های درمان و پیشگیری آن‌ها به‌طور چشمگیری افزایش یافته



[ Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-07-18 ]

است. در پژوهش‌های مختلف بازگشت دوباره به فراورده‌های طبیعی مانند محصولات دریایی و عصاره گیاهان دارویی در کنار به‌کارگیری از داروهای سنتتیک می‌تواند رویکرد موثری در درمان و کنترل پیشرفت طیف وسیعی از بیماری‌های باکتریایی و سرطان داشته باشد.[۲۲و۲۳]

از آنجا که عصاره گیاه به‌لیمو یکی از گیاهانی است که در طب سنتی استفاده می‌شده و در سال‌های اخیر توجه زیادی به آن شده است و با توجه به اینکه تاکنون مقاله‌ای در خصوص ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانتی، ضد باکتریایی و ضد سرطانی این گونه مطرح نشده است، نویسندگان مقاله به بررسی این ویژگی‌ها پرداختند. Shahhoseini و همکارانش، بر روی ترکیبات تشکیل‌دهنده اسانس گیاه به‌لیمو با استفاده از روش GC-MS مطالعه کردند. نتایج آن‌ها نشان داد که اسانس این گیاه دارای ۲۰–۱۶ ترکیب است که بیشترین ترکیب مربوط به Geranial (۳۶/۸٪)، Neral (۲۸/۳٪) و Limonene (۷/۲۷٪) بود.[۱۶]

مطالعاتی در زمینه گونه‌های دیگر این جنس انجام شده است. Stashenko و همکارانش، ترکیبات شیمیایی اسانس گونه‌ای دیگر از گیاه خانواده شاهپسند یعنی *Lippia origanoides* را با روش GC-MS مورد تجزیه و تحلیل قرار دادند. نتایج مطالعه آن‌ها نشان داد که ترکیبات شیمیایی اسانس این گیاه دارای سه گروه ترکیب به‌نام Alpha and beta-phellandrenes، P-Cymene و Limonene می‌باشد و می‌توان از این ترکیبات در صنایع دارویی و غذایی استفاده کرد.[۱۸] یکی از دلایلی که ممکن است ترکیبات شیمیایی عصاره‌های گیاه یک جنس و گونه دارای تفاوت‌هایی باشند می‌تواند به‌دلیل نوع منطقه جغرافیایی و محل رشد این گیاه باشد. Ferraz و همکارانش، اثرات سمیت سلولی اسانس گیاه *Lippia gracilis* را بر روی رده سلولی کبدی HepG2 مورد مطالعه قرار دادند. نتایج پژوهش آن‌ها نشان داد که اسانس این گیاه دارای ۳۵ ترکیب اصلی است که مهمترین آن‌ها تیمول (Thymol) با ٪۵۵ بوده که به‌عنوان مهمترین عامل ضد توموری رده سرطانی HepG2 معرفی شد. مطالعه آن‌ها نشان داد که این عصاره باعث تغییر شکل ظاهری سلول‌های سرطانی شده و آپوپتوز را از مسیر کاسپاز ۳ فعال می‌کند.[۲۰]

Melo Jo و همکارانش اثرات سمیت سلولی اسانس گیاه *Aloysia gracilis* را بر روی رده‌های سلولی سرطان‌های دهانه رحم (Hela)، ملانوما (B16) و سرطان پستان (MCF-7) با تست MTT مورد بررسی قرار دادند. در مطالعه آن‌ها مهمترین ترکیبات فیتوشیمیایی گیاه را تیمول (Thymol) با ٪۴۰ گزارش نمودند که مهمترین عامل از بین برنده سلول‌های سرطانی بوده است.[۲۲] در پژوهش کنونی به‌جای اسانس از عصاره اتانولی گیاه به‌لیمو استفاده شد که در پژوهش‌های پیشین گزارش نشده بود. آنالیز GC-MS عصاره اتانولی، ۳۷ ترکیب اصلی را نشان داد که بیشترین ترکیب آن مربوط به Spathulenol و Caryophyllene oxide بوده که در ارتباط با نقش فعال‌سازی آپوپتوز در رده سلول سرطانی HepG2 است.

همچنین نتایج پژوهش کنونی نشان داد که اثر کشندگی سلول‌ها، بستگی به زمان و غلظت عصاره دارد. مقدار $IC_{50}$ محاسبه شده برای آن ۲۰/۱±۰/۷۸ mg/ml علیه رده سلولی سرطانی کولون نشان داده شد که نشان‌دهنده قدرت بالای کشندگی این عصاره دارد. همچنین نقش آنتی‌اکسیدانتی عصاره اتانولی گیاه به‌لیمو تاکنون در مطالعه‌ای گزارش نشده است. در پژوهش دیگری توسط Mesa-Arango و همکارانش در جهت بررسی اثرات سمیت سلولی عصاره گونه‌ای دیگر از خانواده شاهپسند به‌نام *Lippia alba* بر روی رده سلولی سرطانی دهانه رحم هلا (Hela) مورد مطالعه قرار دادند. نتایج این مطالعه نشان داد که عصاره این گیاه به‌صورت وابسته به دوز توانایی سمیت بسیار بالای برای سلول‌های سرطانی دهانه رحم دارد.[۲۱]

در پژوهش کنونی اثرات عصاره گیاه به‌لیمو *Aloysia citrodora* در افزایش بیان ژن پروآپوپتوتیک *Bax* و کاهش بیان ژن ضد آپوپتوزی *Bcl2* در سلول‌های سرطانی کولون نشان داده شد که در پژوهش‌های پیشین گزارش نشده بود. بالا بردن نسبت *Bax/Bcl2* یکی از شاخصه‌های پیشرفت مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی از طریق آپوپتوز می‌باشد. بنابراین بررسی‌های بیشتری لازم است تا بتوان اثبات کرد که "آیا پروفایل بیانی mRNA این ژن‌ها می‌تواند مدرکی برای نقش آن در پیش‌گویی اختصاصی و دقیق‌تر پاسخ سرطان به درمان باشد؟"

علاوه بر این، در بخش فلوسایتومتری، برای ارزیابی میزان آپوپتوز و نکروز القا شده توسط عصاره، از غلظت $IC_{50}$ استفاده شد. به‌طور کلی، ظرفیت فلوسایتومتری برای آنالیز سریع و منحصر به فرد تعداد زیادی سلول، آن را برای مطالعات مرگ سلولی ایده‌آل می‌کند. در این تست، از دو معرف Annexin V که نشان‌دهنده آپوپتوز و



[ Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-07-18 ]

پروپیریوم یدید (PI) که نمایانگر نکروز می‌باشد، استفاده شد که این روش میزان آپوپتوز و نکروز را بر اساس جابه‌جایی فسفاتیدیل سرین لایه داخلی غشای پلاسمایی به لایه خارجی آن در فاز آپوپتوز می‌باشد.[۲٤و۲٦] در پژوهش کنونی نتایج فلوسایتومتری تاثیر عصاره به‌لیمو نشان داد که این عصاره توانایی القای بیشتر آپوپتوز نسبت به نکروز در سلول‌های کولون دارد که در هیچ‌یک از پژوهش‌های پیشین گزارش نشده است. باید توجه داشت که بیشتر پژوهش‌های سال‌های اخیر در جهت یافتن داروهای ضد سرطانی می‌باشد که بتواند آپوپتوز را در سلول‌های سرطانی القا کند تا بدون ایجاد التهاب در بافت تومور از بین رفته که این خود یکی از راه‌های موثر درمان علیه سرطان محسوب می‌شود.[۲۳و۲۵]

همچنین خاصیت ضد باکتریایی عصاره‌ی گیاه به‌لیمو نشان داد که بیشترین اثر را بر روی باکتری گرم منفی *P. aeroginosa* و کمترین اثر را بر روی باکتری گرم مثبت *B. subtilis* دارد که نشان‌دهنده وجود ترکیب یا ترکیبات ضد باکتری قوی در عصاره‌ی این گیاه می‌باشد. Mothana و همکارانش خواص ضد باکتریایی و آنتی‌اکسیدانی گیاه به‌لیمو بومی کشور آلمان را مطالعه کردند و نتایج این مطالعه نشان داد که عصاره این گیاه دارای ترکیبات متفاوت از گیاه مورد مطالعه بوده و بیشترین تاثیر را بر روی باکتری‌های گرم مثبت دارد و دارای فعالیت ۴۳٪ آنتی‌اکسیدانی است.[۲۷] Pinto و همکارانش خاصیت ضد باکتریایی چندین گونه از Aloysia را مورد مطالعه قرار دادند. نتایج این مطالعه نشان داد که عصاره گیاه *A. origanoides* دارای بیشترین خاصیت ضد باکتریایی بر علیه باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس و مخمر بیماری‌زای کاندیدا آلبیکنس و کاندیدا پاراپسیلوزیس دارد.[۲۸] بنابراین پیشنهاد می‌شود که مطالعات بیشتر در مورد خواص زیستی ترکیبات شناسایی شده انجام گیرد تا اهمیت پزشکی این گیاه بیشتر مشخص شود و به‌عنوان یک ترکیب ضد سرطانی امیدبخش به مراکز دارویی پیشنهاد شود.

نتایج پژوهش کنونی نشان داد که عصاره گیاه به‌لیمو دارای ترکیبات متنوعی است که دارای خواص ضد باکتریایی، ضد سرطانی و آنتی‌اکسیدانی هستند. همچنین عصاره این گیاه بر روی رده سلولی سرطان کولون خاصیت کشندگی چشمگیری دارد.

*سپاسگزاری*: این مطالعه حاصل بخشی از طرح تحقیقاتی تحت عنوان "مطالعه اثر سمیت سلولی عصاره گیاه به‌لیمو بر روی رده‌های سلولی سرطانی کولون و نرمال و بررسی بیان ژن‌های Bax و Bcl-2" مصوب دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شرق (قیامدشت) در سال ۱۳۹۳ به کد ۹۳٤٦۷ می‌باشد که با حمایت باشگاه پژوهشگران جوان دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شرق (قیامدشت) اجرا شده است.

## References

1. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005;55(2):74-108.
2. Hanahan D1, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000;100(1):57-70.
3. Wong RSY. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *J Exp Clin Cancer Res* 2011;30(1):87-90.
4. Dorai T, Aggarwal BB. Role of chemopreventive agents in cancer therapy. *Cancer Lett* 2004;215(2):129-40.
5. Nazir S, Hussain T, Ayub A, Rashid U, MacRobert AJ. Nanomaterials in combating cancer: therapeutic applications and developments. *Nanomedicine* 2014;10(1):19-34.
6. Fock KM. Review article: the epidemiology and prevention of gastric cancer. *Aliment Pharmacol Ther* 2014;40(3):250-60.
7. Edwards MS, Chadda SD, Zhao Z, Barber BL, Sykes DP. A systematic review of treatment guidelines for metastatic colorectal cancer. *Colorectal Dis* 2012;14(2):e31-47.
8. Herszényi L, Tulassay Z. Epidemiology of gastrointestinal and liver tumors. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2010;14(4):249-58.
9. Urruticoechea A, Alemany R, Balart J, Villanueva A, Viñals F, Capellá G. Recent advances in cancer therapy: an overview. *Curr Pharm Des* 2010;16(1):3-10.
10. Zaidi SH, Huddart RA, Harrington KJ. Novel targeted radiosensitisers in cancer treatment. *Curr Drug Discov Technol* 2009;6(2):103-34.
11. Kaur R, Kapoor K, Kaur H. Plants as a source of anticancer agents. *J Nat Prod Plant Resour* 2011;1(1):119-24.
12. Cragg GM, Newman DJ. Plants as a source of anti-cancer agents. *J Ethnopharmacol* 2005;22:72-9.
13. Vuorelaa P, Leinonenb M, Saikkuc P, Tammelaa P, Rauhad JP, Wennberge T, Vuorela H.Natural products in the process of finding new drug candidates. *Curr Med Chem* 2004;11:1375-89.
14. Balunas MJ, Kinghorn AD. Drug discovery from medicinal plants. *Life Sci* 2005;78(5):431-41.
15. Mukherjee AK, Basu S, Sarkar N, Ghosh AC. Advances in cancer therapy with plant based natural products. *Curr Med Chem* 2001;8(12):1467-86.
16. Shahhoseini H, Ghorbani H, Saleh R. Omidbaigi R, Identification of essential oil content and composition of Lippia citriodora seed. *J Plant Production* 2012;18(4):91-6.
17. Pascual ME, Slowing K, Carretero E, Sanchez MD, Villar, A. Lippia: traditional uses, chemistry and pharmacology. *J Ethnopharmacology* 2001;76(3):201-14.
18. Stashenko EE, Martínez JR, Ruíz CA, Arias G, Durán C, Salgar W, Cala M. Lippia origanoides chemotype differentiation based on essential oil GC-MS and principal component analysis. *J Sep Sci* 2010;33(1):93-103.
19. Carcas L. Gastric cancer review. *J Carcinog* 2014; 13:14.



[ Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-07-18 ]

20. Ferraz RP, Bomfim DS, Carvalho NC, Soares MB, da Silva TB, Machado WJ. Cytotoxic effect of leaf essential oil of Lippia gracilis Schauer (Verbenaceae). *Phytomedicine* 2013;20(7):615-21.
21. Mesa-Arango AC, Montiel-Ramos J, Zapata B, Durán C, Betancur-Galvis L, Stashenko E. Citral and carvone chemotypes from the essential oils of Colombian Lippia alba (Mill.) N.E. Brown: composition, cytotoxicity and antifungal activity. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009;104(6):878-84.
22. Melo JO, Fachin AL, Rizo WF, Jesus HC, Arrigoni-Blank MF, Alves PB, et al. Cytotoxic effects of essential oils from three Lippia gracilis Schauer genotypes on HeLa, B16, and MCF-7 cells and normal human fibroblasts. *Genet Mol Res* 2014;13(2):2691-7.
23. Vanajothi R, Sudha A, Manikandan R, Rameshthangam P, Srinivasan P. Luffa acutangula and Lippia nodiflora leaf extract induces growth inhibitory effect through induction of apoptosis on human lung cancer cell line. Biomed Prev Nutr 2012;2(4):287-93.
24. Funari CS, Passalacqua TG, Rinaldo D, Napolitano A, Festa M, Capasso A, Piacente S, Pizza C, Young MC, Durigan G, Silva DH. Interconverting flavanone glucosides and other phenolic compounds in Lippia salviaefolia Cham ethanol extracts. *Phytochemistry* 2011;72(16):2052-61.
25. Inbathamizh L, Mekalai Ponnu T, Jancy Mary E. In vitro evaluation of antioxidant and anticancer potential of Morinda pubescens synthesized silver nanoparticles. *J Pharm Res* 2013;6:32-8.
26. Parsaee H, Asili J, Mousavi SH, Soofi H, Emami SA, Tayarani-Najaran Z. Apoptosis induction of Salvia chorassanica root extract on human cervical cancer cell line. *Iran J Pharm Res* 2013;12:75-83.
27. Mothana RA, Abdo SA, Hasson S, Althawab FM, Alaghbari SA, Lindequist U. Antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activities and phytochemical screening of some yemeni medicinal plants. *Evid Based Complement Alternat Med* 2010;7(3):323-30.
28. Pinto Cda P, Rodrigues VD, Pinto Fda P, Pinto Rda P, Uetanabaro AP, Pinheiro CS, et al. Antimicrobial activity of lippia species from the brazilian semiarid region traditionally used as antiseptic and anti-infective agents. *Evid Based Complement Alternat Med* 2013;2013:614501.



[ Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-07-18 ]

TUMJ Tehran University Medical Journal, June 2016; Vol. 74, No. 3: 168-176 Original Article

# Evaluation of chemical composition, antioxidant, antibacterial, cytotoxic and apoptotic effects of *Aloysia citrodora* extract on colon cancer cell line

Amir Mirzaie Ph.D.[1*]
Seyed Ataollah Sadat Shandiz Ph.D.[1]
Hassan Noorbazargan Ph.D.[2]
Elahe Ali Asgary Ph.D.[3]

*1- Young Researchers and Elite Club, East Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.*
*2- Department of Biotechnology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.*
*3- Department of Biology, East Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.*

[*] Corresponding author: East Tehran Branch, Islamic Azad University, Shahid Bahonar St., Ghiamdasht, Khavaran Highway, Tehran, Iran.
Tel: +98 21 33594950
E-mail: amir_mirzaie92@yahoo.com

## Abstract

Received: 16 Mar. 2016 Revised: 05 Jun. 2016 Accepted: 26 Jul. 2016 Available online: 31 Jul. 2016

***Background:*** *Aloysia citrodora* belongs to the Verbenaceae family of plants, a well-known herbal medicine in Iran. The aim of the present study was to investigate the chemical composition, antioxidant, antibacterial, cytotoxic and apoptotic effect of *A. citrodora* extract against human colon cancer (HT29) cells by using real-time polymerase chain reaction and flow-cytometry methods.

***Methods:*** This experimental study was carried out in Islamic Azad University, East Tehran Branch, from March to September of 2014. At first, the *A. citrodora* chemical constituents were analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) technique. In addition, antioxidant assay, antibacterial and anti-cancer effect was performed using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), disk diffusion and 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) methods, respectively. The half maximal inhibitory concentration ($IC_{50}$) value was calculated. We extracted total RNA molecules by using RNX solution, after which cDNA was synthesized. Finally, the pro-apoptotic (*Bax)* and anti-apoptotic (*Bcl2*) gene expression was performed by real-time polymerase chain reaction and apoptotic effects were analyzed using Flow-cytometry method.

***Results:*** GC-MS analysis of *Aloysia citrodora* extract was shown 37 major components and the most frequent component was belonged to Spathulenol (17.57%) and Caryophyllene oxide (15.15%) The antioxidant activity of the extract was $IC_{50}$= 0.6±0.03 mg/ml. The maximum and minimum antibacterial effects of extract were belonged to gram-negative and gram-positive bacteria, respectively. Cytotoxic results revealed that the *A.citrodora* extract have $IC_{50}$= 20.1±0.78 mg/ml against colon cancer (HT29) cell line and real-time polymerase chain reaction results showed the expression level of *Bax* and *Bcl2* was increased and decreased respectively in colon cancer cell line (3.470±0.72 ($P< 0.05$), 0.43±0.35 ($P< 0.05$)). In addition, the flow-cytometry results indicated the 38.66% apoptosis in colon cancer cell line.

***Conclusion:*** According to the results, it seems that *A. citrodora* extract has potential antioxidant, antibacterial and anticancer effects and it suggested that further studies were performed for *A. citrodora* pharmaceutical importance.

***Keywords:*** *Aloysia citrodora*, antioxidant activity, apoptosis, cytotoxicity, flow-cytometry.



[ Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-07-18 ]