

بررسی اثر عصاره برگ رامنوس فرانگولا میلبر بر توانایی بقای سلول‌های سرطانی سینه (MCF-7) در محیط کشت

رحیم احمدی: استادیار، گروه فیزیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه اسلامی واحد همدان، همدان، ایران. rahahmadi2001@yahoo.com

بهرروز صابری: دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن، مازندران، ایران. B3hr0oz.saberi@gmail.com

ساناز نوروزی: دانشجوی کارشناسی ژنتیک، گروه ژنتیک، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن، مازندران، ایران. sayana.nrzi@gmail.com

ساسان رحیمی: دانشجوی کارشناسی ارشد زیست‌شناسی، گروه فیزیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد همدان، همدان، ایران. sasan.rrahimii@yahoo.com

*پوریا مولوی: دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، تهران، ایران (*نویسنده مسئول). pooriamoulavi@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۹۶/۳/۲۳

تاریخ دریافت: ۹۶/۱/۲۸

چکیده

زمینه و هدف: مطالعات مختلف نشان می‌دهند که عصاره‌های گیاهی می‌توانند اثرات سیتوتوکسیک بر سلول‌های سرطانی داشته باشند. هدف از این مطالعات بررسی اثر عصاره برگ رامنوس فرانگولا میلبر بر توانایی بقای سلول‌های سرطانی سینه در محیط کشت می‌باشد.

روش کار: در این مطالعه تجربی - آزمایشگاهی از رده سلولی سرطان سینه (MCF-7) استفاده شد. سلول‌های MCF-7 در محیط کشت ۱۶۴۰ RPMI حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی و پنی سیلین ۱۰۰ واحد بر میلی لیتر و استرپتومایسین ۱۰۰ میکرو گرم بر میلی لیتر کشت داده شدند و در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و در فشار ۵ درصد از CO₂ نگهداری شدند. سلول‌ها به طور تصادفی به گروه کنترل و گروه‌های در معرض ۰/۰۱، ۰/۱، ۰/۱۰، ۰/۰۱ و ۰/۰۱ میلی گرم/میلی لیتر از عصاره برگ رامنوس فرانگولا تقسیم بندی شدند که زنده مانی سلول‌ها با استفاده از تست MTT مورد اندازه‌گیری قرار گرفت. داده‌ها از طریق آزمون آنالیز واریانس یک طرفه مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

یافته‌ها: زنده مانی سلول‌های MCF-7 بین گروه در معرض ۰/۰۱ میلی گرم/میلی لیتر عصاره و گروه کنترل تفاوت معناداری نداشت. هرچند، زنده مانی سلول‌های MCF-7 در گروه‌های در معرض ۰/۰۱، ۰/۱، ۱ و ۱۰ میلی گرم/میلی لیتر از عصاره نسبت به گروه کنترل دچار کاهش معناداری شد (p = ۰/۰۵).

نتیجه‌گیری: نتایج نشان دادند که دوز پایین عصاره برگ رامنوس فرانگولا اثر سیتوتوکسیک معناداری به سلول‌های MCF-7 ندارد. هرچند دوزهای بالای عصاره اثرات سیتوتوکسیک به سلول‌های MCF-7 دارند.

کلیدواژه‌ها: رامنوس فرانگولا میلبر، زنده مانی، سیتو توکسیک، MCF-7

مقدمه

می‌شود و از طرفی چوب رامنوس فرانگولا نیز برای ساخت زغال سنگ و باروت استفاده می‌شود (۱). MCF-7 یک رده سلولی سرطان پستان می‌باشد که اولین بار در سال ۱۹۷۰ از یک زن قفقازی ۶۹ ساله جدا گردید. همچنین رده سلولی سرطان پستان MCF-7 از مایع جنب که دارای مورفولوژی شبه اپتلیال است تهیه می‌شود که از ویژگی‌های آن می‌توان به سنتز استرادیول اشاره کرد (۲). سرطان سینه امروزه یکی از مهم‌ترین معضلات بهداشتی در سراسر جهان محسوب می‌شود (۳). شیوع سرطان سینه در ایران ۱۷/۴۴

رامنوس فرانگولا درختچه‌ای از خانواده عنابیان یا رامناسه‌ها به حساب می‌آید و جزو درختان گل‌دار طبقه‌بندی می‌شود. این گیاه اغلب در مناطق مرطوب اروپا، آفریقا، کوه‌های اورال، سیبری و البرز می‌روید. این گیاه سمی بوده و قبل از مصرف باید مدت ۱۲ ماه در جایی نگهداری شود. مصرف پزشکی دارد و به عنوان ملین به دلیل داشتن آنترآگوینون در پوست درخت در یبوست مورد استفاده قرار می‌گیرد. همچنین پوست این درخت دارای انترانول است که باعث تحریک عمل استفراغ

مطالعات دیگر عصاره رامنوس فرانگولا می‌تواند بر سلول P-388 (سلول لوسمی لنفوسیتی) خاصیت ضد توموری نشان دهد (۲۵).

برخلاف بیشتر مطالعات صورت گرفته، برخی پژوهش‌ها نشانگر آنند که عصاره پیتیدی فرانگولا آلنوس نسبت به دیگر پتیدهای گیاهی خاصیت ضد سرطانی کمتری دارد (۱۶).

از آنجاکه شیوع و بروز سرطان سینه در نقاط مختلف جهان متفاوت است و سبب بروز عوارض بالینی و اجتماعی زیادی در بیماران می‌گردد (۱۷) و با توجه به مطالعات محدود انجام شده، پژوهش حاضر به بررسی اثر عصاره برگ رامنوس فرانگولا میلر بر توانایی بقای سلول‌های سرطانی سینه در محیط کشت می‌پردازد. نتایج حاصل از این حوزه در درمان و جلوگیری از سرطان سینه حائز اهمیت می‌باشد.

روش کار

طی این مطالعه تجربی-آزمایشگاهی که از رده سلولی سرطان سینه (MCF-7) استفاده شد ابتدا این رده سلولی از بانک سلولی انستیتو پاستور تهران تهیه گردید. سلول‌های این رده سلولی در محیط کشت RPMI 1640 حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی و پنی‌سیلین ۱۰۰ واحد بر میلی‌لیتر و استرپتومایسین ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر کشت داده شدند و در انکوباتور دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و در فشار ۵ درصد از CO₂ نگهداری شدند. همچنین توسط ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۱ میلی‌گرم، ۲۵۰ گرم برگ خشک شده گیاه رامنوس فرانگولا را توزین نموده و پس از آسیاب کردن درون یک ارلن ریخته و روی نمونه ۵۰۰ میلی‌لیتر الکل اتانولی ۵۰ درصد ریخته تا کاملاً روی سطح پودر را بپوشاند، سپس ارلن به مدت ۴۸ ساعت در دستگاه پرکولاتور قرار داده می‌شود. بعد از این مدت زمان، محلول داخل ارلن را سه بار از کاغذ صافی رد کرده تا یک محلول شفاف به دست آید. در مرحله بعد لازم است حلال اتانولی را از محلول بیرون آورده تا یک عصاره خالص به دست آید. برای این منظور محلول به دست آمده را داخل پلیت‌های شیشه‌ای تقسیم کرده و در دمای

نفر در هر ۱۰۰۰۰۰ گزارش شده است (۴). سرطان سینه یک نوع سرطان غدد است که از بافت‌های سینه نشأت می‌گیرد. سرطان سینه بیشتر اوقات از پیشرفت سلول‌های مجاری لنفی تولید شیر و لوب‌هایی که محل ذخیره شیر به همراه لنف هستند، ایجاد می‌شود. سرطان سینه باعث افسردگی، کاهش میل جنسی، گره‌های سینه‌ای، دردهای استخوانی، دردهای سینه‌ای، متاستازهای متفاوت، بالا رفتن آنتی‌ژن‌های اختصاصی پروستات، آسیب‌های مغزی و افزایش مارکرهای سرطان کولون می‌شود (۵ و ۶).

مطالعات حاکی از آن است که گیاهان به عنوان منبع عوامل ضد سرطانی می‌باشند (۷). همچنین تحقیقات نشان می‌دهند که رژیم غذایی گیاهی به دلیل داشتن ویتامین‌ها و کاروتن‌ها به احتمال زیاد باعث کاهش ابتلا به سرطان می‌شوند (۸). همچنین تحقیقات بر آنند که فنولیکس‌های گیاهی به دلیل داشتن خواص آنتی‌اکسیدانی در برابر بیماری با اکسیداتیوی مختلف مثل سرطان‌ها، حفاظت ایجاد می‌کنند (۹). نتایج تحقیقات دیگر نشان‌دهنده آنند که عصاره برگ گیاه رزماری به دلیل داشتن رزمارینیک اسید و کارنوسیک اسید از رشد سلول‌های سرطانی انسان جلوگیری می‌کنند (۱۰). همچنین تحقیقات بیانگر آنند که گیاهان گل‌دار بر سرطان سینه نقش مقاومتی دارا می‌باشند (۱۱). در ادامه مطالعات نشان داده شده که گیاهان گل‌دار مثل ودانیا سامنیفرا و سورالیا کارلیفولیا در جلوگیری و درمان سرطان نقش دارند (۱۲ و ۱۳). تحقیقات نشان‌دهنده آن است که در پزشکی سنتی چینی عصاره گیاه زیزیفوس که یک رامناسه می‌باشد به عنوان داروی ضد سرطان استفاده می‌شود (۱۴). به علاوه، تحقیقات بیان می‌کنند که گیاه اسکوشیا مارتینا که یک رامناسه می‌باشد در کارسینوماهای کبدی موش نقش ضد توموری دارد (۱۵). تحقیقات دیگر بیانگر آنند که گیاه رامنوس فرانگولا بیشتر ساکن خاک و خاک مرطوب می‌باشد و همچنین تحقیقات دیگر نشان دادند که رامنوس فرانگولا می‌تواند خاصیت ضد قارچی از خود نشان بدهد (۲۳ و ۲۴). همچنین با توجه به

فتومتر، در یک میکروپلیت انجام می‌شوند؛ لذا تکرار پذیری، دقت و حساسیت آزمایش بالا است. به همین دلیل در این مطالعه از این آزمون استفاده شد. در ادامه تقریباً ۵ ساعت بعد از اضافه شدن رنگ، محلول MTT خارج شده و ماده (DMSO(Dimethyl sulfoxide) اضافه شد و سپس توسط الیزا جذب نوری نمونه‌ها در طول موج های ۵۷۰ نانومتر خوانده شد.

برای انجام مطالعات آماری از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) با استفاده از برنامه SPSS نسخه ۱۶ نیز استفاده شد و همچنین اختلاف بین گروه‌ها در سطح $0.05 <$ معنا دار در نظر گرفته شد. توزیع طبیعی داده‌ها توسط آزمون کولوموگروف-اسمیرنوف صورت گرفته است.

یافته‌ها

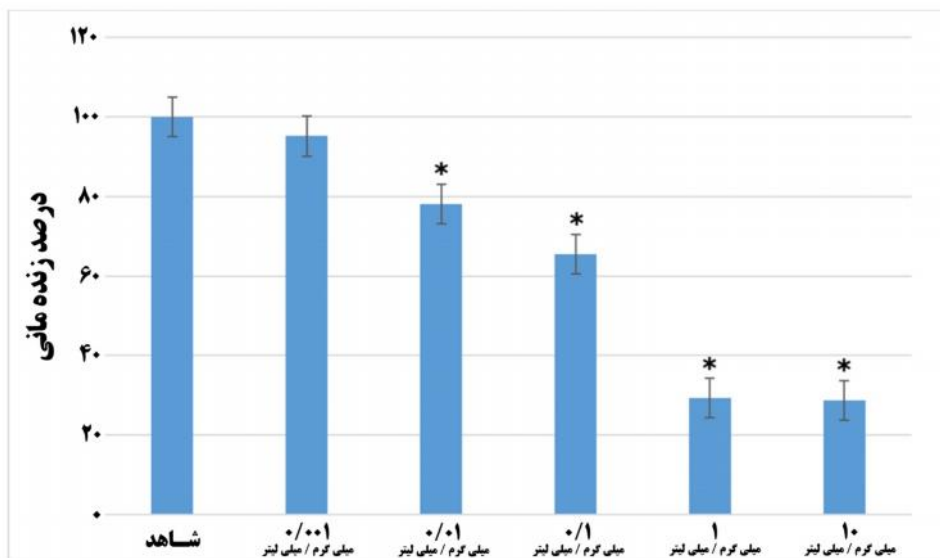
نمودار ۱ بیانگر رده سلولی سرطانی MCF-7 می‌باشد که تحت تاثیر غلظت‌های مختلفی از عصاره گیاهی رامنوس فرانگولا نیز قرار گرفته است.

مطابق نمودار ۱ نتایج نشان می‌دهند که زنده ماندن سلول‌های سرطانی پستان در گروه دریافت کننده ۰,۰۰۱ میلی گرم/ میلی لیتر عصاره رامنوس فرانگولا نسبت به گروه شاهد تغییر معناداری

اتاق قرار داده تا به طور کامل حلال آن تبخیر شود و در انتها عصاره به دست آمده در کف پلیت چسبیده شود. بعد از تراشیدن عصاره چسبیده در ته پلیت و برای ادامه آزمایش‌ها در یخچال نگهداری می‌گردد.

رده سلولی MCF-7 سرطان سینه به طور تصادفی به گروه شاهد و گروه‌های تحت تاثیر غلظت‌های ۱۰ میلی گرم/ میلی لیتر، ۱ میلی گرم/ میلی لیتر، ۰,۱ میلی گرم/ میلی لیتر، ۰,۰۱ میلی گرم/ میلی لیتر و ۰,۰۰۱ میلی گرم/ میلی لیتر عصاره رامنوس فرانگولا، تقسیم شدند. با در نظر گرفتن محیط کشت کافی برای سلول‌ها، عصاره‌ها به چاهک‌ها اضافه شدند و پلیت‌ها درون انکوباتور به مدت ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت نگهداری شدند. سپس مایع از درون پلیت‌ها خارج و رنگ MTT اضافه گردید.

آزمون MTT (۳,۴,۵) دی متیل تiazول - ۲ و ۵ دیفنیل تترازولیوم برمید) به وسیله آنزیم سوکسینات دهیدروژناز و تشکیل کریستال‌های آبی رنگ نامحلول انجام می‌شود. در این روش برخلاف سایر روش‌ها مراحل شستشو و هاروست کردن سلول که اغلب باعث از دست رفتن تعدادی از سلول‌ها می‌شوند، حذف شده‌اند و تمام مراحل آزمایش از ابتدای کشت سلولی تا قرائت نتایج با



نمودار ۱- این نمودار مقایسه ۵ غلظت مختلف عصاره گیاهی رامنوس فرانگولا را بر روی رده سلولی سرطانی MCF-7 نشان می‌دهد. داده‌ها حاصل از تجربیات اثر عصاره گیاهی رامنوس فرانگولا بر رده سلولی MCF-7 می‌باشد که با استفاده از روش آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) مورد مقایسه قرار گرفتند. علائم * نشان دهنده $P < 0.05$ می‌باشد.

جدول ۱- میانگین، واریانس، انحراف معیار و خطای استاندارد در گروه‌های مورد مطالعه

| نمونه‌ها | نمونه‌ها | | | | | کل ۴۰ |
|----------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| | ۱ | ۲ | ۳ | ۴ | ۵ | |
| N | ۸ | ۸ | ۸ | ۸ | ۸ | |
| میانگین | ۰,۳۳۳۸۷۵ | ۰,۲۷۴۲۵ | ۰,۲۳ | ۰,۱۰۲۷۵ | ۰,۱۰۰۶۲۵ | ۰,۲۰۸۳ |
| واریانس | ۰,۰۰۱۳۶۵ | ۰,۰۰۱۵۲۶ | ۰,۰۰۱۰۸۸ | ۰,۰۰۰۴۲۵ | ۰,۰۰۴۰۸ | ۰,۰۰۹۷۵۱ |
| انحراف معیار | ۰,۳۶۹۴۲ | ۰,۰۳۹۰۶۲ | ۰,۰۳۲۹۸۵ | ۰,۰۲۰۶۲۴ | ۰,۰۲۰۱۹۹ | ۰,۰۹۸۷۴۶ |
| خطای استاندارد | ۰,۰۱۳۰۶۱ | ۰,۰۱۳۸۱۱ | ۰,۰۱۱۶۶۲ | ۰,۰۰۷۳۹۲ | ۰,۰۰۷۱۴۱ | ۰,۰۱۵۶۱۳ |

در جدول فوق شماره‌های ۱، ۲، ۳، ۴، ۵ به ترتیب نشان دهنده گروه‌های تحت تاثیر غلظت‌های ۰,۰۰۱، ۰,۰۰۱، ۰,۰۰۱، ۰,۰۰۱، ۰,۰۰۱ میلی‌لیتر، ۰,۰۰۱، ۰,۰۰۱، ۰,۰۰۱، ۰,۰۰۱، ۰,۰۰۱ میلی‌گرم/میلی‌لیتر، ۰,۰۰۱، ۰,۰۰۱، ۰,۰۰۱، ۰,۰۰۱، ۰,۰۰۱ میلی‌گرم/میلی‌لیتر و ۱۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر عصاره رامنوس فرانگولا بر رده سلولی MCF-7 می‌باشد.

جدول ۲- آنالیز واریانس داده‌های حاصل از مطالعه در گروه شاهد و گروه‌های تجربی

| | SS | df | MS | F | P |
|-------------------|-----------|----|----------|-------|---------|
| تیمار بین گروه‌ها | ۰,۳۴۶۵۹۳ | ۴ | ۰,۰۸۶۶۴۸ | ۹,۰۰۳ | ۰,۰۰۰۱< |
| خطاها | ۰,۰۳۳۶۸۴ | ۳۵ | ۰,۰۰۰۹۶۲ | | |
| کل | ۰,۰۳۸۰۲۷۶ | ۳۹ | | | |

جدول فوق که شامل SS، df، MS، F و P می‌باشد به ترتیب نشان دهنده مجموع مربعات، درجه آزادی، میانگین مربعات، کسر f، معناداری می‌باشد.

شده توسط عصاره گیاهی برگ فرانگولا ۰/۴۳ میلی‌گرم/میلی‌لیتر می‌باشد.

بحث و نتیجه‌گیری

این پژوهش نشان می‌دهد که عصاره رامنوس فرانگولا در غلظت‌های بالا می‌تواند اثر مناسب و سمی بر درصد زنده مانی سلول‌های سرطانی پستان (MCF-7) داشته باشد و در غلظت‌های پایین نمی‌تواند اثر مناسبی را به جای بگذارد. همین‌طور که در پژوهش‌ها آمده بود عصاره زیزیفوس که یک رامناسه می‌باشد در پزشکی سنتی چینی به عنوان داروی ضد سرطان نیز استفاده می‌شود (۱۴) و همین‌طور طبق یافته‌ها تری ترپنوئیدهای مشتق شده از گیاهان با داشتن ترکیبات طبیعی باعث جلوگیری و درمان سرطان سینه نیز می‌شوند (۱۸). در راسته ادامه یافته‌ها در نیجریه از عصاره گیاهانی همچون کولا لپیدوتا و روت بارک در پزشکی سنتی در درمان انواع سرطان‌های مختلف به ویژه سرطان پستان مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۹). دیگر تحقیقات بیان می‌کنند که گیاه اسکوشیا مارتیناکه یک رامناسه می‌باشد در کارسینوماها کبدی موش نقش ضد توموری را داشته است (۱۵). با توجه به مطالعات قبلی به نظر می‌رسد حضور ترکیب موثر امودین در رامنوس فرانگولا، می‌تواند نتیجه اثرات

نداشت. از طرفی، زنده مانی سلول‌های سرطانی MCF-7 در گروه‌هایی دریافت کننده ۰/۰۱، ۰/۱، ۱ و ۱۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر عصاره نسبت به گروه شاهد کاهش معناداری داشت (p < ۰/۰۵). همچنین زنده مانی سلول‌های سرطانی در گروه دریافت کننده غلظت ۱۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر نسبت به گروه دریافت کننده ۱ میلی‌گرم/میلی‌لیتر تفاوت معناداری نداشت ولی زنده مانی سلول‌های سرطانی در گروه دریافت کننده ۱۰ یا ۱ میلی‌گرم/میلی‌لیتر از عصاره نسبت به دیگر گروه‌ها (گروه‌های دریافت کننده ۰/۰۰۱، ۰/۰۱ و ۰/۱ میلی‌گرم/میلی‌لیتر از عصاره) تفاوت معناداری داشت (p < ۰/۰۱). از طرفی، زنده مانی سلول‌های سرطانی در گروه دریافت کننده غلظت ۰/۱ میلی‌گرم/میلی‌لیتر نسبت به گروه‌های دریافت کننده ۰/۰۱، ۰/۰۰۱، ۰/۰۱ میلی‌گرم/میلی‌لیتر، تفاوت معناداری از خود نشان داد (به ترتیب p < ۰/۰۵ و p < ۰/۰۱). از سویی، زنده مانی سلول‌های سرطانی در گروه دریافت کننده غلظت ۰/۰۱ میلی‌گرم/میلی‌لیتر نسبت به گروه دریافت کننده ۰/۰۰۱ میلی‌گرم/میلی‌لیتر تفاوت معناداری داشت (p < ۰/۰۱). میزان IC50 (میزان ممانعت از رشد سلول‌های سرطانی) ۵۰٪ از سلول‌ها (۲۶) که میزان IC50 محاسبه شده در گروه‌های سلول‌های سرطانی رده MCF-7 تیمار

تقدیر و تشکر

بدین وسیله از تمامی کسانی که ما در اجرای این پژوهش یاری رسانده‌اند، تقدیر و تشکر به عمل می‌آید.

منابع

1. Fiedler AK, Landis DA. Biotic and abiotic conditions in Michigan Prairie Fen invaded by glossy buckthorn (*Frangula alnus*). *Natural Areas Journal*. 2012;32(1):41-53.
2. Soule HD, Vazquez J, Long A, Albert S, Brennan M. A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst*. 1973; 51(5):1409-16.
3. Lacey JV Jr, Devesa SS, Brinton LA. Recent trends in breast cancer incidence and mortality. *Environ Mol Mutagen*. 2002;39(2-3):82-8.
4. Mousavi SM, Montazeri A, Mohagheghi MA, Jarrahi AM, Harirchi I, Najafi M, et al. Breast cancer in Iran: an epidemiological review. *Breast J* 2007;13(4):383-91.
5. DeSantis C, Siegel R, Bandi P, Jemal A. Breast cancer statistics. *CA Cancer J Clin*. 2011;61(6):409-18.
6. Nicholas Zdenkowski, Butow P, Tesson S, Boyle F. A systematic review of decision aids for patients making a decision about treatment for early breast cancer. *Breast*. 2016;26:31-45.
7. Cragg GM, Newman DJ. Plants as a source of anti-cancer agents. *J Ethnopharmacol*. 2005; 100(12):72-9.
8. Hocman G. Prevention of cancer: vegetables and plants. *Comp Biochem Physiol B*. 1989; 93(2):201-12.
9. Dai J, Mumper RJ. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*. 2010;15(10):7313-52.
10. Yesil-Celiktas O, Sevimli C, Bedir E, Vardar-Sukan F. Inhibitory effects of rosemary extracts, carnosic acid and rosmarinic acid on the growth of various human cancer cell lines. *Plant Foods Hum Nutr*. 2010;65(2):158-63.
11. Ali MA, Abul Farah M, Al-Hemaid FM, Abou-Tarboush FM. In vitro cytotoxicity screening of wild plant extracts from Saudi Arabia on human breast adenocarcinoma cells. *Genet Mol Res*. 2014;13(2):3981-90.
12. Singh N, Verma P, Pandey BR, Gilca M. Role of *Withania somnifera* in prevention and treatment of cancer: An overview. *IJPSDR*. 2011; 3(4):274-9.
13. Bronikowska J, Szliszka E, Jaworska D, Czuba ZP, Krol W. The coumarin psoralidin enhances anticancer effect of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). *Molecules*. 2012; 17(6):6449-64.

سایتوتوکسیک رامنوس فرانگولا نیز باشد (۲۰). با وجود گزارش‌های قابل توجه اثرات مهاری گیاهان جنس رامناسه بر سلول‌های سرطانی، اما گزارش‌های قابل توجهی در ارتباط با رامنوس فرانگولا‌های در حال رشد در شرق ایران که خاصیت ضد سرطانی دارند به خصوص بر سلول‌های MCF-7 نشده است (۲۵). در مقابل، برخی یافته‌ها نشان می‌دهند که عصاره پتیدی فرانگولا آلموس نسبت به دیگر پتیدهای گیاهی خاصیت ضد سرطانی کمتری دارد (۱۶).

از نظر مکانیسم احتمالی، طبق تحقیقات انجام شده گیاهانی از خانواده رامناسه‌ها می‌توانند اثرات توکسیسیته بر روی رده سلولی سرطانی HeLa و سلول‌های توموری MDA-MB-468 نیز داشته باشند (۲۱) و همچنین مطالعات پیشین نشان داده‌اند که امودین یک آنتراکینون هست و به طور طبیعی در ریشه و پوست گیاهان متعدد، کپک‌ها و گل‌سنگ‌ها وجود دارد، می‌تواند اثر مهاری بر روی چرخه سلولی پستانداران داشته باشد؛ بنابراین این ترکیب در رامنوس فرانگولا می‌تواند اثر ضد سرطانی داشته باشد (۲۲). لذا، بر اساس پژوهش‌های انجام شده عصاره رامنوس فرانگولا می‌تواند اثرات مناسبی بر روی رده سلولی سرطان پستان (MCF-7) بگذارد.

این مطالعه در حیطه بررسی اثر عصاره برگ رامنوس فرانگولا میلبر بر توانایی بقای سلول‌های سرطانی سینه در محیط کشت انجام گرفته و از نظر تفسیر در محدوده سلولی و مولکولی با محدودیت همراه است. با توجه به محدودیت‌های مالی و امکانات آزمایشگاهی تا حد امکان در سطح سلولی و مولکولی انجام پذیرفت.

نتایج این پژوهش نشان دادند که عصاره رامنوس فرانگولا در غلظت‌های پایین بر رده سلولی سرطانی پستان (MCF-7) اثر سیتوتوکسیک ندارد اما در غلظت‌های بالا عصاره گیاهی رامنوس فرانگولا می‌تواند اثر سیتوتوکسیک بر رده سلولی MCF-7 نیز داشته باشد. بر این مبنای استفاده از دوزهای مناسب عصاره گیاهی رامنوس فرانگولا می‌توان از تکثیر رده سلولی سرطان پستان (MCF-7) جلوگیری نمود.

14. Plastina P, Bonofiglio D, Vizza D, Fazio A, Rovito D, Giordano C, et al. Identification of bioactive constituents of *Ziziphus jujube* fruit extracts exerting antiproliferative and apoptotic effects in human breast cancer cells. *J Ethnopharmacol.* 2012; 140(2):325-32.
15. Kumar RS, Asokkumar K, Murthy NV. Hepatoprotective effects and antioxidant role of *Scutia myrtina* on paracetamol induced hepatotoxicity in rats. *J Complement Integr Med.* 2011; 8.
16. Tepkeeva II, Moiseeva EV, Chaadaeva AV, Zhavoronkova EV, Kessler YV, Semushina SG, et al. Evaluation of antitumor activity of peptide extracts from medicinal plants on the model of transplanted breast cancer in CBRB-Rb(8.17)11em mice. *Bull Exp Biol Med.* 2008; 145(4):464-6.
17. Fazeli Z, Najafian Zade M, Eshtati B, Almasi Hashiani A. Five year evaluation of epidemiological, geographical distribution and survival analyze of breast cancer in Markazi province, 2007-2011. *AMUJ.* 2014;16(11):73-80.
18. Bishayee A, Ahmed S, Brankov N, Perloff M. Triterpenoids as potential agents for the chemoprevention and therapy of breast cancer. *Front Biosci (Landmark Ed).* 2011; 16:980-96.
19. Engel N, Oppermann C, Falodun A, Kragl U. Proliferative effects of five traditional Nigerian medicinal plant extracts on human breast and bone cancer cell lines. *J Ethnopharmacol.* 2011; 137(2):1003-10.
20. Kupchan SM, Karim A. Tumor inhibitors. 114. Aloe emodin: antileukemic principle isolated from *Rhamnus frangula* L. *Lloydia.* 1976; 39(4):223-4.
21. Jafarian A, Zolfaghari B, Shirani K. Cytotoxicity of different extracts of arial parts of *Ziziphus spina-christi* on Hela and MDA-MB-468 tumor cells. *Biomed Res.* 2014; 3:38.
22. Srinivas G, Babykutty S, Sathiadevan PP, Srinivas P. Molecular mechanism of emodin action: transition from laxative ingredient to an antitumor agent. *Med Res Rev.* 2007; 27(5):591-608.
23. Frappier B, Eckert R, Lee T. Experimental removal of the none indigent shrub *rhamnus frangula* (Glossy Buckthorn): effects on native herbs and woody seedling. *JSTOR.* 2004; 11(3):333- 42.
24. Manojlovic NT, Solujic S, Sukdolak S, Milosev M. Antifungal activity of *Rubia tinctorum*, *Rhamnus frangula* and *Caloplaca cerina*. *Fitoterapia.* 2005; 76(2):244-6.
25. Kupchan SM, Karim A. Tumor inhibitors. 114. Aloe emodin: antileukemic principle isolated from *Rhamnus frangula* L. *Lloydia.* 1976; 39(4):223-4.
26. Tapiolas DMM, Roman. Fenical, octalactins from a marine bacterium *Sterptomyces* sp. *J Am Soc.* 1991; 113:4681-3.

The effects of *Rhamnus frangula miller* leaf extract on breast cancer cells viability in cell culture

Rahim Ahmadi, PhD, Assistant Professor of Physiology, Department of Physiology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University of Hamedan Branch, Hamedan, Iran. rahahmadi2001@yahoo.com

Behrooz Saberi, MSc Student of Microbiology, Department of Microbiology, Faculty of Basic Science, Islamic Azad University of Tonekabon Branch, Mazandaran, Iran. B3hr0oz.saberi@gmail.com

Sanaz Noroozi, BS Student of Genetic, Department of Genetic, Faculty of Basic Science, Islamic Azad University of Tonekabon Branch, Mazandaran, Iran. sayana.nrzi@gmail.com

Sasan Rahimi, MSc Student of Biology, Department of Physiology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University of Hamedan Branch, Hamedan, Iran. sasan.rrahimii@yahoo.com

***Pooria Moulavi**, MSc Student of Biotechnology, Department of Biotechnology, Faculty of Basic Science, Islamic Azad University of North Tehran, Tehran, Iran (*Corresponding author). pooriamoulavi@yahoo.com

Abstract

Background: Various studies have shown that plant extracts may have cytotoxic effects on cancer cells. The aim of this study was to determine the effects of *Rhamnus frangula miller* leaf on viability of breast cancer cells in cell culture.

Methods: In this laboratory experimental study breast cancer cell line (MCF-7) was used. MCF cells were cultured in RPMI 1640 culture medium containing 10% fetal bovine serum and 100 unit/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin and were kept in incubator at 37 C and at pressure of 5% CO₂. The cells were randomly divided into control group and groups exposed to 10, 1, 0.1, 0.01 and 0.001 mg/ml of *Rhamnus frangula* leaf extract. Viability of cells was assayed using MTT test. The data were analyzed using ANOVA.

Results: There was no significant difference between viability of MCF7 cells in group exposed to 0.001 mg/ml of extract and control group. However, viability of MCF7 cells significantly decreased in groups exposed to 0.01, 0.1, 1 and 10 mg/ml of extract compared with control group (p<0.05).

Conclusion: Our findings indicated that low dose of the *Rhamnus frangula* leaf extract has no significant cytotoxic effect on MCF-7 cells. However, high doses of extract of have cytotoxic effects on MCF-7 cells.

Keywords: *Rhamnus frangula miller*, Viability, Cytotoxicity, MCF-7