IranJPP
Iranian Journal of
Physiology and Pharmacology

مجله فیزیولوژی و فارماکولوژی ایران

۲ (۱)، ٦٦- ۵۹ بهار ۱۳۹۷

مقاله پژوهشی

ارزیابی خاصیت آنتی اکسیدانی و سمیت سلولی عصاره اتانولی گل شاهدانه (*Cannabis sativa*) بر روی سرطان پستان رده سلولی MDA-MB-231

بابک باباخانی*[۱]، هدیه پروانه[۲]

۱. گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن، تنکابن
۲. گروه زیست سلولی و مولکولی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن، تنکابن

دریافت: ۳ مهر ۹۵ پذیرش: ۲۵ دی ۹۵

چکیده

مقدمه: سرطان سینه دومین سرطان شایع در خانمها است. فرآورده‌های طبیعی استخراج شده از گیاهان دارویی می‌تواند نقش مهمی در درمان سرطان داشته باشند. این مطالعه به منظور بررسی خاصیت آنتی اکسیدانی و سمیت سلولی عصاره اتانولی گیاه شاهدانه بر رده سلولی سرطانی سینه انجام شده است.

روش ها: پس از کشت و تکثیر رده سلولی MDA-MB-231، سلول‌ها در مجاورت غلظت‌های مختلف عصاره اتانولی شاهدانه (µg/ml ۲۰۰ و۱۰۰، ۵۰، ۲۵) قرار گرفتند و به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت انکوبه شدند. سپس جهت تعیین سمیت سلولی عصاره از روش آزمون رنگ سنجی MTT استفاده شد. همچنین میزان کل فنل، فلاونوئید، آنتوسیانین،کاروتنوئید و فعالیت آنتی اکسیدانی به روش به دام اندازی رادیکال دی فنیل پیکریل هیدرازیل (DPPH) نیز اندازه‌گیری شد.

یافته ها: نتایج نشان داد که عصاره اتانولی در غلظت‌های مختلف، رشد سلول‌ها را به طور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل کاهش داد ($p < ۰/۰۵$). بالاترین درصد مهار رشد به میزان ۹۶/۹۹ درصد در غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره بدست آمد. عصاره گیاه شاهدانه غنی از ترکیبات آنتی اکسیدان از جمله مقادیر بالایی از فنل و کاروتنوئید می باشد که به ترتیب معادل ۰/۱۲ ± ۲۹/۹۴ میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم وزن خشک گیاه، و ۰/۱۸ ± ۳۱/۹۳ میلی‌گرم گالیک اسید بر وزن مرطوب گیاه بدست آمد. همچنین غلظت‌های مختلف این گیاه تاثیر معنی‌داری بر مهار رادیکال DPPH دارد به طوری که بیشترین اثر مهاری (۵۱٪) در غلظت ۳/۲ میلی‌گرم در میلی لیتر عصاره مشاهده گردید.

نتیجه‌گیری: عصاره اتانولی گیاه شاهدانه دارای خاصیت آنتی اکسیدانی و سمیت سلولی قابل توجهی علیه رده سلولی MDA-MB-231 می‌باشد. مطالعات بیشتر نیاز است تا اثر ضد سرطانی اجزای تشکیل دهنده عصاره مشخص گردد.

واژه های کلیدی: آنتی اکسیدان، آزمون MTT، رده سلولی MDA-MB-231، شاهدانه

مقدمه

سرطان، بعد از بیماری‌های قلبی، دومین عامل مرگ و میر در جهان محسوب می‌شود و سالانه حدود میلیون‌ها نفر در جهان به آن مبتلا می‌شوند. سرطان پستان شایع‌ترین سرطان در خانمهای ۴۰ تا ۴۴ ساله می‌باشد. این سرطان مسئول ۳۳ درصد تمام سرطان‌های خانمها و ۲۰ درصد مرگ ناشی از سرطان می‌باشد. شیوع سرطان پستان در کشورهای در حال توسعه در حال افزایش است و در بسیاری از نقاط دنیا به صورت شایع‌ترین بیماری بدخیم در بین بانوان در آمده است [۱]. درمان‌های امروزی آن اغلب چندان موثر نبوده و با اثرات جانبی نامطلوب همراه هستند. بنابراین با در نظر گرفتن عدم پاسخ مطلوب به درمان و رشد سریع بیماری تلاش برای یافتن داروهای موثرتر با سمیت کمتر ضروری است. به کمک پیشرفت‌های تکنولوژی در بیوانفورماتیک و تکنیک‌های

* نویسندهٔ مسئول مکاتبات: B.Babakhani94 @yahoo.com
وبگاه مجله: http://ijpp.phypha.ir
پست الکترونیکی: ijpp@phypha.ir

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2025-05-23]

مولکولی، اطلاعات زیادی بدست آمده است که در تشخیص زودهنگام بیماری سرطان کمک خواهد کرد. همچنین غربالگری به موقع برای بعضی از سرطان‌ها کمک موثری در تشخیص زودرس آن می‌نماید [۲]. امروزه تلاش‌های فراوانی جهت یافتن روش‌های مناسب برای درمان این بیماری صورت گرفته که از جمله می‌توان به کشف داروهای جدید ضد سرطان (که بیش از نیمی از آنها از گیاهان استخراج شده‌اند) اشاره نمود. در دهه‌های اخیر، گیاهان به عنوان یکی از منابع اصلی مواد فعال بیولوژیکی، برای تهیه داروهای طبیعی جهت درمان سرطان اهمیت جهانی پیدا کرده‌اند [۳]. عقیده بر این است که اثرات ضد سرطانی گیاهان از طریق مهار آنزیم‌های محرک سرطان، کمک به ترمیم DNA، تحریک تولید آنزیم‌های ضدتوموری در سلول، افزایش ایمنی بدن و القای اثرات آنتی‌اکسیدانی ایجاد می‌شوند [۲].

شاهدانه (Cannabis sativa L) گیاهی یک ساله، دو پایه و از شاخهٔ نهاندانگان و خانوادهٔ Cannabinaceae است. برگ‌های این گیاه پنجه‌ای با پنج تا هفت برگچه دندانه‌دار می‌باشد. گیاه شاهدانه در سراسر جهان پراکندگی دارد و در ایران در مناطق شمالی، اراک، کرمان و کاشان می‌روید. بر اساس تحقیقات گزارش شده ترکیبات مختلفی از جمله فلاونوئیدها، آلکالوئیدها، روغن‌های فرار، مونوترپن‌ها و سزکوئی‌ترپن‌ها از گیاه شاهدانه شناسایی و جداسازی شده است [۴]. گیاه شاهدانه در مناطق مختلفی از ایران به صورت خودرو می‌روید و تاکنون مطالعه مدونی در مورد اثرات ضد سرطانی این گیاه در ایران صورت نگرفته است. هدف اصلی از انجام این تحقیق بررسی محتوای آنتی اکسیدانی عصاره گیاه شاهدانه بومی ایران، اثر مهاری آن بر رشد سلول‌های سرطان سینه و وجود همبستگی احتمالی بین میزان آنتی اکسیدانها و اثر مهار رشد سلولی است تا شاید بتوان بهره برداری اقتصادی از این گیاه صورت گیرد و در آینده امیدوار بود که از این گیاه به عنوان یک داروی ضد سرطان بدون داشتن عوارض جانبی استفاده کرد.

مواد و روش‌ها

گیاه شاهدانه از منطقه بجنورد جمع‌آوری و سپس در سایه و در مجاورت هوا خشک و آسیاب گردید. به منظور استخراج عصاره شاهدانه از روش سوکسله و از حلال اتانول استفاده شد. مقدار۳۰ گرم از نمونه در ۳۰۰ میلی‌لیتر اتانول در دمای ۵۰ درجه سانتیگراد به مدت ۴ تا ۵ ساعت خیسانده شد. سپس عصاره صاف شده و در دمای کمتر از ۴۰ °C توسط دستگاه روتاری حلال آن تبخیر گردید. باقیمانده برای انجام آزمایشات در یخچال با درجه حرارت ۴ °C نگهداری شد [۵].

برای سنجش میزان آنتوسیانین مقدار ۰/۰۲ گرم از گیاه خشک با ۴ میلی‌لیتر محلول اسید کلریدریک ۱٪ حاوی متانول در یک هاون چینی ساییده شد. محلول حاصل به مدت ۲۴ ساعت در یخچال نگهداری شد. سپس محلول به مدت ۱۰ دقیقه و در ۱۳۰۰۰ دور سانتریفوژ گردید. فاز رویی را برداشته و جذب محلول ها در طول موج ۵۳۰ و ۶۵۷ نانومتر نسبت به شاهد اندازه‌گیری شد. از ۴ میلی‌لیتر محلول اسید کلریدریک ۱٪ متانول به عنوان شاهد استفاده شد. میزان آنتوسیانین برای هر عصاره با استفاده از معادله زیر محاسبه گردید [۶]:

$$A = A_{530} - (۰/۲۵ \times A_{657})$$

A : جذب محلول (اعداد اندیس نشانگر طول موج‌هایی است که جذب در آنها اندازه‌گیری شد.

جهت اندازه‌گیری میزان فنل گیاه، مقدار ۰/۱ گرم از گیاه در ۵ میلی‌لیتر اتانول در یک هاون چینی سابیده شد. سپس به مدت ۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور سانتریفیوژ گردیدد و فاز رویی برای سنجش فنل کل مورد استفاده قرار گرفت. در مرحله بعد از فاز رویی مقدار ۱۰۰ میکرولیتر برداشته و ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر، ۲ میلی‌لیتر کربنات سدیم ۲ درصد و ۱۰۰ میکرولیتر معرف فولین اضافه گردید. مخلوط حاصل به خوبی ورتکس و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای محیط نگهداری شد. جذب محلول‌ها در طول موج ۷۲۰ نانومتر نسبت به شاهد اندازه‌گیری شد. گالیک اسید به عنوان استاندارد برای رسم منحنی استاندارد استفاده شد. محتوای فنل کل عصاره‌ها بر اساس میلی‌گرم معادل گالیک اسید بر گرم وزن خشک گیاه گزارش شد [۷].

برای سنجش میزان فلاونوئید کل به ۵۰۰ میکرولیتر از عصاره ۱/۵ میلی‌لیتر اتانول، ۱۰۰ میکرولیتر آلومینیوم کلراید (۱۰ درصد)، ۱۰۰ میکرولیتر استات پتاسیم ۱ مولار و ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه شد. جذب مخلوط پس از گذشت ۴۰ دقیقه در طول موج ۴۱۵ نانومتر نسبت به شاهد اندازه‌گیری شد. برای رسم منحنی استاندارد از کوئرستین استفاده شد. میزان فلاونوئید کل عصاره بر اساس میلی‌گرم معادل کوئرستین بر گرم وزن خشک گیاه گزارش شد [۸].

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2025-05-23]

برای اندازه‌گیری میزان کاروتنوئید کل مقدار ۰/۰۵ گرم از بافت تازه گیاه با ۵ میلی‌لیتر استون در یک هاون چینی در حمام یخ هموژن شد. سپس به هموژنات حاصل ۱ گرم سولفات سدیم بدون آب افزوده شد و با استفاده از کاغذ صافی، صاف گردید و محلول صاف شده با استون به حجم ۱۰ میلی‌لیتر رسانده شد. سپس محلول به مدت ۱۰ دقیقه و در ۲۶۰۰ دور سانتریفوژ گردید. فاز رویی را برداشته و جذب محلول در طول موج‌های ۶۶۲، ۶۴۵ و ۴۷۰ نانومتر نسبت به شاهد اندازه‌گیری شد. از استون به عنوان شاهد استفاده شد. میزان کاروتنوئید عصاره با استفاده از فرمول‌های زیر محاسبه گردید [۹]:

$$C_a = ۱۱/۲۴\ A_{۶۶۲} - ۲/۰۴\ A_{۶۴۵}$$
$$C_b = ۲۰/۱۳\ A_{۶۴۵} - ۴/۱۹\ A_{۶۶۲}$$
$$C_t = ۱۰۰۰\ A_{۴۷۰} - ۱/۹\ A\ C_a - ۶۳/۱۴ C_b\ /\ ۲۱۴$$

C_a: میزان کلروفیل a C_b: میزان کلروفیل b C_t: میزان کاروتنوئید کل

به منظور تعیین فعالیت به دام اندازی رادیکال دی فنیل پیکریل هیدرازیل (DPPH) غلظت‌های مختلف عصاره با ۲ میلی‌لیتر محلول اتانولی ۰/۰۰۴ درصد DPPH مخلوط شد. محلول کنترل شامل ۲ میلی‌لیتر DPPH و ۲ میلی‌لیتر اتانول است. محلول‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی و در دمای اتاق نگهداری شدند. سپس جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۱۷ نانومتر نسبت به شاهد اندازه‌گیری شد. درصد مهار رادیکال آزاد (I%) هر عصاره به کمک فرمول زیر تعیین شد:

$$\%I = (A_{control} - A_{sample}) / A_{control} \times 100$$

بر اساس اطلاعات حاصل IC_{50} عصاره از منحنی درصد مهار در مقابل غلظت‌های مختلف عصاره بدست آمد. با محاسبه‌ی IC_{50}برای اسیدآسکوربیک به عنوان استاندارد و با استفاده از فرمول زیر، داده‌ها بر اساس فعالیت آنتی‌اکسیدانی معادل آسکوربیک اسید (AEAC) بیان شدند [۱۰]:

$$AEAC\ (mgAA/g\ dw) = (IC_{50}\ ascorbate/IC50\ sample) \times 1000$$

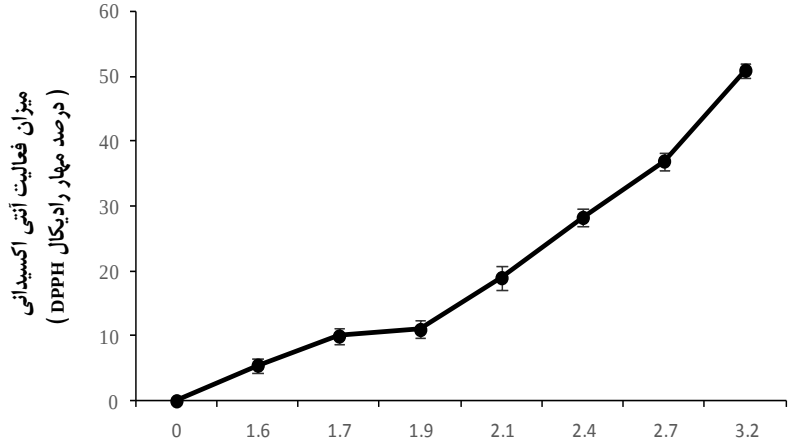
رده سلولی MDA-MB-231 از انستیتو پاستور ایران خریداری شد. این رده سلولی در محیط حاوی RPMI 1640 غنی شده با سرم جنین گاوی (FBS) ۱۰ درصد و آنتی‌بیوتیک‌های استرپتومایسین (۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر) و پنی‌سیلین (۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر) در انکوباتور کشت سلول، در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد، ۵ درصد CO_2 و رطوبت ۹۵ درصد، کشت و نگهداری شد. برای این منظور مقدار ۴۵ میلی‌لیتر از محیط کشت RPMI 1640، ۴/۵ میلی‌لیتر سرم FBS و ۵۰۰ میکرولیتر آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین/ استرپتومایسین (جهت جلوگیری از رشد قارچ) با هم مخلوط شدند تا محیط کشت کامل برای رشد رده سلولی در آن فراهم شد. تمام مراحل فوق در زیر هود لامینار و در محیطی کاملاً استریل انجام گرفت. برای پاساژ دادن رده سلولی ابتدا تمام محیط کشت حاوی رده سلولی داخل فلاسک را به یک فالکون انتقال داده و آن را به مدت ۸ دقیقه با ۱۲۵۰ rpm سانتریفیوژ شد. سپس به رسوب حاصل مقدار ۵ میلی‌لیتر محیط کشت کامل اضافه شده و عمل پیپتاژ به آرامی انجام گرفت تا رسوب در محیط کشت حل شود و در نهایت بعد از شمارش سلول برای تعیین میزان تراکم آنها، به داخل یک فلاسک جدید انتقال داده شد و سپس فلاسک به انکوباتور CO_2 دار با میزان رطوبت ۹۵ درصد و دمای ۳۷ درجه انتقال داده شد.

به منظور بررسی اثر عصاره اتانولی شاهدانه بر رشد و زیستایی سلولی از آزمون رنگ سنجی MTT (۵، ۴، ۳ دی متیل تیازول ۲ – ایل ۵، ۲ دی فینیل تترازولیوم) استفاده شد. برای این منظور تعداد ۱۰۴ سلول در هر چاهک در پلیت‌های ۹۶ چاهکی قرار داده شد. بعد از ۲۴ ساعت، غلظت‌های ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی مولار از عصاره اتانولی شاهدانه به هر چاهک برای زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت اضافه شد. در هر بازه زمانی، جذب نمونه‌ها توسط دستگاه الایزا در طول موج ۵۴۰ نانومتر مورد بررسی قرار گرفت. درصد زیستایی توسط فرمول زیر محاسبه شد [۱۱]:

درصد زیستایی = OD نمونه / OD کنترل × ۱۰۰

جهت آنالیز آماری داده ها از روش آنالیز واریانس یک عامله استفاده شد. در صورت معنی‌دار بودن نتیجه آنالیز واریانس، از آزمون دانکن برای مقایسات زوجی و همچنین نمودارهای مقایسه‌ای استفاده می‌گردید. آنالیزهای ذکر شده در نرم افزارهای SAS صورت گرفته و نمودارها در نرم افزار Excel ترسیم گردید. همچنین از نرم افزار SPSS برای محاسبه ضریب همبستگی بین مشخصه‌ها استفاده می‌شود.

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2025-05-23]



نمودار ۱- تاثیر غلظت‌های مختلف عصاره اتانولی گیاه شاهدانه بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی به روش DPPH. هر نقطه نشان دهنده میانگین ± انحراف استاندارد می باشد.

نتایج

فعالیت آنتی اکسیدانی به روش DPP

غلظت‌های مختلف عصاره متانولی گیاه شاهدانه تاثیر معنی‌داری بر مهار رادیکال DPPH داشت به طوری که بیشترین اثر مهاری (۵۱٪) در غلظت ۳/۲ میلی‌گرم از عصاره مشاهده شد. در نهایت فعالیت آنتی‌اکسیدانی معادل ۳/۵۵ میلی‌گرم اسیدآسکوربیک بر گرم وزن خشک گیاه بدست آمد (نمودار ۱).

میزان فنل، فلاونوئید آنتوسیانین و کاروتنوئید تام

عصاره گیاه شاهدانه غنی از ترکیبات آنتی اکسیدان است و دارای مقادیر بالایی از فنل و کاروتنوئید می‌باشد که به ترتیب معادل ۰/۱۲ ± ۲۹/۹۴ میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم وزن خشک گیاه و معادل ۰/۱۸ ± ۳۱/۹۳ میلی‌گرم گالیک اسید بر وزن مرطوب گیاه بدست آمد (جدول ۱).

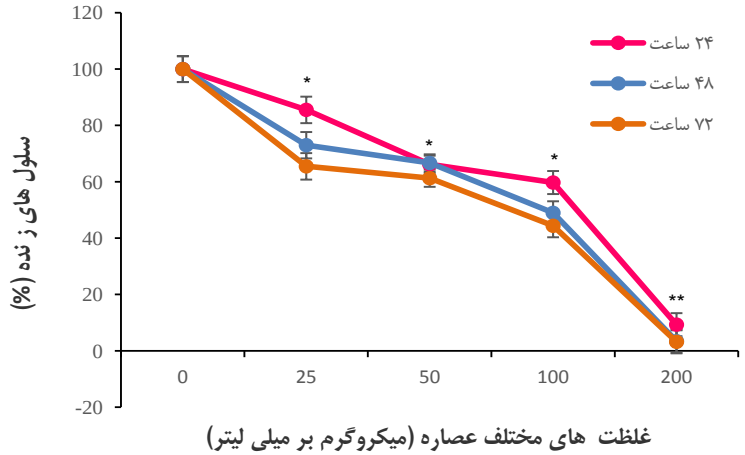
بررسی‌ها نشان داد که غلظت‌های مختلف عصاره شاهدانه توانست رشد سلول‌های سرطانی را در طی زمان‌های مختلف مهار کند و تاثیر غلظت‌های مختلف عصاره معنی‌دار بوده به طوری که با افزایش غلظت عصاره در مدت زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، درصد رشد سلول‌های زنده کاهش یافت (نمودار ۲). نتایج نشان داد که در مدت زمان ۲۴ ساعت بیشترین مهار رشد سلول‌های سرطانی در غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره ۸۵/۲۴ درصد بدست آمد. در مدت زمان ۴۸ ساعت درصد سلول‌های زنده در غلظت‌های ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصاره به ترتیب ۷۳، ۶۷ و ۴۹ درصد بدست آمد اما نکته قابل توجه در مورد درصد سلول‌های زنده در مدت ۴۸ ساعت، تأثیر زیاد غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره شاهدانه بر روی رشد سلول‌های سرطانی بود به طوری که با افزودن این غلظت از عصاره درصد سلول‌های زنده به ۳/۴۵ درصد کاهش پیدا کرد که این میزان کاهش قابل ملاحظه می‌باشد. در مدت زمان ۷۲ ساعت تأثیر غلظت‌های ۲۵ و ۵۰

جدول ۱- میزان برخی از ترکیبات آنتی اکسیدان غیر آنزیمی نظیر فنل، فلاونوئید، آنتوسیانین و کاروتنوئید کل عصاره گیاه شاهدانه.

آنتی اکسیدان تام	فنل (میلی‌گرم معادل گالیک اسید بر گرم وزن خشک گیاه)	فلاونوئید (میلی‌گرم معادل کوئرستین بر گرم وزن خشک گیاه)	آنتوسیانین (میلی‌گرم بر گرم وزن خشک گیاه)	کاروتنوئید (میلی گرم بر گرم وزن مرطوب گیاه)
میزان	۲۹/۹۴ ± ۰/۱۲	۱۱/۳۳ ± ۰/۷۳	۰/۸۲ ± ۰/۰۰۱	۳۱/۹۳ ± ۰/۱۸

داده‌ها به صورت میانگین داده‌ها ± انحراف استاندارد می‌باشند.

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2025-05-23]



نمودار ۲- تاثیر عصاره گیاه شاهدانه بر زنده مانی سلول‌های سرطانی پستان در زمان‌های مختلف به روش MTT. * تفاوت معنی دار با غلظت صفر با $p \leq ۰/۰۵$ ** تفاوت معنی دار با غلظت صفر با $p \leq ۰/۰۱$

میکروگرم بر میلی لیترعصاره بر مهار رشد سلول‌ها یکسان بوده و بیشترین درصد مهار رشد سلول‌های سرطانی در غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره ۹۶/۹ درصد بدست آمد. بنابراین، تاثیر عصاره بر رشد سلول‌ها وابسته به غلظت و زمان است و بیشترین مهار رشد سلول‌ها در غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره و در مدت زمان ۷۲ ساعت نسبت به گروه کنترل مشاهده شد. همچنین غلظت مهارکنندگی ۵۰ درصد رشد سلول‌ها (IC_{50}) برای سلول‌های سرطانی در زمان‌های ۴۸ و ۷۲ ساعت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بدست آمد.

نتایج آزمون همبستگی نشان داد که همبستگی مثبت معنی‌داری با $p < ۰/۰۵$ بین میزان مهار رشد سلول‌های سرطانی با محتوای فلاونوئید و آنتوسیانین وجود دارد. بنابراین با افزایش محتوای فلاونوئیدها و آنتوسیانین‌های موجود در عصاره شاهدانه، میزان مهار رشد سلول‌های سرطانی افزایش یافت. همچنین نتایج نشان داد که همبستگی معنی‌داری بین محتوای کاروتنوئید و فنل تام بر مهار رشد سلولهای سرطانی وجود نداشت (جدول ۲).

بحث

در سال‌های اخیر استفاده از ترکیبات طبیعی برای مقابله با سرطان با توجه به عوارض جانبی کم و تاثیرات امید بخش آن مورد توجه قرار گرفته و مطالعات متعددی جهت بررسی اثرات ضدسرطانی گیاهان دارویی و بومی در کشورهای مختلف انجام گرفته است. دارو درمانی هنوز یکی از روش‌های مورد استفاده در درمان سرطان بوده و مراکز تحقیقاتی مختلف در دنیا و ایران در تلاش دستیابی به داروهای موثر با اثر انتخابی بر سلول‌های سرطانی و اثر کمتر بر سلول‌های سالم می‌باشند. در این راستا گیاهان دارویی منبع بسیار بزرگ و امیدبخشی جهت کشف داروهای جدید می‌باشند. بنابراین گیاه دارویی شاهدانه از رویشگاه طبیعی خود جمع‌آوری و مطالعه شد. نتایج پژوهش حاضر نشان داد که غلظت‌های مختلف عصاره اتانولی گیاه شاهدانه باعث مهار رشد سلول‌های سرطانی پستان رده MDA-MBA-231 شده و رشد سلول‌ها را به طور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل کاهش می دهد. همچنین مشخص شد که عصاره شاهدانه به طور وابسته به غلظت باعث مهار رشد این سلول‌ها می گردد و بیشترین مهار سلول‌ها بعد از ۷۲ ساعت در غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره به میزان ۹۶/۹ درصد بود. علاوه براین نتایج نشان داد که عصاره شاهدانه دارای مقادیر زیادی از ترکیبات آنتی‌اکسیدان نظیر فلاونوئیدها، فنل‌ها، کاروتنوئیدها و آنتوسیانین می‌باشد و همبستگی مثبت معنی‌داری بین ترکیبات فلاونوئیدی و آنتوسیانینی با مهار رشد سلول‌های سرطانی وجود دارد به طوری که با افزایش این ترکیبات در گیاه مهار رشد سلول‌ها افزایش می‌یابد. این ترکیبات ممکن است چرخه سلولی را مهار کرده و مانع همانندسازی DNA شوند و یا مسیر داخلی و یا خارجی آپوپتوز را فعال کنند [۱۳و ۱۲]. مطالعات قبلی نشان داده است که ترکیبات آنتی‌اکسیدان مثل فنولیک اسیدها، پلی‌فنل‌ها و فلاونوئیدها رادیکال‌های آزادی نظیر

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2025-05-23]

جدول ۲- ضریب همبستگی بین مهار رشد سلول‌های سرطانی و برخی ترکیبات آنتی‌اکسیدانی غیر آنزیمی گیاه شاهدانه.

	محتوای فنل	محتوای فلاونوئید	محتوای آنتوسیانین	محتوای کاروتنوئید	مهار رشد سلول‌های سرطانی
مهار رشد سلول‌های سرطانی	۰/۲۷۸	۰/۷۵۵*	۰/۶۸۱*	۰/۵۴۷	۱
محتوای کاروتنوئید	۰/۱۶۰	-۰/۷۱۵*	۰/۰۳۸	۱	
محتوای آنتوسیانین	۰/۱۴۶	۰/۶۷۲*	۱		
محتوای فلاونوئید	۰/۲۲۱	۱			
محتوای فنل	۱				

* همبستگی معنی‌دار با $p \leq ۰/۰۵$.

هیدروپراکسید، سوپراکسید و پراکسیدهیدروژن را پالایش می‌کنند و فرآیندهای اکسیداتیو مسبب آسیب و جهش ژنومی را مهار می کنند. فلاونوئیدها به طور عمده فرآیندهای ایمنی و سلولی مرتبط با گسترش و پیشرفت سرطان مثل تکثیر سلولی، تمایز سلولی و ایجاد رگ‌های جدید را مانع می‌شوند [۳]. گزارشهای دیگری نشان دادند که فلاونوئیدهای پلی‌هیدروکسیله و کوئرستین، رشد سلول‌های سرطانی را در شرایط آزمایشگاهی مهار کرده و ساخت DNA را به میزان ۱۴ درصد نسبت به گروه کنترل کاهش می‌دهند و مانع عبور سلول از مرحله G_1 چرخه سلولی به مرحله S می‌گردند [۱۴]. همچنین بررسی‌ها نشان داده است که شاهدانه حاوی ترکیبات کانابینوئیدی می‌باشد که دارای اثرات سایتوتوکسیک است. کانابینوئیدها ترکیبات ترپنوفنولیک هستد که می‌توانند از طریق فعال‌کردن مسیر آپوپتوز وابسته به اتوفاژی و فعال کردن فاکتور رونویسی BOX_2 باعث القا مسیر آپوپتوز و کاهش رشد سلول‌های توموری شوند [۱۶ و ۱۵]. اگرچه بر حسب اطلاع ما مطالعه در زمینه اثرات سیتوتوکسیک عصاره شاهدانه بسیار اندک است اما گزارشات زیادی نشان داده‌اند که عصاره‌های گیاهی، اثرات ضد سرطانی متفاوتی را در سرطان‌های مختلف و حتی بر روی یک رده سلولی یکسان از خود نشان می‌دهند. در اکثر این تحقیقات یک همبستگی بین میزان ترکیبات فنلی و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها با تأثیر آنها بر سلول‌های سرطانی وجود دارد. این ترکیبات از مسیرهای مختلفی بر سلول‌های سرطانی اثر می‌گذارند به طوری که در اکثر مطالعات، ترکیبات موجود در عصاره گیاهی باعث القاء آپوپتوز در سلول‌های سرطانی می‌شوند که این اثر از طریق افزایش بیان ژن کاسپاز ۳ صورت می‌گیرد. همچنین ترکیبات موجود در عصاره دارای خاصیت سیتوتوکسیک هستند و از این طریق باعث مرگ سلول سرطانی می‌شوند. در برخی از گزارشات نیز ترکیبات موجود در عصاره باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان نظیر سوپراکسید دسموتاز، کاتالاز، گلوتاتیون پراکسیداز و ترکیبات آنتی‌اکسیدان غیر آنزیمی شده و از این مسیر باعث از بین رفتن رادیکال‌های آزاد و در نتیجه کاهش تولید سلول‌های سرطانی جدید می‌شوند [۱۷، ۱۸ و ۱۹]. در تحقیق حاضر مسیرهای بیوشیمیایی و مکانیسم عمل عصاره شاهدانه در مهار سلول‌های سرطان پستان مورد بررسی قرار نگرفته است بنابراین در این مورد نمی‌توان اظهار نظر کرد، اما در این پژوهش مشخص شد که عصاره شاهدانه حاوی مقدار زیادی از ترکیبات آنتی‌اکسیدان است و همبستگی مثبت معنی-دار بین فلاونوئیدها و آنتوسیانین موجود در عصاره با مهار رشد سلول‌های سرطانی می‌تواند نشان دهنده این باشد که این ترکیبات احتمالاً از طریق یکی از مسیرهای ذکر شده باعث مهار رشد سلول‌های سرطانی می‌شوند.

نتیجه‌گیری

در مجموع عصاره اتانولی گیاه شاهدانه دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی و اثرات مهاری بر روی سلول‌های سرطان سینه رده MDA-MB-231 می‌باشد. به نظر می‌رسد که اثرات ضد سرطانی این گیاه مربوط به حضور متابولیت‌های ثانویه به‌خصوص فلاونوئیدها و ترکیبات آنتوسیانینی است. بنابراین شاید بتوان با مطالعات فارماکولوژی بیشتر در آینده از ترکیبات این گیاه به عنوان یک داروی ضد سرطان بدون داشتن عوارض جانبی استفاده کرد.

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2025-05-23]

سپاسگزاری

از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن به خاطر حمایت از این مطالعه تقدیر و تشکر می‌شود.

تعارض در منافع

نویسندگان این مقاله تعارض در منافع ندارند.

سهم نویسندگان

ب.ب.: انجام مطالعه و نگارش مقاله و ایده، طراحی، نظارت بر حسن اجرای مطالعه و نگارش مقاله; ه.پ: مشاوره و اجرای بخشی از مطالعه.

فهرست منابع

[1] Harirchi I, Kolahdoozan S, Karbakhsh M, Chegini N, Mohseni SM, Montazeri A, Momtahen AJ, Kashefi A, Ebrahimi M, Twenty years of breast cancer in Iran: down staging without a formal screening program. ***Ann Oncol*** 22 (2011) 93-97.

[2] Singh P, Raj R, Kumar V, Mahjan MP, Bedi PMS, Kaur T, 1, 2, 3-Triazole tethered b-lactam-chalcone bifunctional hybrids: synthesis and anticancer evaluation. ***Eur J Med Chem*** 47 (2012) 594-600.

[3] Sirvastava V, Negi AS, Kumar JK, Gupta MM, Khanuja SP, Plant-based anticancer molecules: a chemical and biological profile of some important leads. ***Bioorg Med Chem*** 13 (2005) 5892-5908.

[4] Souza DC, Abi-saab WM, Madonick S, Forselius-Bielen K, Doersch A, Braley G, Delta-9-tetrahydro canabinol effect in schizophrenia: implications for cognition psychosis and addiction. ***Biol Psychiatry*** 57 (2005) 594-608.

[5] Pourmorad F, Hosseinimehr SJ, Shahabimajd N, Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants. ***African J Biotechnol*** 5 (2006) 1142-1145.

[6] Mita S, Murano N, Akaike M, Nakamura K, Mutants of Arabidopsis thaliana with Pleiotropic Effects on the Expression of the Gene for Beta-amylase and on the Accumulation of Anthocyanin Those are Inducible by Sugars. ***Plant J*** 11 (1997) 841-851.

[7] Meda A, Lamien CE, Romito M, Millogo J, Nacoulma OG, Determination of the total phenolic, flavonoid and pralin contents in Burkinafasan honey, as well as their scavenging activity. ***Food Chem*** 91 (2005) 571-577.

[8] Chang C, Yang M, Wen H, Chern J, Estimation of total flavonoid content in Propolis by two complementary colorimetric methods. ***Food Drug Anal*** 10 (2002) 178-182.

[9] Lichtenthaler, HK, Chlorophylls and carotenoids; pigments of photosynthetic membranes. ***Methods Enzymol*** 148 (1987) 350-382.

[10] Miliauskas G, Venskutonis PR, Vanbeek TA, Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. ***Food Chem*** 85 (2004) 231-237.

[11] Sitiasma MJ, Al-jamal H, Yong-Ang CH, Matasan J, Seeni A, Johan MF, Apoptosis induction in MV4-11 and K562 human leukemic cells by *Pereskia sacharosa* (Cactaceae) leaf crude extract. ***APJCP*** 15 (2014) 475-481.

[12] Kandaswami C, Lee LT, Lee PP, Hwang JJ, Ke FC, Huang YT, Lee MT, The antitumor activities of flavonoids. ***In vivo*** 19 (2005) 895-909.

[13] Ren W, Flavonoids: promising anticancer agents. ***Med Res Rev*** 23 (2003) 519-534.

[14] Yoshida M, Sakai T, Hosokawa N, Marui N, Matsumoto K, Fujioka A, Nishino H, Aoike A, The effect of quercetin on cell cycle progression and growth of human gastric cancer cells. ***FEBS letters*** 260 (1990)10-13.

[15] Velasco G, Hernández-Tiedra S, Dávila D, Lorente M, The use of cannabinoids as anticancer agents. ***Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry*** 64 (2016) 259–266.

[16] Sakarkar DM, Deshmukh VN, Ethnopharmacological review of traditional medicinal plants for anticancer activity. ***Int J Pharm Tech Res*** 3 (2011) 298-308.

[17] Davoodi R, Esmaeilzade Behabadi S, Najafi Sh, Mazaheri Naeeini M, Effect of hydro alcoholic extract of *Citrullus colocynthis* fruit on caspase 3 gene expression in MCF-7 breast cancer cell line. ***J Shahid Sadoughi Univ Med Sci*** 23 (2015) 508-5018.

[18] Mohammadi A, Baradaran B, Apoptotic effect of the *Urtica dioica* plant extracts on breast cancer cell line (MDA-MB-468). ***J Ardabil Univ Med Sci*** 15 (2015) 283-290.

[19] Suphachai C, Antioxidant and anticancer activities of *Moringa oleifera* leaves. ***J Med Plant Res*** 8 (2014) 318-325.

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2025-05-23]

Research paper

Evaluation of antioxidant activity and cytotoxicity of an ethanol extract of *Cannabis sativa* on human breast cancer MDA-MB-231 cell line

Babak Babakhani[*1], Hedyeh Parvaneh[2]

[1]*Department of Biology, Islamic Azad University, Tonkabon Branch, Tonkabon, Iran*

[2]*Department of Cellular and Molecular Biology, Islamic Azad University, Tonkabon Branch, Tonkabon, Iran*

Received: 24 September 2016 Accepted: 14 January 2017

Abstract

Introduction: Breast cancer is the second most common cancer in the women. Natural products extracted from medicinal plants can play an important role in cancer treatment. This study investigated antioxidant and cytotoxic activity of an ethanol extract of *Cannabis sativa* in a human breast cancer cell line.

Methods: MDA-MB-231cell line was cultivated and proliferated. Then, the cells exposed to different concentrations of *C. sativa* (25, 50, 100 and 200 µg/ml) and were incubated for 24, 48, and 72 hours. After the incubation period, the colorimetric MTT method was used to determine cytotoxicity. The total phenol, flavonoid, anthocyanin, and carotenoid contents of the extract as well as the antioxidant activity using DPPH method were determined.

Results: The ethanol extract significantly decreased growth of cells compared to control ($p < 0.05$). The maximum growth inhibition obtained 96.99% at the concentration 200 µg/ml. The extract of *C. sativa* is a rich source of antioxidant compounds. The phenol and carotenoid compounds of the extract were equal to 29.94 ± 0.12 mg galic acid/g of dried weight, and 31.93 ±0.18 mg galic acid/g of wet weight of the plant, respectively. Furthermore, the extract significantly inhibited DPPH radicals and the highest inhibitory effect (51%) was obtained by 2.3 mg/ml of the extract.

Conclusion: These results suggest that the ethanol extract of *Cannabis sativa* has significant antioxidant and cytotoxic activity against MDA-MB-231 cell line. Further studies are needed to clarify potential anticancer effects of its ingredients.

Keywords: Antioxidant, *Cannabis sativa*, MDA-MB-231 cell line, MTT assay

Please cite this article as follows:
Babakhani B, Parvaneh H, Evaluation of antioxidant activity and cytotoxicity of an ethanol extract of *Cannabis sativa* on human breast cancer MDA-MB-231 cell line. ***Iran J Physiol Pharmacol*** 1 (2018) 59-66.

*Corresponding author e-mail: B.Babakhani94 @yahoo.com
Available online at: http://ijpp.phypha.ir
E-mail: ijpp@phypha.ir

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2025-05-23]