



Cytotoxic effect of methanolic extracts of vegetative and reproductive parts of *Vinca rosea* on A431, a human skin squamous carcinoma cell line

Yalda Khazaei Poul¹, Ahmad Majd², Farzaneh Labibi³, Taraneh Moini zanjani^{1*}

1. Dept. of Pharmacology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

2. Dept. of Biology, Kharazmi University, Tehran, Iran

3. Dept. of Immunology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Received: 4 May 2014

Accepted: 22 Aug 2014

Abstract

Introduction: *Vinca rosea*, an important medicinal plant, is well-known for its anticancer properties especially against breast cancer. In this study, we compared the cytotoxic effects of methanolic extracts of the vegetative (young and old leaves) and reproductive (flowers) organs of this plant on a human squamous cell carcinoma using MTT assay.

Methods: The cytotoxic effects of *Vinca rosea*'s methanolic extracts of young and old leaves as well as flowers were assessed on A431, a human skin squamous carcinoma cell line using different concentrations. To compare the cytotoxicities, cells without being exposed to extracts were used as control. Cells were incubated with plant extracts in triplicate in 96 wells microplates and cytotoxicity was determined by the MTT assay. The experiments were repeated 4 times and IC₅₀ values were calculated. Cell viability was also evaluated by trypan blue staining.

Results: A time dependent decrease in IC₅₀ values of extracts was observed during the experimental period, and a significant inhibition in cell proliferation was observed after the exposure of cells to the reproductive part of the plant (flower) after 48 hours of incubation.

Conclusion: The results of this study showed that the reproductive part of the plant is more effective in reducing cell proliferation compared to the vegetative organ. Moreover, the incubation time can influence the IC₅₀ value and the antiproliferative activity of the methanolic extract of *Vinca rosea*'s reproductive part.

Key words: *Vinca rosea*, methanolic extract, A431 cell line, MTT assay

* Corresponding author e-mail: tzanjani@yahoo.com
Available online at: www.phypha.ir/ppj

مطالعه اثرات سمیت سلولی عصاره متانولی اندام های رویشی و زایشی گیاه پروانش (وینکا روزآ) بر رده سلولی A431 سرطان پوست انسان

یلدا خزایی پول^۱، احمد مجد^۲، فرزانه لیبی^۳، ترانه معینی زنجانی^{*۱}
۱. گروه فارماکولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران
۲. گروه زیست شناسی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران
۳. گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران
دریافت: ۱۴ اردیبهشت ۹۳ پذیرش: ۳۱ مرداد ۹۳

چکیده

مقدمه: گیاه وینکا روزآ از زمان های بسیار دور به عنوان یک گیاه دارویی مهم مورد توجه فراوان بوده است و دارای اثرات ضد سرطانی به خصوص در سرطان پستان می باشد. در این پژوهش مقایسه اثر ضد سرطانی عصاره متانولی در دو اندام رویشی (برگ های جوان و مسن) و زایشی (گل) گیاه وینکا روزآ، بر رده سلولهای سرطانی پوست A431 به روش MTT در شرایط آزمایشگاهی بررسی شده است.

روش ها: تاثیر سمیت سلولی عصاره متانولی برگ های جوان، مسن و گل گیاه وینکا روزآ در غلظت های مختلف بر رده سلولی A431 سرطان پوست انسان در ۳ گروه: گل، برگ های جوان و مسن بررسی شد. برای بدست آوردن غلظت مهاری عصاره ها از گروه کنترل (بدون عصاره)، به عنوان مقایسه بصورت سه بار تکرار در چهار زمان متفاوت انکوباسیون در پلیت های ۹۶ خانه توسط روش کالریمتری MTT استفاده شد. رنگ آمیزی تریپان بلو جهت بررسی زنده بودن سلول ها به کار برده شد.

یافته ها: کاهش در IC50 بدست آمده از عصاره های مورد آزمایش در فواصل زمانی مختلف مشاهده شد. بهترین تأثیر با کمترین غلظت IC50 در مهار تکثیر سلولها در اندام زایشی گیاه در زمان ۴۸ ساعت بدست آمد.

نتیجه گیری: نتایج این تحقیق نشان می دهد که اندام زایشی گیاه وینکا روزآ دارای اثرات مهار تکثیر سلولی موثر تری نسبت به قسمت رویشی می باشد و همچنین فاکتور زمان می تواند در کاهش غلظت IC50 و افزایش فعالیت مهار تکثیر سلول ها توسط عصاره متانولی گل موثر باشد.

واژه های کلیدی: وینکا روزآ، عصاره متانولی، رده سلولی A431، MTT

مقدمه

عصاره گیری و توصیف ترکیبات فعال در گیاهان دارویی، منتهی به کشف داروهای جدید با ارزش درمانی زیاد شده است [۱۲]. گیاه وینکا روزآ از زمان های قدیم به عنوان یک گیاه دارویی مهم مورد توجه فراوان بوده و دارای اثرات گوناگون از جمله اثرات ضد سرطانی می باشد. دو گونه از وینکا روزآ به نام های وینکا مینور و وینکا مائور می باشند که به دلیل کوچکی و رشد سریع خود به صورت گسترده به عنوان گیاهان زینتی کشت داده می شوند [۲، ۱۶] در ایران فقط گونه وینکا مینور وجود دارد. حداقل ۱۳۰ آلکالوئید از گیاهان جنس وینکا

گیاهان دارویی از منابع طبیعی بسیار مهمی هستند که از دیرباز مورد توجه بوده و برای تسکین دردها و درمان بسیاری از بیماری ها از جمله سرطان به کار برده شده اند. به مرور زمان با پیشرفت علوم، آگاهی درباره گیاهان افزایش یافته است.

tzanjani@yahoo.com

www.phypha.ir/ppj

* نویسنده مسئول مکاتبات:

وبگاه مجله:

شرکت گییکو، محیط کشت RPMI 1640، تریپسین-EDTA، پودر MTT ساخت شرکت سیگما، متانول ۱۰۰ در صد، محلول رنگ آمیزی تریپان بلو و محیط انجماد DMSO ساخت شرکت مرک بوده است.

روش تهیه نمونه ها:

نمونه های برگ های جوان، برگ های مسن و گل های گیاه وینکا روزا پس از جمع آوری، شستشو داده شده و در دمای محیط آزمایشگاه قرار گرفتند. پس از خشک شدن، نمونه ها بصورت پودر درآمده و سپس جهت جلوگیری از آلودگی میکروبی، نمونه ها به مدت یک ساعت در دمای ۱۱۰ درجه سانتی گراد در فور قرار گرفته و سپس به مدت یک شبانه روز درون یخچال گذاشته شده تا عصاره گیری به عمل آید.

روش عصاره گیری از گیاه و تهیه استوک:

به ۵۰ گرم از پودر خشک نمونه ها میزان ۵۰۰ میلی لیتر متانول خالص (۱۰۰٪) اضافه شده و جهت آمیخته شدن در انکوباتور شیکر دار در دمای ۲۰ درجه سانتی گراد و با سرعت ۵۰۰ دور در دقیقه و به مدت ۴۸ ساعت قرار گرفتند. سپس محلول حاوی نمونه های مختلف از فیلتر (کاغذ صافی) رد شده و در دمای آزمایشگاه قرار گرفته تا تبخیر شوند. پس از گذشت یک هفته، میزان یک گرم عصاره از برگ های جوان، مسن و گل گیاه به دست آمد.

به منظور تهیه استوک اولیه میزان ۵۰۰ میکروگرم از عصاره ها در ۱ میلی لیتر محیط کشت به عنوان استوک اولیه حل گشته و جهت جلوگیری از آلودگی توسط فیلتر ۰٫۲۲ میکرون استریل شدند.

کشت سلول:

در این تحقیق از رده سلولی A431 سرطان پوست انسان که از انستیتو پاستور (ایران - تهران) تهیه شد، استفاده گردید. سلول ها در محیط کشت RPMI 1640 همراه با ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (FBS) و پنی سیلین ۱۰۰ واحد بین المللی و استرپتومایسین ۱۰ میلی گرم در میلی لیتر در فلاسک استریل کشت سلولی قرار گرفته و در شرایط دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، رطوبت ۸۸ درصد و فشار ۵ درصد دی اکسید کربن - ۹۵ درصد هوا نگهداری شدند. پس از رسیدن سلول ها در حد نهایی فاز رشد، به وسیله تریپسین-EDTA جدا، سانترفیوژ شده و سپس با روش رنگ آمیزی تریپان بلو درصد

روزآ شناسایی شده است از جمله وین کرسیتین، وین بلاستین، رزوپین، رابازین و تعداد متنوع دیگری می باشد [۲۳]. طبق مطالعات ثابت شده از میان ترکیبات بی شماری که از این گیاه گزارش شده است، چهار آلکالوئید شامل ویندولین، وین کریستین، وین بلاستین و کاتارانتین با غلظت های متفاوت در بخش های هوایی گیاه وجود دارند و از میان این آلکالوئیدها دو ترکیب وین کریستین و وین بلاستین از متابولیت های ثانویه مهم گیاه بوده که امروزه به عنوان داروهای ضد سرطان استفاده می شوند [۴، ۲۰، ۲۳]. وین بلاستین آنالوگ شیمیایی وین کریستین می باشد [۱۴، ۲۴]. تحقیقات نشان می دهند که آلکالوئید های این گیاه نقش مهمی در شیمی درمانی سرطان های پیشرفته از جمله بیماری لنفای هوجکین و لوسمی حاد لنفوبلاست و سرطان پستان و ... دارد [۶، ۹، ۱۷]. برگ های گیاه وینکا روزا تا کنون به عنوان منبع غنی از آلکالوئیدهای وین کریستین و وین بلاستین، ویندولین و کاتارانتین شناسایی شده اند [۵، ۱۸]. مطالعات مختلفی انجام شده که در آن اثرات ضد میکروبی عصاره گل وینکا روزا برای درمان زخم های بیماران به اثبات رسیده است. [۲۲]، همچنین اثر ضد دیابتی آن در موش های دیابتی نیز مشخص شده است [۱، ۱۱]. از طرف دیگر سرطان پوست یکی دیگر از شایع ترین سرطان ها در دنیا می باشد و تاکنون مطالعه ای در رابطه با مقایسه عصاره قسمت های مختلف این گیاه بر سرطان پوست صورت نگرفته است، لذا هدف از این تحقیق، مقایسه اثرات سیتوتوکسیک عصاره متانولی اندام های رویشی (برگ جوان و برگ مسن) و اندام زایشی (گل) گیاه وینکا روزا بر رده سلولی A431 سرطان پوست می باشد. بر طبق مطالعات، عصاره متانولی گیاه وینکا روزا در مقایسه با سایر عصاره ها، بیشترین تاثیر در مهار رشد سلول های سرطانی را داشته، لذا از حلال متانول برای گرفتن عصاره های قسمت های رویشی و زایشی در این مطالعه استفاده گردید [۱۵].

مواد و روش ها

مواد مورد استفاده در این تحقیق شامل بافر PBS، پنی سیلین - استرپتومایسین و سرم جنین گاو (FBS) ساخت

ب) جهت مقایسه اثرات سمیت سلولی عصاره های اندام های مختلف گیاه از گروه های عصاره برگ جوان، عصاره برگ مسن و عصاره گل استفاده شد.

تمامی آزمایش ها به صورت سه بار تکرار انجام شدند. نتایج بصورت میانگین $\pm$ خطای معیار نشان داده شده است. تجزیه و تحلیل داده ها توسط نرم افزار SPSS و رسم نمودارها با استفاده از نرم افزار Excel انجام شد. برای مقایسه میانگین های گروه های مورد مطالعه از تست آماری ANOVA یک طرفه و برای مقایسه بین گروهی: از آزمون Tukey-kramer استفاده شد. $P < 0.05$ به عنوان سطح معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته ها

مقایسه مقادیر IC50 (بر حسب میکروگرم بر میلی لیتر) عصاره متانولی برگ جوان، مسن و گل بر رده سلول سرطانی A431: همانطور که در جدول ۱ مشاهده می شود، در زمان ۶ ساعت تفاوت معنی داری در غلظت IC50 در برگ های جوان و گل ها (۹,۳۷ میکروگرم بر میلی لیتر) با برگ های مسن (۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر) ($P < 0.001$ ****) ایجاد شد. در زمان ۱۲ ساعت نیز، این تفاوت بین غلظت های IC50 برگ های جوان و گل ها (به ترتیب ۹,۲۲ و ۹,۳۵ میکروگرم بر میلی لیتر) در مقایسه با برگ های مسن (۱۸,۳۵ میکروگرم بر میلی لیتر) ($P < 0.001$ ****) معنی دار بود. در زمان ۲۴ ساعت، تفاوت معنی دار بین غلظت IC50 برگ های جوان (۶,۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر) با گل ها (۴,۶۸ میکروگرم بر میلی لیتر) ($P < 0.001$ ****) نیز مشاهده شد، این تفاوت در برگ های جوان و گل با برگ مسن (۹,۳۵ میکروگرم بر میلی لیتر) ($P < 0.001$ ****) نیز معنی دار بود. در زمان ۴۸ ساعت، بین غلظت IC50 برگ های جوان، مسن (۳,۱۲ میکروگرم بر میلی لیتر) و گل ها (۲,۳۴ میکروگرم بر میلی لیتر) علیرغم کاهشی در میزان IC50 در گل ها، تفاوت معنی داری دیده نشد. از طرف دیگر بعد از گذشت ۴۸ ساعت در میزان IC50 اندام های رویشی و زایشی نسبت به زمان های قبل کاهش معنی داری ایجاد شد ($P < 0.001$ +++).

مقایسه درصد کاهش تکثیر مربوط به عصاره متانولی برگ

زنده ماندن سلول ها بدست آمد [۱۵]، به این صورت که میزان ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون یکنواخت سلولی با ۲۰ میکرولیتر از رنگ تریپان بلو ۴ درصد مخلوط و سپس ۲۰ میکرولیتر از مخلوط حاصل در زیر لام ثوبار تزریق و شمارش سلول های زنده در زیر میکروسکوپ انجام شد. در سلول های زنده به دلیل سالم بودن غشای سلول، رنگ به داخل سلول نفوذ نمی کند بنابراین شفاف دیده می شوند، در حالی که سلول های معیوب دارای رنگ آبی هستند. با استفاده از رابطه تعداد سلول های زنده / تعداد کل سلول ها $\times 100$ ، درصد زنده ماندن سلول ها محاسبه شدند.

بررسی اثر عصاره های متانولی بر روی رده

سلولی A431:

جهت بدست آوردن غلظتی از عصاره ها که باعث مهار ۵۰ درصد تکثیر سلولی می شود (IC50)، تعداد 10^4 سلول در پلیت ۹۶ خانه به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شدند. بعد از گذشت زمان ۲۴ ساعت انکوباسیون، محیط کشت خارج و غلظت های مختلف عصاره متانولی برگ های جوان، مسن و گل ها (۲۰۰ تا ۰,۳۹ میکروگرم/میلی لیتر) به سلول ها اضافه شدند. جهت بررسی اثر سمیت سلولی، عصاره ها به صورت تکرار سه تایی (تریپلیکیت) به مدت ۶، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت، در مجاورت سلول ها قرار گرفتند.

روش سنجش MTT:

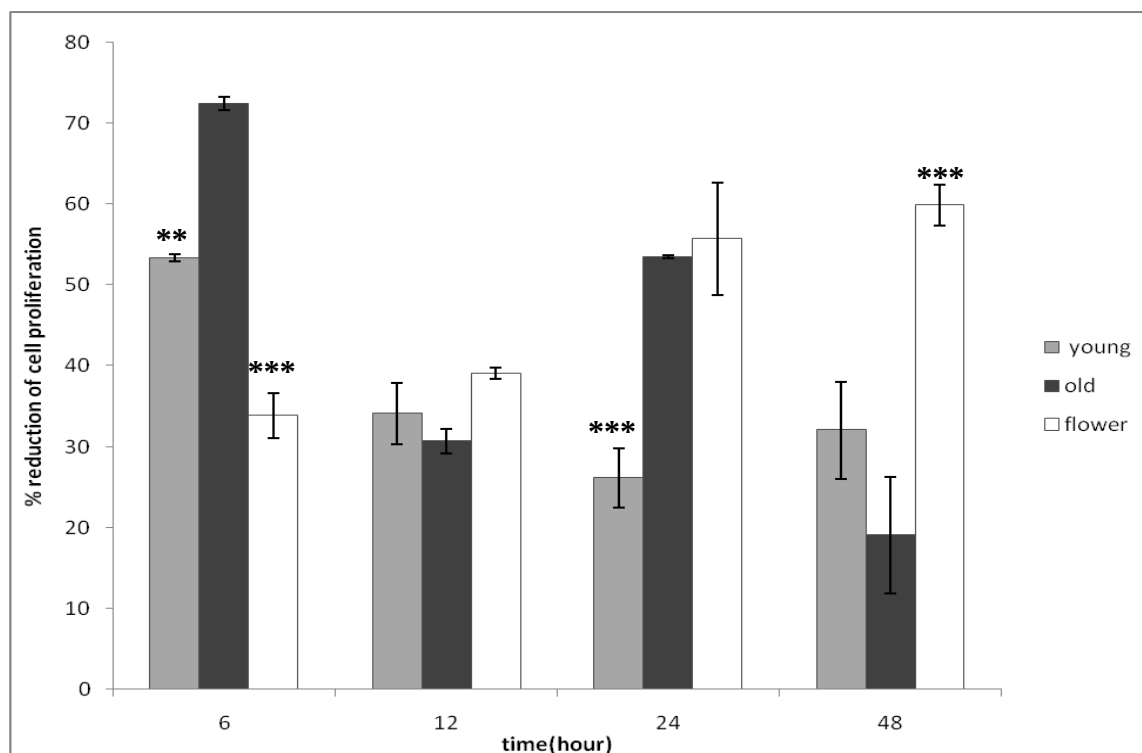
بعد از اتمام زمان های انکوباسیون، محیط حاوی عصاره ها از روی سلول ها برداشته و پس از شستشو با محلول PBS، به هر خانه ۱۰ میکرولیتر از محلول استوک MTT (۵ میلی گرم بر میلی لیتر) اضافه و به مدت ۳ ساعت در انکوباتور قرار گرفتند. سپس جهت حل شدن بلورهای های فورمازان تشکیل شده و همچنین جهت لیز کردن سلول ها، به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر اسید الکل (ایزوپروپانول) ۴ درصد اضافه شد و جذب نوری توسط دستگاه الایزا ریدر در طول موج ۵۷۰ نانومتر در برابر طول موج رفرانس ۶۳۰ نانومتر خوانده شد [۱۰].

گروه های آزمایش:

الف) جهت بدست آوردن غلظتی از عصاره ها که باعث مهار ۵۰ درصد تکثیر سلولی می شود (IC50) از گروه های عصاره برگ جوان، عصاره برگ مسن، عصاره گل و گروه کنترل که عصاره دریافت ننمودند، استفاده شد.

جدول ۱- مقایسه مقادیر IC50 (بر حسب میکروگرم بر میلی لیتر) عصاره متانولی برگ جوان، مسن و گل بر رده سلول سرطانی A431 با استفاده از تست MTT در زمانهای ۶، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت. نتایج به صورت میانگین $\pm$ خطای معیار مشخص شده اند. ($***P<0.001$) نشان دهنده اختلاف معنی دار ما بین گروه های مختلف در یک زمان مورد نظری باشد و ($+++P<0.001$) نشان دهنده تفاوت معنی دار در هر گروه در زمان ۴۸ ساعت در مقایسه با سایر زمان ها می باشد.

Time(hour)	Young leaves ($\mu\text{g/ml}$) Mean $\pm$ SEM	Old leaves ($\mu\text{g/ml}$) Mean $\pm$ SEM	Flower ($\mu\text{g/ml}$) Mean $\pm$ SEM
6	9.37 $\pm$ 0.07	50 $\pm$ 1.39***	9.37 $\pm$ 0.18
12	9.22 $\pm$ 0.12	18.35 $\pm$ 0.59***	9.35 $\pm$ 0.05
24	6.2 $\pm$ 0.10	9.35 $\pm$ 0.05***	4.68 $\pm$ 0.30***
48	3.12 $\pm$ 0.03+++	3.12 $\pm$ 0.03+++	2.34 $\pm$ 0.05+++



شکل ۱- مقایسه درصد کاهش تکثیر مربوط به عصاره متانولی برگ جوان، مسن و گل بر رده سلول سرطانی A431 با استفاده از تست MTT در زمان های ۶، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت. نتایج به صورت میانگین $\pm$ خطای معیار مشخص شده اند ($***P<0.001$) و ($**P<0.01$) نشان دهنده اختلاف معنی دار ما بین گروه های مختلف مورد آزمایش در هر یک از زمان های مورد مطالعه می باشد.

درحالی که در زمان ۴۸ ساعت بیشترین میزان کاهش تکثیر سلولی در گل ها دیده شد ($***P<0.001$). جدول ۲: مقایسه اثر گذشت زمان بر میزان کاهش درصد تکثیر سلولی عصاره های برگ جوان، مسن و گل بر رده سلول سرطان A431 در مقایسه با زمان ۶ ساعت در همان گروه. همانطور که در جدول مشاهده می شود، در برگ های جوان بین زمان ۶ با ۲۴ و ۴۸ ساعت تفاوت معنی دار مشاهده شد ($**P<0.01$). در برگ های مسن نیز بین زمان ۶ با ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت اختلاف معنی دار دیده شد ($***P<0.001$) ($*P<0.05$).

جوان، مسن و گل بر رده سلول سرطانی A431: همانطور که در شکل ۱ مشاهده می شود، درصد کاهش تکثیر سلولی در زمان ۶ ساعت در برگ های جوان و مسن به طور معنی داری در مقایسه با گل بیشتر بوده است ($***P<0.001$)، از طرف دیگر این تفاوت بین برگ های مسن و برگ های جوان نیز معنی دار بود ($**P<0.01$). در زمان ۱۲ ساعت اختلاف معنی داری بین اندام های زایشی و رویشی گیاه مشاهده نشد، اما در زمان ۲۴ ساعت بین برگ های جوان در مقایسه با برگ های مسن و گل تفاوت مشهود بوده است ($***P<0.001$).

جدول ۲- مقایسه اثر گذشت زمان بر میزان کاهش درصد تکثیر سلولی عصاره های برگ جوان، مسن و گل بر رده سلول سرطان A 431 با استفاده از تست MTT. نتایج به صورت میانگین $\pm$ خطای معیار مشخص شده است. ($P < 0.05$), ($P < 0.01$), ($P < 0.001$) و در مقایسه با زمان ۶ ساعت در همان گروه سنجیده شده است که نشان دهنده اختلاف معنی دار درون گروهی در گروه های مختلف می باشد.

Time (hour)	Young leaves Mean $\pm$ SEM	Old leaves Mean $\pm$ SEM	Flower Mean $\pm$ SEM
6	50.02 $\pm$ 0.47	71.75 $\pm$ 0.77	35.53 $\pm$ 2.78
12	39.74 $\pm$ 3.84	33.96 $\pm$ 1.5***	38.73 $\pm$ 0.69
24	25.95 $\pm$ 3.66**	53.9 $\pm$ 0.21*	55.79 $\pm$ 6.93*
48	32.06 $\pm$ 6.02**	19.71 $\pm$ 7.21***	64.84 $\pm$ 2.5**

بین زمان ۶ ساعت با زمان های ۲۴ و ۴۸ ساعت در عصاره گل نیز اختلاف معنی دار بود ($P < 0.05$) ($P < 0.01$).

بحث

در این مطالعه اثر عصاره متانولی اندام های رویشی و زایشی گیاه وینکا روزاً بر تکثیر سلولی بررسی شد. یافته های این آزمایش نشان داد که بخش زایشی گیاه تاثیر مناسبی در کاهش روند تکثیر سلول های رده A431 سرطان پوست انسان دارد. سرطان بیشترین عامل مرگ و میر در زنان و مردان می باشد. بنظر می رسد تولید داروهای ضد سرطانی با کارایی بیشتر و سمیت کمتر امری ضروری است. استفاده از گیاهان دارویی در درمان سرطان از جایگاه ویژه ای برخوردار است. در این رابطه موثر بودن بسیاری از این ترکیبات در پیشگیری و یا درمان سرطان در سلول های سرطانی کشت داده شده در آزمایشگاه مشخص شده است [۲۱]. سرطان پستان از جمله سرطان های بسیار شایع در زنان می باشد. داروهای مختلف در درمان این نوع سرطان بکار می روند [۸]. از جمله داروهای متداول در درمان این نوع سرطان داروهای با منشا گیاهی وین کریستین و وین بلاستین می باشد که از آلکالوئیدهای مهم گیاه وینکا روزاً می باشند. مطالعات نشان می دهند که این آلکالوئیدها به پروتئین توبولین در میکروتوبول ها که باعث ایجاد دوک قطبی در تقسیم میتوز می شوند، متصل شده و شکل و ساختار آنها را مهار می نمایند. هنگامیکه توبولین توسط آلکالوئید ها مهار می شود، از تقسیم سلول های سرطانی جلوگیری می شود [۹]. گزارشات حاکی از این امر است که آلکالوئیدهای گیاه وینکا روزاً بیشتر در قسمت رویشی گیاه از جمله ریشه و ساقه و برگ گیاه متمرکز شده اند [۱۳].

از میان این اندام ها، برگ های گیاه بیشترین تاثیرات فارماکولوژیک در حیطه پزشکی را دارا می باشند و بیشترین مطالعه در مورد عصاره های برگ این گیاه بوده است [۲۳] و به عنوان منبع غنی از آلکالوئیدهای وین کریستین و وین بلاستین، ویندولین و کاتارانتین شناسایی شده اند [۵، ۱۸]. از طرف دیگر گزارشات محدودی حاکی از وجود این آلکالوئید در اندام زایشی گیاه (گل) می باشد [۱۱]. تاثیر آلکالوئیدهای گیاه وینکا روزاً در سلول های سرطانی رده های مختلف و متعدد مطالعه شده است [۱۹، ۲۳]، در عین حال مطالعات در مورد سرطان پوست محدود می باشد. پوست اندامی است که بدن را در برابر آسیب و آلودگی های محیطی محافظت می کند. دو لایه اصلی پوست اپیدرم (لایه خارجی) و درم (لایه داخلی) می باشند. سرطان پوست در لایه اپیدرم که خود از سه نوع سلول تشکیل شده است شروع می شود: سلولهای اسکوآموس که شامل سلولهای پهن و نازک لایه بالای اپیدرم است، سلولهای بازال که سلولهای گرد، زیر سلولهای اسکوآموس هستند و ملانوسیتها که در لایه پائین اپیدرم قرار دارند. به طور معمول سرطان پوست در نواحی از بدن که با نور خورشید در تماس هستند مانند صورت، گردن، دستها و بازوها بیشتر اتفاق می افتد. سرطان های سلول های اسکوآموس و سلول های بازال رایج ترین انواع سرطان پوست می باشند [۳]. به دلیل گزارشات محدودی از اثرات آلکالوئیدهای وینکا در درمان سرطان پوست، در این تحقیق از سلول های سرطانی اسکوآموس رده سلولی A431 استفاده شد. نتایج این مطالعه نشان دادند که غلظت IC50 در زمان ۶ ساعت، در برگ های جوان و گل ها، یکسان بوده ولی این غلظت در برگ های مسن افزایش معنی داری را نشان داد. در زمان ۱۲ ساعت نیز هر چند بین برگ های جوان و گل ها از نظر میزان IC50

تفاوت معنی دار وجود نداشت ولی این تفاوت با عصاره برگ های مسن معنی دار بود، در عین حال در برگ های مسن در زمان ۱۲ ساعت نسبت به زمان ۶ ساعت، کاهش معنی داری از نظر میزان IC50 مشاهده شد. میزان IC50 در زمان ۲۴ ساعت در برگ های مسن در مقایسه با گل و برگ جوان افزایش معنی داری را نشان داد ولی در زمان ۴۸ ساعت این میزان در برگ های مسن، جوان و گل یکسان بود. به نظر می رسد گذشت زمان عامل مهمی در تعیین میزان IC50 باشد. از طرف دیگر در این مطالعه مشاهده شد که درصد کاهش تکثیر در برگ های مسن در زمان ۶ ساعت نسبت به برگ های جوان و گل ها بیشتر می باشد که احتمالاً به علت غلظت بالای مهار کننده در این زمان است در حالیکه بعد از ۱۲ ساعت تفاوتی در میزان کاهش تکثیر سلولی در قسمت های مختلف گیاه مشاهده نشد، ولی کاهش تکثیر بعد از گذشت ۲۴ و ۴۸ ساعت در گل ها در مقایسه با اندام رویشی گیاه بارز بوده است به نظر می رسد که قسمت زایشی گیاه تاثیر بیشتری در کاهش تکثیر سلول ها داشته باشد به عبارت دیگر هر چقدر مدت زمان انکوباسیون توسط عصاره گل ها بیشتر باشد به صورت چشمگیری کاهش در تکثیر سلول ایجاد می گردد در حالیکه در برگ های جوان و مسن گذشت زمان تاثیر چندانی بر این روند ندارد. احتمالاً کاهش تکثیر سلولی در برگ های جوان و مسن در مقایسه با گل ها در مدت زمان کمتر انکوباسیون، می تواند به علت حضور ترکیبات تانن در برگ ها باشد، مشخص شده است که تانن به میزان قابل توجهی در مرحله S از چرخه سلولی وارد عمل شده و باعث کاهش تکثیر سلول های سرطانی می گردد [۷]. این نتایج با نتایج مطالعات قبل که بر این تاکید داشتند که تنها منبع آلكالوئیدهای ایندول مونو ترپنوئیک در گیاه کاتارانتوس روزنوس در برگ ها می باشد متناقض است [۴، ۵] ولی از طرف دیگر این یافته ها با نتایج فاورتو و همکاران (۲۰۰۱) مبنی بر وجود این آلكالوئید ها در برگ ها و در گل ها مطابقت دارد [۱۷].

طبق نتایج حاصل از بررسی غلظت های IC50، در نمونه های آزمایش شده می توان به این نتیجه رسید، ظاهراً با گذشت زمان، بنظر می رسد میزان ترکیبات سیتوکسیک آزاد شده از گیاه افزایش می یابد و این امر منجر به افزایش قدرت

اثرات مهاری در تکثیر بر سلول سرطانی می گردد. از طرف دیگر با گذشت زمان، غلظت IC50 در هر سه عصاره مورد آزمایش کاهش یافته است که این نکته در برگ های مسن کاملاً مشهود می باشد و همانطور که اشاره شد دلالت بر افزایش میزان ترکیبات آنتی اکسیدان و سیتوکسیک آزاد شده در طول مدت زمان بیشتری از گیاه را دارد [۷]. با توجه به این که کمترین غلظت عصاره به کار رفته، احتمال اثر تخریبی بر روی سلول های طبیعی بدن را کاهش و از عوارض آن می کاهد، بنابراین طبق نتایج این تحقیق، کمترین غلظت در زمان ۴۸ ساعت در عصاره گل مشاهده گردید که می تواند اثر مهاری بهتری را نسبت به زمان های مختلف و همچنین نسبت به عصاره های قسمت های دیگر گیاه در درمان داشته باشد. این یافته موید این نکته می باشد که عصاره گل گیاه احتمالاً تاثیر بیشتری در اثرات درمانی گیاه داشته باشد چنانچه اثرات ضد میکربی گیاه وینکا روزا نیز در قسمت گل عمدتاً یافت شده است [۴]. گزارش شده است که بخش های مختلف گیاه حاوی غلظت های متفاوتی از آلكالوئیدها می باشند علی رقم وجود چهار آلكالوئید اصلی در برگ های گیاه، مطالعات حاکی از وجود غلظت بالایی از وین بلاستین در قسمت زایشی گیاه (گل) می باشد که از ارزش درمانی بالایی در سرطان برخوردار است [۳].

بر طبق این داده ها می توان نتیجه گرفت که قسمت زایشی گیاه کاتارانتوس روزنوس بیشترین تاثیر را از نظر قدرت کاهش تکثیر سلول های سرطانی را دارا می باشد. در این رابطه مطالعات تکمیلی در جهت شناخت ماهیت ترکیبات موجود در عصاره های متانولی اندام های رویشی و زایشی مورد نیاز می باشد و همچنین دستکاری های ژنتیک نیز احتمالاً امکان بدست آوردن ترکیبات با کارایی و تاثیر بیشتر و سمیت کمتر در پیشبرد تحقیقات در درمان سرطان و به خصوص سرطان پوست را فراهم می نماید.

سپاسگزاری

انجام این پروژه در گروه فارماکولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی میسر گردید. نویسندگان بدین وسیله مراتب تشکر و قدردانی خود را از همکاران محترم این گروه اعلام می دارند.

References

- [1] Ahmed MF, Kazim SM, Ghorri SS, Mehjabeen SS, Ahmed SP, Ali SM, Ibrahim M, Antidiabetic Activity of Vinca rosea Extracts in Alloxan-Induced Diabetic Rats. *Int J Endocrinol* 2010 (2010) 1-6.
- [2] Aslam J, Mujib A, Fatima Z, Sharma MP, Variations in vinblastine production at different stages of somatic embryogenesis, embryo, and field-grown plantlets of Catharanthus roseus as revealed by HPLC. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 46 (2010) 348-353.
- [3] Aslam J, Haque Khan S, Siddiqui Z, Fatima Z, Maqsood M, Bhat M, Nasim SA, Ilah A, Zareen A, Khan S, Mujib A, Sharma M, Catharanthus roseus (L.) An important drug: its application and production, *Pharmacie Globale (IJCP)* 4 (2010) 1-16.
- [4] Berman JJ, Tumor taxonomy for the developmental lineage classification of neoplasms. *BMC Cancer* 4 (2004) 88.
- [5] Gajalakshmi S, Vijayalakshmi S, Devi Rajeswri V, pharmacological activities of catharanthus roseus. *Int J Pharm Bio Sci* 4 (2013) 431-439.
- [6] Guirimand G, Guihur A, Poutrain P, Hericourt FS, Benoit SM, Burlat V, Courdavault V, Spatial organization of the vindoline biosynthetic pathway in Catharanthus roseus. *J Plant Physiol* 168 (2011) 549-557.
- [7] Iwast A, Aoyagi H, Takagi MO, Tanak H, Development of a Novel System for Producing Ajmalicine and Serpentine Using Direct Culture of Leaves in Catharanthus roseus Intact Plant. *J Biosci Bioeng* 99 (2005) 208-215.
- [8] Johnson IS, Armstrong JG, Gorman M, Burnett JP, The vinca alkaloids: a new class of oncolytic agents. *Cancer Res* 23 (1963) 1390-1427.
- [9] Jayakumar D, Mary SJ, Santhi RJ, Evaluation of antioxidant potential and antibacterial activity of Calotropis gigantea and Vinca rosea using invitro model. *Indian J Sci Technol* 3 (2010) 0974- 6846.
- [10] Laura J, Veer V, Dai H, Marc J, Youdong D, Augustinus A, Hart AM, Mao M, Peterse HL, Kooy K, Marton MJ, Witteveen AT, Schreiber GJ, Kerkhoven RM, Roberts C, Linsley PS, Bemards R, Friend SH, Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 415 (2002) 530-536.
- [11] Lobert S, Fahy J, Hill BT, Duflos A, Etievant C, Correia JJ, Vinca Alkaloid-Induced Tubulin Spiral Formation Correlates with Cytotoxicity in the Leukemic L1210 Cell Line. *Biochemistry* 39 (2000) 12053-12062.
- [12] Mueller H, Kassack MU, Wiese M, Comparison of the Usefulness of the MTT, ATP, and Calcein Assays to Predict the Potency of Cytotoxic Agents in Various Human Cancer Cell Lines. *J Biomol Screen* 9 (2004) 506-515.
- [13] Nayak BS, Pereira LM, Catharanthus roseus flower extract has wound-healing activity in Sprague Dawley rats. *BMC Complement Altern Med* 41 (2006) 1-6.
- [14] Newall C, Anderson L, Phillipson J, editors, Herbal medicines. 3rd ed. London: The Pharmaceutical Press, (1996) 1-3.
- [15] Newman DJ, Cragg GM, Snader KMJ, Natural products as sources of new drug over the period 1981-2002. *J Nat prod* 66 (2003) 1022-1037.
- [16] Orosz F, Comin B, Puigjaner J, Kovacs J, Tarkanyi G, Acs T, Keve T, Cascante M, Ovadi J, New semisynthetic vinca alkaloids: chemical, biochemical and cellular studies. *Br J Cancer* 79 (1999) 1356-1365.
- [17] Parvathy MV, Umamaheshwari A, Cytotoxic Effect of Oleifera Leaf Extracts on Human Multiple Myeloma Cell Lines. *Trends Med Res* 1 (2007) 44-50.
- [18] Pan Q, Chen Y, Wang Q, Yuan F, Xing S, Tian Y, Zhao J, Sun X, Tang K, Effect of plant growth regulators on the biosynthesis of vinblastine, vindoline and catharanthine in Catharanthus roseus. *Plant Growth Regul* 60 (2010) 133-141.
- [19] Peebles C, Sander GW, Hughes E, Peacock R, Shanks JV, YiuSan K, The expression of 1-deoxy-D-xylulose synthase and geraniol-10-hydroxylase or anthranilate synthase increases terpenoid indole alkaloid accumulation in Catharanthus roseus hairy roots. *Metab Eng* 13 (2011) 234-240.
- [20] Roepke J, Salima V, Wua M, Thamma MK, Muratab J, Ploss K, Boland W, De Luca V, Vinca drug components accumulate exclusively in leaf exudates of Madagascar periwinkle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107 (2010) 15287-15299.
- [21] Rajabalian S, Methanolic extract of *Teucrium Polium L* potenciales the cytotoxic and apoptotic effects of anticancer drug OF vincristine, vinblastine and

- doxorubicine against a panel of cancerous cell line. *Exp Oncol* 30 (2008) 133-138.
- [22] Siddiqui MJ, Ismail Z, Aisha AF, Abdul Majid AMS, Cytotoxic Activity of Catharanthus roseous (Apocynaceae) Crude Extracts and Pure Compounds Against Human Colorectal Carcinoma Cell Line. *Int J Pharmacol* 6 (2010) 43-47.
- [23] Siddiqui S, Ismail Z, Saidan N, Simultaneous Determination of Secondary Metabolites from *Vinca rosea* Plant extractives by reverse phase high performance liquid chromatography. *Pharmacogn Mag* 7 (2011) 92-96.
- [24] Srivastava V, Negi AS, Gupta MM, Khanuja SP, Plant-based anticancer molecules: A chemical and biological profile of some important leads. *Bioorg Med Chem* 13 (2005) 5892-5908.
- [25] Turker H, Yıldırım A, Karaka FP, Sensitivity of Bacteria Isolated from Fish to Some Medicinal Plants. *Turk J Fish Aquat Sci* 9 (2009) 181-186.
- [26] Yao D, Ding S, Burchell B, Wolf CR, Friedberg T, Detoxication of Vinca Alkaloids by Human P450 CYP3A4-Mediated Metabolism: Implications for the Development of Drug Resistance. *J Pharmacol Exp Ther* 294 (2000) 387-395.