

القای سمیت سلولی و آپوپتوز توسط عصاره هیدرو الکلی کبابه چینی در سلول‌های سرطانی پستان

فرهنگ تفرجی^۱، طیبه محمدی^۲، مهرداد پویانمهر^۳

تاریخ دریافت ۱۴۰۳/۱۰/۱۹ تاریخ پذیرش ۱۴۰۳/۱۱/۲۷

چکیده

پیش‌زمینه و هدف: سرطان پستان به‌عنوان یکی از شایع‌ترین انواع سرطان، همچنان تهدیدی جدی برای سلامت زنان در سراسر جهان محسوب می‌شود. به علت عوارض جانبی بالای شیمی‌درمانی، جستجو برای ترکیبات طبیعی با خاصیت ضد سرطانی و عوارض جانبی کمتر، از اهمیت بالایی برخوردار است. هدف از این مطالعه، بررسی سمیت سلولی عصاره هیدرو الکلی کبابه چینی روی سلول‌های سرطانی پستان بود.

مواد و روش کار: در این مطالعه، سلول‌های سرطانی MCF-7 در معرض غلظت‌های مختلف عصاره هیدرو الکلی کبابه چینی قرار گرفتند. سپس، با استفاده از آزمون MTT، بقای سلولی سنجیده شد. همچنین، تغییرات مورفولوژیکی سلول‌ها و وقوع آپوپتوز با استفاده از رنگ‌آمیزی‌های گیمسا و اتیدیوم بروماید-آکریدین اورنج بررسی گردید.

یافته‌ها: نتایج حاصل نشان داد که عصاره به‌صورت وابسته به غلظت، باعث کاهش بقای سلولی در سلول‌های سرطانی MCF-7 شد. IC50 عصاره در این مطالعه 1 mg/ml تعیین گردید. همچنین، مشاهده تغییرات مورفولوژیکی مشخص در سلول‌های تیمار شده با عصاره، نشان‌دهنده القای مرگ سلولی در سلول‌ها از نوع آپوپتوز بود.

بحث و نتیجه‌گیری: یافته‌های این مطالعه نشان داد که عصاره هیدرو الکلی گیاه کبابه چینی دارای اثرات کشندگی قابل‌توجه بر روی سلول‌های سرطانی پستان MCF-7 بود. این یافته‌ها، می‌تواند پتانسیل بالای این گیاه را به‌عنوان یک منبع طبیعی برای توسعه داروهای جدید ضد سرطان نشان دهد.

کلیدواژه‌ها: کبابه چینی، سرطان پستان، MCF-7، آپوپتوز، سمیت سلولی

مجله مطالعات علوم پزشکی، دوره سی و پنجم، شماره دهم، ص ۸۵۸-۸۵۰ دی ۱۴۰۳

آدرس مکاتبه: دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران، تلفن: ۰۹۱۲۴۱۹۷۴۳۷

Email: tymhd@razi.ac.ir

مقدمه

عوامل اصلی در شروع و پیشرفت سرطان در نظر گرفته می‌شود و مسئول بیش از ۹۰ درصد از مرگ‌های مرتبط با سرطان است (۲) و (۳). در بافت‌های سرطانی، در مقایسه با بافت‌های سالم، تغییر در بیان ژن‌های مرتبط با فرایندهای حیاتی سلول مانند کنترل چرخه سلولی، ترمیم DNA، تمایز و مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلول (آپوپتوز) رخ می‌دهد. شواهد علمی حاکی از آن است که هرچه الگوی بیان ژن‌ها بیشتر با وضعیت طبیعی تکوین سلول‌ها همخوانی داشته باشد و تغییرات در بیان ژن‌ها کمتر باشد، پیش‌آگهی بیماری بهتر و احتمال متاستاز کمتر خواهد بود. در مقابل، تغییرات قابل‌توجه در الگوی بیان ژن‌ها در مقایسه با حالت نرمال، با پیش‌آگهی بدتر و افزایش احتمال متاستاز همراه است (۴-۶).

سرطان، دومین عامل مرگ‌ومیر در سطح جهان است (۱). توسعه این بیماری پیچیده شامل مجموعه‌ای از رخدادهاست که اغلب با سلول‌هایی آغاز می‌شود که به دلیل انباشت جهش‌های ژنتیکی، کنترل رشد خود را از دست می‌دهند و به‌طور نامنظم تکثیر می‌شوند. این جهش‌ها، تغییراتی را در ژن‌های کلیدی مانند انکوژن‌ها (ژن‌های محرک رشد سلول) و ژن‌های سرکوبگر تومور (ژن‌های مهارکننده رشد سلول) ایجاد می‌کنند. این ژن‌ها در مکانیسم‌های سلولی و مولکولی گوناگونی که در فرایندهای تکثیر، حرکت و مهاجرت سلولی نقش دارند، دخیل هستند. متاستاز، یعنی گسترش سرطان از محل اولیه به سایر نقاط بدن، به‌عنوان یکی از

^۱ دانش آموخته دکترای عمومی دامپزشکی، گروه علوم پایه و پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران

^۲ استادیار، گروه علوم پایه و پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه رازی، کرمانشاه ایران (نویسنده مسئول)

^۳ استادیار، گروه علوم پایه و پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه رازی، کرمانشاه ایران

از این رو، انجام مطالعات بالینی ضد سرطان بر روی گیاهان *Piper* از جمله *P. cubeba*، و اصول فعال زیستی آن‌ها ارزشمند به نظر می‌رسد.

از آنجاکه رده سلولی MCF-7 به دلیل سابقه طولانی و بیان گیرنده استروژن، یکی از پرکاربردترین رده‌های سلولی سرطان پستان در تحقیقات سرطان است، همچنین، اکثر بیماران (۷۲.۷٪) با وضعیت HR/HER شناسخته شده (گیرنده استروژن + گیرنده پروژسترون/گیرنده فاکتور رشد اپیدرمی انسان) -HR+/HER2 هستند و سلول‌های MCF-7 یکی از محدود رده‌های سلولی سرطان پستان است که -HR+/HER2 نیز هست، آن را به مدلی بسیار مرتبط برای مطالعه سرطان پستان مهاجم تبدیل کرده است (۱۳). در رابطه با تأثیر کبابه چینی روی سلول‌های سرطانی پستان، در مطالعه‌ای Gradist و همکاران (۲۰۱۵)، اثر عصاره‌های متانولی و دی کلرومتانی آن را روی رده‌های سلولی نرمال و سرطان پستان ارزیابی کردند. نتایج آن‌ها نشان داد که عصاره خام متانولی در مقایسه با عصاره خام دی‌کلرومتانی، فعالیت سمیت سلولی بالاتری علیه سلول‌های سرطانی داشت. با این حال در خصوص تأثیر عصاره هیدرو الکلی کبابه چینی بر سلول‌های سرطان پستان تا جایی که اطلاع داریم مطالعه‌ای انجام نشده است (۱۴). از این رو، در مطالعه حاضر، با هدف بررسی پتانسیل ضد سرطانی این گیاه، اثر کشندگی عصاره هیدرو الکلی آن بر روی سلول‌های سرطانی سینه رده -MCF-7 به عنوان مدلی از سرطان پستان مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش کار

تهیه عصاره

مقدار ۵۰۰ گرم دانه کبابه چینی از شرکت گیاهان دارویی زردبند خریداری شد. ۲۵۰ گرم از آن وزن و پودر گردید. سپس، ۱۰۰ گرم از پودر حاصل با اتانول ۷۰٪ (نسبت ۱ گرم پودر در ۱۰ میلی‌لیتر اتانول ۷۰٪) به مدت ۷۲ ساعت روی شیکر در دمای اتاق عصاره‌گیری شد. عصاره حاصل، ابتدا با پارچه نخی و سپس با کاغذ صافی فیلتر شد، در مرحله بعد با کمک روتاری اواپوراتور تغلیظ و سپس در آون خشک شد و تا زمان استفاده در یخچال نگهداری شد.

کشت و پاساژ سلولی

سلول‌های MCF-7 به صورت منجمد از دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه تهیه و به اتاق کشت سلول دانشکده منتقل شدند و بلافاصله از حالت انجماد خارج و در فلاسک کشت T25 در محیط DMEM حاوی ۱۰٪ FBS و ۱٪ پنی‌سیلین/استرپتومایسین کشت و در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، رطوبت کافی و CO₂ ۵٪ قرار داده شدند. ۲۴ ساعت بعد تعویض محیط سلول‌ها انجام شد و اجازه داده شد تا سلول‌ها کف

از میان انواع مختلف سرطان، سرطان پستان به عنوان یکی از شایع‌ترین و مرگبارترین سرطان‌ها در زنان شناخته می‌شود. در سال ۲۰۲۲، ۲/۳ میلیون زن مبتلا به سرطان پستان تشخیص داده شد و سالانه ۶۷۰ هزار مرگ در جهان به خاطر سرطان پستان رخ می‌دهد (۷). در سال‌های اخیر، تحقیقات گسترده‌ای به منظور کشف داروهای جدید ضد سرطان انجام شده است که بتوانند با القای مرگ سلولی در سلول‌های سرطانی، به درمان مؤثر این بیماری کمک کنند. منابع طبیعی همچون گیاهان و میکروارگانیسم‌ها به عنوان گنجینه‌ای غنی از ترکیبات زیست فعال شناخته می‌شوند. بر اساس گزارشات موجود، بیش از نیمی از داروهای ضد سرطانی مورد استفاده، منشأ طبیعی دارند. اهمیت استفاده از ترکیبات طبیعی در درمان سرطان به دلایل متعددی از جمله اثرات جانبی کمتر، دسترسی آسان‌تر و هزینه پایین‌تر نسبت به داروهای شیمیایی است. همچنین، گیاهان دارویی به عنوان بخشی از طب سنتی در بسیاری از جوامع، سابقه طولانی در درمان بیماری‌ها از جمله سرطان دارند (۸ و ۹). گیاه کبابه چینی با نام علمی *Piper cubeba* L. که فلفل جاوا نیز نامیده می‌شود، از دیرباز در طب سنتی به واسطه طیف گسترده‌ای از خواص دارویی مورد توجه بوده است. کاربردهای سنتی این گیاه از تسکین درد تا درمان عفونت‌ها را در برمی‌گیرد. ترکیبات متعددی که از آن استخراج شده‌اند، به دلیل پتانسیل ضد سرطانی و سمیت سلولی‌شان مورد بررسی قرار گرفته‌اند، که از جمله آن‌ها می‌توان به کوبیین و مشتقات آن اشاره کرد (۱۰). خواص بیولوژیکی *Piper cubeba* مستقیماً با وجود لیگنان‌هایی مانند کوبه‌بین، هینوکینین، و دی‌هیدروکوبه‌بین مرتبط است که توسط محققین مختلف در گیاهان دیگر نیز مورد مطالعه قرار گرفته‌اند. لیگنان‌ها متابولیت‌های خاصی هستند که توسط گیاهان تولید می‌شوند و عموماً با دفاع گیاه در برابر عملکرد عوامل بیماری‌زا مرتبط هستند و در جنس کبابه فراوان‌اند. چندین لیگنان اثرات ضد سرطانی، آنتی‌اکسیدانی، ضد میکروبی، ضد التهابی، سرکوب‌کننده سیستم ایمنی و محافظت‌کننده کبد اعمال می‌کنند (۱۱).

گزارش شده است که بسیاری از گیاهان جنس *Piper* به طور سنتی برای درمان سرطان یا علائم شبه سرطان استفاده می‌شوند. این موارد شامل *P. aduncum* L. برای تومورهای پوستی، *P. longum* L. برای سرطان پستان، *P. nigrum* L. برای تومورها یا سرطان‌های شکمی، تنفسی یا معده است. عصاره‌ها و ترکیبات زیادی از جنس *Piper* ثابت شده است که در برابر سلول‌های سرطانی سمیت سلولی دارند. به عنوان مثال، آلکالوئیدهای آمیدی تا ۵۳ درصد از فعال‌ترین ترکیبات را تشکیل می‌دهند. به طور برجسته، پیرپرونوگومین سمیت عالی در برابر رده سلولی سرطانی هم در شرایط آزمایشگاهی و هم در شرایط *in vivo* نشان داده است (۱۲).

سلول‌ها با متانول فیکس، با PBS شستشو داده شدند و با گیمسا ۰.۴٪ رنگ‌آمیزی شدند. تغییرات ریخت‌شناسی سلول‌ها با میکروسکوپ نوری اینورت (بزرگنمایی ۲۰× و ۴۰×) بررسی و عکس‌برداری شد. همچنین، پس از ۲۴ ساعت تیمار، محلول اکریدین اورنج/اتیدیوم برماید (۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) اضافه و پس از ۵ دقیقه با میکروسکوپ فلورسانس با فیلتر آبی بررسی و عکس‌برداری انجام شد.

یافته‌ها

آزمون MTT و تعیین IC50 عصاره در سلول MCF-7

جذب نوری سلول‌های MCF-7 تیمار شده به مدت ۲۴ ساعت با غلظت‌های مختلف عصاره هیدرو الکلی کبابه چینی (۰.۱، ۰.۰۱، ۱ و ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) و همچنین جذب نوری گروه کنترل توسط دستگاه الایزا ریدر قرائت شد و پس از گذاشتن در فرمول، درصد بقای سلول‌ها برای گروه‌های تیمار شده با غلظت‌های ۰.۱، ۰.۰۱، ۱ و ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به ترتیب ۰.۷۱٪، ۰.۹۷٪، ۰.۵۰٪ و ۰.۲۱٪ محاسبه گردید (درصد بقای گروه کنترل ۱۰۰٪ در نظر گرفته شد). نتایج نشان داد که با افزایش غلظت عصاره، بقای سلولی MCF-7 کاهش می‌یابد که نشان‌دهنده اثر وابسته به غلظت عصاره است. مقدار IC50 عصاره در سلول‌های MCF-7، ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر محاسبه شد (تصویر ۱).

فلاسک را پر کنند. پس‌ازاین مرحله، پاساژ سلولی انجام گرفت و سلول‌ها بین دو فلاسک جدید تقسیم شدند و مجدداً در انکوباتور قرار داده شدند تا به تعداد کافی جهت انجام آزمایش، تکثیر شوند. پاساژ سلولی با استفاده از تریپسین/ ادتا ۰.۲۵٪ (شرکت بیوایده، ایران) انجام شد.

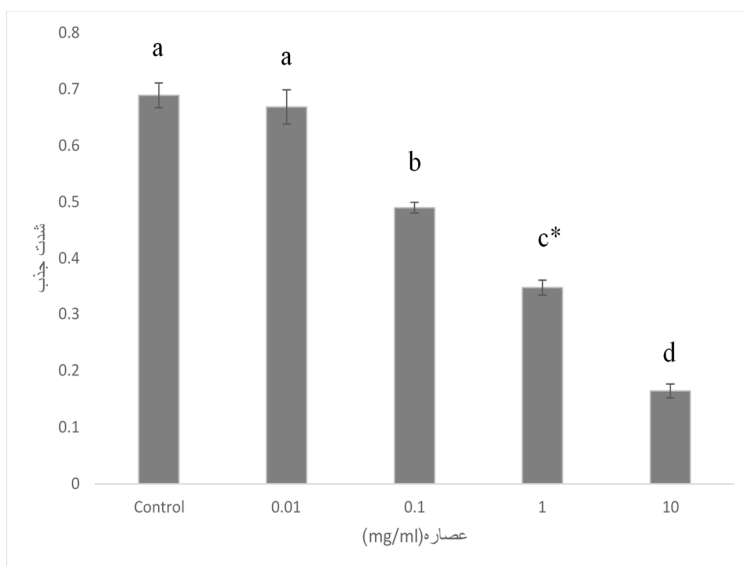
تعیین IC50 با کمک آزمون MTT

سلول‌ها با تراکم 5×10^3 سلول در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه کشت و پس از ۲۴ ساعت با غلظت‌های مختلف عصاره (۰.۱، ۰.۰۱، ۱ و ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) به مدت ۲۴ ساعت تیمار شدند. گروه کنترل فقط محیط کشت دریافت کرد. پس از ۲۴ ساعت، محیط کشت از چاهک‌ها خارج شد و ۱۰۰ میکرولیتر محیط تازه حاوی ۱۰ میکرولیتر محلول MTT اضافه شد. پس از ۴ ساعت انکوباسیون، ۱۰۰ میکرولیتر DMSO اضافه و جذب نوری در ۵۷۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. هر غلظت ۳ تکرار داشت. درصد بقای سلول با فرمول زیر محاسبه شد:

$$\text{درصد بقای سلول} = (\text{گروه تیمار OD} / \text{گروه کنترل OD}) \times 100$$

رنگ‌آمیزی سلولی

سلول‌ها با تراکم ۵۰ هزار سلول در هر چاهک کشت و پس از ۲۴ ساعت با غلظت IC50 عصاره تیمار شدند. گروه کنترل فقط محیط کشت حاوی ۱۰٪ FBS دریافت کرد. پس از ۲۴ ساعت تیمار،



تصویر ۱): مقایسه میانگین $\pm$ SEM میزان جذب نوری در سلول‌های MCF-7 پس از تیمار ۲۴ ساعته با غلظت‌های مختلف عصاره کبابه (حروف مختلف نشان‌دهنده معنی‌داری تفاوت بین گروه‌های مورد مطالعه است).

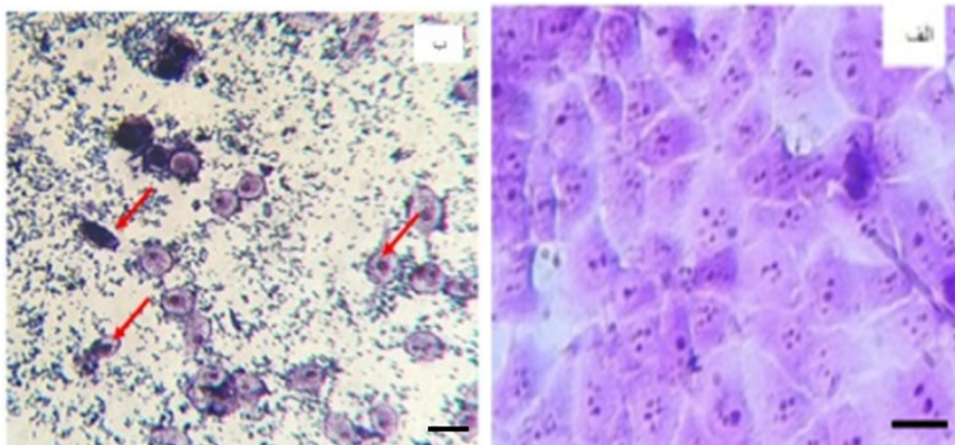
(×): غلظت ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به عنوان IC50 عصاره در سلول‌های MCF-7 تعیین شد.

تغییرات مورفولوژی سلول‌های MCF-7 تیمار شده با غلظت

IC50 عصاره کبابه چینی با روش رنگ‌آمیزی گیمسا

به‌منظور بررسی اثر عصاره کبابه چینی بر مورفولوژی سلول‌های MCF-7، از رنگ‌آمیزی گیمسا استفاده شد. سلول‌های تیمار شده

با غلظت IC50 از عصاره (غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)، انقباض هسته، فشردگی کروماتین، کاهش حجم و چروکیدگی سلول را در مقایسه با گروه کنترل نشان دادند که مؤید القای مرگ سلولی توسط عصاره است (تصویر ۲).



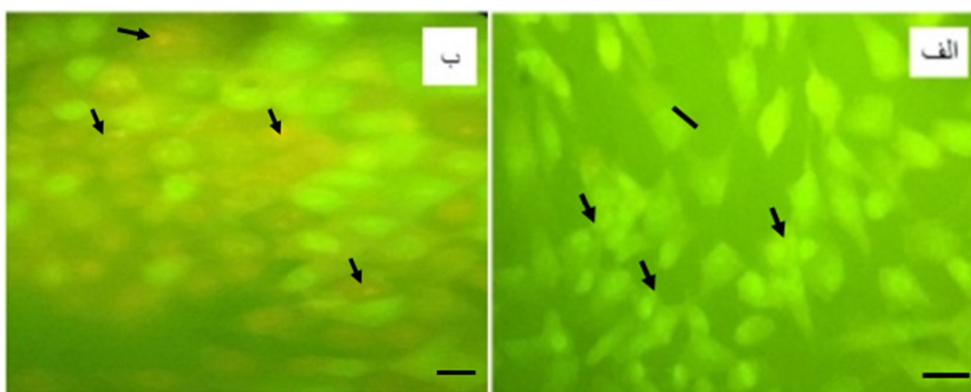
تصویر (۲): نمایش آپتوز در سلول‌های MCF-7 به کمک رنگ‌آمیزی گیمسا (عدسی ۴۰X). الف) گروه کنترل و ب) گروه تیمار شده با غلظت IC50 عصاره کبابه چینی. در سلول‌های تحت تیمار با عصاره در مقایسه با گروه کنترل کاهش حجم سلول، چروکیدگی، فشردگی و تراکم هسته (پیکان‌ها) بیانگر مرگ سلولی است.

آپتوز در سلول‌های MCF-7 با استفاده از رنگ‌آمیزی

اکریدین اورنج/اتیدیوم برماید

اکریدین اورنج با عبور از غشای سلولی، هسته سلول‌های زنده را سبزرنگ می‌کند، درحالی‌که اتیدیوم برماید با عبور از غشاهای آسیب‌دیده، هسته سلول‌های آپتوز شده را نارنجی و در مراحل نهایی آپتوز، قرمز و قطعه‌قطعه نشان می‌دهد. در سلول‌های MCF-7 تیمار شده با عصاره، هسته‌ها به‌صورت منفرد مشاهده

شدند، درحالی‌که در گروه کنترل، هسته‌ها به شکل دسته‌ای و در کنار هم قرار داشتند. هسته‌های سلول‌های کنترل، گرد، درشت، شفاف و سبزرنگ بود که نشان‌دهنده زنده‌بودن آن‌هاست. در مقابل، سلول‌های تیمار شده، هسته‌های نارنجی، منفرد، فشرده و متراکم نشان دادند که تأییدی بر القای مرگ سلولی در این گروه توسط عصاره است. این تغییرات مورفولوژیکی هسته، ازجمله فشردگی و تراکم، از شاخص‌های آپتوز به شمار می‌روند (تصویر ۳).



تصویر (۳): نمایش آپتوز سلول‌های MCF-7 با استفاده از رنگ‌آمیزی اکریدین اورنج/اتیدیوم (عدسی ۴۰X). الف) گروه کنترل و ب) گروه تیمار شده با IC50 عصاره. در گروه کنترل هسته سلول‌ها کروی و سبز مشاهده می‌شود درحالی‌که در گروه تیمار شده با عصاره، درصد قابل‌توجهی از سلول‌ها آپتوزی با کروماتین نارنجی‌رنگ و قطعه‌قطعه قابل‌مشاهده است (پیکان‌ها هسته‌ها را نشان می‌دهند).

بحث و نتیجه گیری

سرطان به‌عنوان تکثیر بی‌رویه و خارج از کنترل سلول‌ها، ناشی از اختلال در تعادل بین تکثیر و مرگ سلولی تعریف می‌شود (۱۵). اختلال در فرآیند مرگ سلولی می‌تواند منجر به رشد سلول‌های سرطانی و اختلالات خودایمنی شود (۱۶). سرطان، دومین عامل مرگ‌ومیر در کشورهای توسعه‌یافته است و نرخ آن همچنان رو به افزایش است. روش‌های درمانی کنونی شامل جراحی، پرتودرمانی و شیمی‌درمانی، با محدودیت‌هایی از جمله عوارض جانبی بالا، آسیب به بافت‌های سالم، مقاومت دارویی و هزینه‌های بالا همراه هستند (۱۷). این محدودیت‌ها، ضرورت یافتن رویکردهای درمانی نوین را افزایش داده است. طی سال‌های اخیر، استفاده از ترکیبات با منشأ طبیعی، به‌ویژه گیاهان، به دلیل عوارض جانبی کمتر، مورد توجه ویژه قرار گرفته است. مطالعات متعددی بر روی اثرات سیتوتوکسیک و ضد توموری گونه‌های گیاهی مختلف انجام شده است و روش‌های گوناگونی برای ارزیابی بقا و تکثیر سلولی و تعیین اثرات ضد سرطانی این مواد وجود دارد (۸ و ۹). در این مطالعه، اثرات سیتوتوکسیک و آپوپتوتیک عصاره هیدرو الکلی کبابه چینی بر رده سلولی MCF-7 بررسی شد. درصد بقای سلولی با روش MTT اندازه‌گیری شد. نتایج حاصل نشان داد که عصاره کبابه چینی به‌صورت وابسته به غلظت، اثر سمیت سلولی و کاهش بقای زیستی بر سلول‌های MCF-7 دارد. در غلظت‌های پایین عصاره، تغییرات بقای سلولی نسبت به گروه کنترل اندک بود، اما در غلظت‌های بالاتر، مهار رشد و تکثیر سلول‌ها به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. غلظت مؤثر عصاره بر مهار ۵۰ درصدی رشد سلول‌ها (IC₅₀) در رده سلولی MCF-7 ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تعیین شد. بررسی تغییرات مورفولوژیک سلولی با رنگ‌آمیزی گیمسا نشان داد که سلول‌های MCF-7 گروه کنترل، درشت، گرد با هسته شفاف و دارای ارتباطات کلنی‌مانند بودند. سلول‌های تیمار شده به سلول‌های منفرد، کوچک، چروکیده و با سیتوپلاسم کوچک تغییر شکل دادند و انقباض و تراکم در هسته سلول‌ها مشاهده شد. رنگ‌آمیزی اکریدین اورنج/اتیديوم بروماید وجود سلول‌های آپوپتوزی در گروه تیمار را نشان داد درحالی‌که در گروه کنترل سلول آپوپتوزی مشاهده نشد. در سلول‌های MCF-7 تیمار شده، هسته‌ها منفرد، کوچک، متراکم با کروماتین قطعه‌قطعه و نارنجی‌رنگ در مقایسه با هسته‌های بزرگ، شفاف و سبزرنگ گروه کنترل بودند که بیانگر وقوع آپوپتوز در سلول‌های تیمار شده بود. بنابراین، می‌توان بر اساس مشخصات مورفولوژیکی حاصل از رنگ‌آمیزی‌های انجام شده، بیان کرد که تیمار با عصاره هیدرو الکلی کبابه چینی منجر به فعال شدن روند آپوپتوز در سلول‌های مورد مطالعه شده است، در دیگر مطالعات پیشین، این اثر کبابه

چینی روی سلول‌های سرطانی گزارش شده است. ازجمله یام و همکاران پتانسیل عصاره کبابه چینی را در مهار تکثیر سلول‌های سرطانی پروستات از طریق کاهش سنتز DNA و القای آپوپتوز گزارش کردند (۱۷). گریدیست و همکاران (۲۰۱۵) نیز، اثر سمیت سلولی عصاره متانولی کبابه را روی رده‌های سلول سرطانی سینه بررسی کردند و فعالیت سیتوتوکسیک بالای عصاره متانولی آن را گزارش کردند (۱۴). در مطالعه دیگری در سال ۲۰۲۲، اثر عصاره *P. cubeba* و لیگنان‌های اصلی آن (کوبیین، دی هیدروکوبیین، اتیل کوبیین، هینوکنین و متیل کوبیین) بر سلول‌های کارسینوما سینه‌گشتری حنجره (Hep-2) و دهان (SCC-25) ارزیابی شد. همه آن‌ها تکثیر و مهاجرت سلولی را کاهش دادند. این امر به تغییر بیان ژن‌ها و پروتئین‌های دخیل در فرآیند التهابی نسبت داده شد و نتایج آن نشان داد که کوبیین و متیل کوبیین جداشده از *P. cubeba* تأثیر زیادی بر تکثیر، مهاجرت و مشخصات ژنوتوکسیک سلول‌های سرطان سر و گردن دارند (۱۹). اثرات کوبیین به‌عنوان یکی از لیگنان‌های اصلی جداشده از *P. cubeba* بر سمیت سلولی، جهش‌زایی، سینتیک تکثیر سلولی و القای آپوپتوز در سلول‌های آدنوکارسینوما روده بزرگ انسان (HT29) نشان داده شده است (۲۰). در مطالعه دیگری سمیت عصاره اتانولی *piper nigrum* L برای سلول‌های MCF-7 گزارش شده است (۲۱).

القای آپوپتوز توسط عصاره‌های گیاهی مختلفی در مطالعات متعددی گزارش شده است. به‌عنوان مثال، اثر سیتوتوکسیک عصاره گل میمونی شیردار بر رده سلولی MCF-7 از طریق القای آپوپتوز وابسته به ژن BAX اعلام شده است (۲۲) و مرگ سلول‌های سرطانی سینه به دنبال تیمار با اسانس آویشن وحشی نیز از طریق القای آپوپتوز بیان شده است (۲۳). بررسی خواص ضد سرطانی و سیتوتوکسیک عصاره‌های کورکومین و چای سبز و نقش تعدیل‌کنندگی آن‌ها بر روی رده سلولی سرطان پستان MCF-7 نشان داده است که چای سبز قادر به سرکوب ژن انکوژن Raf-1 و تلوامراز و کورکومین قادر به افزایش بیان ژن‌های TNF- α و IL-8 بود (۲۴). در بررسی اثر سیتوتوکسیک عصاره اتانولی ریشه زردچوبه سیاه‌روی رده‌های سلولی سرطان پستان، با کمک آزمون MTT مشخص شد که عصاره روی رده‌های سلولی سرطان پستان مورد مطالعه ازجمله MCF اثر سمیت سلولی قوی داشت (۲۵). شیخ‌زاده و همکاران اثر عصاره ریشه *Rheum turkestanicum* را روی سلول‌های سرطانی و سالم بررسی کردند و اثرات کشندگی سلولی و القاکنندگی آپوپتوز آن را در این سلول‌ها گزارش کردند (۲۶). محمدی و همکاران (۱۳۹۵) اثرات سیتوتوکسیک و آپوپتوتیک عصاره گیاه عاقرقرح در سلول‌های سرطانی دهان رده

KB را مطالعه کردند و نشان دادند که عصاره گیاه عاقرقرا باعث القا آپوپتوز در سلول‌های KB شده و ممکن است این عصاره در درمان سرطان مفید باشد (۲۷). مقایسه نتایج حاصل از مطالعه حاضر با نتایج مطالعات مشابه پیشین در این زمینه، نشان می‌دهد که نتایج مطالعه حاضر با یافته‌های مطالعات پیشین همخوانی دارد و پتانسیل ضد سرطانی عصاره دانه کبابه چینی را تأیید می‌کند. اثرات سیتوتوکسیک و ضد تکثیری وابسته به غلظت عصاره بر سلول‌های MCF-7، نشان‌دهنده وجود ترکیبات فعال زیستی در این عصاره است که می‌توانند در مهار رشد سلول‌های سرطانی و القای مرگ سلولی از نوع آپوپتوز مؤثر باشند. تغییر شکل سلول‌ها، انقباض و تراکم هسته و قطعه‌قطعه شدن DNA از جمله شاخص‌های آپوپتوز هستند که در سلول‌های تیمار شده با عصاره مشاهده شدند. با توجه به نتایج حاصل از مطالعات مشابهی که با عصاره کبابه چینی روی سلول‌های سرطانی دیگر انجام شده است و در آن‌ها مسیر آپوپتوز بررسی شده است، می‌توان بیان کرد یافته‌های مطالعه حاضر، نشان می‌دهند که عصاره کبابه چینی احتمالاً با فعال کردن مسیرهای آپوپتوز، می‌تواند منجر به مرگ سلول‌های سرطانی شود. هرچند برای تأیید این فرضیه، باید تأثیر کبابه بر بیان ژن‌های دخیل در مسیر آپوپتوز را در مطالعه‌ای دیگر بررسی کرد. همان‌طور که در بالا ذکر شد، مطالعات مشابه متعددی، اثرات سیتوتوکسیک و آپوپتوتیک عصاره‌های گیاهی مختلف را بر رده‌های سلولی سرطانی گزارش کرده‌اند و اثرات مشابهی را در مهار رشد و القای آپوپتوز در

سلول‌های سرطانی نشان داده‌اند. این همسویی، اعتبار یافته‌های مطالعه حاضر را تقویت می‌کند و بر اهمیت بررسی بیشتر پتانسیل درمانی گیاهان دارویی در درمان سرطان تأکید می‌ورزد. با این حال، تحقیقات بیشتری برای درک کامل مکانیسم‌های مولکولی دخیل در اثرات این عصاره در سطح سلولی و ارزیابی اثربخشی و سمیت آن در مدل‌های حیوانی و در نهایت مطالعات بالینی ضروری است. شناسایی ترکیبات فعال موجود در عصاره و بررسی اثرات آن‌ها به صورت مجزا و ترکیبی، می‌تواند به توسعه داروهای جدید و هدفمندتر برای درمان سرطان کمک کند.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله نویسندگان مقاله از معاونت پژوهشی دانشگاه کمال تشکر خود را اعلام می‌نمایند.

حمایت مالی

این مقاله برگرفته از پایان‌نامه دکترای عمومی آقای فرهنگ تفرجی است و منابع مالی آن توسط معاونت پژوهشی دانشگاه تأمین شده است.

تضاد منافع

نویسندگان تضاد منافی ندارند.

ملاحظات اخلاقی

مطالعه حاضر با پس از اخذ شناسه اخلاق IR.RAZI.AEC.1403.016 انجام شده است.

References:

- 1- Siegel RL, Giaquinto AN, Jemal A. Cancer statistics, 2024. *CA Cancer J Clin*. 2024; 74(1):12-49. doi: 10.3322/caac.21820.
- 2- Ayob AZ and Ramasamy TS. Cancer stem cells as key drivers of tumour progression. *J Biomed Sci*. 2018; 25(1):20. Epub 2018/03/07.
- 3- Cambria E, Coughlin MF, Floryan MA, Offeddu GS, Shelton SE, Kamm RD. Linking cell mechanical memory and cancer metastasis. *Nat Rev Cancer*. 2024;24(3):216-228. doi: 10.1038/s41568-023-00656-5. Epub 2024 Jan 18. PMID: 38238471; PMCID: PMC11146605.
- 4- Suski JM, Braun M, Strmiska V, Sicinski P. Targeting cell-cycle machinery in cancer. *Cancer Cell*. 2021;14:39(6):759-78. doi: 10.1016/j.ccell.2021.03.010.
- 5- Hopkins JL, Lan L, Zou L. DNA repair defects in cancer and therapeutic opportunities. *Genes Dev*. 2022;36(5-6):278-93. doi: 10.1101/gad.349431.
- 6- Kashyap D, Garg VK, Goel N. Intrinsic and extrinsic pathways of apoptosis: Role in cancer development and prognosis. *Adv Protein Chem Struct Biol*. 2021;125:73-120. doi: 10.1016/bs.apcsb.2021.01.003.
- 7- WHO. Global cancer burden growing, amidst mounting need for services [Internet]. [cited 2025 Feb 15]. Available from: <https://www.who.int/news/item/01-02-2024-global-cancer-burden-growing--amidst-mounting-need-for-services>
- 8- Sharma AN, Dewangan HK, Upadhyay PK. Comprehensive Review on Herbal Medicine: Emphasis on Current Therapy and Role of

- Phytoconstituents for Cancer Treatment. Chem Biodivers. 2024;21(3):e202301468. doi: 10.1002/cbdv.202301468.
- 9- Kassaye D, Amberbir A, Getachew B, Mussema Y. A historical overview of traditional medicine practices and policy in Ethiopia. Ethiop.J.Health Dev, 2006; 20(2): 127-34
- 10- Lovika B, Fauziah F, and Bellatasie R. Cytotoxic Activity of Piper cubeba: A Review, IRJPMS, 2021; 4(3): 12-8.
- 11- Zuhair T, Abdul J, Ahmed N. Piper cubeba: phytochemical and pharmacological review of a routinely used spices. 2022; 10.31838/ijpr/2020.SP1.119.
- 12- Drissi B, Mahdi I, Yassir M, Ben Bakrim W, Bouissane L and Sobeh M. Cubeb (Piper cubeba L.f.): A comprehensive review of its botany, phytochemistry, traditional uses, and pharmacological properties. Front. Nutr. 2022; 9:1048520. doi: 10.3389/fnut.2022.1048520
- 13- Booms A, Coetzee GA, Pierce SE. MCF-7 as a Model for Functional Analysis of Breast Cancer Risk Variants. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2019;28(10):1735-1745. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-19-0066.
- 14- Graidist P, Martla M, Sukpondma Y. Cytotoxic activity of Piper cubeba extract in breast cancer cell lines. Nutrients. 2015;10;7(4):2707-18. doi: 10.3390/nu7042707.
- 15- Ouyang L, Shi Z, Zhao S, Wang FT, Zhou TT, Liu B, Bao JK. Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. Cell Prolif. 2012;45(6):487-98. doi: 10.1111/j.1365-2184.2012.00845.x.
- 16- Saraste A and Pulkki K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. Cardiovascular research, 2000; 45(3): 528-537.
- 17- Johnson JJ and Mukhtar H. Curcumin for chemoprevention of colon cancer. Cancer letters, 2007; 255(2): 170-81.
- 18- Yam J, Kreuter M, Drewe J. Piper cubeba targets multiple aspects of the androgen-signalling pathway. A potential phytotherapy against prostate cancer growth? Planta Med. 2008;74(1):33-8. doi: 10.1055/s-2007-993758. Epub 2007; PMID: 18080233.
- 19- Gusson-Zanetoni JP, da Silva JSGM, Picão TB, Cardin LT, Prates J, Sousa SO, Henrique T, Oliani SM, Tajara EH, E Silva MLA, Cunha NL, da Silva Gomes AC, Laurentiz RS, Rodrigues-Lisoni FC. Effect of Piper cubeba total extract and isolated lignans on head and neck cancer cell lines and normal fibroblasts. J Pharmacol Sci. 2022;148(1):93-102. doi: 10.1016/j.jphs.2021.09.002. Epub 2021; PMID: 34924135.
- 20- Niwa AM, de Paula NA, Vesenick DC, Sartori D, Maistro EL, Ribeiro LR, et al. Evaluation of lignan (–)-cubebin extracted from Piper cubeba on human colon adenocarcinoma cells (HT29). Null. 2016 79:92–100. doi: 10.1080/15287394. 2015.1110067
- 21- Grinevicius VMAS, Andrade KS, Ourique F, Micke GA, Ferreira SRS, Pedrosa RC. Antitumor activity of conventional and supercritical extracts from Piper nigrum L. Cultivar bragantina through cell cycle arrest and apoptosis induction. J Super Fluids. 2017; 128:94–101. doi: 10.1016/j.supflu.2017.05.009
- 22- Tabatabaee MS, Ahmadi R, and Kassae MS. The Cytotoxic Effects of Hydroalcoholic Extract of Aerial Parts of Scrophularia striata on MCF-7 Cell Line and Evaluation of BAX and KAI1 Genes Expression. Qom Univ Med Sci J 2018; 12(9): 38-46.
- 23- Hajebi S, Chehrangi RA, Lariyazdi H. Study of cytotoxic effect of essential oil of Tymus vulgaris L. By MTT and Trypan blue assay on breast cancer cell line MCF-7. j dev biol, 2017; 1-12.
- 24- Fawzy RM, Abdel-Aziz AA, Bassiouny K, Fayed AM. Phytocompounds-based therapeutic

- approach: Investigating curcumin and green tea extracts on MCF 7 breast cancer cell line. *J Genet Eng Biotechnol.* 2024; 22(1): 100339,.
<https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2023.100339>.
- 25- Das AK, Borah M, Kalita JJ, Bora U. Cytotoxic potential of Curcuma caesia rhizome extract and derived gold nanoparticles in targeting breast cancer cell lines. *Sci Rep.* 2024; 26;14(1):17223. doi: 10.1038/s41598-024-66175-x.
- 26- Shiekhzadeh F, Mousavi SH, Amiri MS, Iranshahi M, Tayarani-Najaran Z, Karimi G. Cytotoxic and Apoptotic Potential of Rheum turkestanicum Janisch Root Extract on Human Cancer and Normal Cells. *Iran J Pharm Res.* 2013;12(4):811-9. PMID: 24523761; PMCID: PMC3920695.
- 27- Mohammadi A, Mansoori B, ghakaboodi K C, Baradaran B. Cytotoxic effects of anacyclus pyrethrum plant extract in oral cancer cell(KB cell line). *UNSU,* 2016;27(4):257-65. (Persian)

INDUCTION OF CYTOTOXICITY AND APOPTOSIS BY HYDROALCOHOLIC EXTRACT OF *PIPER CUBEBA* L IN BREAST CANCER CELLS

Farhang Tafaraji¹, Tayebah Mohammadi^{2*}, Mehrdad Pooyanmehr³

Received: 08 January, 2025; Accepted: 15 February, 2025

Abstract

Background & Aims: Breast cancer, as one of the most common types of cancer, remains a significant threat to women's health worldwide. Due to the high incidence of side effects associated with chemotherapy, the search for natural compounds with anticancer properties and fewer side effects is of great importance. The aim of this study was to investigate the cytotoxic effect of the hydroalcoholic extract of *Piper cubeba* L. on breast cancer cells.

Materials & Methods: In this study, MCF-7 cancer cells were exposed to different concentrations of the hydroalcoholic extract of *Piper cubeba* L. Subsequently, cell viability was measured using the MTT assay. Additionally, morphological changes in cells and the occurrence of apoptosis were investigated using Giemsa staining and ethidium bromide-acridine orange staining methods.

Results: The results showed that the extract, in a concentration-dependent manner, reduced cell viability and induced apoptosis in MCF-7 cancer cells. A concentration of 1 mg/mL was determined as the IC₅₀ of the extract in this study. Moreover, the observation of distinct morphological changes in cells treated with the extract indicated the induction of apoptotic cell death.

Conclusion: The findings of this study demonstrate that the hydroalcoholic extract of *Piper cubeba* L. has significant cytotoxic effects on MCF-7 breast cancer cells. These findings indicate the strong potential of this plant as a natural source for the development of new anticancer drugs.

Keywords: *Piper Cubeba*, breast cancer, MCF-7, apoptosis, cytotoxicity

Address: Razi university, Kermanshah, Iran

Tel: +989124197437

Email: tymhd@razi.ac.ir

SOURCE: STUD MED SCI 2025; 35(10): 858 ISSN: 2717-008X

This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/) which permits copy and redistribute the material just in noncommercial usages, provided the original work is properly cited.

¹ Doctor of Veterinary Medicine (DVM) Graduate, Department of Basic Sciences and Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Razi University, Kermanshah, Iran

² Assistant Professor, Department of Basic Sciences and Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Razi University, Kermanshah, Iran (Corresponding Author)

³ Assistant Professor, Department of Basic Sciences and Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Razi University, Kermanshah, Iran