Original Article

In vitro Cytotoxicity Evaluation of Steviosid on Cancerous Liver (Hep G2), Colon (HT29), Breast (MCF7) cells and Normal Kidney Cell (Hek293) in Comparison with Cisplatin

Ahmad Abolhasani[1,2], *Fatemeh Heidari*[1,3], *Roghayeh Raminfar*[4], *Shokoufeh Mousavi*[4], *Hoda Abolhasani*[1,5,6*]

[1]*Cellular and Molecular Research Center, Qom University of Medical Sciences, Qom, Iran.*

[2]*Department of Chemical Engineering, School of Technology and Engineering, Qom University, Qom, Iran.*

[3]*Department of Anatomy, School of Medicine, Qom University of Medical Sciences, Qom, Iran.*

[4]*Student Research Committee, Qom University of Medical Sciences, Qom, Iran.*

[5]*Department of Pharmacology, School of Medicine, Qom University of Medical Sciences, Qom, Iran.*

[6]*Spiritual Health Research Center, Qom University of Medical Sciences, Qom, Iran.*

[*]***Corresponding Author:***
Hoda Abolhasani;
Department of Pharmacology, School of Medicine, Qom University of Medical Sciences, Qom, Iran.

Email:
hodaabolhasani@gmail.com,
habolhasani@muq.ac.ir.

Received: 27 Feb, 2020
Accepted: 14 Jun, 2020

Abstract

Background and Objectives: Stevioside, a natural sweetener derived from Stevia plant, has anti-cancer properties. Accordingly, the present study investigated the *in vitro* effects of stevioside cytotoxicity on cancerous liver (Hep G2), colon (HT29), and breast (MCF7) cells and normal human embryonic kidney cell (Hek293) compared to cisplatin as anticancer drug.

Methods: In the present study, cytotoxic activity of stevioside was investigated and compared with cisplatin as a well-known anti-cancer drug. The cytotoxic effects of stevioside and cisplatin on Hep G2, HT29, MCF7, and Hek293 cells, were investigated by MTT assay. IC_{50} values were calculated by fitting the data in a sigmoidal dose-response curve using non-linear regression analysis for each cell line.

Results: Among the studied cancerous cell lines, stevioside showed higher cell growth inhibition on Hep G2 cell line. Stevioside did not have high toxicity on Hek293 normal cell line, but cisplatin had more toxicity in comparison with steviosid on the normal human embryonic kidney cell.

Conclusion: The sweetener stevioside, showed less cytotoxic effects compared to cisplatin. Due to its non-toxicity to normal human kidney embryonic cell (Hek293), stevioside can be used as auxiliary treatment regimen in patients with liver, breast, and colon cancers.

Keywords: Stevioside; HT29 Cells; Hep G2 Cells; MCF-7 Cells; Hek293 Cells.

DOI: 10.29252/qums.14.3.26

International License Creative Commons Attribution License 4.0

مجله دانشگاه علوم پزشکی قم
دوره چهاردهم، شماره سوم، خرداد ۹۹
صفحه ۲۶ الی ۳٤

مقاله پژوهشی
(Original Article)

بررسی برون‌تن سمیت سلولی استویوزید بر سلول‌های سرطانی کبد (Hep G2)، کولون (HT29) و پستان (MCF7) و سلول‌های سالم کلیوی (Hek293) در مقایسه با سیس‌پلاتین

احمد ابوالحسنی[۱،۲]، فاطمه حیدری[۱،۳]، رقیه رامین فر[٤]، شکوفه موسوی [٤]، هدی ابوالحسنی[۱،٥،٦*]

[۱]مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی قم، قم، ایران.

[۲]استادیار بیوتکنولوژی، گروه مهندسی شیمی، دانشکده فنی مهندسی، دانشگاه قم، قم، ایران.

[۳]استادیار آناتومی، گروه آناتومی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی قم، قم، ایران.

[۴]کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی قم، قم، ایران.

[۵]استادیار شیمی دارویی، گروه فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی قم، قم، ایران.

[۶]مرکز تحقیقات سلامت معنوی، دانشگاه علوم پزشکی قم، قم، ایران.

*نویسنده مسئول مکاتبات:
هدی ابوالحسنی؛ گروه فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی قم، قم، ایران.

آدرس پست الکترونیکی:
hodaabolhasani@gmail.com;
habolhasani@muq.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۲/۸
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۳/۲۵

چکیده

زمینه و هدف: استویوزید ماده شیرین‌کننده طبیعی است که از گیاه استویا به‌دست می‌آید و خواص ضدسرطانی دارد. مطالعه حاضر به بررسی برون‌تن اثرات سمیت سلولی استویوزید بر سلول‌های سرطانی کبد (Hep G2)، کولون (HT29) و پستان (MCF7) و سلول‌های سالم کلیه جنین انسان (Hek293) در مقایسه با داروی ضدسرطان سیس‌پلاتین می‌پردازد.

روش بررسی: در مطالعه حاضر فعالیت سمیت سلولی استویوزید بررسی و با سیس‌پلاتین به‌عنوان یک داروی شناخته‌شده ضدسرطانی مقایسه شد. اثرات سمیت سلولی استویوزید و سیس‌پلاتین روی سلول‌های سرطانی Hep G2، HT29، MCF7 و Hek293 با استفاده از روش MTT بررسی شد. مقادیر IC_{50} با قراردادن داده‌ها در یک منحنی دُز-پاسخ سیگموئیدی با استفاده از تحلیل رگرسیون غیرخطی برای هر رده سلولی محاسبه شد.

یافته‌ها: در بین رده‌های سلول سرطانی مطالعه‌شده، استویوزید روی رده سلول سرطانی Hep G2 نسبت به دیگر رده‌های سلول سرطانی درصد مهار رشد سلولی بیشتری را نشان داد. استویوزید روی رده سلول سالم Hek293 سمیت زیادی را نشان نداد؛ اما سیس‌پلاتین در مقایسه با استویوزید سمیت بیشتری را در سلول سالم کلیه نشان داد.

نتیجه‌گیری: ماده شیرین‌کننده استویوزید اثرات سمیت سلولی کمتری نسبت به سیس‌پلاتین نشان داد. با توجه به غیرسمی‌بودن آن برای سلول سالم Hek293، می‌توان از استویوزید به‌عنوان رژیم درمانی کمکی در بیماران مبتلابه سرطان‌های کبد، پستان و کولون کمک گرفت.

کلیدواژه‌ها: استویوزید؛ سلول‌های HT29؛ سلول‌های Hep G2؛ سلول‌های MCF-7؛ سلول‌های Hek293.

لطفاً به این مقاله به‌صورت زیر استناد نمایید:

Abolhasani A, Heidari F, Raminfar R, Mousavi Sh, Abolhasani H. In vitro Cytotoxicity Evaluation of Steviosid on Cancerous Liver (Hep G2), Colon (HT29), Breast (MCF7) cells and Normal Kidney Cell (Hek293) in Comparison with Cisplatin. . Qom Univ Med Sci J 2020;14(3):26-34. [Full Text in Persian]

International License Creative Commons Attribution License 4.0

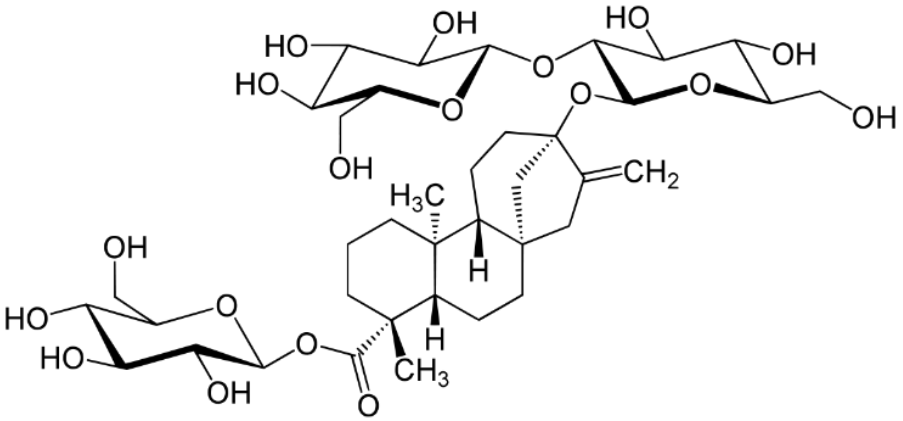
مقدمه

سرطان نوعی بیماری است که با رشد و تکثیر غیرمعمول سلول‌ها و ایجاد تومور همراه است و بافت‌های سالم بدن را نیز از بین می‌برد (۱). سرطان یکی از مهم‌ترین علل مرگ‌ومیر در جهان به شمار می‌رود و بعد از بیماری‌های قلبی‌عروقی، دومین عامل شایع مرگ‌ومیر در کشورهای توسعه‌یافته و سومین عامل مرگ در کشورهای کمتر توسعه‌یافته است. مطالعات اپیدمیولوژیکی نشان داده‌اند چاقی با افزایش خطر سرطان در ارتباط است (۲). برای درمان سرطان از روش‌هایی چون پرتودرمانی، جراحی، شیمی‌درمانی و یا ترکیبی از این روش‌ها استفاده می‌شود؛ اما متأسفانه هیچ‌یک باعث درمان قطعی سرطان نشده‌اند و بخصوص در شیمی‌درمانی، فقدان سمیت سلولی انتخابی، اغلب به بروز عوارض جانبی غیرقابل‌تحمل منجر می‌شود (۳). همچنین اگرچه بسیاری از سرطان‌ها در ابتدا به شیمی‌درمانی پاسخ می‌دهند، اغلب پس از مدتی به آن مقاوم می‌شوند (۴). به علت پاسخ درمانی کم و عوارض جانبی ناشی از داروهای رایج شیمی‌درمانی، کشف ترکیباتی (به‌خصوص با منشأ گیاهی) که اثرات ضدسرطانی از خود نشان دهند بسیار ضروری به نظر می‌رسد (۵). ترکیبات گیاهی و مشتقات حاصل از آن‌ها می‌تواند به‌عنوان دارو در شیمی‌درمانی علیه سلول‌های سرطانی استفاده شود (۶).

یکی از گیاهانی که اثرات فارماکولوژیک زیادی دارد و در سال‌های اخیر تحقیقات متعددی در راستای کشف اثرات سایتوتوکسیک آن انجام شده، گیاه استویا است.

این گیاه بـه دلیـل شیرین‌بودن و خاصیت درمانی ازنظر اقتصادی و علمی بسیار موردتوجه قرار گرفته است. استویا با نام علمی Stevia Rebaudiana Bertoni از ۲۴۰ گونه خانواده آفتاب‌گردان است. این گیاه بومی مناطق گرمسیری و نیمه‌گرمسیری آمریکای شمالی تا آمریکای جنوبی است. گونه‌های استویا که عموماً با نام برگ شیرین، برگ قندی، برگ عسلی و استویا شناخته شده‌اند، به‌خاطر استفاده از برگ شیرینشان به‌طور وسیعی کاشته می‌شوند (۷). گیاه استویا سرشار از شیرین‌کننده‌های کم‌کالری، فیبر، انواع پروتئین، ویتامین، مواد معدنی، اسانس و فیتونوترینت‌های متعدد است (۸). شیرین‌کنندگی استویا ۲۵۰ برابر شکر است و ماده مؤثره شیرین‌کننده این گیاه استویوزید (Stevioside) است (۹، ۱۰).

مطالعاتی که در کشورهای تولیدکننده استویا انجام شده است نشان می‌دهد این گیاه به‌عنوان یک افزودنی غذایی شیرین و کم‌کالری برای انسان مزایای بسیار متنوعی دارد (۱۱). استویوزید با وجود شیرین‌بودن، اثری روی قند خون ندارد؛ بنابراین، برای افرادی که قند خون بالایی دارند بی‌خطر است. درواقع استویا به‌صورت مستقیم سبب تحریک ترشح انسولین از سلول‌های بتای پانکراس می‌شود و می‌تواند در بیماران مبتلابه دیابت نوع II سبب پایین‌آمدن قند خون نیز شود (۱۵-۱۲). اخیراً مطالعه‌ای نشان داده است ممانعت از ورود گلوکز به سلول سرطانی مانع رشد سلول سرطانی می‌شود (۱۶). این موضوع می‌تواند نقش شیرین‌کننده غیرگلوکزی مانند استویوزید را در رژیم غذایی و رژیم درمان بیماران سرطانی نشان دهد.



شکل شماره ۱: ساختار شیمیایی استویوزید

International License Creative Commons Attribution License 4.0

مطالعات زیادی برای بررسی اثرات سمیت سلولی عصاره‌های مختلف استویا (۱۷)، استویول (۱۸، ۱۹) و همچنین استویوزید (۲۰) روی چندین سلول سرطانی و سالم (۱۷) انجام شده است. در برخی از این مطالعات مکانیسم اثر ضدسرطانی استویا (۲۰-۱۸) بیان شده است. هدف از مطالعه حاضر بررسی سمیت سلولی استویوزید، ماده مؤثره گیاه استویا، ازلحاظ اثر مهارکنندگی رشد رده سلول‌های سرطانی انسانی کبد (Hep G2)، کولون (HT29) و پستان (MCF7) و مقایسه اثرات آن‌ها با رده سلول سالم کلیوی (Hek293) است. همچنین به‌منظور بررسی میزان تأثیر استویوزید بر سلول‌های سرطانی و سالم، سمیت سلولی استویوزید با داروی ضدسرطان سیس‌پلاتین مقایسه شده است. امید است یافته‌های حاصل از این تحقیق بتواند در حوزه پیشگیری و درمان سرطان‌های پستان، کولون و کبد مفید واقع شود.

روش بررسی

مواد کشت سلولی

محیط کشت سلولی RPMI 1640، رنگ تریپان بلو، سرم جنین گاوی (FBS)، بافر فسفات (PBS)، محلول آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین/ استرپتومایسین و محلول تریپسین /EDTA از شرکت Gibco آلمان خریداری شدند. پودر MTT (۳-۴ و ۵- دی متیل تیازول-۲-ایل) -۲ و ۵-دی فنیل تترازولیوم بروماید)، حلال دی متیل سولفوکساید (DMSO)، گلایسین و نمک NaCl از شرکت شیمیایی Sigma Aldrich تهیه شدند.

کشت سلولی

رده سلول‌های سرطانی انسانی کبد (Hep G2)، کولون (HT29) و پستان (MCF7) و نیز رده سلولی سالم انسانی جنینی کلیوی (Hek293) از انستیتو پاستور تهران خریداری و به‌صورت منجمد در تانک نیتروژن با دمای ۱۹۶- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. همه سلول‌ها در محیط کشت RPMI 1640 کامل حاوی ۱۰ درصد (v/v) سرم جنین گاوی، ال-گلوتامین (۲ میلی‌مولار)، آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین جی - استرپتومایسین (100 U/ml و 100 µg/ml) (۱ درصد آنتی‌بیوتیک) در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و غلظت CO_2 برابر ۵ درصد و رطوبت ۷۰ تا ۸۰ قرار داده شدند.

تهیه استویوزید و ساخت رقت‌های آن

پودر سفیدرنگ استویوزید استفاده‌شده در این پژوهش (ماده مؤثره گیاه استویا) به‌صورت پودر خالص از شرکت دارویی ماهور خوزستان خریداری شد. رقت‌های ۱۰۰۰، ۱۰۰، ۱۰، ۱، ۰/۱ و ۰/۰۱ میکرومولار از استویوزید در محیط کشت RPMI 1640 تهیه شدند.

تهیه سیس‌پلاتین و ساخت رقت‌های آن

داروی ضدسرطان سیس‌پلاتین با علامت تجاری Cisplatin MYLAN 1mg/mL در غلظت‌های ۱۰۰۰، ۱۰۰، ۱۰، ۱، ۰/۱ و ۰/۰۱ میکرومولار سیس‌پلاتین در محیط کشت RPMI 1640 تهیه شد.

تهیه کنترل مثبت و منفی

به‌منظور تهیه محلول کنترل مثبت ۱ میلی‌مولار آب‌اکسیژنه (H_2O_2 1 mM)، ۱۱ میکرولیتر از محلول استوک آب‌اکسیژنه ۳ درصد به محیط کشت RPMI1640 اضافه شد. به‌عنوان محلول کنترل منفی، محیط کشت بدون هیچ ترکیبی استفاده شد.

سنجش سمیت سلولی با تست MTT

اثر مهار رشد استویوزید، سیس‌پلاتین و کنترل مثبت و منفی روی رده‌های سلول سرطانی کبد (Hep G2)، کولون (HT29) و پستان (MCF7) و رده سلول سالم کلیوی (Hek293) با استفاده از تست MTT سنجیده شد (۱۶، ۲۱، ۲۲). شمارش سلولی و زنده‌مانی سلول‌ها با رنگ‌آمیزی تریپان بلو و به‌وسیله لام هموسیتومتر انجام شد. فقط سلول‌های با ۹۰ درصد تراکم سلولی برای انجام تست MTT انتخاب شدند. تمام سلول‌ها به تعداد ۶۰۰۰ سلول در حجم ۲۰۰ میکرولیتر در هر چاهک از پلیت ۹۶ خانه کشت داده شدند. سپس سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور گرماگذاری شدند (پره انکوباسیون). بعد از مرحله گرماگذاری محیط کشت قبلی خارج شد و محیط کشت تازه همراه با رقت‌های دارویی تهیه‌شده جایگزین شدند (درمان سلول‌ها). برای هر رقت دارویی تعداد ۳ چاهک در نظر گرفته شد و در زمان تحلیل داده‌ها از این سه چاهک میانگین گرفته شد (Test V). برای حداقل قابلیت حیات (Min V)، نمونه‌ای از سلول‌ها با هیدروژن پراکسید ۱ میلی‌مولار گرماگذاری شد که موجب مرگ کل سلول‌ها می‌شود و به‌عنوان کنترل مثبت قرار گرفت.

International License Creative Commons Attribution License 4.0

در مقابل برای قابلیت حیات ماکزیمم (Max V)، نمونه‌ای از سلول‌ها که تحت مواجهه دارویی قرار نگرفته و فقط روی آن‌ها محیط کشت ریخته شده بود، به‌عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شدند. برای هرکدام از کنترل‌های مثبت و منفی نیز سه چاهک در نظر گرفته شد. سلول‌ها به‌طور جداگانه برای مدت‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد در مواجهه با رقت‌های دارویی قرار گرفتند. سپس ۲۰۰ میکرولیتر (µL) از محلول تازه آماده‌شده MTT (۲ mg/mL)، (۱/۴) بافر فسفات استریل + ۳/۴ محیط کشت)، جایگزین محیط کشت حاوی دارو شد و پلیت ها به مدت ۴ ساعت در داخل انکوباتور با شرایط دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و CO_2 ۵ درصد نگه داشته شدند. بعد از گذشت ۴ ساعت از زمان انکوباسیون، کریستال‌های بنفش فورمازان ایجادشده با افزودن ۲۰۰ میکرولیتر حلال DMSO و ۲۵ میکرولیتر بافر گلایسین سورنسن (۰/۱ مولار گلایسین+ ۰/۱ مولار سدیم‌کلراید که با هیدروکسیدسدیم ۰/۱ مولار در pH برابر ۱۰/۵ تنظیم شده است) به‌عنوان متوقف‌کننده واکنش، حل شدند. پلیت ها به مدت ۴۰ دقیقه روی شیکر قرار گرفتند و سلول‌ها در حلال حل شدند. درنهایت، شدت رنگ نمونه‌ها به روش اسپکتروفتومتری در طول‌موج ۵۷۰ نانومتر با دستگاه ELISA reader قرائت شد.

تحلیل آماری داده‌های حاصل از آزمایش MTT

برای محاسبه درصد مهار رشد سلول‌ها توسط هر رقت از داروها از معادله شماره ۱ و نرم‌افزار Microsoft Excel 2013 استفاده شد. سپس نتایج به‌دست‌آمده به نرم‌افزار GraphPad PRISM 8.0.2 منتقل شد. ابتدا داده‌های مربوط به درصد مهار رشد رقت‌های مختلف هر دارو نرمالایز شدند. سپس با قراردادن آن‌ها در یک منحنی دُز-پاسخ سیگموییدی و با استفاده از تجزیه‌وتحلیل رگرسیون غیرخطی، IC_{50} (غلظتی از دارو که رشد ۵۰ درصد سلول‌ها را مهار می‌کند) استویوزید و سیس‌پلاتین به‌دست آمدند. $P\leq ۰/۰۵$ به‌عنوان پاسخ معنی‌دار در نظر گرفته شد. هر غلظت از ترکیب در سه چاهک تکرار شد و آزمایش نیز در سه تکرار مجزا صورت گرفت.

معادله ۱

$$\%\ Growth\ Inhibition = \left(1 - \frac{Test\ V - Min\ V}{Max\ V - Min\ V}\right) \times 100$$

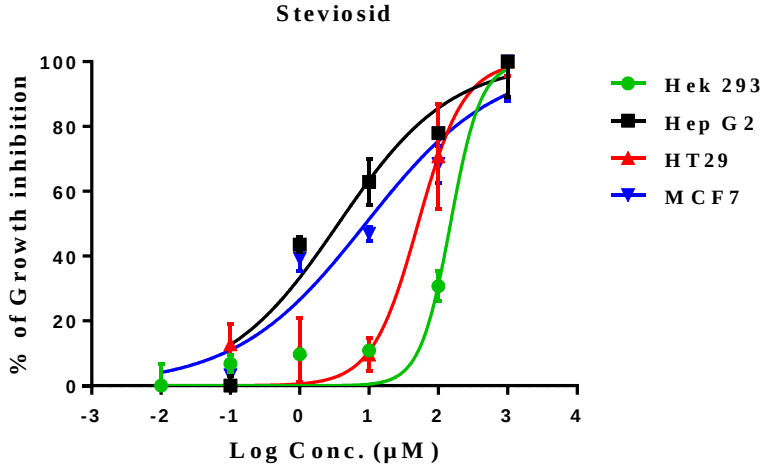
یافته‌ها

ارزیابی اثرات مهار رشد استویوزید (شکل ۱) و داروی ضدسرطان سیس‌پلاتین روی رده‌های سلولی MCF7 (سرطان پستان)، HT29 (سرطان کولون)، Hep G2 (سرطان کبد) و Hek293 (سلول سالم کلیه انسان) به‌صورت جداگانه انجام گرفت. میانگین نتایج سه بار آزمایش غلظت‌های مختلف استویوزید و سیس‌پلاتین روی تکثیر سلول‌های ذکرشده، با روش تست MTT پس از ۷۲ ساعت در جدول شماره ۱ و شکل‌های شماره ۲ و ۳ آورده شده است. بر اساس جذب‌های نوری به‌دست‌آمده و تحلیل‌های انجام‌گرفته، نتایج به‌دست‌آمده نشان داد استویوزید بیشترین فعالیت سمیت سلولی را روی رده سلول سرطانی کبد (Hep G2) با IC_{50} برابر ۱/۲۰۹ ± ۳/۶۰۸ میکرومولار و پس‌ازآن بر رده سلول سرطانی پستان (MCF7) با IC_{50} برابر ۱/۲۳ ± ۸/۰۹ میکرومولار نشان داده است که این مقادیر از میزان مهار رشد سلولی سیس‌پلاتین (۰/۰۴۹± ۰/۰۳۶) به‌عنوان داروی ضدسرطان شناخته‌شده بسیار کمتر است (جدول شماره ۱). در مقابل، استویوزید کمترین فعالیت مهار رشد سلولی را در رده سلولی سرطانی کولون (HT29) با IC_{50} برابر ۱/۳۳ ± ۵۰/۸۰ میکرومولار نشان داد. همچنین استویوزید روی رده سلول سالم کلیه انسان (Hek293) مهار رشد سلولی قابل‌توجهی نشان نداد. این در صورتی است که سیس‌پلاتین باعث مهار رشد سلول سالم کلیه انسان با IC_{50} برابر ۰/۳۷ ± ۱/۲۴۴ میکرومولار شد (جدول شماره ۱).

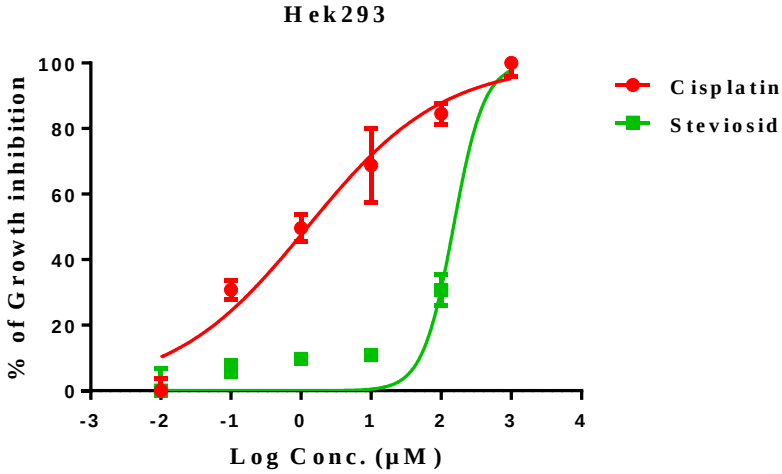
نتایج حاصل از ارزیابی مهار رشد سیس‌پلاتین در سلول‌های سرطانی HT29، MCF7 و Hep G2 که در ۷۲ ساعت انجام شده است با نتایج حاصل از ارزیابی مهار رشد سیس‌پلاتین در سلول‌های سرطانی HT29، MCF7 و Hep G2 در مطالعات قبلی (۲۱، ۲۲) همخوانی دارد. درنتیجه استویوزید در هر سه رده سلول سرطانی در مقایسه با داروی ضدسرطان سیس‌پلاتین اثرات مهار رشد بسیار کمتری را بروز داد، این در حالی است که استویوزید

International License Creative Commons Attribution License 4.0

بر رده سلول سالم کلیه جنین انسان (Hek293) سمیت زیادی را نشان نداد و IC_{50} آن بسیار بالا است؛ اما سیس‌پلاتین برای سلول سالم کلیه جنین انسان نسبت به استویوزید سمیت بیشتری را بروز داد (شکل شماره ۳).



شکل شماره ۲: منحنی غلظت-پاسخ تست MTT استویوزید روی رده‌های سلولی MCF7، HT29، Hep G2 و Hek293 بعد از ۷۲ ساعت انکوباسیون توسط نرم‌افزار PRISM. مقادیر نشان داده‌شده میانگین ± انحراف‌معیار نسبی ((RSD (Relative SD= [SD/average]*100) از حداقل سه آزمایش است.



شکل شماره ۳: منحنی غلظت-پاسخ تست MTT استویوزید و سیس‌پلاتین روی رده سلول سالم کلیه انسان Hek293 بعد از ۷۲ ساعت انکوباسیون با نرم‌افزار PRISM. مقادیر نشان داده‌شده میانگین ± انحراف‌معیار نسبی ((RSD (relative SD= [SD/average]*100) از حداقل سه آزمایش است.

جدول شماره ۱: مقادیر IC_{50} به‌دست‌آمده از ارزیابی سمیت سلولی ترکیبات استویوزید و سیس‌پلاتین به روش MTT بر رده‌های سلول سرطانی MCF7 ، HT-29 و Hep G2 و رده سلول سالم Hek293 بعد از ۷۲ ساعت

ترکیبات/رده سلولی	Hek293 [a] IC_{50} ± RSD	MCF7 [a] IC_{50} ± RSD	HT29 [a] IC_{50} ± RSD	Hep G2 [a] IC_{50} ± RSD
استویوزید(µM)	۱/۳۸±۱٤۹/۱	۱/۲۳±۸/۰۹	۱/۳۳±۵۰/۸۰	۱/۲۰۹±۳/٦۰۸
سیس‌پلاتین(µM)	۰/۳۷±۱/۲٤٤	۰/۰۲±۰/۱۹۳	۰/۰۱۸ ±۰/۰۱٤	۰/۰٤۹±۰/۰۳٦

International License Creative Commons Attribution License 4.0

IC_{50}[a]، غلظتی از داروی موردنیاز برای مهار رشد ۵۰ درصد از سلول‌هایی است که با تست MTT اندازه‌گیری شده‌اند. سلول‌ها برای مدت سه روز (۷۲ ساعت) در معرض استویوزید و سیس‌پلاتین قرار گرفتند.

مقادیر IC_{50} برابر میانگین ± انحراف‌معیار نسبی (RSD (relative SD= [SD/average]*100)) از حداقل سه آزمایش است.

بحث

ازآنجایی‌که سرطان یکی از مهم‌ترین علل مرگ‌ومیر در جهان به شمار می‌رود، یافت ترکیباتی که اثرات ضدسرطان از خود نشان می‌دهند باارزش به نظر می‌رسد. یکی از گیاهانی که اثرات فارماکولوژیک زیادی دارد (۲۳) و در سال‌های اخیر تحقیقات متعددی در راستای کشف اثرات سایتوتوکسیک آن انجام شده، گیاه استویا است. استویا به علت اثرات مثبتی که بر کاهش چاقی، درمان دیابت و فشارخون بالا دارد و نیز نداشتن اثرات سرطان‌زایی در مقایسه با سایر شیرین‌کننده‌ها، غیرسمی و گیاهی‌بودن بسیار موردتوجه قرارگرفته است (۱۰). در این تحقیق استویوزید، ماده مؤثره شیرین‌کننده گیاه استویا با تست سایتوتوکسیسیتی به روش رنگ‌سنجی MTT ارزیابی شد. با توجه و بررسی مطالعاتی که بر روی گیاه استویا انجام شد، نبود ارزیابی و مقایسه سمیت سلولی استویوزید روی رده‌های سلول سرطانی HT29، Hep G2، MCF7 و رده سلول سالم Hek293 و همچنین مقایسه آن‌ها با داروی ضدسرطان سیس‌پلاتین به چشم می‌خورد. نتایج مطالعه حاضر نشان داد استویوزید بیشترین فعالیت سمیت سلولی را در بین سه رده سلول سرطانی مطالعه‌شده، روی رده سلول سرطانی کبد (Hep G2) و پس‌ازآن روی سلول سرطان پستان (MCF7) نشان داد؛ اما این مقادیر نسبت به داروی ضدسرطان سیس‌پلاتین بسیار کمتر بود و در این صورت نمی‌توان از استویوزید انتظار اثرات درمانی شاخص در درمان سرطان کولون، پستان و حتی کبد داشت؛ اما با توجه به اثرات منفی چاقی و قند خون بالا در بیماران سرطانی و همچنین عوارض بسیار زیادی که داروهای ضدسرطان ازجمله سیس‌پلاتین بر سلول‌های سالم بدن ایجاد می‌کنند، می‌توان از استویوزید به‌عنوان رژیم غذایی کمکی در درمان سرطان‌های کبد، پستان و حتی کولون و همچنین به‌عنوان شیرین‌کننده غذایی بدون کالری و بدون عارضه بر سلول‌های سالم انسانی ازجمله سلول سالم کلیه جنین انسان Hek293 که در این مطالعه بررسی شد، در بیماران سرطانی کمک گرفت.

در راستای نتایج به‌دست‌آمده حاصل از این تحقیق، برخی تحقیقات نشان دادند عصاره گیاه استویا بر سلول سالم Vero اثرات مهار رشد ندارد، اما بر سلول‌های HEp2 اثرات سمیت سلولی را نشان داده است (۱۷). همچنین مطالعه دیگری نشان داد ماده شیرین‌کننده استخراج‌شده از گیاه استویا بر رده‌های سلول سرطان کلون (Caco 2) و سرویکس (Caski) فعالیت ضدسرطانی از خود نشان می‌دهد (۱۱). بررسی ویژگی‌های سایتوتوکسیک استویا و فراورده نانوپارتیکل ZnS به‌دست‌آمده از استویا با روش رنگ‌سنجی در دو رده سلول سرطانی سینه (MCF7) و سالم نشان داد مهار رشد سلولی نانوپارتیکل‌های ZnS به‌دست‌آمده از استویا بر سلول‌های سرطانی MCF7 در مقایسه با عصاره استویا بیشتر بوده است، به‌طوری‌که IC_{50} در نانوپارتیکل‌های ZnS به میزان ۴۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر و در عصاره استویا ۲۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به‌دست آمده است (۲۴).

بررسی فعالیت ضدسرطانی عصاره اتانولی برگ‌های استویا در تزریق داخل‌صفاقی به موش‌های دارای Erlisch's Ascites carcinoma نیز نشان داد عصاره اتانولی برگ‌های استویا اثر ضدسرطانی خوبی را در دُز ۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم دارد. همچنین عصاره اتانولی برگ‌های استویا سبب کاهش حجم تومور، کاهش تعداد سلول‌های زنده توموری و افزایش وزن ماندگار موش‌ها شده بود که این موضوع به دُز عصاره وابسته بود و با داروی استاندارد ضدسرطان FU-5 مقایسه شد (۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در داروی FU-5) (۲۵).

مکانیسم اثر ضدسرطانی و مهار رشد سلولی اجزای مختلف استویا نیز به‌دست آمده است. در سال ۲۰۱۲ اولین گزارش در زمینه مکانیسم اثر ضدسرطانی استویوزید بر سلول سرطانی پستانی رده MCF7 منتشر و اعلام شد که استویوزید در سلول‌های سرطانی پستانی رده MCF7 باعث القای آپوپتوز با واسطه

International License Creative Commons Attribution License 4.0

ROS (reactive oxygen species) از طریق مسیر میتوکندریال می‌شود (۲۰). مکانیسم اثر ضدسرطانی استویول نیز در سلول سرطانی پستانی رده MCF7 به‌صورت القای آپوپتوز در سلول‌های MCF7 به‌صورت وابسته به دُز نشان داده شد (۱۹). همچنین مطالعه‌ای بر روی اثرات مهار رشد استویول بر شش رده سلول سرطانی سیستم گوارش (MGC-، MKN-45، HCT 116، HCT-8، Caco-2،HGC-27 803) انجام شد که نشان داد استویول به‌صورت قابل‌مقایسه با داروی استاندارد ضدسرطان ۵ ـ فلورویوراسیل توانایی ایجاد اثرات مهار رشد سلولی را دارد. مکانیسم اثر مهاری استویول، مسیر آپوپتوتیک میتوکندریال نشان داده شد و این مسیر با افزایش نسبت Bax/Bcl-2 و فعالیت p21 و P53 و همچنین مکانیسم Caspase-3-independent همراه بود (۱۸).

نتیجه‌گیری

ماده شیرین‌کننده استویوزید بیشترین فعالیت سمیت سلولی را به‌ترتیب در رده سلول سرطانی کبد (Hep G2)، پستان (MCF7) و کولون (HT29) نشان داد، اما این مقادیر نسبت به داروی ضدسرطان سیس‌پلاتین بسیار کمتر بود. در این صورت نمی‌توان از استویوزید انتظار اثرات درمانی شاخص در درمان سرطان‌های بررسی‌شده را داشت. با توجه به عدم بروز سمیت سلولی توسط استویوزید در رده سلول سالم کلیه جنین انسان (Hek293) نسبت به سمیت سلولی زیادی که سیس‌پلاتین در سلول سالم کلیه نشان داد و همچنین با توجه به اثرات منفی چاقی و قند خون بالا در بیماران سرطانی، می‌توان از استویوزید به‌عنوان رژیم غذایی کمکی بدون کالری و بدون عارضه بر سلول‌های سالم انسانی در بیماران مبتلابه سرطان‌های کبد، پستان و کولون کمک گرفت.

تشکر و قدردانی

آزمایش‌های مطالعه حاضر در مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی قم به سرپرستی خانم دکتر طاهره کمیلی موحد انجام شده است. بخشی از این مقاله حاصل از پایان‌نامه خانم رقیه رامین‌فر با شناسه اخلاق در پژوهش به شماره IR.MUQ.REC.1397.129 و تحت حمایت مالی اعطاشده از سوی معاونت محترم تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی قم است. بدین‌وسیله از حمایت مادی و معنوی دانشگاه علوم پزشکی قم تقدیر و تشکر می‌شود.

References:

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018. CA Cancer J Clin 2018;68(1):7-30. PMID: 29313949

2. Cancer search–diet related cancer. Kafoodle. Available at: URL: https://kafoodle.com/blog/cure-cancer-diet-related/161011-being-overweight-and-cancer-types_-_to_upload_3/; 2017. Link

3. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. Int J Cancer 2015;136(5):E359-86. PMID: 25220842

4. Sarmento-Ribeiro AB, Scorilas A, Goncalves AC, Efferth T, Trougakos IP. The emergence of drug resistance to targeted cancer therapies: clinical evidence. Drug Resist Updat 2019;47:100646. PMID: 31733611

5. Manoj G, Thampi BS, Leelamma S, Menon PV. Effect of dietary fiber on the activity of intestinal and fecal beta-glucuronidase activity during 1,2-dimethylhydrazine induced colon carcinogenesis. Plant Foods Hum Nutr 2001;56(1):13-21. PMID: 11213165

6. Espinoza MI, Vincken JP, Sanders M, Castro C, Stieger M, Agosin E. Identification, quantification, and sensory characterization of steviol glycosides from differently processed Stevia rebaudiana commercial extracts. J Agric Food Chem 2014;62(49):11797-804. PMID: 25393842

International License Creative Commons Attribution License 4.0

7. Rao GN, Rao PP, Balaswamy K, Satyanarayana A. Antioxidant activity of stevia (Stevia rebaudianaL.) leaf powder and a commercial stevioside powder. J Food Pharm Sci 2014;2(2):32-8. Link

8. Gawel-Beben K, Bujak T, Niziol-Lukaszewska Z, Antosiewicz B, Jakubczyk A, Karas M, et al. Stevia rebaudiana Bert. leaf extracts as a multifunctional source of natural antioxidants. Molecules 2015;20(4):5468-86. PMID: 25826787

9. Ahmed B, Hossain M, Islam R, Kumar Saha A, Mandal A. A review on natural sweetener plant – stevia having medicinal and commercial importance. Agronomski Glasnik 2011;73(1-2):75-92. Link

10. Jyoti J, Kaur M, Mishra V, Mittal A. Sweet future of stevia: a magical sweetener. Asian J Pharm Clin Res 2018;11(2):36-42. Link

11. Deshmukh SR, Kedari VR. Isolation, purification and characterization of sweetners from stevia rebaudiana (Bertoni) for their anticancerous activity against colon cancer. World J Pharm Pharm Sci 2014;3(5):1394-410. Link

12. Geuns JM. Stevioside. Phytochemistry 2003;64(5):913-21. PMID: 14561506

13. Shivanna N, Naika M, Khanum F, Kaul VK. Antioxidant, anti-diabetic and renal protective properties of Stevia rebaudiana. J Diabetes Complications 2013;27(2):103-13. PMID: 23140911

14. Ritu M, Nandini J. Nutritional composition of Stevia rebaudiana, a sweet herb, and its hypoglycaemic and hypolipidaemic effect on patients with non-insulin dependent diabetes mellitus. J Sci Food Agric 2016;96(12):4231-4. PMID: 26781312

15. Mohd-Radzman NH, Ismail WI, Adam Z, Jaapar SS, Adam A. Potential roles of stevia rebaudiana bertoni in abrogating insulin resistance and diabetes: a review. Evid Based Complement Alternat Med 2013;2013:718049. PMID: 24324517

16. Abolhasani A, Biria D, Abolhasani H, Zarrabi A, Komeili T. Investigation of the role of glucose decorated chitosan and PLGA nanoparticles as blocking agents to glucose transporters of tumor cells. Int J Nanomed 2019;14:9535-46. PMID: 31824149

17. Jayaraman S, Manoharan M, Illanchezian S. In-vitro antimicrobial and antitumor activities of stevia rebaudiana (Asteraceae) leaf extracts. Trop J Pharm Res 2008;7(4):1143-9. Link

18. Chen J, Xia Y, Sui X, Peng Q, Zhang T, Li J, et al. Steviol, a natural product inhibits proliferation of the gastrointestinal cancer cells intensively. Oncotarget 2018;9(41):26299-308. PMID: 29899860

19. Gupta E, Kaushik S, Purwar S, Sharma R, Balapure AK, Sundaram S. Anticancer potential of steviol in MCF-7 human breast cancer cells. Pharmacogn Mag 2017;13(51):345-50. PMID: 28839355

20. Paul S, Sengupta S, Bandyopadhyay TK, Bhattacharyya A. Stevioside induced ROS-mediated apoptosis through mitochondrial pathway in human breast cancer cell line MCF-7. Nutr Cancer 2012;64(7):1087-94. PMID: 23061910

21. Abolhasani A, Heidari F, Noori S, Mousavi S, Abolhasani H. Cytotoxicity evaluation of dimethoxy and trimethoxy indanonic spiroisoxazolines against cancerous liver cells. Curr Chem Biol 2020;14(1):38-48. Link

22. Abolhasani H, Zarghi A, Abolhasani A, Hamzeh-Mivehroud M, Bargahi N, Notash B, et al. Design, synthesis and in vitro cytotoxicity evaluation of new 3',4'-bis (3,4,5-trisubstituted)-4'H-spiro[indene-2,5'-isoxazol]-1(3H)-one derivatives as promising anticancer agents. Lett Drug Des Discov 2014;11(10):1149-61. Link

23. Ruiz-Ruiz JC, Moguel-Ordoñez YB, Segura-Campos MR. Biological activity of Stevia rebaudiana Bertoni and their relationship to health. Crit Rev Food Sci Nutr 2017;57(12):2680-90. PMID: 26479769

24. Alijani HQ, Pourseyedi S, Mahani MT, Khatami M. Green synthesis of zinc sulfide (ZnS) nanoparticles using Stevia rebaudiana Bertoni and evaluation of its cytotoxic properties. J Mol Struct 2019;1175:214-8. Link

25. Rajesh P, Rajesh VK, Durai MT. Effect of Stevia rebaudiana Bertoni ethanolic extract on anti-cancer activity of Erlisch's Ascites carcinoma induced mice. Curr Biotica 2010;3(4):549-54. Link

International License Creative Commons Attribution License 4.0