

مقاله پژوهشی

بررسی اثر سمیت عصاره‌های هیدروالکلی گیاه پونه و مرزه تابستانی بر رده‌های سلولی سرطان سینه انسانی (MCF-7 و MCF-10)

آیت محبی^۱، هانیه یزدانی^۲، سمیه نوریان^۳، رضوانه ترابی گودرزی^۳، یاسین سرواهرابی^{۴*}

^۱ کارشناسی ارشد سلولی و مولکولی، عضو باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، مرکز بروجرد، دانشگاه آزاد اسلامی، لرستان، ایران
^۲ کارشناسی ارشد سلولی و مولکولی، گروه زیست‌شناسی، مرکز بروجرد، دانشگاه آزاد اسلامی، لرستان، ایران
^۳ کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، گروه زیست‌شناسی، مرکز بروجرد، دانشگاه آزاد اسلامی، لرستان، ایران
^۴ دکتری تخصصی میکروبیولوژی، گروه زیست‌شناسی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۹/۱۷ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۲/۰۹

چکیده

مقدمه: سرطان پستان یکی از بدخیمی‌های مهم می‌باشد که از هر هشت زن، یک نفر را مبتلا می‌کند. با وجود روش‌های درمانی جدید، مرگ ناشی از سرطان هر سال رو به افزایش می‌باشد. گیاهان دارویی از جمله منابع مهم ترکیبات ضد سرطان هستند. در این راستا، مطالعه حاضر با هدف تعیین اثرات سمیت سلولی عصاره هیدروالکلی گیاه پونه و مرزه تابستانی بر رده‌های سلولی MCF-7 و MCF-10 (سرطان پستان انسانی) در شرایط آزمایشگاهی انجام شد.

مواد و روش‌ها: مطالعه حاضر در آزمایشگاه دانشگاه آزاد بروجرد در سال ۱۳۹۹ انجام شد. پس از تهیه عصاره هیدروالکلی هر دو گیاه، اثر غلظت‌های مختلف ۱۲۵،۶۰،۳۰،۱۵،۷،۳ و ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر گیاه پونه و مرزه تابستانی بر رده‌های سلولی تهیه شده از بخش تومور بانک انستیتو پاستور ایران به مدت ۲۴، ۲۸ و ۷۲ ساعت مورد بررسی قرار گرفت. اثر سمیت سلولی با استفاده از روش MTT (ارزیابی شد. جذب نوری نیز توسط دستگاه الیزا در طول موج ۵۷۰ نانومتر اندازه‌گیری گردید. در این مطالعه از روش‌های آماری آنالیز واریانس یک طرفه استفاده شد. شناسایی ترکیبات توسط دستگاه GC/MS (Gas chromatography-mass spectrometry) صورت گرفت.

یافته‌ها: بالاترین درصد مهار رده سلول‌های سرطانی MCF-7 و MCF-10 در عصاره هیدروالکلی گیاه مرزه تابستانی در غلظت ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به میزان ۹۶/۵۵۸ درصد و در گیاه پونه با همین غلظت معادل ۸۸/۵۴۷ درصد بود. نتیجه‌گیری: نتایج نشان دادند که عصاره هیدروالکلی برگ گیاه پونه و مرزه تابستانی، اثر سمیت سلولی قابل توجهی بر رده سلول‌های سرطانی داشته و منجر به مهار شدید رشد رده سلولی سرطانی شده است.

کلمات کلیدی: پونه، سرطان سینه، عصاره هیدروالکلی، مرزه تابستانی

مقدمه

سرطان پستان شایع‌ترین نوع سرطان در میان زنان با تخمین ۱/۳۸ میلیون مورد جدید در سال ۲۰۱۹ (۲۳ درصد از تمام انواع سرطان‌ها) بوده و در رتبه دوم تمامی انواع سرطان قرار دارد. اخیراً مشخص شده است که شیوع سرطان پستان در کشورهای توسعه‌یافته و توسعه‌نیافته با حدود ۶۹۰۰۰۰ مورد جدید در هر ناحیه (نسبت جمعیتی ۴: ۱) می‌باشد (۱). بخشی از این افزایش شیوع را می‌توان به تغییر در الگوی تولید مثل مانند باروری با تأخیر و داشتن تعداد فرزند کمتر نسبت داد (۲). اگرچه افزایش شیوع این بیماری در ایران در چهار دهه اخیر میزان کمتری نسبت به سایر کشورها داشته است؛ اما هنوز هم یکی از شایع‌ترین بدخیمی‌ها در زنان ایرانی به شمار می‌آید (۳). بافت پستان به طور عمده توسط هورمون‌های جنسی استروژن و پروژسترون تنظیم می‌شود و تکثیر سلول‌های اپیتلیال پستان به طور گسترده به عنوان نشانگر مواجهه با هورمون یا اثرات آن مورد استفاده قرار می‌گیرد. از آنجایی که اثرات شبه استروژنیک ایزوفلاون‌ها مورد توجه است، آگاهی از رابطه بین استروژن و سرطان پستان می‌تواند سبب ایجاد یک چشم‌انداز مناسب در این زمینه شود (۴). ایزوفلاون‌ها زیرمجموعه‌ای از استروژن‌ها می‌باشند. فیتواستروژن‌ها ترکیباتی طبیعی هستند که در گیاهان یافت می‌شوند. ایزوفلاون‌ها، کومستان‌ها و لیگنان‌ها سه زیرمجموعه مهم فیتواستروژن‌ها محسوب می‌شوند (۵). محصولات طبیعی به ویژه اندام‌های رویشی گیاهان برای درمان بیماری‌های مختلف طی هزاران سال مورد استفاده قرار گرفته است. با توجه به عوارض جانبی بسیاری از داروهای شیمیایی، استفاده از داروهای طبیعی جایگزین در دهه‌های گذشته به شدت افزایش یافته است (۶). در مطالعات مختلف نشان داده شده است که برخی از داروهای گیاهی، فعالیت ضد سرطانی دارند. کمبود شواهد علمی در

ارتباط با مسیرهای فعالیت گیاهان دارویی، استفاده بالینی از آن‌ها را کاهش می‌دهد (۷). خانواده *Labiatae* یا لامیاسه (*Lamiaceae*) شامل: ۲۲۰ جنس و ۳۳۰۰ گونه است که مصارف گوناگونی دارد (۸). *Mentha Pulegitim L.* یا پونه یکی از گونه‌های جنس منتا از خانواده لابیاته است (۹). این گیاه در کشورهای اروپای غربی، جنوبی و مرکزی همچون اوکراین، ایرلند، آفریقای شمالی، ایتالیایی، برزیل، پرتغال، تونس، ایران و کشورهای عربی رشد می‌کند (۱۰، ۱۱). گیاه پونه به طور عمده به عنوان ضد نفخ، ضد اسپاسم و ضد التهاب در ایران مصرف می‌شود (۱۲). به طور سنتی، جوشانده این گیاه در درمان فیبروز و سرطان گردن رحم مورد استفاده قرار می‌گیرد. با این وجود، هیچ پژوهش علمی مبنی بر سمیت سلولی این داروی گیاهی در سرطان سینه گزارش نشده است (۱۳). گیاه دارویی مرزه تابستانی *Satureja hortensis.L.* از خانواده نعناعیان بوده و به صورت بوته‌ای رشد می‌کند (۱۴). مرزه گیاهی است دارای گل‌های متعدد به اندازه ۱/۵ میلی‌متر که برگ‌های آن به صورت نیزه‌ای شکل بوده و دارای غدد ترشحی حاوی اسانس می‌باشد (۱۵). مرزه تابستانی گیاهی است معطر که اثرات مختلفی از جمله درمان دردهای عضلانی، تهوع و بیماری‌های عفونی و اسهال دارد (۱۶). در این راستا، سنجش میزان بقا و تکثیر سلولی در تعیین میزان اثر داروهای ضد سرطانی بر سلول‌ها امری مهم به نظر می‌رسد که در این خصوص روش‌های متعددی استاندارد شده است (۱۷). با توجه به اینکه تاکنون مطالعه جامعی در زمینه اثر ضد سرطانی هیدروالکلی گیاهان پونه و مرزه تابستانی صورت نگرفته است، مطالعه حاضر با هدف تعیین اثر سمیت سلولی هیدروالکلی برگ گیاه پونه و مرزه تابستانی بر رده‌های سلولی MCF-7 و MCF-10 به عنوان مدلی از سرطان پستان به طور مقدماتی و برای اولین بار انجام شد.

مواد و روش‌ها

این مطالعه در سال ۱۳۹۹ در آزمایشگاه دانشگاه آزاد بروجرد انجام شد. گیاهان تازه پونه و مرزه تابستانی در فصل تابستان از مناطق مختلف شهرستان بروجرد و درود جمع‌آوری شدند و در هر بار یوم گیاهی دانشگاه آزاد اسلامی واحد بروجرد مورد تأیید قرار گرفتند. پس از جمع‌آوری، گیاهان به مدت یک هفته در شرایط مناسب و در سایه خشک گردیدند و سپس برای تهیه عصاره توسط آسیاب برقی پودر شدند.

عصاره‌گیری

عصاره هیدروالکلی گیاهان به روش تقطیر با آب به دست آمد و ترکیبات آن توسط دستگاه گاز کروماتوگرافی جرمی (توسط دستگاه GC/MS) شناسایی گردید. عصاره‌گیری به روش سوکسله صورت گرفت. ۵۰ گرم پودر به دست آمده از برگ‌های خشک شده گیاهان با ۴۰۰ سی‌سی اتانول ۸۰ درصد مخلوط شد و در دستگاه سوکسله قرار گرفت. این عمل حدوداً ۲۴ ساعت به طول انجامید. پس از عصاره‌گیری، عمل حذف حلال با استفاده از پمپ خلاء در فشار کم انجام شد و عصاره در انکوباتوری با دمای ۴۷ درجه سانتی‌گراد کاملاً خشک گردید.

روش MTT

پس از پاساژ دادن سلول‌ها و شمارش آن‌ها با هموسایتومتر (شرکت مارینفلد)، ۱۰۰۰۰ سلول در هر چاهک از پلیت ۹۶ خانه‌ای ریخته شد و به مدت ۲۴ ساعت با محیط کشت FBS (Fetal Bovine Serum) ۱۰ درصد، RPMI 1640 (محیط کشت Roswell Park Memorial Institute)، ۱/۵ سی‌سی استرپتومايسين و ۵ سی‌سی پنی‌سیلین در انکوباتور ۳۷ درجه Co₂ (شرکت ممرت) قرار گرفت تا سلول‌ها به کف چاهک بچسبند.

سپس چاهک‌ها با بافر PBS (Phosphate buffered saline) شستشو داده شدند و با ۱۰۰ میکرولیتر محیط تازه و ۲۰ میکرولیتر از دوزهای مورد نظر تیمار گردیدند و هر تیمار سه بار تکرار گشت. سپس پلیت‌ها به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در انکوباتور Co₂ در دمای ۳۷ درجه قرار داده شدند. پس از طی زمان مورد نظر، محیط قبلی برداشته شد و با بافر شستشو داده شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر محیط تازه بدون سرم و ۱۰ میکرولیتر محلول MTT (شرکت سیگما) به هر چاهک اضافه گردید و به مدت دو ساعت در انکوباتور دارای Co₂ قرار داده شد. پس از گذشت این مدت، مایع رویی چاهک‌ها دور ریخته شد و به هر چاهک جهت لیز سلولی، ۲۰۰-۱۵۰ میلی‌لیتر DMSO (Dimethyl sulfoxide) (شرکت سیگما) اضافه گردید و سپس جذب نوری متعلق به هر چاهک در طول موج بین ۵۷۰-۵۹۰ نانومتر توسط دستگاه الیزا ریدر (DLAGNOSTIC) خوانده شد. از فرمول زیر برای محاسبه میزان زنده بودن سلول‌ها استفاده گردید (۱۸).

$$100 \times \text{کنترل OD} - \text{نمونه OD} = \text{توان زیستی سلول‌ها}$$

آنالیز آماری

به منظور محاسبه میانگین سنجش اثر سایتوتوکسیسیته عصاره‌های هیدروالکلی از نرم‌افزار SIGMASTATIN San Raphael, (Jandel CA)، Software استفاده گردید و تحلیل داده‌ها با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه (one Way ANOVA) و آزمون تعقیبی Tukey در سطح معناداری ۰/۰۵ انجام شد.

نتایج

نسبت ترکیبات هر دو گیاه پونه و مرزه تابستانی توسط دستگاه GC/MS مشخص شد. بیشترین میزان ترکیب موجود در گیاه پونه مربوط به

میانگین و انحراف معیار سلول سرطانی و سلول سالم برای گیاه مرزه تابستانی و گیاه پونه در جدول ۳ ارائه شده است. مطابق با یافته‌ها، متوسط سلول سرطانی در گیاه مرزه تابستانی کمتر از متوسط سلول سرطانی پونه

بود. [cyclohexanol,5-methyl-2-]1-methylethyl همچنین بیشترین میزان ترکیب موجود در گیاه مرزه تابستانی مربوط به Phenol بود (جداول ۱ و ۲). با توجه به نتایج ذکر شده در جدول ۳، نرمال بودن توزیع تمامی گونه‌ها مورد تأیید قرار می‌گیرد.

جدول ۱: نتایج آنالیز درصد ترکیبات موجود در عصاره هیدروالکلی گیاه *Mentha Pulegium L.* توسط GC/MS

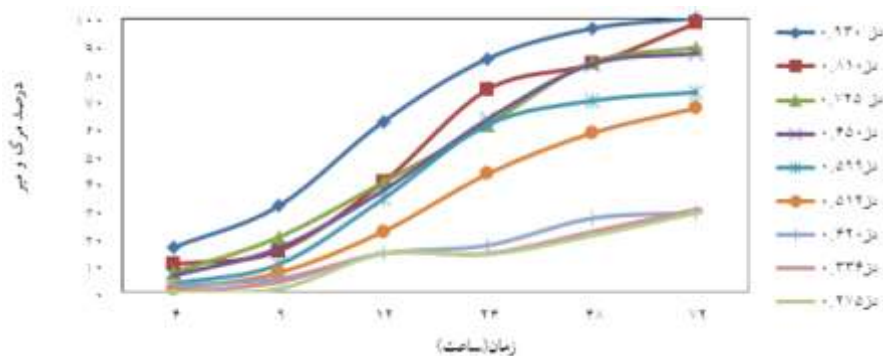
ردیف	محتوا	درصد
۱	1,2-propanediol	۸,۸۴۶
۲	isopulegol 1	۲,۳۱۱
۳	l-menthone	۰,۳۳۳
۴	menthol	۰,۶۹۶
۵	[cyclohexanol,5-methyl-2-]1-methylethyl	۸۵,۸۵۷
۶	cyclohexanol,5-methyl-2-[1-methylethyl]-,[1.alpha.,2beta.,5.alpha]	۰,۵۱۸
۷	benzoic acid,4-hydroxy-, methyl ester	۰,۷۸۰
۸	octadec-9enoic acid	۰,۲۸۶۰
۹	phthalic acid ,di[2-propylpentyl] ester	۰,۲۸۱
۱۰	octasioxane,1,1,3,3,5,5,7,7,9,9,11,11,13,13,15,15,-hezadeca methyl	۰,۰۹۲

جدول ۲: درصد ترکیبات موجود در عصاره هیدروالکلی گیاه *Satureja hortensis L.* توسط GC/MS

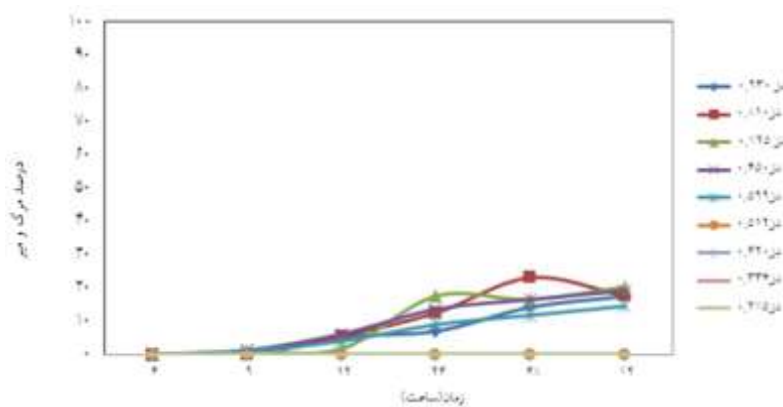
ردیف	محتوا	درصد
۱	ESTRAGOLE	۸,۶۶۸
۲	PHENOL	۳۵,۲۸۹
۳	GAMMA.-TERPINENE	۲۹,۹۲۱
۴	ALPHA.-TERPINENE	۶,۷۰۶
۵	P-CYMENE	۴,۹۱۸
۶	BETA-NYRCENE	۲,۵۹۷
۷	ALPHA.-THUJENE	۱,۹۶۶
۸	ALPHA-PINENE	۱,۲۵۸
۹	2-BETA.-PINENE	۱,۰۰۱
۱۰	BETA-PHELLANDRENE	۱,۱۷۷

جدول ۳: آماره‌های توصیفی متغیرهای پژوهش

نام متغیر	معیارهای تمرکز		
	میانگین	انحراف معیار	میانگین
میانگین سلول سرطانی برای مرزه	۰/۴۹	۰/۳۰	۰/۵۹
میانگین سلول سالم برای مرزه	۰/۶۲	۰/۱۵	۰/۷۲
میانگین سلول سرطانی برای پونه	۰/۵۵	۰/۲۷	۰/۶۸
میانگین سلول سالم برای پونه	۰/۷۰	۰/۰۷	-



نمودار ۱: درصد کشندگی مرزه تابستانی



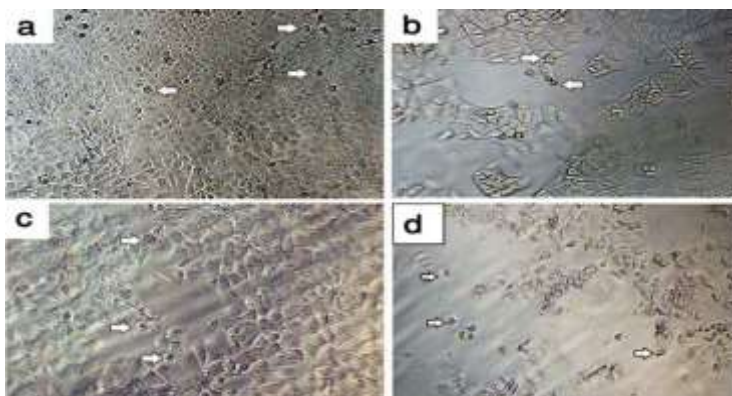
نمودار ۲: درصد کشندگی پونه

۷۱/۲۱۲ درصد بوده است که دارای اختلاف معنادار ($P < 0.05$) می‌باشند. همچنین مهار رشد یا تقسیم سلولی رده MCF-7 در پی تأثیر عصاره‌های هیدروالکلی گیاهان مرزه تابستانی و پونه در غلظت‌های مختلف حاکی از آن است که گیاه مرزه تابستانی در غلظت‌های ۵۰۰، ۲۵۰ و ۱۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر، بالاترین تأثیر را بر مهار رشد داشته است. گیاه پونه نیز در غلظت ۵۰۰ و ۲۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، بالاترین اثر مهاری را داشته است. مشاهده تغییرات مورفولوژیک سلول‌ها پس از تیمار با غلظت‌های مختلف عصاره هیدروالکلی، یافته‌های آزمایش سنجش با MTT را تأیید می‌کند. شایان ذکر است که با افزودن عصاره‌ها به ویژه در غلظت‌های بالا، سلول‌های تغییر شکل داده و جدا شده از سطح و همچنین برخی از لاشه‌های سلولی که دلالت بر سمی

بوده است. بین میانگین سلول سرطانی و میانگین سلول سالم برای مرزه تابستانی (OD) تفاوت معناداری وجود ندارد؛ اما بین میانگین سلول‌های سرطانی (MCF-7) و (MCF-10) و میانگین سلول‌های سالم برای پونه (OD) تفاوت معناداری مشاهده می‌شود.

بالاترین درصد مهار رده سلول‌های سرطانی MCF-7 و MCF-10 در عصاره هیدروالکلی گیاه مرزه تابستانی در غلظت ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به میزان ۹۶/۵۵۸ درصد و در گیاه پونه در همین غلظت معادل ۸۸/۵۴۷ درصد بوده است که این مقادیر دارای اختلاف معنادار ($P < 0.05$) می‌باشند (نمودارهای ۱ و ۲). نتایج حاکی از آن هستند که بالاترین درصد مهار رده سلول‌های سرطانی MCF-10 در گیاه مرزه تابستانی در غلظت ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به میزان ۹۱/۹۹۴ درصد و در گیاه پونه در همین غلظت برابر با

بودن عصاره‌های هیدروالکلی و وقوع مرگ سلول دارد، به خوبی مشاهده گردید (شکل ۱).



شکل ۱: سلول‌های MCF-7 و MCF-10 در گروه تیمار با عصاره‌های هیدروالکلی گیاه مرزه تابستانی و پونه؛ (a) غلظت ۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر تیمار با مرزه تابستانی؛ (b) غلظت ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تیمار با مرزه تابستانی؛ (c) غلظت ۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر تیمار با پونه؛ (d) غلظت ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تیمار با پونه

بحث

شناسایی دقیق‌تر مکانیسم و اثرات بیولوژیکی آن‌ها و همچنین اثرات آن‌ها بر فاکتورهای مختلف داخل سلولی را امکان‌پذیر می‌سازد. این امکانات شناسایی هرچه بهتر فرایند فعل و انفعالات داخلی سلولی طی درمان سرطان با گیاهان دارویی را ممکن می‌سازد که می‌تواند منجر به ارتقای روش‌های درمانی گردد. در هر حال، یکی از مهم‌ترین کاندیداهای سنتز داروهای ضد سرطانی، گیاهان دارویی با اثرات سمیت و به ویژه سمیت سلولی هستند که سمیت آن‌ها در کشت سلولی قابل اندازه‌گیری می‌باشد. ترکیبات با منشأ گیاهی به دلیل فراوانی، عوارض جانبی و تداخلات دارویی کمتر، امروزه کانون توجه داروسازان به منظور سنتز داروهای نوین در درمان بیماری‌های صعب‌العلاج مانند سرطان می‌باشد (۲۳). با نظر اجمالی به جداول و نمودارهای ارائه شده در این پژوهش می‌توان ادعا کرد که عصاره هیدروالکلی گیاه مرزه تابستانی دارای اثر سمیت سلولی بر رده سلولی سرطان پستان (MCF-7 و MCF-10) بوده است. در پژوهش حاضر با توجه به اینکه با گذشت زمان، بالاترین خاصیت سمیت سلولی حتی در غلظت پایین عصاره هیدروالکلی مرزه تابستانی و پونه بروز کرد، حضور ترکیبات ضد سرطانی قوی مانند فلاونوئیدها، ایزوفلاون

واژه آپوپتوزیس یا آپوپتوز (Apoptosis) یک واژه یونانی به معنای ریزش برگ درختان پاییزی است. در سال ۱۹۷۲ هنگامی که Kerr و همکاران برای نخستین بار تفاوت میان نکروز و آپوپتوز را مشاهده کردند، گمان نمی‌بردند که پدیده اکتشافی آن‌ها روزی سرلوحه مطالعات ضد سرطان قرار گیرد (۱۹). فرایند آپوپتوز از طریق مسیرهایی چون ممانعت‌کننده‌های کاسپازی (۲۰)، مسیر مولکولی P53 (۲۱)، اختلالات در میزان یون کلسیم (۲۲) و غیره صورت می‌پذیرد. در سنوات گذشته، بیش از صدها عصاره هیدروالکلی و اسانس از بیش از ۲۰ خانواده گیاهی در بیش از ۲۰ نوع سرطان مورد ارزیابی قرار گرفته است. در این راستا، پژوهش حاضر بر فعالیت‌های ضد سرطانی عصاره هیدروالکلی دو گیاه پونه و مرزه تابستانی و اثرات آن‌ها بر انواع مختلف سرطان متمرکز می‌باشد. استفاده از روش‌های کشت سلولی، درک بسیار عمیق‌تری را از تأثیر داروها و گیاهان دارویی بر سلول‌های سرطانی و طبیعی پدید می‌آورد. اثرات و تغییراتی که ترکیبات مختلف مانند عصاره هیدروالکلی گیاهان مرزه و پونه (که در این پژوهش مورد بررسی قرار گرفتند) بر سلول‌ها در فضای کنترل شده و قابل بررسی کشت سلولی ایجاد می‌نمایند،

می‌شوند و از طریق مکانیسم رقابتی، این گلیکوپروتئین را غیر فعال می‌سازند (۲۷).

نتیجه‌گیری

با توجه به یافته‌های این پژوهش، بروز اثر سمیت سلولی عصاره هیدروالکلی پونه و مرزه تابستانی در این مقاله، اثر مکانیسم ارائه شده فلاونوئیدهای موجود در پونه بوده است. با توجه به ترکیبات فلاونوئید و دیگر ترکیبات آنتی‌اکسیدانی در گیاهان مورد بررسی در این پژوهش که خاصیت سمیت سلول سرطانی آن‌ها به اثبات رسید، مکانیسم دقیق مولکولی این اثرات، جداسازی سایر ترکیبات مؤثر در عصاره هیدروالکلی گیاهان ذکر شده و مقایسه ترکیبات موجود در بخش‌های مختلف گیاهان دارویی توصیه می‌شود.

پیشنهادات

با توجه به اثر سمیت سلولی و ضد سرطانی گیاهان مرزه تابستانی و پونه بر رشد سلول‌های سرطان پستان پیشنهاد می‌شود پژوهش در مورد کاربرد کلینیکی این گیاهان دارویی در دوزهای مختلف به دست آمده در جهت پیشگیری و درمان - حتی در کنار داروهای شیمی‌درمانی - این نوع شایع سرطان به صورت *in vivo* صورت گیرد.

حمایت مالی

این مطالعه با حمایت مالی دانشگاه آزاد اسلامی واحد بروجرد و تهران مرکزی انجام شده است.

تضاد منافع

نویسندگان اعلام می‌نمایند که هیچ‌گونه تعارض منافی در پژوهش حاضر وجود ندارد.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از تمامی افرادی که در راستای انجام این پژوهش با نویسندگان همکاری نمودند، تقدیر و تشکر می‌گردد.

ها و دیگر ترکیبات آنتی‌اکسیدانی در این دو گیاه تأیید می‌شود. از میان ۱۹ ترکیب عصاره هیدروالکلی مرزه تابستانی، کارواکرول (۴۵/۳۹ درصد)، گاما ترپنین (۷۲/۳۱ درصد) و پارسیمن (۲۵/۱۱ درصد) عمده‌ترین ترکیبات تشکیل‌دهنده گیاه مرزه تابستانی هستند. این گیاه در بررسی‌های آزمایشگاهی، اثرات ضد میکروبی، آنتی‌اکسیدانی، خواب‌آوری و ضد اسپاسم را نشان داده است (۲۴). در مطالعه Badia و همکاران، ۱۹ عصاره مناتولی از گیاهان خانواده لامیاسه جمع‌آوری شده از نقاط مختلف یونان برای ارزیابی فعالیت ضد سرطانی علیه میگوی آب شور مورد بررسی قرار گرفت که در آزمون مرگ‌بار میگوی آب شور، گیاه پونه تنها نمونه‌ای بود که خاصیت ضد سرطانی را در $IC_{50}=347/3$ میکروگرم بر میلی‌لیتر نشان داد؛ در حالی که تمام نمونه‌های باقی‌مانده، IC_{50} را در غلظت‌های بالاتر از ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نشان دادند (۲۵). در مطالعه‌ای دیگر، حاجی قاسمی و همکاران اثر ضد سرطانی گونه دیگری از نعنا با نام منتا اسپیکاتا را بر دو رده سلول توموری فیبروسارکوما و لوسمی مونوسیت بررسی کردند که IC_{50} برای رده سلولی فیبروسارکوما معادل $63/97$ ، $4/5$ و $4/77$ میکروگرم بر میلی‌لیتر و برای رده سلولی لوسمیک مونوسیت معادل $5/6$ ، $5/3$ و $4/84$ میکروگرم بر میلی‌لیتر به ترتیب پس از گذشت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به دست آمد (۲۶). نکته قابل تأمل در پژوهش حاضر در مقایسه با آزمایشات بادیا و حاجی قاسمی این است که در مطالعه حاضر، IC_{50} در غلظتی پایین‌تر حاصل شد که می‌تواند ناشی از انتخاب عصاره هیدروالکلی برای استخراج کامل ترکیبات ضد سرطانی این گیاه و همچنین تفاوت در نوع رده‌های سلولی سرطانی بررسی شده در این پژوهش باشد. نتایج مطالعات Ozben نشان دادند که فلاونوئیدها به طور مستقیم با قسمت C ترمینال از دومین گلیکوپروتئین P ارتباط برقرار می‌کنند. علاوه بر این، فلاونوئیدها مانع تبدیل آدنوزین تری‌فسفات به آدنوزین دی‌فسفات

References

- Kang HB, Zhang YF, Yang JD, Lu KL. Study on soy isoflavone consumption and risk of breast cancer and survival. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2012; 13(3):995-8.
- Goya MM, Alavian SM, Ramezani R. National cancer registration programmer. Available at: URL: http://vch.iuims.ac.ir/uploads/ncr_guideline.pdf; 2012.
- Mousavi SM, Montazeri A, Mohagheghi MA, Jarrahi AM, Harirchi I, Najafi M, et al. Breast cancer in Iran: an epidemiological review. *Breast J*. 2007; 13(4):383-91.
- Xu WH, Liu ZB, Yang C, Qin W, Shao ZM. Expression of dickkopf-1 and beta-catenin related to the prognosis of breast cancer patients with triple negative phenotype. *PLoS One*. 2012; 7(5):e37624.
- Peeters PH, Keinan-Boker L, van der Schouw YT, Grobbee DE. Phytoestrogens and breast cancer risk. Review of the epidemiological evidence. *Breast Cancer Res Treat*. 2003; 77(2):171-83.
- Hemati A, Azarnia M, Angaji SA. Medicinal effects of *Heracleum persicum* (Golpar). *Middle East J Sci Res*. 2010; 5(3):174-6.
- Eisenberg DM, Kessler RC, Foster C, Norlock FE, Calkins DR, Delbanco TL. Unconventional medicine in the United States. Prevalence, costs, and patterns of use. *N Engl J Med*. 1993; 328(4):246-52.
- Kamkar A, Javan AJ, Asadi F, Kamalinejad M. The antioxidative effect of Iranian *Mentha pulegium* extracts and essential oil in sunflower oil. *Food Chem Toxicol*. 2010; 48(7):1796-800.
- Darvishi E, Kahrizi D, Bahraminejad S, Mansouri M. In vitro induction of α -pinene, pulegone, menthol, menthone and limonene in cell suspension culture of pennyroyal (*Mentha pulegium*). *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 2016; 62(3):7-9.
- Jafari A, Kahrizi D, Mansouri M. Effects of plant growth regulators and explant on callus induction in pennyroyal (*Mentha pulegium* L.). *Biharean Biol*. 2016; 10(2):134-6.
- Darvishi E, Kazemi E, Kahrizi D, Bahraminejad S, Mansouri M, Chaghakaboudi SR, et al. Optimization of callus induction in Pennyroyal (*Mentha pulegium*). *J Appl Biotechnol Rep*. 2014; 1(3):97-100.
- Marderosian AD. Peppermint. The review of natural products. New York: Fact and Comparisons; 2001. P. 465-6.
- Parejo I, Viladomat F, Bastida J, Rosas-Romero A, Flerlage N, Burillo J, et al. Comparison between the radical scavenging activity and antioxidant activity of six distilled and nondistilled mediterranean herbs and aromatic plants. *J Agric Food Chem*. 2002; 50(23):6882-90.
- Zargari, A. Medicinal plants. Tehran, Iran: Tehran University Publisher; 1989. P. 894.
- Omidbeigi R. Approaches to production and processing of medicinal plants (III). Mashhad, Iran: Astanghods Razavi Publisher; 2000. P. 283.
- Vazquez P, Holguin G, Puente ME, Lopez-Cortes A, Bashan Y. Phosphate-solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of mangroves in a semiarid coastal lagoon. *Biol Fertil Soils*. 2000; 30(5):460-8.
- Shokrgozar M, Zali H, Rezaei-Tavirani M, Amanzadeh A. Comparison of two staining assays; Trypan blue and MTT in vitro evaluation of human calprotectin proliferation inhibition on human gastric cancer cell. *Kowsar Med J*. 2007; 127(2):12-37.
- Shahrokhbadi K, Tavakkolafshari J, Rakhshandeh H, Brook A. Study of cytotoxicity effect of total Saffron's extract on HepG2 cell line. *Tehran Azad Univ Med Sci J*. 2009; 19:153-9.
- Cohen GM. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J*. 1997; 326 (Pt 1):1-16.
- Ekert PG, Silke J, Vaux DL. Caspase inhibitors. *Cell Death Different*. 1999; 6(11):1081-6.
- Cheok CF, Verma CS, Baselga J, Lane DP. Translating p53 into the clinic. *Nat Rev Clin Oncol*. 2011; 8(1):25-37.
- Nguyen RL, Medvedeva YV, Ayyagari TE, Schmunk G, Gargus JJ. Intracellular calcium dysregulation in autism spectrum disorder: an analysis of converging organelle signaling pathways. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*. 2018; 1865(11 Pt B):1718-32.
- Sarris J. Herbal medicines in the treatment of psychiatric disorders: 10-year updated review. *Phytother Res*. 2018; 32(7):1147-62.
- Abou Baker DH, Al-Moghazy M, ElSayed AA. The in vitro cytotoxicity, antioxidant and antibacterial potential of *Satureja hortensis* L. essential oil cultivated in Egypt. *Bioorg Chem*. 2020; 95:103559.
- Badisa RB, Tzakou O, Couladis M, Pilarinou E. Cytotoxic activities of some Greek Labiatae herbs. *Phytother Res*. 2003; 17(5):472-6.
- Hajighasemi F, Hashemi V, Khoshzaban F. Cytotoxic effect of *Mentha spicata* aqueous extract on cancerous cell lines in vitro. *J Med Plants Res*. 2011; 5(20):5142-7.
- Ozben T. Mechanisms and strategies to overcome multiple drug resistance in cancer. *FEBS Lett*. 2006; 580(12):2903-9.



Original Article

Cytotoxicity of Hydroalcoholic Extracts of *Mentha pulegium* L. and *Satureja hortensis* L. on Human Breast Cancer Cell Lines (MCF-7 and MCF-10)

Ayat Mohebifar¹, Hanieh Yazdani², Somayeh Nourian³, Rezvaneh Torabi Godarzi³,
Yasin SarveAhrabi^{4*}

¹ MSc of Cellular and Molecular Biology, Members of the Young and Elite Researchers Club, Boroujerd Branch, Islamic Azad University, Lorestan, Iran

² MSc of Cellular and Molecular Biology, Department of Biology, Boroujerd Branch, Islamic Azad University, Lorestan, Iran

³ MSc of Microbiology, Department of Biology, Boroujerd Branch, Islamic Azad University, Lorestan, Iran

⁴ PhD of Microbiology, Department of Biology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Received: 07 December 2020

Accepted: 26 April 2021

Abstract

Introduction: Breast cancer is one of the most important neoplasms affecting one out of eight women. Despite new therapeutic methods, the breast cancer mortality rate is increasing annually. Medicinal plants are considered important sources of anti-cancer compounds. The present study was conducted to evaluate the cytotoxic effects of hydroalcoholic extract of *Mentha Pulegitim* L. and *Satureja hortensis* L. on MCF-7 and MCF-10 breast cancer cell lines in vitro.

Materials and Methods: This study was performed in the laboratory of Boroujerd Azad University, Boroujerd, Iran, in 2020. After the preparation of hydroalcoholic extracts of *Mentha Pulegitim* L. and *Satureja hortensis* L., the effect of different concentrations of 3, 7, 15, 30, 60, 125, and 500 g/ml of both plants were examined on cell lines prepared at the tumor section of the Department of Cell Bank of Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran, for 24, 28, and 72 h. The effect of cytotoxicity was evaluated using an MTT assay. The light absorption was determined at 570 nm wavelengths using an enzyme-linked immunosorbent assay reader. In this study, a one-way analysis of variance was utilized. The identification of the compounds was performed using the Gas Chromatography-Mass Spectrometry method.

Results: The highest percentages of inhibition of MCF-7 and MCF-10 breast cancer cell lines were found in the 500 µg/ml concentrations of the hydroalcoholic extracts of *Satureja hortensis* L. and *Mentha Pulegitim* L. at 96.558% and 88.547%, respectively.

Conclusion: The results of the present study showed that the hydroalcoholic extracts of *Satureja hortensis* L. and *Mentha Pulegitim* L. leaves had significant cytotoxicity effects on the breast cancer cell line and prohibited their growth extensively.

Keywords: *Satureja Hortensis* L., *Mentha Pulegitim* L., Breast Cancer, Hydroalcoholic Extract