مقاله تحقیقی

مجله دانشگاه علوم پزشکی بابل
سال ۱۳۹۹، دوره ۲۲، صفحه ۲۲۸-۲۲۲

تاثیر عصاره Valeriana Sysimberifolia بر بیان ژن VEGF در رده سلولی سرطانی ریه A549

سیروس چگینی (MSc)[۱]، فرزانه تفویضی (PhD)[۱*]، حسن نوربازرگان (PhD)[۲]

۱-گروه زیست شناسی، واحد پرند، دانشگاه آزاد اسلامی، پرند، ایران
۲-گروه بیوتکنولوژی، دانشکده فناوری های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

دریافت: ۹۸/۵/۱۲، اصلاح: ۹۸/۱۰/۲۳، پذیرش: ۹۸/۱۰/۳۰

خلاصه

سابقه و هدف: امروزه استفاده از گیاهان دارویی در درمان سرطان، به دلیل عوارض جانبی کمتر از اهمیت ویژه ای برخورداراست. Vascularendothelial Growth Factor (VEGF) یکی از مهمترین فاکتورهای تحریک کننده آنژیوژنز و پیشبرد سرطان می باشد. هدف از این مطالعه، بررسی اثر ممانعتی عصاره ریشه Valeriana Sysimberifolia در تکثیر سلول های سرطانی ریه (A549) و بیان ژن VEGF در سلول های تحت تیمار می باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، عصاره هیدروالکلی ریشه گیاه Valeriana Sysimberifolia به روش پرکولاسیون تهیه شد. پس از تهیه رده سلولی A549 از مرکز ملی ذخایر زیستی و ژنتیکی، سلول های سرطانی در محیط کشت با غلظت‌های مختلف عصاره ریشه گیاه (۰/۷۸ µg/ml، ۱/۵۶، ۳/۱۲، ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰) در سه زمان ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تیمار شدند و بررسی درصد زیستایی با استفاده از روش MTT در هر سه زمان انجام شد. از روش Real Time-PCR برای بررسی بیان ژن VEGF در سلول های سرطانی تحت تیمار با غلظت IC50 عصاره گیاه استفاده شد.

یافته ها: با افزایش غلظت عصاره و زمان تیمار، کاهش درصد زیستایی سلول های سرطانی دیده شد. بیشترین مهار تکثیر سلولی در غلظت ۵۰µg/ml پس از ۷۲ ساعت دیده شد (۹۴٪ مهار رشد) که نسبت به گروه کنترل معنی دار بود (p=۰/۰۰۰۱). همچنین با افزایش زمان تیمار،کاهش بیان ژن VEGF نسبت به گروه کنترل دیده شد. بطوریکه،کاهش دو برابری بیان ژن VEGF در سلول ها، پس از ۷۲ ساعت دیده شد (p=۰/۰۰۱۷).

نتیجه گیری: بر اساس نتایج این مطالعه عصاره ریشه Valeriana Sysimberifolia، دارای فعالیت ضد تکثیری و رگزایی می باشد. لذا به نظر می رسد بتوان از عصاره گیاه به عنوان یک محصول بیولوژیک در درمان سرطان استفاده کرد.

واژه های کلیدی: Valeriana Sysimberifolia، VEGF، سرطان ریه.

مقدمه

سرطان ریه، از نظر تعداد موارد جدید تشخیص داده شده (۱/۸میلیون مورد، ۱۲/۹٪ از کل موارد) و میزان مرگ و میر (۱/۶ میلیون مرگ، ۱۹/۴٪ از کل موارد) هنوز هم شایع ترین سرطان در سراسر جهان است. میزان مرگ و میر سرطان ریه در نقاط مختلف جغرافیایی و کشورهای مختلف جهان بسیار متفاوت است. بیشترین مرگ و میر سرطان ریه در کشورهای کمتر توسعه یافته اتفاق می افتد. طبق آمارهای موجود، شیوع سرطان ریه در مردان و زنان ایرانی به طور پیوسته رو به افزایش است. در سال ۲۰۱۲، ۴۳۶۱ مرگ و میر ناشی از سرطان ریه در ایران ثبت شده است که به ترتیب ۹/۸۰٪ و ۶/۰۷٪ از کل مرگ و میرهای مربوط به ده سرطان شایع در بین زنان و مردان ایرانی به ترتیب بود (۴-۱). در متاآنالیزی که توسطHassanipour و همکاران انجام گرفت، شیوع سرطان ریه در ایران در مقایسه با سایر مناطق جغرافیایی کمی پایین تر است (۵). شایع‌ترین علت سرطان ریه، استعمال دخانیات است که دلیل ۸۵٪ از سرطان‌های ریه است (۶) و دلایل دیگر ترکیبی از عوامل ژنتیکی، گاز رادون، آزبست، آلودگی هوا (۷) و دود سیگار فرد ثالث می‌باشد (۹و۸). درمان‌های رایج عبارت از جراحی، شیمی‌درمانی، پرتودرمانی، فتودینامیک و مراقبت بالینی و مهمترین داروهای شیمی درمانی، سیس پلاتین و جمسیتابین می‌باشند (۱۰). برای رشد سریع بافت در حال توسعه تومور، وجود گردش خون کافی و دریافت عروق خونی بیشتر ضروری است و سلول های تومور حداقل از دو مکانیسم استفاده می‌کنند: یکی آنژیوژنز و دیگری واسکولوژنز. فرآیند آنژیوژنز نه تنها در القای رشد تومور بلکه در فرآیند پیچیده گسترش و متاستاز تومورها از محل اولیه و مهاجرت در طول عروق خونی و لنفاوی به نقاط دوردست نقش مهمی دارند (۱۱). آنژیوژنز تحت تأثیر فاکتورهای فعال کننده مانند: bFGF، VEGF، MMPs، NO قرار دارد (۱۲). VEGF یک پروتئین همودیمر باند شونده به هپارین با وزن مولکولی KD45 است که توانایی فعالیت پروآنژوژنیک هم در شرایط in vivo و in vitro را داراست و دارای ۷ ایزوفرم

این مقاله حاصل پایان نامه سیروس چگینی دانشجوی کارشناسی ارشد رشته ژنتیک به شماره ۲۸۹۳۰۵۰۳۹۶۱۰۰۱ دانشگاه آزاد اسلامی واحد پرند می باشد.
* مسئول مقاله: دکتر فرزانه تفویضی
آدرس: پرند، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد پرند، گروه زیست شناسی. تلفن: ۵۶۷۳۳۱۵۸-۰۲۱
E-mail: farzanehtafvizi54@gmail.com

[DOR: 20.1001.1.15614107.1399.22.1.30.2]
[DOI: 10.22088/jbums.22.1.222]

A، B، C، D، E، F و PIGF بوده که در نتیجه اسپلایسینگ متفاوت از این ژن حاصل می شوند (۱۳). VEGF از مهمترین فاکتورهای تحریک کننده آنژیوژنز بوده که اعمال میتوژنیکی و آنژیوژنزی خود را با واسطه دو رسپتور تیروزین کینازی ۲ و۱ VEGFR از طریق مکانیسم های اتوکرین یا پاراکرین اعمال می کند (۱۴).

در سرطان ریه، مطالعات سیگنالینگ VEGF اتوکرین برای فعالسازی مسیر سیگنالینگ ERK/MEK وPI3K/AKT جهت تکثیر سلول های NSCLC و تاثیر NRP1 نیز در تنظیم بیان VEGF در رده سلول های NSCLC نشان داده شده است (۱۶و۱۵). به همین منظور با بهینه سازی روش‌های درمانی از ترکیبات ضد VEGF که نه تنها در سرطان ریه بلکه در سایر سرطان ها نیز می تواند اثر گذار باشد استفاده می شود و به این ترتیب با استفاده از ترکیبات پلی فنولی گیاهی علاوه بر افزایش سیستم ایمنی بدن از طریق مهار رادیکال های آزاد همچنین متصل شدن به فاکتورهای گیرنده رشد، از فرستادن پیام‌های رشد و تکثیر سلول های سرطانی ممانعت نموده که با تحقق این امر گامی در جهت کاهش داروهای شیمیایی در درمان سرطان ریه برداشته خواهد شد (۱۷). آثار سایتوتوکسیک گیاهان مختلفی از جمله Phyllanthus (۱۸)، Momordica charantia (۱۹)، Justicia adhatoda (۲۰)، بر روی سلول های سرطانی ریه A549 گزارش شده است. همچنین گزارش شده است که ریشه Ebenus boissieri (۲۱) دارای فعالیت مهار تکثیر سلولی و القا آپوپتوز در رده سلولی A549 می باشد.

گیاه Valeriana sisymbriifolia یکی از شش گونه جنس سنبل‌الطیب در ایران است که ریشه آن دارای مواد مؤثر ارزشمندی است که طبق تحقیق دانشمندان، ۵۷ ترکیب مختلف در نتیجه کروماتوگرافی گازی (GC/MS) از این گیاه شناسایی شد (۲۲) که بسیاری از این ترکیبات مانند کاریو فیلن اکسید (۲۳)، بورنئول (۲۴)، بورنیل استات (۲۵)، کارواکرول (۲۶)، گوایول (۲۷)، پینن (۲۸)، ترپینن (۲۹)، المن (۳۰)، کادینن (۳۱) و غیره دارای خواص ضد سرطانی و مهار کنندگی در رشد رده های مختلف سلول های سرطانی می باشند. ولی تحقیقی در مورد اثر این گیاه در رده سلولی A549 یافت نشد. لذا در تحقیق حاضر، اثر عصاره هیدروالکلی این گیاه بر مهار تکثیر سلولی و بیان ژن VEGF در رده سلولیA549 سرطان ریه مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

این مطالعه تجربی پس از تصویب در کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی واحد پرند با شماره نامه ۶۵۲۰-۱۸-۰۸ انجام شد.

عصاره گیری: در ابتدا عصاره گیری هیدروالکلی به روش پرکولاسیون از گیاه مورد نظر انجام شد. بدین ترتیب که ریشه گیاه از مرکز ذخایر ژنتیک و زیستی ایران به صورت خشک شده با شماره هرباریومی IBRC P1007034 تهیه شد. پس از آسیاب شدن، ۱۰۰ گرم از پودر حاصل به ارلن حاوی ۵۰۰ میلی لیتر متانول ۵۰ درجه اضافه و به مدت ۴۸ ساعت در شرایط آزمایشگاه خیسانده شد. برای جلوگیری از تبخیر الکل، دهانه ارلن با پارافیلم بسته شده و جهت جلوگیری از واکنش های ناخواسته و تغییر در فاکتورهای موثر گیاه در تاریکی نگهداری شد. سپس مایع شفاف رویی با صافی جدا و رسوب آن دور ریخته شد. مایع صاف شده در دستگاه روتاری خلاء در دمای ۴۲ درجه سانتی گراد قرار داده شد تا حلال جدا شود. عصاره در آون کاملاً خشک گردید و با پودر باقی مانده با غلظت ۱۰ میلی‌گرم در میلی لیتر محلول ذخیره تهیه و تا زمان استفاده در دمای ۴ درجه در ظروف تیره نگهداری شد.

کشت سلول: فلاسک سلول حاوی ۶۰ میلی لیتر محیط کشت غنی شده سلولی از مرکز ذخایر ژنتیک و زیستی ایران با شماره ثبتی IBRC C10080 تهیه و در شرایط دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، ۵٪ CO2 و اکسیژن ۹۵٪ به مدت ۴ الی ۵ روز نگهداری شد تا تراکم سلول های موجود در محیط به بالاتر از ۸۰ درصد برسد. سلول های رسوب یافته با استفاده از محلول PBS 1M و pH ۷/۴ شستشو داده شدند و میزان ml ۲ از محیط کشت DMEM غنی شده با L-glutamin و ۱۰٪ FBS، مجموعه از آنتی بیوتیک‌ها که شامل: نئومایسین ۵۰ µg/ml، پنی‌سیلین ۵۰µg/ml، استرپتومایسین ۱۰۰ µg/ml اضافه شدند. سپس با استفاده از میکروسکوپ معکوس و همچنین روش تریپان بلو و لام هموسایتومتر تعداد سلول ها و درصد زیستایی سلول ها (Viability) شمارش گردید. پس از شمارش سلول ها و اطمینان از سلامت آن ها، از این کشت برای انجام مراحل بعدی آزمایش از جمله تست بررسی اثر سمیت عصاره گیاه بر سلول های سرطانی استفاده شد.

بررسی میزان سمیت سلولی: به منظور بررسی اثر عصاره گیاهی بر روی رشد و تکثیر سلول های سرطانی از روش رنگ سنجی MTT استفاده شد. این روش یک تست متابولیک رقابتی میتوکندریایی است و بر اساس شکستن نمک تترازولیوم توسط آنزیم میتوکندریایی سوکسینات دهیدروژناز سلول های زنده استوار است. برای انجام آزمایش، حجم ۱۰۰ µl محیط کشت حاوی تعداد 10^4 سلول A549 در هر چاهک پلیت ۹۶ تایی قرار داده شد. سلول های سرطانی با غلظت های مختلف ۵۰ µg/ml، ۲۵، ۱۲/۵، ۶/۲۵، ۳/۱۲، ۱/۵۶، ۰/۷۸از عصاره گیاه به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت انکوبه شدند. پس از طی زمان های مذکور به هر خانه پلیت، ۱۰۰µl تترازولیوم با فرمول شیمیائی (۳-[۴،۵- dimethylthiazol-2-yl] 2,5-diphenyl tetrazolium bromid) یا MTT با غلظت ۰/۵ mg/ml اضافه شد و به مدت چهار ساعت در انکوباتور ۳۷ مجهز به CO2 انکوبه شد. سپس محیط کشت حاوی MTT به دقت خارج شد و به هر خانه پلیت حجم ۱۰۰ µl DMSO جهت حل نمودن کریستال های فرمازان ارغوانی رنگ اضافه شد. پس از ۳۰ دقیقه انکوباسیون، جذب نوری هر چاهک با استفاده از دستگاه الایزا ریدر مدل BioTek it – ELX808 در طول موج ۵۷۰ نانومتر قرائت شد. نتایج حاصله به صورت میزان بقای سلولی با سه بار تکرار گزارش شدند.

بررسی بیان ژن VEGF: به این منظور ابتدا از سلول های تیمار شده با غلظت IC_{50} از عصاره گیاهی، استخراج RNA و سپس سنتز cDNA انجام شد و در نهایت با پرایمر اختصاصی برای ژن VEGF، با روش Real Time PCR میزان بیان ژن VEGF نسبت به گروه کنترل ارزیابی شد.

استخراج RNA و سنتز cDNA: استخراج RNA از سلول های A549 که به مدت ۲۴، ۴۸ و۷۲ ساعت در معرض رقت IC_{50} از عصاره گیاهی قرار گرفته بودند طبق دستورالعمل کیتTotal RNA Purification Kit/RT01 (Gene Mark) به روش ستونی انجام شد و RNA استخراج شده به فریزر منفی ۷۰ درجه سانتی گراد منتقل شد. کیفیت RNA استخراج شده توسط روش

[DOR: 20.1001.1.15614107.1399.22.1.30.2]
[DOI: 10.22088/jbums.22.1.222]

ژل با آگاروز ۲٪ و همچنین با دستگاه نانودراپ Nabi Micro Digital اندازه‌گیری شد و بعد از تایید غلظت و کیفیت مطلوب به لحاظ عدم آلودگی با DNA، Protein و کربوهیدرات ها، برای سنتز cDNA استفاده شد. ساخت مولکول‌های DNA مکمل با کیت Revert AidTM First strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas، لیتوانی) انجام گرفت که در آن مخلوط واکنش حاوی ۵ میکرولیتر بافر واکنش ۵x، یک میکروگرم RNA، ۰/۵ میکرولیتر آغازگر شش نوکلئوتیدی تصادفی، ۰/۵ میکرولیتر آغازگر الیگوdT، دو میکرولیتر مخلوط داکسی نوکلئوتید تری فسفات (۱۰ میلی مولار)، یک میکرولیتر مهارکننده آنزیم RNase (۲۰ واحد در میکرولیتر)، یک میکرولیتر آنزیم رونوشت بردار معکوس و آب مقطر دو بار تقطیر (تا حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر) بود. برنامه دمایی- زمانی به صورت ۲۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه (برای اتصال آغازگر)، ۴۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ دقیقه (ساخت cDNA)، ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه (غیر فعال شدن رونوشت بردار معکوس) و ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه انجام گرفت (۳۲).

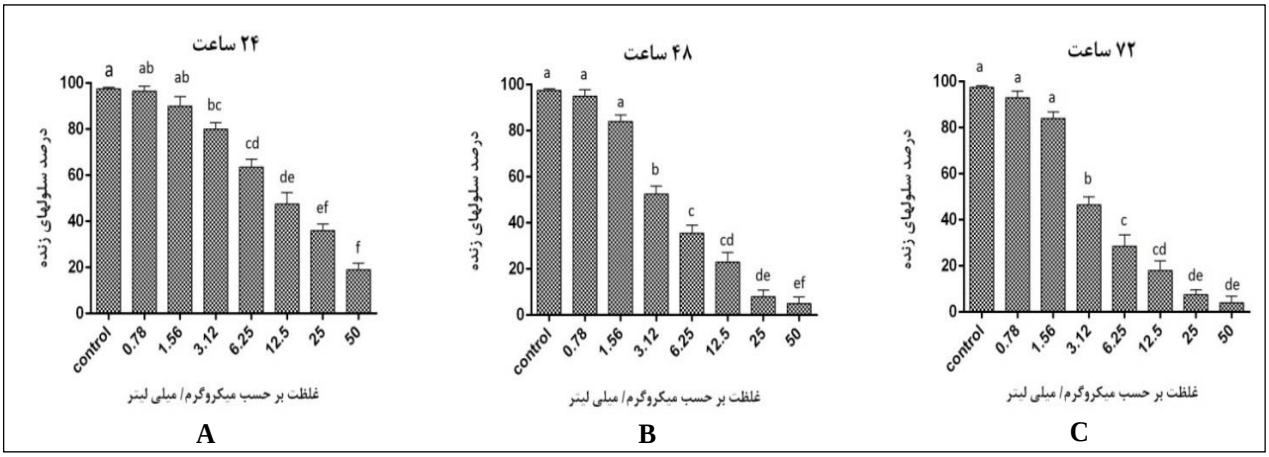
Real-Time-PCR: واکنش Real time PCR در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر به شرح ذیل بهینه سازی شد: ۱۰ میکرولیتر از SYBR TM (2X) Master Mix (Takara Company)، ۱ میکرولیتر از پرایمرهای رفت و برگشت با غلظت ۱۰ µM (شرکت تکاپو زیست) (۳۳)، ۷ میکرولیتر از آب دیونیزه و ۱ میکرولیتر cDNA الگو. ژن b-actin به عنوان کنترل داخلی مورد استفاده قرار گرفت (۳۴).

برنامه حرارتی به شرح ذیل انجام شد: واسرشت سازی اولیه DNA الگو با دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه، مرحله دوم به صورت متناوب در طول ۴۰ چرخه با دمای ۹۵ درجه به مدت ۲۰ ثانیه و ۶۵ درجه به مدت ۲۰ ثانیه و ۷۲ درجه به مدت ۲۰ ثانیه انجام شد. میزان فلورسنت توسط دستگاه Heal Force X-960 انجام شد و منحنی های تکثیر و تفکیک با استفاده از نرم افزار رسم و آنالیز شد.

آنالیز داده ها و بررسی آماری: داده های خام حاصل از Real-Time-PCR با استفاده از نرم افزار تجزیه و تحلیل شد. پس از تکثیر CT (cycle threshold) نمونه ها شناسایی و همچنین PCR efficiency mean تعیین شد. بر اساس روش RQ (Relative Quantification) و فرمولاسیون $2^{-\Delta\Delta CT}$ به صورت مضربی از میزان بیان ژن VEGF درج شد و در مقایسه با ژن داخلی b-actin مورد بررسی قرار گرفت. گروه های تست با گروه کنترل مورد مقایسه قرار گرفت و معنی دار بودن داده ها با استفاده از نرم افزار Graphpad Prims ver.6 و آزمون T-test و One way ANOVA و روش آماری Tukey‘s HSD test hoc-post (جهت تفاوت بیان ژن های هدف، بین نمونه های کنترل و تیمارشده) تجزیه و تحلیل شدند و $p<۰/۰۵$ معنی دار در نظر گرفته شد.

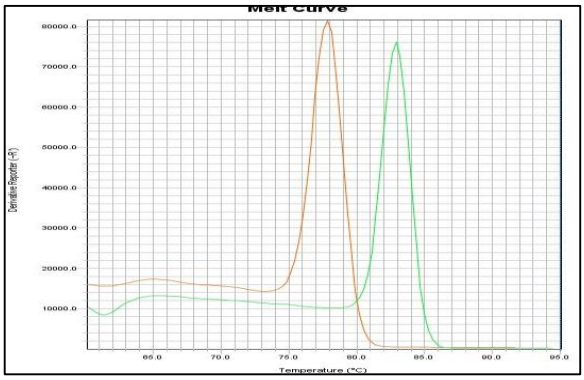
یافته ها

در این مطالعه با افزایش غلظت عصاره و مدت زمان تیمار، افزایش مهار تکثیر سلولی و کاهش درصد زیستایی دیده شد. بطوریکه در غلظت های ۵۰µg/ml بیشترین مهار تکثیر سلولی مشاهده شد که از لحاظ آماری نسبت به گروه کنترل معنی دار بود ($p<۰/۰۰۱$). در حالی که آثار سیتوتوکسیک ناچیزی در غلظت های ۰/۷۸ µg/ml و ۱/۵۶ مشاهده شد و کاهش درصد زیستایی مشاهده شده نسبت به گروه کنترل اختلاف معنی داری را نشان نداد. میزان IC_{50} مربوط به عصاره در زمان ۲۴ ساعت برابر ۱۱/۹۱±۱/۵۱۰µg/ml و در ۴۸ و ۷۲ ساعت به ترتیب ۳/۹۰±۰/۴۸۵ µg/ml و ۲/۳۰±۰/۴۱۹ µg/ml بود (نمودار ۱). تکثیر اختصاصی قطعات ژنی مورد نظر، عدم جفت شدن پرایمرها و عدم تکثیر قطعات غیراختصاصی برای هر ژن با استفاده از منحنی ذوب تعیین شد. منحنی ذوب ژن‌های VEGF و β-Actin در رده سلولی A549 در نمودار های ۲و ۳ نشان داده شده است. تغییر در بیان ژن در سلول های A549 تیمار شده با غلظت IC_{50} عصاره بعد از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت ارزیابی شد. نسبت بیان ژن VEGF در رده سلولی سرطانی A549 تیمار شده با عصاره نسبت به گروه کنترل با افزایش مدت زمان تیمار کاهش یافت. بطوریکه این کاهش پس از ۴۸ ساعت ($p=۰/۰۰۱۸۹$) و ۷۲ ساعت ($p=۰/۰۰۱۷$) نسبت به گروه کنترل معنی دار بود. کاهش بیان دیده شده در زمان ۲۴ ساعت پس از تیمار نسبت به گروه کنترل از نظر آماری معنی دار نبود. با افزایش مدت زمان تیمار، کاهش بیان بیشتری دیده شد به طوریکه کاهش بیان بالاتری در زمان ۷۲ ساعت نسبت به دو زمان دیگر مشاهده شد (نمودار ۴).

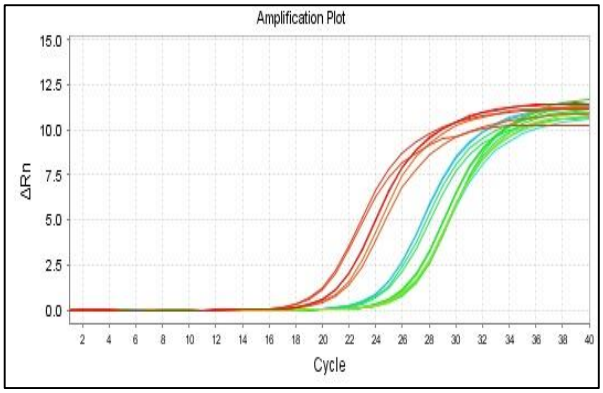


نمودار ۱. مقایسه اثر سیتوتوکسیسیتی غلظت های مختلف عصاره Valeriana sisymbriifolia بر سلول های سرطانی ریه (A549) بعد از گذشت زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت. حروف لاتین مشابه در بالای هر ستون نشان دهنده عدم اختلاف معنی دار و حروف لاتین متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی دار بین گروه ها است.

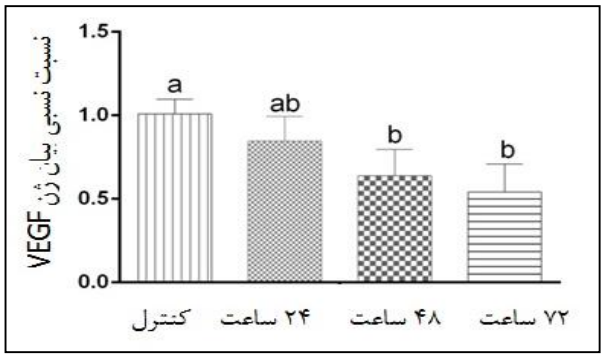
[DOR: 20.1001.1.15614107.1399.22.1.30.2]
[DOI: 10.22088/jbums.22.1.222]



نمودار ۲. الگوی منحنی ذوب ژن VEGF و β- Actin در دمای ۸۲/۸۶°C و ۷۷/۸۹ °C



نمودار ۳. نمودار حاصل از تکثیر ژن های VEGF و β- Actin در سلول‌های تیمار شده و تیمار نشده با عصاره گیاه



نمودار ۴. بررسی بیان ژن VEGF در سلول های A549 تیمارشده با عصاره گیاه در مدت زمان های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت. (حرف b در زمان ۴۸ و ۷۲ ساعت نشان دهنده معنی داری نسبت به گروه کنترل و عدم معنی داری نسبت به ۲۴ ساعت می باشد).

بحث و نتیجه گیری

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که عصاره گیاه مذکور در الگوی وابسته به زمان و دوز سبب مهار تکثیر سلولی و کاهش بیان ژن VEGF می گردد. به طوریکه با گذشت زمان، میزان بیان ژن به طور معنی داری نسبت به گره کنترل کاهش نشان داد و پس از ۷۲ ساعت بیشترین میزان کاهش بیان ژن دیده شد. تا به حال مطالعه‌ای در مورد اثر سایتوتوکسیک و مهار رشد سلولی توسط عصاره ریشه گیاه Valeriana Sysimberifolia (سنبل الطیب) در رده سلولی سرطان ریه A549 انجام نشده است. آثار سایتوتوکسیک و ضد تکثیری گیاهان مختلفی از جمله Phyllanthus (IC_{50}: ۶۱/۳ µg/ml برای ۷۲ ساعت) (۱۸)، Momordica charantia (IC_{50}: ۳۲/۵ µg/ml برای ۲۴ ساعت) (۱۹)، Justicia adhatoda (IC_{50}: ۸۰µg/ml برای روز اول) (۲۰)، Urtica dioica (IC_{50}: ۵ mg/ml برای ۴۸ و ۷۲ ساعت) (۳۵)، Haplophyllum tuberculatum (IC_{50}: ۱۵۲/۱۳µg/ml برای عصاره دی اتیل اتر ساقه به مدت ۲۴ ساعت) (۳۶)، Sapindus mukorossi (IC_{50}: ۳۰ mg/ml برای ۴۸ ساعت) (۳۷)، Lagenaria siceraria (IC_{50}: ۶/۵ µg/ml برای ۷۲ ساعت) (۳۸)، بر روی سلول های سرطانی ریه A549 گزارش شده است. مقایسه اثر سمیت سلولی عصاره ریشه Valeriana Sysimberifolia با گیاهان دیگر بر رده سلولی A549 نشان داد که عصاره ریشه گیاه Valeriana Sysimberifolia توان بسیار قوی تری در توقف تکثیر و مهار رشد سلولی دارد که از مقایسه IC50 عصاره ریشه Valeriana Sysimberifolia به خوبی مشخص می شود (IC_{50}: ۱۱/۹۱ µg/ml، IC_{50}: ۳، IC_{50}: ۲ به ترتیب برای ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت). نشان داده شده است که ریشه Ebenus boissieri (۲۱) و ZINGIBER OFFICINALE (۳۹) نیز دارای فعالیت مهار تکثیر سلولی و القا آپوپتوز می باشند. غلظت مهارکنندگی ریشه Ebenus boissieri در ۷۲ ساعت ۳۵/۸ میکروگرم بر میلی لیتر و ریشه ZINGIBER OFFICINALE پس از ۲۴ ساعت ۷۹/۵۷ میکروگرم بر میلی لیتر بود که در مقایسه با تحقیق ما غلظت های بسیار کمتری از عصاره ریشه Valeriana Sysimberifolia قادر به کاهش و ممانعت از رشد سلولی است و توان قوی‌تری در القا مرگ سلولی و ممانعت از تکثیر سلولی دارد. در مطالعه ای Chang و همکاران از عصاره های کورکومینوئید و نانو امولسیون های Curcuma longa Linnaeus جهت بررسی سمیت سلولی در رده A549 استفاده کردند. در این تحقیق غلظت مهارکنندگی (IC_{50}) برای نانو امولسیون (۳/۹) و برای کورکومینوئید (۳/۷۵) میکرو گرم بر میلی لیتر در نظر گرفته شد که مشابه با تحقیق حاضر بود (۴۰). Sakamato و همکاران نشان دادند که عصاره Epigallacatechin 3 gallate قادر به کاهش بیان ژن VEGF در مدت زمان های ۰ و ۶ و ۱۲ و ۲۴ ساعت می باشد. ولی بر خلاف تحقیق ما، اندازه گیری فعالیت حیاتی سلول ها در مدت زمان های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به روش تریپان بلو اختلاف معنی داری را نشان نداد (۴۱). نتایج تحقیق حاضر نشان داد که عصاره ریشه گیاه Valeriana Sysimberifolia دارای فعالیت ضد تکثیری و آنتی آنژیوژنز در سلول های سرطانی ریه A549 می باشد. بطوریکه که عصاره ریشه این گیاه دارای اثرات ضد التهابی و ضد رگزایی قوی است که بدین وسیله می تواند از تکثیر و گسترش سلول های سرطانی ریه جلوگیری کند. امید است بتوان با انجام تست های تکمیلی و شناسایی مسیرهای سیگنالینگ و تاثیر آن بر آپوپتوز سلولی وهمچنین آزمایشات بالینی در شرایط in vivo بتوان از این گیاه به عنوان محصولی بیولوژیک در مهار و کنترل سرطان ریه بهره گرفت.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهر پرند و شهر قدس تشکر و قدردانی می گردد.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1399.22.1.30.2]
[DOI: 10.22088/jbums.22.1.222]

Effect of Valeriana Sysimberifolia Extract on VEGF Expression in A549 Cell Line

S.Chegini (MSc)[1], F.Tafvizi (PhD)*[1], H. Noorbazargan (PhD)[2]

1.Department of Biology, Parand Branch, Islamic Azad University, Parand, I.R.Iran
2.Department of Biotechnology, Faculty of Advanced Technologies in Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, I.R.Iran

J Babol Univ Med Sci; 22; 2020; PP: 222-228

Received: Aug 3rd 2019, Revised: Jan 13rd 2020, Accepted: Jan 20th 2020.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: Today, the use of medicinal plants in the treatment of cancer is more important due to its fewer side effects. Vascular endothelial growth factor (VEGF) is one of the most important factors in stimulating angiogenesis and promoting cancer. The aim of this study was to investigate the inhibitory effect of Valeriana Sysimberifolia root extract on proliferation of lung cancer cells (A549) and VEGF gene expression in treated cells.

METHODS: The hydro alcoholic extract of Valeriana Sysimberifolia root was prepared by percolation. After preparation of cell line A549 from the Iranian Biological Resource Center, cancer cells were treated in culture medium with different concentrations of plant root extract (50, 25, 12.5, 6.25, 3.12, 1.56, 0.78 µg/ml) at 24, 48 and 72 hours and viability was performed by MTT assay at all three time. Real Time-PCR method was used to evaluate the expression of VEGF gene in cancer cells treated with IC50 concentration of plant extract.

FINDINGS: With increasing the concentration of the extract and the treatment time, a decrease in viability of cancer cells was observed. The highest inhibition of cell proliferation was observed at a concentration of 50µg/ml after 72 hours (94% growth inhibition) which was significant compared to the control group (p= 0.0001). Also, with increasing treatment time, decreased VEGF gene expression was seen compared to the control group. Thus, a two times decrease in VEGF gene expression was seen in cells after 72 hours (p= 0.0017).

CONCLUSION: Valeriana Sysimberifolia root extract has anti-proliferative and anti-angiogenesis activity. It seems that further studies can be used as a biological product in the treatment of cancer.

KEY WORDS: *Valeriana Sysimberifolia*, *VEGF*, *Lung Cancer*.

Please cite this article as follows:

Chegini S, Tafvizi F, Noorbazargan H. Effect of Valeriana Sysimberifolia Extract on VEGF Expression in A549 Cell Line. J Babol Univ Med Sci. 2020;22: 222-8.

***Corresonding Author: F. Tafvizi (PhD)**
Address: Department of Biology, Parand Branch, Islamic Azad University, Parand, I.R.Iran
Tel: +98 21 56733158
E-mail: farzanehtafvizi54@gmail.com

[DOR: 20.1001.1.15614107.1399.22.1.30.2]
[DOI: 10.22088/jbums.22.1.222]

References

1. 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.
2. Youlden DR, Cramb SM, Baade PD. The international epidemiology of lung cancer: geographical distribution and secular trends. J Thorac Oncol. 2008;3(8):819-31.
3. Hosseini M, Naghan PA, Karimi S, SeyedAlinaghi SA, Bahadori M, Khodadad K, et al. Environmental risk factors for lung cancer in Iran: a case-control study. Int J Epidemiol. 2009;38(4):989-96.
4. Khorasani S, Rezaei S, Rashidian H, Daroudi R. Years of Potential Life Lost and Productivity Costs Due to Premature Cancer-Related Mortality in Iran. Asian Pac J Cancer Prev. 2015;16(5):1845-50.
5. Hassanipour S, Mokhtari AM, Fathalipour M, Salehiniya H. The incidence of lung cancer in Iran: a systematic review and meta-analysis. World Cancer Res J. 2017;4(4):e980.
6. National Cancer Institute. Lung Cancer-Patient Version. Available from: https://www.cancer.gov/types/lung
7. Alberg AJ, Brock MV, Samet JM. Epidemiology of lung cancer: looking to the future. J Clin Oncol. 2005;23(14):3175-85.
8. Rahal Z, El Nemr S, Sinjab A, Chami H, Tfayli A, Kadara H. Smoking and lung cancer: a geo-regional perspective. Front Oncol. 2017;7:194.
9. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Tobacco smoke and involuntary smoking. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum. 2004;83:1-1438. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15285078/
10. Carr LL, Jett JR .Treatment of non-small-cell lung cancer: chemotherapy. In: Grippi MA, Elias JA, Fishman JA, Kotloff RM, Pack AI, Senior RM, et al, editors. Fishman's Pulmonary Diseases and Disorders, 5th ed. United States of America: McGraw-Hill; 2015.p. 1752.
11. Dvorak HF. Angiogenesis: update 2005. J Thromb Haemost. 2005;3(8):1835-42.
12. Pandya NM, Dhalla NS, Santani DD. Angiogenesis—a new target for future therapy. Vascul Pharmacol. 2006;44(5):265-74.
13. Hoeben A, Landuyt B, Highley MS, Wildiers H, Van Oosterom AT, De Bruijn EA. Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. Pharmacol Rev. 2004;56(4):549-80.
14. Goel HL, Mercurio AM. VEGF targets the tumour cell. Nat Rev Cancer. 2013;13(12):871-82.
15. Barr MP, Gray SG, Gately K, Hams E, Fallon PG, Davies AM, et al. Vascular endothelial growth factor is an autocrine growth factor, signaling through neuropilin-1 in non-small cell lung cancer. Mol Cancer. 2015;14:45.
16. Jia H, Cheng L, Tickner M, A Bagherzadeh, D Selwood, I Zachary. Neuropilin-1 antagonism in human carcinoma cells inhibits migration and enhances chemosensitivity. Br J Cancer. 2010;102(3):541-52.
17. Zargari A. Medicinal plants. Tehran: Tehran University Press; 1981.p. 725-60. [In Persian]
18. Lee SH, Jaganath IB, Wang SM, Sekaran SD. Antimetastatic effects of Phyllanthus on human lung (A549) and breast (MCF-7) cancer cell lines. PloS One. 2011;6(6):e20994.
19. Thiagarajan S, Arapoc DJ, Shafie NH, Keong YY, Bahari H, Adam Z, et al. Momordica charantia (Indian and Chinese Bitter Melon) Extracts Inducing Apoptosis in Human Lung Cancer Cell Line A549 via ROS-Mediated Mitochodria Injury. Evid-Based Compl Alt. 2019;2019:2821597.
20. Latha D, Prabu P, Arulvasu C, Manikandan R, Sampurnam, S, Narayanan V. Enhanced cytotoxic effect on human lung carcinoma cell line (A549) by gold nanoparticles synthesized from Justicia adhatoda leaf extract. Asian Pac J Trop Biomed. 2018;8(11):540-7.
21. Aydemir EA, Simsek E, Imir N, Göktürk RS, Yesilada E, Fiskin K. Cytotoxic and apoptotic effects of Ebenus boissieri Barbey on human lung cancer cell line A549. Pharmacogn Mag. 2015;11(Suppl 1):S37-45.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1399.22.1.30.2]
[DOI: 10.22088/jbums.22.1.222]

22.Filizadeh Y, Goodarzi G. Essential Oils from Hairy Root Cultures and Field Cultivated Roots of Valerian (Valeriana sisymbriifolium). J Med Plants. 2010;9(35):120-8. [In Persian]
23.Pan Z, Wang S-K, Cheng X-L, Tian X-W, Wang J. Caryophyllene oxide exhibits anti-cancer effects in MG-63 human osteosarcoma cells via the inhibition of cell migration, generation of reactive oxygen species and induction of apoptosis. Bangladesh J Pharmacol. 2016;11:817-23.
24.Chen J, Li L, Su J, Li B, Chen T, Wong Y-S. Synergistic Apoptosis-Inducing Effects on A375 Human Melanoma Cells of Natural Borneol and Curcumin. PLoS One. 2014;9(6):e101277.
25.Li J, Wang S-X. Synergistic enhancement of the antitumor activity of 5-fluorouracil by bornyl acetate in SGC-7901 human gastric cancer cells and the determination of the underlying mechanism of action. J BUON. 2016;21(1):108-17.
26.Yin Q-H, Yan F-X, Zu X-Y, Wu Y-H, Wu X-P, Liao M-C, et al. Anti-proliferative and pro-apoptotic effect of carvacrol on human hepatocellular carcinoma cell line HepG-2. Cytotechnology. 2012;64(1):43-51.
27.Yang X, Zhu J, Wu J, Huang N, Cui Z, Luo Y, et al. (-)-Guaiol regulates autophagic cell death depending on mTOR signaling in NSCLC. Cancer Biol Ther. 2018;19(8):706-14.
28.Chen W, Liu Y, Li M, Mao J, Zhang L, Huang R, et al. Anti-tumor effect of α-pinene on human hepatoma cell lines through inducing G2/M cell cycle arrest. J Pharmacol Sci. 2015;127(3):332-8.
29.Wu C-S, Chen Y-J, Chen JJ, Shieh J-J, Huang C-H, Lin P-S, et al. Terpinen-4-ol Induces Apoptosis in Human Nonsmall Cell Lung Cancer In Vitro and In Vivo. Evid Based Complement Alternat Med. 2012;2012:818261.
30.Zhao SY, Wu J, Zheng F, Tang Q, Yang L, Li L, et al. b-elemene inhibited expression of Dna methyltransferase 1 through activation of ERK1/2 and Ampk a signalling pathways in human lung cancer cells the role of Sp1. J Cell Mol Med. 2015;19(3):630-41.
31.Hui L-M, Zhao G-D, Zhao J-J. δ-Cadinene inhibits the growth of ovarian cancer cells via caspase-dependent apoptosis and cell cycle arrest. Int J Clin Exp Pathol. 2015;8(6):6046-56.
32.Edalat Fard S, Tafvizi F, Bikhof Torbati M. Silver nanoparticles biosynthesised using Centella asiatica leaf extract: apoptosis induction in MCF-7 breast cancer cell line. IET Nanobiotechnol. 2018;12(7):994-1002.
33.Akbari Asl E, Fallah Mehrabadi J, Afshar D, Noorbazargan H, Tahmasebi H, Rahimi A. Apoptotic Effects of Linum album Extracts on AGS Human Gastric Adenocarcinoma Cells and ZNF703 Oncogene Expression. Asian Pac J Cancer Prev. 2018;19(10):2911-6.
34.Jafargholizadeh N, Zargar SJ, Aftabi Y. The cucurbitacins D, E, and I from Ecballium elaterium (L.) upregulate the LC3 gene and induce cell-cycle arrest in human gastric cancer cell line AGS. Iran J Basic Med Sci. 2018;21(3):253-9.
35.Nikoumanesh S, Asgharian AM. The Antioxidant and cytotoxic Effects of nettle-leaves (Urtica dioica L.) Ethanolic extract on the A549 cell line. New Cell Mol Biotechnol J. 2017;7(26):27-34. [In Persian]
36.Dastranj F, Karimi F, Rahmani N. Cytotoxic evaluations of metanolic extract fractions from Haplophyllum tuberculatum against RAJI and A549 cancerous cell lines. J Plant Res (Iran J Biol). 2018;31(1):116-26. [In Persian]
37.Liu M, Chen Y-L, Kuo Y-H, Lu M-K, Liao C-C. Aqueous extract of Sapindus mukorossi induced cell death of A549 cells and exhibited antitumor property in vivo. Sci Rep-Uk. 2018;8(1):4831.
38.Shokrzadeh M, Parvaresh A, Shahani S, Habibi E, Zalzar Z. Cytotoxic Effects of Lagenaria siceraria Standl. Extract on Cancer Cell Lin. J Mazandaran Univ Med Sci. 2013;22(97):225-230. [In Persian]
39.Nair RR, Bhaskar D, Khalaf Jabbar K, Amresh N, Sathyamurthy B. Invitro Studies on the Effect of Zingiber Officinale Methanol Extract in Lung Cancer A549 Cell Lines. World J Pharm Res. 2017;6(15):1097-114.
40.Chang H-B, Chen B-H. Inhibition of lung cancer cells A549 and H460 by curcuminoid extracts and nanoemulsions prepared from Curcuma longa Linnaeus. Int J Nanomedicine. 2015;10:5059-80.
41.Sakamato Y, Terashita N, Muraguchi T, Fukusato T, Kubota S. Effects of Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) on A549 Lung Cancer Tumor Growth and Angiogenesis. Biosci Biotechnol Biochem. 2013;77(9):1799-803.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1399.22.1.30.2]
[DOI: 10.22088/jbums.22.1.222]