خون
فصلنامه پژوهشی
دوره ۱۳ شماره ۴ زمستان ۹۵ (۳۱۳-۳۰۴)

مقاله پژوهشی

# تاثیر عصاره بخش‌های هوایی گیاه اُرس(*Juniperus excelsa*) بر تکثیر و مرگ سلول‌های سرطانی لوسمی لنفوبلاستیک حاد رده‌های Nalm-6 و Reh

*مینا درویشی[۱]، سمیه اسماعیلی[۲]، نسرین دهقان نیری[۳]، پرگل مشاتی[۱]، احمد قره‌باغیان[۴]*

## چکیده

### سابقه و هدف

**لوسمی لنفوبلاستیک حاد(ALL)، شایع‌ترین بدخیمی در کودکان است. به دلیل اثرات جانبی فراوان داروهای شیمی‌درمانی، استفاده از ترکیبات طبیعی مورد توجه قرار گرفته است. اُرس یک گیاه دارویی است که اثر مهاری عصاره آن بر روی چندین رده سلولی سرطانی گزارش شده است. هدف از این مطالعه، بررسی اثر کشندگی و آپوپتوتیک عصاره بخش‌های هوایی گیاه اُرس بر رده‌های سلولی ALL ( Nalm-6 و Reh) بود.**

### مواد و روش‌ها

**در این مطالعه بنیادی سلول‌های Nalm-6 و Reh بعد از کشت سلولی با غلظت‌های مختلف عصاره تیمار شده و با آزمون MTT ، درصد سلول‌های زنده بعد از ۴۸ و ۷۲ ساعت انکوباسیون بررسی شد. جهت درک مکانیسم مرگ سلولی از آزمون فلوسیتومتری Annexin V-FITC و سنجش فعالیت کاسپاز ۳ استفاده شد. آنالیز آماری داده‌ها با استفاده از آزمون one-way ANOVA و SPSS ۲۳ انجام گرفت.**

### یافته‌ها

**نتایج حاصل از آزمون MTT نشان داد که غلظت‌های ۳، ۴ و ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره در هر دو رده سلولی، موجب کاهش معنادار درصد سلول‌های زنده می‌شود($p< ۰/۰۰۱$). هم چنین نتایج حاصل از فلوسیتومتری حاکی از افزایش قابل توجه آپوپتوز در سلول‌های تیمار شده نسبت به گروه کنترل بود($p< ۰/۰۰۱$). در آزمون سنجش فعالیت کاسپاز ۳ نیز افزایش قابل توجه فعالیت آن در سلول‌های تیمار شده نسبت به گروه کنترل مشاهده شد($p< ۰/۰۵$).**

### نتیجه گیری

**با توجه به نتایج، عصاره بخش‌های هوایی گیاه اُرس دارای اثرات کشندگی و آپوپتوتیک بر سلول‌های سرطانی رده Nalm-6 و Reh بودند.**

***کلمات کلیدی:*** **لوسمی لنفوبلاستیک حاد، جونیپروس اکسلسا، اثر کشندگی، آپوپتوز**

*تاریخ دریافت: ۹۵/ ۷/۱۴*
*تاریخ پذیرش : ۹۵/۸/۱۹*

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد خونشناسی آزمایشگاهی و بانک خون ـ دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی ـ تهران ـ ایران
۲- PhD فارماکوگنوزی ـ دانشیار مرکز تحقیقات طب سنتی و مفردات پزشکی ـ دانشکده طب سنتی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی ـ تهران ـ ایران
۳- دانشجوی دکترای پروتئومیکس ـ دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی ـ تهران ـ ایران
۴- مؤلف مسئول: PhD ایمونوهماتولوژی بالینی ـ استاد دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی ـ مرکز تحقیقات بیماری‌های مادرزادی خونی کودکان دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی ـ خیابان شریعتی ـ تهران ـ ایران ـ کد پستی: ۱۵۵۱۴-۱۵۴۶۸



[ Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-08-02 ]

## مقدمه

لوسمی لنفوبلاستیک حاد(ALL)، با تکثیر و تجمع کلونال سلول‌های بلاست در مغز استخوان و خون محیطی همراه است. این لوسمی در کودکان ۲ الی ۵ سال شایع‌تر است. شیوع این لوسمی در بالغین(بالای ۱۵ سال)، یک سوم شیوع آن در کودکان می‌باشد. دومین شیوع بالای آن در بالغین بالای ۵۰ سال است که با افزایش سن، احتمال بروز آن افزایش می‌یابد(۱). مشتقات صناعی و نیمه صناعی حاصله از گیاهان، از منابع مهم داروهای ضد سرطان هستند(۲). تقریباً ۶۰٪ داروهایی که در بالین به عنوان ضد سرطان مصرف می‌شوند، از منابع طبیعی به دست آمده یا با آن مرتبط هستند. گیاهان مدت زمان زیادی است که در درمان سرطان استفاده می‌شوند(۳). جونیپروس اکسلسا (Juniperus excelsa)، یک درخت یا درختچه‌ای همیشه سبز از خانواده Cupressaceae می‌باشد که در کشورهای منطقه بالکان، ترکیه، سوریه، لبنان، گرجستان، ارمنستان، آذربایجان و قسمت شرقی ایران نزدیک ترکمنستان و هم چنین در نواحی شمال شرق سواحل دریای سیاه و دامنه قفقاز وجود دارند(۴). نام‌های محلی این گیاه اُرس، اردوج و آروس می‌باشد(۵). جونیپروس اکسلسا یک گیاه دارویی محسوب می‌شود که در گذشته برای درمان دیس منوره یا قاعدگی دردناک، سرفه، برونشیت و سرماخوردگی، یرقان، سل و تحریک قاعدگی مورد استفاده قرار می‌دادند(۸-۶، ۴). این گیاهان به طور سنتی در عربستان در درمان زردی و سل و در ترکیه برای درمان سرفه، برونشیت و هموروئید مورد استفاده قرار گرفته‌اند(۹). هم چنین توسط افراد بومی ایران به عنوان گیاهی با کاربردهای متنوع شناخته شده است و به طور سنتی در درمان بیماری‌های قلبی، عصبی، گوارشی و مجاری ادراری و... کاربرد دارد(۱۰). فعالیت ضد میکروبی ماده مؤثره میوه و برگ‌های این گیاه علیه چندین میکروب شامل باسیلوس سابتیلیس، کاندیدیا آلبیکنز، استافیلوکوک اورئوس و اشریشیاکلی مورد بررسی قرار گرفته است(۴). هم چنین در مطالعه‌ای نشان داده شده که اجزای این گیاه فعالیت آنتی‌لیشمانیایی نیز دارد(۱۱). در فرآیند آپوپتوز کاسپازها نیز نقش مهمی ایفا می‌کنند. کاسپازها، سیستئین پروتئازهایی هستند که به شکل پروآنزیم وجود دارند و در اثر شکسته شدن فعال می‌شوند(۱۳، ۱۲). دو مسیر جایگزین برای شروع فرآیند آپوپتوز وجود دارد: مسیر خارجی که وابسته به گیرنده‌های مرگ موجود بر سطح سلول است و مسیر داخلی که وابسته به میتوکندری می‌باشد. در هر دو مسیر کاسپازها فعال می‌شوند(۱۴). مسیر خارجی و داخلی به یک مسیر مشترک ختم می‌شوند که با شکستن کاسپاز ۳ آغاز شده و نهایتاً منجر به شکستن DNA ، دژنره شدن پروتئین‌های اسکلت سلولی و پروتئین‌های هسته‌ای، شکل‌گیری اجسام آپوپتوتیک، بیان لیگاند برای گیرنده‌های سلول‌های فاگوسیت‌کننده و در آخر جذب توسط سلول‌های فاگوسیت‌کننده منتهی خواهد شد(۱۵). در این مرحله از آپوپتوز، فسفاتیدیل سرین(PS) به سطح خارجی غشای سلول می‌آید. فسفاتیدیل سرین‌ها به طور طبیعی در لایه داخلی یا سیتوپلاسمیک غشای سلول‌های زنده قرار گرفته‌اند(۱۶). انکسین V دارای جایگاه اتصال به فسفاتیدیل سرین است. اخیرا مشخص شده هر نوع سلول دارای مکانیسمی است که باعث ظاهر شدن فسفاتیدیل سرین در سطح سلول می‌شود، که این مکانیسم طی آپوپتوز فعال می‌شود. جهت درک مکانیسم مرگ سلولی از آزمون فلوسیتومتری Annexin V-FITC استفاده می‌شود(۱۷). هم چنین در این مطالعه، بررسی فعالیت کاسپاز ۳ به دلیل اهمیت آن در هر دو مسیر آپوپتوز صورت گرفت. تا به حال در مورد اثرات سایتوتوکسیک و آپوپتوتیک عصاره بخش‌های هوایی گیاه جونیپروس اکسلسا بر رده‌های سلولی لوسمی لنفوبلاستیک حاد گزارشی منتشر نشده است، لذا در این مطالعه بر آن شدیم تا اثر این عصاره را بر سلول‌های سرطانی لنفوبلاستیک حاد شامل Nalm-6 و Reh مورد بررسی قرار دهیم.

## مواد و روش‌ها

در یک مطالعه بنیادی، این گیاه از استان کهگیلویه و بویراحمد در جنوب غربی ایران جمع‌آوری شده است. اندام مورد استفاده در عصاره‌گیری، اندام هوایی شامل سرشاخه‌های مخروط‌دار بوده که در مرحله زایشی جمع‌آوری گردید. ۱۰ گرم از پودر گیاه خشک شده توسط



[ Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-08-02 ]

۱۰۰ میلی‌لیتر متانل(به نسبت ۱ به ۱۰) با استفاده از روش خیساندن(maceration) به مدت ۲۴ ساعت عصاره‌گیری شد. عصاره‌های به دست آمده با استفاده از کاغذ صافی از پودر گیاه جدا شده و سپس با دستگاه روتاری در دمای کمتر از ۴۰ درجه سانتی‌گراد تغلیظ و در ویال ریخته شد. عصاره تغلیظ شده در زیر هود خشک و تا قبل از بررسی در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. تمامی مراحل مربوط به عصاره‌گیری در مرکز تحقیقات طب سنتی و گیاهان دارویی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی و زیر نظر متخصص فارماکوگنوزی انجام گرفت. برای آماده‌سازی عصاره و رساندن آن به غلظت مورد نظر، ابتدا میزان ۱۰۰ میلی‌گرم عصاره در میکروتیوب با ترازوی دیجیتال وزن شده و سپس در ۱ میلی‌لیتر DMSO استریل حل شدند(غلظت نهایی استوک اولیه عصاره ۱۰۰ mg/mL بود).

با توجه به رقیق نمودن استوک اولیه عصاره، جهت تهیه غلظت‌های مورد نیاز برای مطالعه، غلظت نهایی DMSO به کمتر از ۰/۰۱ رسیده و نیازی به کنترل DMSO نبوده است.

*کشت سلولی و تیمار سلول‌ها با عصاره:*

رده‌های سلولی Nalm-6 و Reh از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران (تهران، ایران) تهیه شد. در یک مطالعه تجربی، به منظور کشت سلولی ابتدا سلول‌ها از تانک ازت خارج و یخ‌زدایی شدند، سپس در محیط کشت RPMI 1640 (جیبکو) حاوی ۱۰٪ FBS و ۱٪ پنی‌سیلین کشت داده شدند.

فلاسک‌های کشت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد با ۵٪ $CO_2$ انکوبه شدند. بعد از این که سلول‌ها به قدر کافی رشد کردند، $۳ \times ۱۰^۵$ تا از هر سلول در پلیت‌های ۹۶ خانه با غلظت‌های مختلف عصاره تیمار و در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد با ۵٪ $CO_2$ به مدت ۴۸ و ۷۲ ساعت انکوبه شدند. غلظت‌های مختلف عصاره با استفاده از محیط کشت استریل تهیه شدند. همه آزمایش‌ها به صورت شش‌تایی و در حداقل سه آزمایش جداگانه مورد بررسی قرار گرفتند.

*آزمون MTT به منظور سنجش فعالیت متابولیک:*

پس از تیمار و اتمام زمان انکوباسیون، به هر چاهک ۲۰ میکرولیتر محلول MTT ( 4,5 dimethyl diphenyl tetrazolium bromid ) اضافه نموده و مجدداً به مدت ۲ تا ۴ ساعت در انکوباتور دی‌اکسید کربن در ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. سپس پلیت‌ها با دور g ۲۹۰۰ به مدت ۹ دقیقه سانتریفوژ شده و محیط کشت رویی دور ریخته شد. در طی زمان انکوباسیون، MTT توسط سیستم سوکسینات دهیدروژناز که یکی از آنزیم‌های چرخه تنفسی میتوکندری‌ها است، احیا می‌شود. احیا و شکسته شدن این حلقه موجب تولید کریستال‌های آبی رنگ فورمازان می‌شود. میزان رنگ تولید شده با تعداد سلول‌هایی که از نظر متابولیک فعال هستند(سلول‌های زنده) رابطه مستقیم دارد. کریستال‌های فورمازان در آب غیرمحلول بوده و بایستی قبل از رنگ‌سنجی توسط ماده حلالی نظیر دی متیل سولفوکساید(DMSO) به حالت محلول درآیند. بنابراین بعد از تخلیه محیط کشت، ۱۰۰ میکرولیتر DMSO به هر چاهک اضافه شد. در نهایت جذب نوری چاهک‌ها توسط دستگاه الایزا ریدر در طول موج ۵۷۰ نانومتر قرائت شده و درصد سلول‌های زنده با فرمول زیر محاسبه شدند.

$$\text{میزان سلول‌های زنده (٪)} = \left( \frac{\text{میانگین جذب نوری سلول‌های تیمار شده با عصاره در هر غلظت}}{\text{میانگین جذب نوری خانه‌های حاوی سلول‌های کنترل}} \right) \times ۱۰۰$$

*آزمون فلوسیتومتری به منظور سنجش میزان آپوپتوز:*

ابتدا سلول‌ها در محیط RPMI حاوی ۱۰٪ FBS در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد حاوی ۵٪ گاز $CO_2$ به منظور دسترسی به جمعیت مورد نظر کشت شدند. طبق دستور کیت(Annexin V Apoptosis Detection Kit FITC ، بیوساینس)، برای هر آزمون به $۳ \times ۱۰^۵$ سلول نیاز است. سلول‌ها در پلیت ۹۶ خانه با غلظت‌های مختلف عصاره تیمار شده و به مدت ۴۸ ساعت انکوبه شدند. بعد از انکوباسیون، سلول‌ها به فالکون منتقل شده و سانتریفوژ شدند و مایع‌رویی آن دور ریخته شد. ۵۰۰ میکرولیتر از بافر باندکننده به سلول‌های تیمار شده اضافه شد، سپس به ویال مربوط به انجام فلوسیتومتری منتقل شدند. در نهایت



[ Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-08-02 ]

۵ میکرولیتر انکسین V و ۱۶ میکرولیتر PI ( Premium Iodide) به ویال اضافه و به مدت ۲۰ دقیقه در تاریکی و در دمای اتاق انکوبه شدند در نهایت ویال‌ها توسط دستگاه فلوسیتومتری خوانده شد.

*آزمون بررسی فعالیت کاسپاز ۳ به منظور سنجش میزان آپوپتوز:*

برای این آزمایش از کیت سنجش کلرومتریک فعالیت کاسپاز ۳ (آبکام، آمریکا، ab39301) استفاده شد. تعداد سلول مورد نیاز برای هر غلظت طبق دستورالعمل کیت، $10^5 \times 5$-۱ می‌باشد. ابتدا سلول‌های کشت داده شده با دوزهای مختلف عصاره جونیپروس اکسلسا در پلیت‌های ۱۲ خانه، طبق روشی که قبلاً توضیح داده شد، تیمار شده و پلیت به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور $CO_2$ دار انکوبه شد. بعد از انکوباسیون، طبق دستورالعمل کیت پروتئین‌های سلول‌ها استخراج شده و به روش BCA protein assay ، میزان پروتئین آن‌ها سنجیده شد. غلظت مناسب پروتئین برای هر آزمون در سنجش فعالیت کاسپاز ۳ ، ۵۰ الی ۲۰۰ میکروگرم به ازای هر ۵۰ میکرولیتر بافر لیز کننده می‌باشد. در ادامه آزمون، فعالیت کاسپاز ۳ همراه با تکرار به صورت دوتایی صورت گرفت. یک چاهک به عنوان background حاوی ۵۰ میکرولیتر Reaction Buffer و در سایر چاهک‌ها، به میزان ۵۰ میکرولیتر از نمونه‌ها اضافه شدند. سپس ۵۰ میکرولیتر از مخلوط 2X Reaction Buffer و DTT و سپس به میزان ۵ میکرولیتر از سوبسترا (۴ میلی‌مول DEVD-p-NA) به هر چاهک اضافه کرده و پلیت به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. در نهایت جذب نوری چاهک‌ها در طول موج ۴۰۰-۴۵۰ nm خوانده شد.

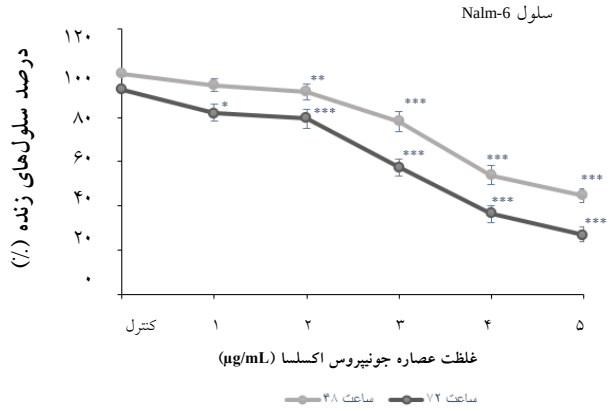
*آزمون‌های آماری:*

آنالیز آماری داده‌ها با کمک نرم‌افزار SPSS ۲۳ صورت گرفت. از آزمون one-way ANOVA برای ارزیابی اختلاف آماری بین گروه‌های تیمار شده و کنترل استفاده شد و $p<$ ۰/۰۵ از لحاظ آماری معنادار تلقی گردید و $p<$ ۰/۰۰۱، $p<$ ۰/۰۱ و $p<$ ۰/۰۵ نشانگر کاهش معنادار نسبت به کنترل بودند.

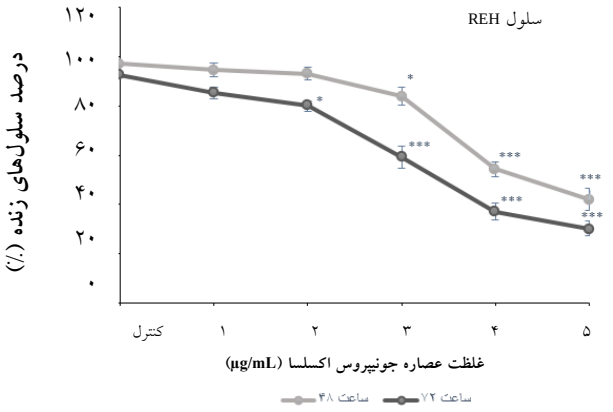
## یافته‌ها

*نتایج آزمون MTT :*

برای انجام آزمون MTT ، سلول‌های Nalm-6 و Reh با غلظت‌های ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره جونیپروس اکسلسا با روشی که قبلا بیان شد، تیمار شدند. بعد از ۴۸ و ۷۲ ساعت انکوباسیون پلیت‌ها، جذب خانه‌های حاوی سلول‌های تیمار شده با جذب خانه‌های حاوی سلول‌های کنترل مقایسه شده و درصد سلول‌های زنده محاسبه گردید.



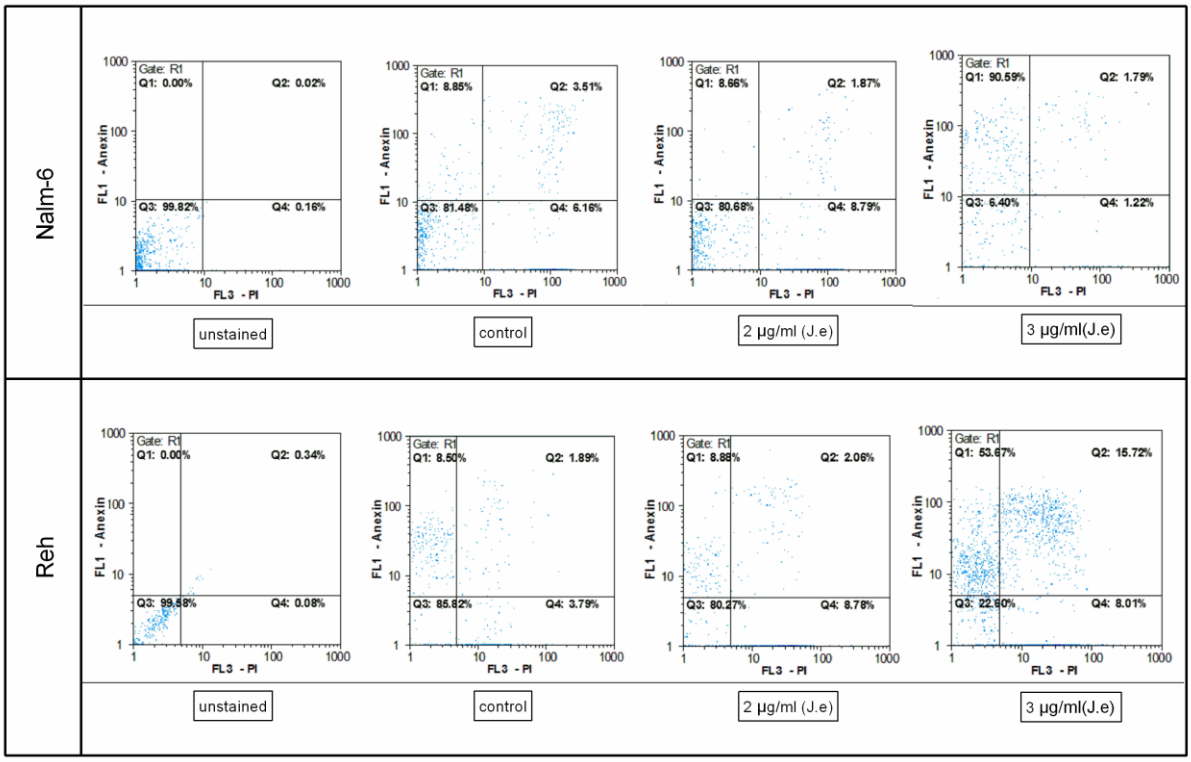

**نمودار ۱: اثر کشندگی عصاره بخش‌های هوایی گیاه جونیپروس اکسلسا بر رده سلولی Nalm-6 با روش MTT**




**نمودار ۲: اثر کشندگی عصاره بخش‌های هوایی گیاه جونیپروس اکسلسا بر رده سلولی Reh با روش MTT**



[ Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-08-02 ]




**شکل ۱: بررسی میزان آپوپتوز سلول‌های تیمار شده با عصاره بخش‌های هوایی گیاه جونیپروس اکسلسا در رده‌های سلولی Nalm-6 و Reh به روش فلوسیتومتری. در این گراف‌ها ربع سمت چپ پایین- سلول‌های انکسین منفی/PI منفی(سلول‌های زنده)، ربع سمت چپ بالا- سلول‌های انکسین مثبت/PI منفی(آپوپتوز اولیه)، ربع سمت راست پایین- سلول‌های انکسین منفی/PI مثبت(سلول‌های نکروتیک) و ربع سمت راست بالا- سلول‌های انکسین مثبت/PI مثبت(آپوپتوز تاخیری) می‌باشند.**

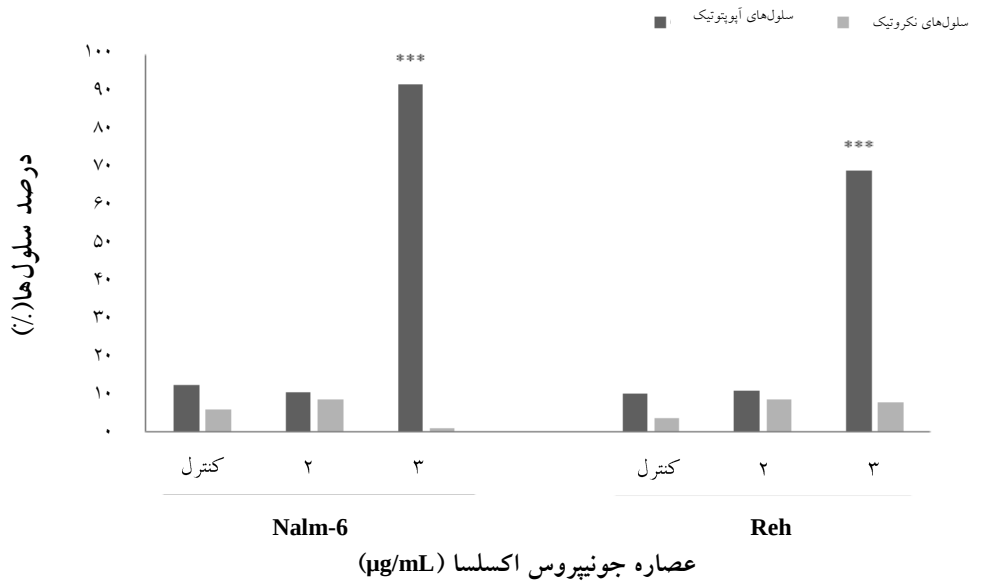
نتایج حاصل از آزمون MTT نشان داد که افزایش دوز عصاره جونیپروس اکسلسا، باعث کاهش فعالیت متابولیکی ناشی از مرگ سلول‌های Nalm-6 و Reh می‌شود. فرآیند کاهش فعالیت متابولیک علاوه بر این که وابسته به غلظت عصاره است، وابسته به زمان نیز می‌باشد. به طوری که بعد از تیمار ۴۸ ساعته با غلظت µg/mL ۴ و در تیمار ۷۲ ساعته، در غلظت µg/mL ۳ ، حدوداً ۵۰٪ از سلول‌ها (IC50) در هر دو رده سلولی کشته شدند. همان طور که در نمودارهای ۱ و ۲ نشان داده شده است، در تیمار ۴۸ ساعته، میانگین جذب نوری در غلظت‌های ۳ ، ۴ و ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر به میزان قابل توجه‌ای با گروه کنترل متفاوت بوده($p< ۰/۰۰۱$) و در تیمار ۷۲ ساعته علاوه بر غلظت‌های فوق، غلظت ۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر نیز اختلاف قابل توجه‌ای نسبت به گروه کنترل داشته است ($p< ۰/۰۰۱$ ). در نمودارهای ۱ و ۲، داده‌ها به صورت mean ± SD ، حاصل از حداقل سه آزمون جداگانه گزارش شدند.

*نتایج آزمون فلوسیتومتری:*

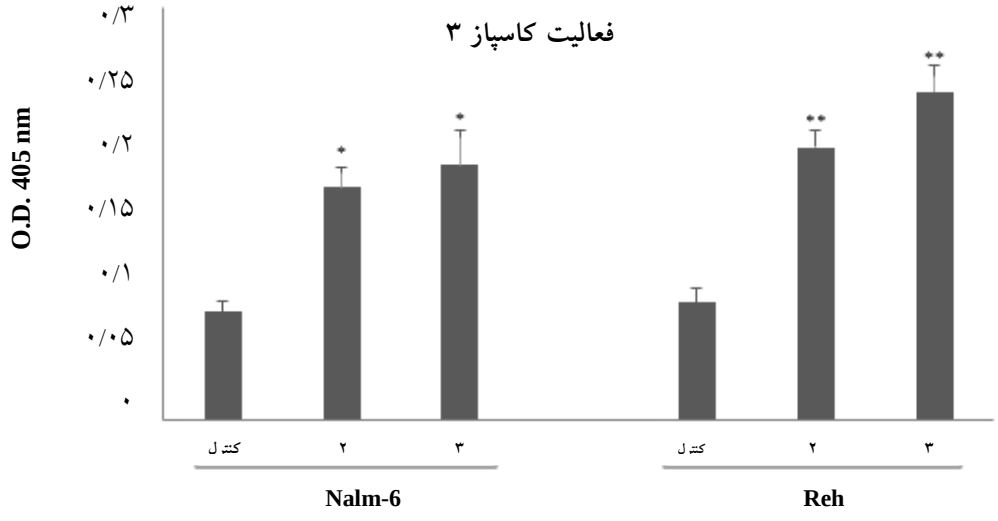
برای آزمون فلوسیتومتری، سلول های Nalm-6 و Reh با غلظت‌های ۲ و ۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره جونیپروس اکسلسا با روشی که قبلاً بیان شد، تیمار شدند. نتایج حاصل از آزمون فلوسیتومتری بعد از تیمار ۴۸ ساعته، نشان‌دهنده افزایش میزان آپوپتوز در سلول‌های تیمار شده با عصاره نسبت به گروه کنترل بود. همان طور که در شکل ۱ و نمودار ۳ نشان داده شده است، میزان آپوپتوز سلول‌ها وابسته به غلظت عصاره بوده و غلظت ۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره در هر دو رده سلولی، باعث



[ Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-08-02 ]




**نمودار ۳: نمودار نتایج حاصل از آزمون فلوسیتومتری در سلول Nalm-6 و Reh (p< ۰/۰۱)*****




**نمودار ۴: نمودار فعالیت کاسپاز ۳ در سلول‌های Nalm-6 و Reh . نمودار فوق میزان فعالیت کاسپاز ۳ در سلول‌های Nalm-6 و Reh پس از تیمار ۴۸ ساعته با عصاره گیاه جونیپروس اکسلسا را نشان می‌دهد. بعد از استخراج پروتئین و انجام مراحل مرتبط با کیت فعالیت کاسپاز ۳، OD پلیت بعد از ۲۴ ساعت سنجیده شد(p< ۰/۰۱ ** و p< ۰/۰۵ *).**

افزایش چشمگیر و معنادار آپوپتوز نسبت به گروه کنترل می‌شود(p< ۰/۰۰۱). در این آزمایش هم چنین افتراق سلول‌های آپوپتوز شده از سلول‌های نکروتیک صورت گرفت(شکل ۱). همان طور که در شکل ۱ نشان داده شده است، درصد سلول‌های نکروز شده در سلول‌های تیمار شده با عصاره نسبت به گروه‌های کنترل ، در هر دو رده



[ Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-08-02 ]

سلولی اختلاف معناداری نداشته است.

*نتایج آزمون فعالیت کاسپاز ۳:*

برای این آزمون، سلول‌های Nalm-6 و Reh با غلظت‌های ۲ و ۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره جونیپروس اکسلسا با روشی که قبلاً بیان شد، تیمار شدند. نتایج حاصل از سنجش فعالیت کاسپاز ۳ نشان داد که در هر دو رده سلول Nalm-6 و Reh ، تیمار با عصاره جونیپروس اکسلسا، باعث افزایش فعالیت کاسپاز ۳ نسبت به گروه‌های کنترل می‌شود. در سلول‌های Nalm-6 میانگین جذب نوری در غلظت‌های ۲ و ۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره به میزان زیادی با گروه کنترل متفاوت است($p< ۰/۰۵$). در سلول‌های Reh نیز غلظت‌های ۲ و ۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره دارای اختلاف قابل توجه نسبت به گروه کنترل می‌باشد($p< ۰/۰۱$)(نمودار ۴). داده‌ها در نمودار ۴ به صورت mean ± SD ، حاصل از حداقل سه آزمون جداگانه گزارش شدند.

## بحث

نتایج حاصل از این مطالعه بیانگر اثر مهاری عصاره بخش‌های هوایی گیاه جونیپروس اکسلسا بر رده‌های سلولی Nalm-6 و Reh می‌باشد. همان طور که در نتایج مربوط به آزمون MTT نشان داده شده است، در هر دو رده سلولی، عصاره گیاه جونیپروس اکسلسا از غلظت ۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر به بالا دارای اثر کشندگی قابل توجه‌ای نسبت به گروه‌های کنترل بوده و بیشترین اثر مهاری در تیمار ۷۲ ساعت مشاهده شد. به طوری که کاهش در میزان سلول‌های زنده، به ویژه در غلظت‌های بالاتر مشهود است. در بررسی‌هایی که قبلاً صورت گرفت، اثر مهاری عصاره دانه و شاخه‌های گیاه جونیپروس اکسلسا بر روی رده‌های سلولی دیگر از جمله HeLa ، KB و MDA-MB-468 در غلظت‌های بیشتر از ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره‌ها نشان داده شده است(۱۸). این در حالی است که در مطالعه حاضر غلظت‌های کمتر از ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر بررسی و اثرات مهارکنندگی مشاهده شده است. هم چنین در مطالعه دیگری نیز اثر ضد توموری عصاره دانه‌های گیاه جونیپروس اکسلسا بررسی شد که مهار ۸۶ درصدی تومور در مقایسه با داروی کنترل وین کریستین را گزارش نمودند(۱۱). در مطالعه دیگری اثر مهاری ماده مؤثره گیاه جونیپروس اکسلسا بر رده‌های سلولی CCRF-CEM و CEM-ADR5000 مورد بررسی قرار گرفته و IC50 معادل ۴۴-۴۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر گزارش شده است(۱۹). در مطالعه اسماعیلی و همکاران، اثر کشندگی عصاره گیاه جونیپروس اکسلسا بر دیگر سلول‌های سرطانی از جمله HepG-2 ، MCF-7 و A-549 بررسی و IC50 معادل ۳۰ µg/mL < گزارش شده است(۲۰).

در مطالعه حاضر نتایج حاصل از آزمون فلوسیتومتری نیز نشان داد که غلظت ۳ µg/mL عصاره بخش‌های هوایی گیاه جونیپروس اکسلسا تاثیر بسیار قابل توجه‌ای(۷ الی ۷/۵ برابر نسبت به گروه‌های کنترل) بر روی آپوپتوز هر دو رده سلولی گذاشته است، که این میزان آپوپتوز با کاهش معنادار درصد سلول‌های زنده در آزمون MTT مطابقت دارد. هم چنین در این مطالعه میزان فعالیت کاسپاز ۳ نیز مورد ارزیابی قرار گرفت. افزایش فعالیت کاسپاز ۳ در سلول‌های تیمار شده با عصاره بخش‌های هوایی گیاه جونیپروس اکسلسا، نسبت به گروه‌های کنترل نیز حاکی از افزایش القای فرآیند آپوپتوز در هر دو رده سلولی مورد مطالعه می‌باشد. همان طور که در نمودار ۴ نشان داده شده است، کاسپاز ۳ در سلول‌های تیمار شده با عصاره، فعالیت بیشتری نسبت به گروه‌های کنترل داشته است. به طوری که در هر دو رده سلولی، در غلظت ۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر افزایش تقریباً ۲/۲ برابری و در غلظت ۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر افزایش ۲/۶ برابری فعالیت کاسپاز نسبت به گروه کنترل مشاهده شد.

در مطالعه اُچ و همکاران، گونه‌های جونیپروس به عنوان منبعی جایگزین برای ترکیبات پودوفیلوتوکسین (PDP) و دئوکسی پودوفیلوتوکسین(dO-PDP) در نظر گرفته شدند و اثر کشندگی PDP و عصاره اتانولی برگ‌های گونه‌های جونیپروس علیه چندین رده سلولی سرطانی هم چون CCRF-CEM، CEM-C1 و J45.01 ارزیابی شد. نتایج این مطالعه ارتباط احتمالی بین میزان



[ Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-08-02 ]

PDP و اثر کشندگی عصاره اتانولی برگ‌های جونیپروس را نشـان داده اسـت و محـدوده IC50 نیـز از ۰/۳ الـی ۵/۴ میکروگرم بر میلی‌لیتـر گـزارش شـده اسـت(۲۱). عصـاره الکلی بخـش‌هـای هـوایی گیـاه جـونیپروس اکسلسـا نیـز می‌تواند هم چون سایر گونـه‌هـای جـونیپروس بـه عنـوان منبعی از PDP و dO-PDP بوده و اثرات کشـندگی عصـاره این گیاه ناشی از این ترکیبات باشد.

## نتیجه‌گیری

در این مطالعه برای اولین بار اثر کشندگی و آپوپتوتیـک عصاره بخش‌های هوایی گیاه جونیپروس اکسلسـا بـر روی رده‌های سلولی لوسمی لنفوبلاستیک حاد نشـان داده شـده است. لذا می‌توان عصاره این گیاه را بـه عنـوان مـاده‌ای بـا اثرات کشندگی بـر روی رده‌هـای Nalm-6 و Reh پیشـنهاد کـرد. لازم اسـت تحقیقـات بیشـتری در زمینـه شـناخت مکانیسم سلولی و مولکولی این عصـاره بـر روی رده‌هـای سلولی فوق صورت پذیرد، هم چنین این عصاره مـی‌توانـد به عنوان جایگزین بالقوه در مطالعه‌هـای مـرتبط بـا یـافتن داروهای جدید در درمان بیماری لوسمی لنفوبلاستیک حاد مورد استفاده قرار گیرد.

## References:


1- Harrison CJ. Acute lymphoblastic leukaemia. Best Practice & Research Clinical Haematology. 2001;14(3):593-607.

2- de Mesquita ML, de Paula JE, Pessoa C, de Moraes MO, Costa-Lotufo LV, Grougnet R, et al. Cytotoxic activity of Brazilian Cerrado plants used in traditional medicine against cancer cell lines. Journal of ethnopharmacology. 2009;123(3):439-45.

3- Cragg GM, Newman DJ. Antineoplastic agents from natural sources: achievements and future directions. Expert Opinion on Investigational Drugs. 2000;9(12):2783-2797.

4- Asili J, Emami S, Rahimizadeh M, Fazly-Bazzaz B, Hassanzadeh M. Chemical and antimicrobial studies of Juniperus excelsa subsp. excelsa and Juniperus excelsa subsp. polycarpos essential oils. Journal of Essential Oil Bearing Plants. 2008;1(3):292-302.

5- Mozaffarian V. A dictionary of Iranian plant names: Latin, English, Persian: Farhang Mo'aser; 1996.

6- Fujita T, Sezik E, Tabata M, Yesilada E, Honda G, Takeda Y, et al. Traditional medicine in Turkey VII. Folk medicine in middle and west Black Sea regions. Economic Botany. 1995;49(4):406-22.

7- Muhammad I, Mossa J, El- Feraly F. Antibacterial diterpenes from the leaves and seeds of Juniperus excelsa M. Bieb. Phytotherapy Research. 1992;6(5):261-4.

8- Yeşilada E, Honda G, Sezik E, Tabata M ,Fujita T, Tanaka T, et al. Traditional medicine in Turkey. V. Folk medicine in the inner Taurus Mountains. Journal of ethnopharmacology. 1995;46(3):133-52.

9- Topçu G, Gören AC, Bilsel G, Bilsel M, Çakmak O, Schilling J, et al. Cytotoxic Activity and Essential Oil Composition of Leaves and Berries of Juniperus excelsa. Pharmaceutical biology. 2005;43(2):125-8.

10- Pirani A, Moazzeni H, Mirinejad S, Naghibi F, Mosaddegh M. Ethnobotany of Juniperus excelsa M. Bieb.(Cupressaceae) in Iran. Ethnobotany Research and Applications. 2011;9:335-41.

11- Nabi S, Ahmed N, Khan MJ, Bazai Z, Yasinzai M, Al-Kahraman Y. In vitro antileishmanial, antitumor activities and phytochemical studies of methanolic extract and its fractions of Juniperus excelsa berries. World Applied Sciences Journal. 2012;19(10):1495-500.

12- Martin SJ, Green DR. Protease activation during apoptosis: death by a thousand cuts? Cell. 1995;82(3):349-52.

13- Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. Science. 1998;281(5381):1312-6.

14- Igney FH, Krammer PH. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. Nature Reviews Cancer. 2002;2(4):277-88.

15- Martinvalet D, Zhu P, Lieberman J. Granzyme A induces caspase-independent mitochondrial damage, a required first step for apoptosis. Immunity. 2005;22(3):355-70.

16- Arur S, Uche UE, Rezaul K, Fong M, Scranton V, Cowan AE, et al. Annexin I is an endogenous ligand that mediates apoptotic cell engulfment. Developmental cell. 2003;4(4):587-98.

17- Zhang G, Gurtu V, Kain SR, Yan G. Early detection of apoptosis using a fluorescent conjugate of annexin V. Biotechniques. 1997;23(3):525-31.

18- Sadeghi-aliabadi H, Emami A, Sadeghi B, Jafarian A. In vitro cytotoxicity of two subspecies of Juniperus excelsa on cancer cells. Iranian Journal of Basic Medical Sciences. 2009;11(4):250-3.

19- Saab AM, Guerrini A, Sacchetti G, Maietti S, Zeino M, Arend J, et al. Phytochemical Analysis and Cyto-toxicity Towards Multidrug-Resistant Leukemia Cells of Essential Oils De-rived from Lebanese Medicinal




[ Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-08-02 ]

Plants12-20.

20- Esmaeili S, Hamzeloo-Moghadam M, Ghaffari S, Mosaddegh M. Cytotoxic activity screening of some medicinal plants from south of Iran. Research Journal of Pharmacognosy. 2014;1(4):19-25.

21- Och M, Och A, Cieśla Ł, Kubrak T, Pecio Ł, Stochmal A, et al. Study of cytotoxic activity, podophyllotoxin, and deoxypodophyllotoxin content in selected Juniperus species cultivated in Poland. Pharmaceutical biology. 2015;53(6):831-7.

[ Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-08-02 ]

*Sci J Iran Blood Transfus Organ 2017; 13(4): 304-313*

***Original Article***

# The effect of extract from aerial parts of *Juniperus excelsa* plant on proliferation and apoptosis of acute lymphoblastic leukemia cell lines, Nalm-6 and Reh

***Darvishi M.[1], Esmaeili S.[2], Dehghan–Nayeri N.[1], Mashati P.[1], Gharehbaghian A.[1,3]***

*[1]School of Allied Medical Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran*
*[2]Traditional Medicine and Materia Medica Research Center, School of traditional medicines, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.*
*[3]Pediatric congenital hematologic disorders research center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran*

## Abstract

***Background and Objectives***

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is the most common childhood malignancy. The side effects of chemotherapeutic drugs have primarily lead to the increased use of natural products for cancer treatment. Juniperus excelsa, a medicinal herb, was reported to show antiproliferative effects on various cancer cells. In this study, cytotoxic and apoptotic effects of extract from aerial parts of Juniperus excelsa plant were investigated on acute lymphoblastic leukemia cell lines, Nalm-6 and Reh.

***Materials and Methods***

In this basic research, Nalm-6 and Reh were cultured and then they were treated with various concentrations of J. excelsa extract for 48 and 72 h and then the cell viability was evaluated by using MTT assay. Apoptosis also was assessed by caspase 3 activity assay and flow cytometry following Annexin V and Propidium iodide staining. Statistical analysis was assessed by one-way ANOVA test and SPSS 23.

***Results***

MTT assay results show that J. excelsa extract concentrations of 3, 4 and 5 µg/ml significantly reduce percentage of alive cells ($p < 0.001$). Flow cytometry results also show that J. excelsa extract significantly increase percentage of apoptotic cells compared with control groups ($p < 0.001$). Caspase 3 activity assay results show that caspase 3 activity was significantly increased in treated cells ($p < 0.05$).

***Conclusions***

Our study shows that extract from aerial parts of J. excelsa has cytotoxic and apoptotic effects on Nalm-6 and Reh cells.

***Key words:*** Acute lymphoblastic leukemia, Juniperus excelsa, cytotoxicity, Apoptosis

*Received: 5 Oct 2016*
*Accepted: 9 Nov 2016*

*Correspondence:* Gharehbaghian A., PhD in Clinical Immunohematology. School of Allied Medical Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences and Pediatric congenital hematologic disorders research center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences.
P.O.Box: 15468-15514, Tehran, Iran. Tel: (+9821) 22721150; Fax: (+9821) 22731999
E-mail: *gharehbaghian@sbmu.ac.ir*



[ Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-08-02 ]