بررسی اثر عصاره هیدروالکلی کلم قرمز بر مهار رشد و القاء آپوپتوز در سلول های سرطانی پستان (MCF-7)

دکتر داوود مهدیان[۱]، دکتر آذر حسینی[۲*]، دکتر سید هادی موسوی[۳و۴]، دکتر مهدی بی همتا[۱]، دکتر محمد مهدی واحدی[۱]

۱. دستیار گروه فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران.
۲. استادیار مرکز تحقیقات فارماکولوژیک گیاهان دارویی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران.
۳. دانشیار گروه فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران.
۴. دانشیار مرکز تحقیقات فارماکولوژیک گیاهان دارویی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱۲/۲ **تاریخ پذیرش:** ۱۳۹۴/۴/۴

خلاصه

مقدمه: سبزیجات براسیکا متعلق به خانواده کلم بوده و شامل انواع مختلف کلم (قرمز، سبز و ...)، گل کلم، کلم بروکلی و کلم پیچ می باشد. گزارشات نشان می دهند که مصرف این گیاهان در کاهش خطر ابتلاء به بیماری های حاد مانند بیماری قلبی عروقی و سرطان مؤثرند. یک گروه از این خانواده کلم قرمز می باشد. مطالعات نشان داده اند که کلم قرمز حاوی ترکیباتی است که در درمان بیماری های مختلف از جمله سرطان نقش دارند. مطالعه حاضر با هدف بررسی اثرات سایتوکسیک و آپاپتوتیک عصاره هیدروالکلی کلم قرمز بر رده سرطانی پستان (MCF-7) انجام شد.

روش کار: مطالعه حاضر اواخر سال ۱۳۹۲ به صورت برون تنی بر روی سلول های سرطانی پستان (MCF-7) در مرکز تحقیقات فارماکولوژیک گیاهان دارویی انجام گردید. سلول ها در محیط کشت DMEM با ۱۰٪ سرم جنینی گاو، ۱۰۰ واحد در میلی لیتر پنی سیلین و ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر استرپتومایسین کشت شده و با غلظت های متفاوتی از عصاره کلم قرمز انکوبه شدند. میزان زنده ماندن سلول ها با تست MTT ارزیابی شد. میزان سلول های آپوپتوتیک نیز با استفاده از رنگ آمیزی پروپیدیوم یداید (PI) به وسیله فلوسایتومتری (پیک SUB-G1) اندازه گیری شد.

یافته ها: کلم قرمز رشد سلول های سرطانی را به صورت وابسته به دوز و زمان مهار کرد. بعد از ۲۴ ساعت غلظت ۲۰۰۰ میکروگرم در میلی لیتر ($p<0/05$)، بعد از ۴۸ ساعت غلظت های ۱۰۰۰ ($p<0/05$)، ۱۵۰۰ ($p<0/05$) و ۲۰۰۰ ($p<0/01$) و پس از گذشت ۷۲ ساعت غلظت های ۵۰۰ ($p<0/05$)، ۱۰۰۰ ($p<0/01$)، ۱۵۰۰ ($p<0/01$) و ۲۰۰۰ ($p<0/001$) به صورت معنی داری مرگ و میر سلول های زنده را افزایش دادند. همچنین عصاره در غلظت های ۱۰۰۰ ($p<0/05$)، ۱۵۰۰ ($p<0/01$) و ۲۰۰۰ ($p<0/001$) باعث تحریک آپپتوز شد. همچنین تست MTT نشان داد که عصاره سمیتی بر سلول های نرمال در زمان های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت نداشت. میزان غلظتی از عصاره که بتواند رشد سلول ها را ۵۰ درصد مهار کند، (IC50) 2685 میکروگرم بر میلی لیتر می باشد.

نتیجه گیری: کلم قرمز از طریق تحریک آپوپتوز میزان مرگ و میر سلول های MCF-7 را افزایش می دهد، در نتیجه کلم قرمز می تواند در درمان سرطان پستان مؤثر باشد.

کلمات کلیدی: آپوپتوز، سرطان پستان، کلم قرمز، مرگ سلولی، MCF-7

* **نویسنده مسئول مکاتبات:** دکتر آذر حسینی؛ دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران. **تلفن:** ۰۵۱-۳۸۰۰۲۸۳؛ **پست الکترونیک:** hoseiniaz@mums.ac.ir

مقدمه

امروزه سرطان یک بیماری پیچیده و در برخی موارد غیرقابل درمان می باشد (۱). سرطان پستان یکی از شایع ترین سرطان ها در زنان می باشد که هر ساله باعث مرگ تعدادی زیادی از زنان می شود (۲). شیمی درمانی، یکی از راه های درمانی بیماران سرطانی می باشد (۳). اگرچه هدف اصلی شیمی درمانی، حذف سلول های توموری است، اما در اکثر موارد، داروهای شیمی درمانی به سلول های سالم نفوذ کرده و آن ها را تخریب می کند (۴). علاوه بر این بسیاری از عوارض جانبی به دنبال مصرف آن ها بروز می کند که شایع ترین آن ها شامل خستگی، تهوع، استفراغ، اسهال، موکوزیت (التهاب مخاط دهان)، درد، راش، عفونت، سردرد و مشکلات دیگر می باشد (۵). محققین معتقدند که عوامل تغذیه ای، گیاهان و ترکیبات موثر آن ها ممکن است شیمی درمانی را تحت تأثیر قرار داده و لذا در درمان سرطان کمک کننده باشند. ترکیبات طبیعی مختلف از طریق کاهش مقاومت به داروهای شیمی درمانی، کاهش یا حذف عوارض این داروها می توانند اثربخشی عوامل شیمی درمانی را بهبود ببخشند (۶). در نتیجه محققین تلاش می کنند اثرات مثبت گیاهان و یا عوامل مؤثر آن ها را در مطالعات حیوانی و سلولی نشان دهند. برخی گیاهان دارای ترکیبات آنتی اکسیدانی هستند که مصرف آن ها ممکن است از بروز سرطان جلوگیری کند. سبزیجات براسیکا متعلق به خانواده Cruciferous و مشتمل بر جنس های متفاوتی از کلم (سبز، قرمز، ....)، گل کلم، کلم بروکلی و کلم پیچ می باشند. مطالعات مختلف نشان داده اند که این سبزیجات خواص آنتی اکسیدان و ضد سرطانی دارند (۷). مصرف سبزیجات براسیکا جهت کاهش خطر برخی کارسینوم ها در انسان شناخته شده اند. این دسته از سبزیجات حاوی تیوگلوکوزیدهای آلیفاتیک، ایندول و آلکیل بوده که به گلوکوزینولات (GLS[1]) معروف هستند. سبزیجات براسیکا دارای گروه بزرگی از گلوکوزینولات ها می باشند. تحقیقات نشان داده اند که فعالیت آنتی اکسیدان گلوکوزینولات ها بالا می باشد. همچنین مطالعات درون تنی و برون تنی نشان داده اند که ایندول و آلیفاتیک GLS خواص ضد سرطانی دارند (۷). پیگمان قرمز کلم مربوط به حضور آنتوسیانین می باشد. بیش از ۱۵ آنتوسیانین متفاوت در کلم قرمز در وزنی معادل ۲۵ میلی گرم در ۱۰۰ گرم از کلم قرمز وجود دارند (۸).

اجزاء اصلی کلم قرمز شامل ایزوسیانات (گلوکوزینولات)، ویتامین های A، B، C و آنتوسیانین ها می باشد (۹). مطالعات نشان داده اند که آنتوسیانین ها نسبت به فلاونوئیدها آنتی اکسیدانت های قوی تری هستند (۱۱). همچنین مطالعات نشان داده اند که کلم قرمز دارای خواص آنتی اکسیدان، کاهش دهنده تری گلیسرید خون (۱۲، ۱۳)، ضد سرطان (۱۴، ۱۵) و کاهش دهنده کلسترول خون (۱۴) می باشد. کلم قرمز همچنین از استرس های اکسیداتیو القایی در کبد و مغز حیواناتی که در معرض پاراکوات (۱۵) و ان - متیل - د- آسپارتات قرار گرفته اند، جلوگیری می کند (۱۶). کلم قرمز حاوی ترکیباتی است که رشد سلول های سرطان پستان دارای استروژن گیرنده مثبت و هم استروژن گیرنده منفی را مهار می کند (۱۷). مطالعه دوی و همکاران (۲۰۱۲) نشان داد که سولفورافون جدا شده از کلم قرمز باعث مهار رشد و تحریک آپوپتوزیس در رده سلول های سرطان حنجره انسانی می شود (۱۸). همچنین محققین نشان داده اند که عصاره کلم قرمز در دوزهای ۲۰۰۰-۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر باعث تحریک آپپتوز و کاهش نسبتBCL2/Bax در رده سلول های سرطانی پستان از نوع MDA-MB-231 می شود (۱۹). مطالعه هفید و همکاران (۲۰۱۳) نشان داد که عصاره کلم قرمز فعالیت های ضد سرطان بارزی در مقابل سلول های سرطانی دهانه رحم و هپاتوکارسینوما دارد. عصاره کلم قرمز فعالیت ضدسرطانی بیشتری در برابر سلول های رده Hela نسبت به سلول های HepG2 دارد (۲۰). با توجه به مطالعات انجام شده، مطالعه حاضر با هدف بررسی اثر

[1] Glucosinolate

ضد سرطانی عصاره هیدروالکلی کلم قرمز بر رده سرطانی MCF-7 انجام شد.

روش کار

مطالعه حاضر به صورت برون تنی بر روی سلول های سرطانی پستان (MCF-7) در اواخر سال ۱۳۹۲ در مرکز تحقیقات فارماکولوژیک گیاهان دارویی انجام گردید. جهت انجام مطالعه کلم قرمز تازه از بازار محلی خریداری و توسط مهندس جوهرچی در پژوهشکده علوم کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد از نظر جنس براسیکا شناسایی و مورد تایید قرار گرفت. پروپیدیم یدید (PI)، سیترات سدیم، تریتون X-۱۰۰ و ۳- (۴ و ۵- دی متیل تیازول-۲-ایل)-۲ و ۵- دی فنیل تترازولیوم (MTT) از سیگما خریداری شد. مواد دیگر به طور عمده شامل DMEM گلوکز بالا، پنی سیلین- استرپتومایسین و FBS از Gibco خریداری شد.

-کشت سلول و درمان:

سلول های سرطانی پستان از نوع MCF-7 از انستیتو پاستور ایران خریداری شد. سلول ها در محیط DMEM با ۱۰٪ سرم جنین گاوی، ۱۰۰ واحد / میلی لیتر پنی سیلین و ۱۰۰ میکروگرم / میلی لیتر استرپتومایسین کشت داده شدند. سپس سلول ها داخل پلیت ۹۶ خانه کشت داده و با غلظت های مختلف عصاره به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت انکوبه گردید. برای استفاده از تست MTT[1]، سلول ها در پلیت ۹۶ خانه به تعداد ۵۰۰۰ سلول در هر چاهک کشت داده شدند. برای هر غلظت و زمان، یک نمونه شاهد که درمان نشده باقی می ماند و حجم مساوی ای از محیط کشت در آن بود وجود داشت. برای ارزیابی آپوپتوز، سلول های در پلیت ۲۴ خانه به تعداد ۱۰۰۰۰۰ سلول در هر چاهک کشت داده شدند (۲۱). تمام تست ها سه بار تکرار شدند.

- تهیه عصاره

بخش های هوایی کلم قرمز، خشک و سپس پودر شدند و در معرض استخراج با اتانول ۷۰٪ در دستگاه سوکسله به مدت ۴۸ ساعت قرار گرفتند. عصاره آبی الکلی حاصل بر روی بن ماری خشک و سپس در دی متیل سولفوکساید حل شد.

- تعیین میزان بقای سلولی (viability) با استفاده از آزمون MTT:

اساس این روش، شکستن نمک تترازولیوم توسط آنزیم سوکسینات دهیدروژناز میتوکندریایی سلول های زنده است. نتیجه این فعالیت ایجاد بلورهای فورمازان ارغوانی رنگ می باشد که توسط دی متیل سولفوکساید به صورت محلول در می آیند. هرچه سلول ها فعال تر و تعدادشان بیشتر باشد، میزان رنگ ایجاد شده بیشتر است. پس از دو پاساژ سلولی جهت سنجش MTT سلول های McF-7 به میزان ۵۰۰۰ سلول در هر خانه در پلیت ۹۶ خانه ای به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت کشت داده شدند. پس از مجاورت سلول ها با غلظت های مختلف از عصاره کلم قرمز (۱۰-۲۰۰۰ میکروگرم / میلی لیتر) میزان بقای سلولی با استفاده از رنگ دی متیل تیازول و دی فتیل تترازولیوم ارزیابی شد؛ به این ترتیب که ۱۰ میکرولیتر محلول MTT حل شده در محیط کشت به غلظت ۵ میلی گرم در میلی لیتر به هر کدام از چاهک های ۹۶ تایی اضافه و سلول ها برای دو ساعت در انکوباتور در حرارت ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه شدند. پس از اینکه محیط سلول ها دور ریخته شد، به رسوب (سلول ها و بلورهای حاصله از محلول) ۱۰۰ میکرولیتر DMSO اضافه و جذب نوری آنها در ۵۷۰ نانومتر (در برابر ۶۲۰ نانومتر) در دستگاه الایزا ریدر بررسی شد (۲۲، ۲۳).

- رنگ آمیزی PI

از خاصیت نفوذپذیر شدن غشای سلول های مرده می توان برای تعیین سلول های مرده و زنده استفاده کرد. در رنگ آمیزی با محلول فلورسنت PI، از این خاصیت استفاده می شود و هسته سلول های مرده رنگ آمیزی می شود. برای انجام این تست از یک پلیت ۲۴ خانه استفاده می شود. ۵۰۰ میکرولیتر از محیط کشت همراه سلول (۱۰۰۰۰۰ سلول) به هر کدام از چاهک ها انتقال داده شد. به مدت ۲۴ ساعت پلیت مربوطه در انکوباتور قرار داده شد تا سلول ها به طور کامل در کف

[1] 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium

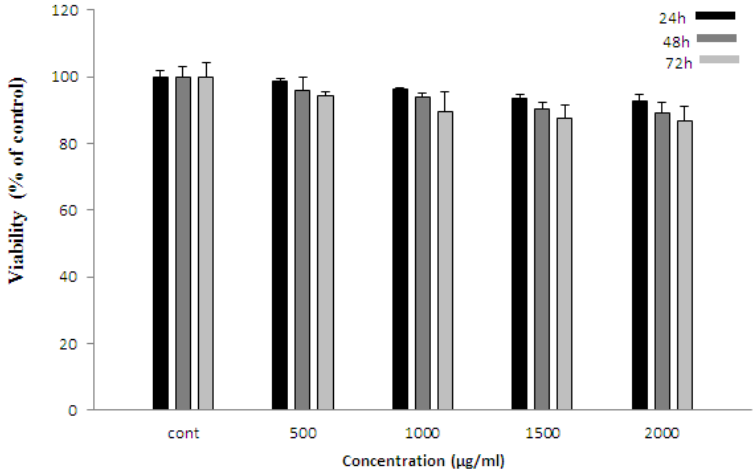
پلیت بچسبند. بعد از ۴۸ ساعت تیمار با غلظت های مختلف از عصاره کلم قرمز (۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۱۵۰۰ و ۲۰۰۰ میکروگرم / میلی لیتر)، محیط رویی جدا شد و سانتریفیوژ گردید. در مرحله بعدی رنگ PI به مقدار ۷۵۰ میکرولیتر به هر چاهک اضافه شد و به مدت نیم ساعت داخل انکوباتور قرار گرفت. بعد از نیم ساعت محیط هر چاهک به رسوب قبلی حاصل از سانتریفیوژ اضافه و برای یک شب در یخچال قرار گرفت و در روز بعد توسط فلوسایتومتری خوانده شد (۲۴، ۲۵).

برای تجزیه و تحلیل داده ها از آزمون آنالیز واریانس ANOVA استفاده شد و تعیین اختلاف بین گروه ها با آزمون Benferoni بررسی شد. نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار ارائه شد. نتایج به دست آمده در ارزیابی آپوپتوز توسط فلوسایتومتری به وسیله نرم افزار WinMDI (نسخه ۲/۷) مورد بررسی قرار گرفت. میزان p کمتر از ۰/۰۵ معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته ها

- اثر عصاره کلم قرمز در زنده ماندن سلول های سالم فیبروبلاست (HFF)

سلول های HFF با عصاره کلم قرمز (۲۰۰۰-۱۰ میکروگرم بر میلی لیتر) به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت انکوبه شدند. زنده ماندن سلول ها با استفاده از روش MTT ارزیابی شد. نتایج نشان داد که عصاره کلم قرمز در هیچ کدام از زمان ها سمیت نداشت (نمودار ۱).



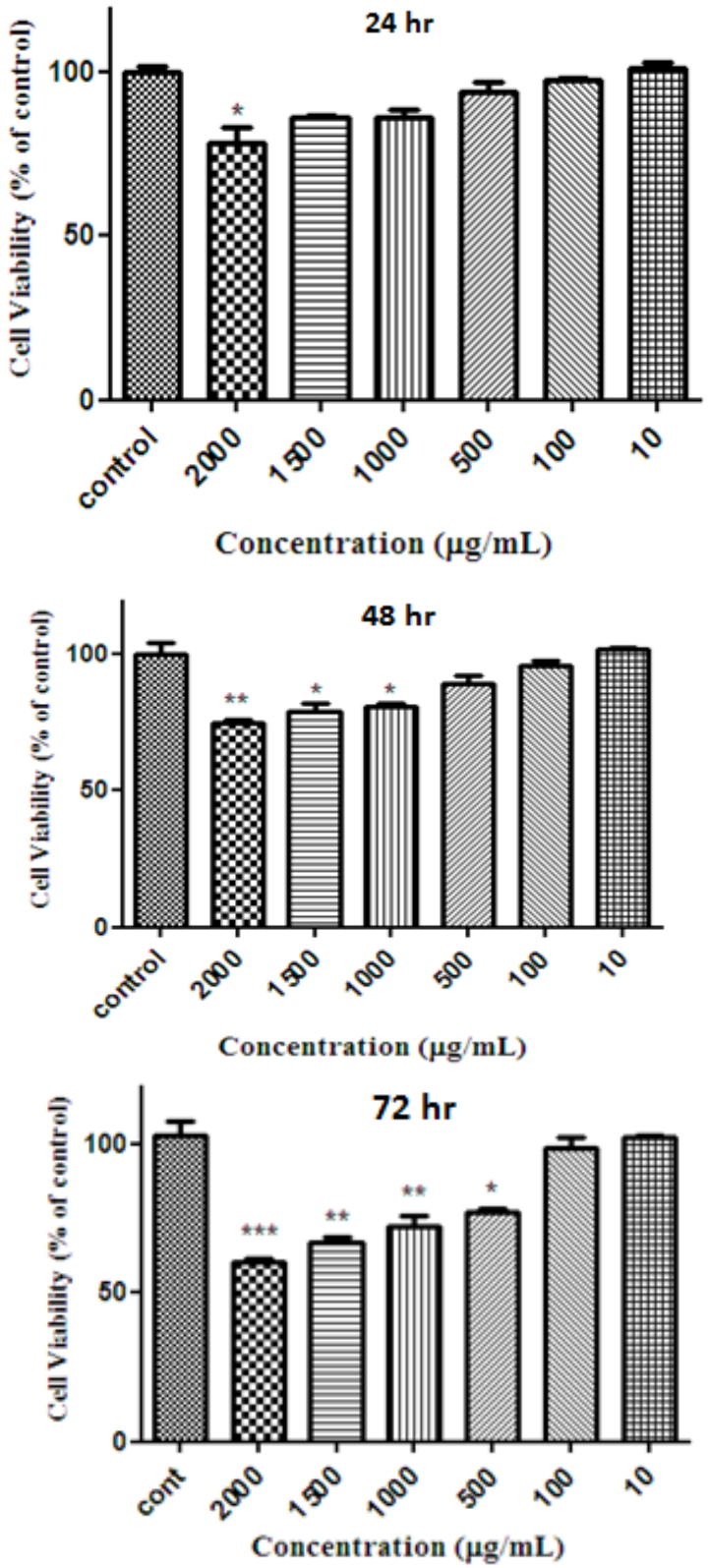
نمودار ۱- اثر عصاره هیدروالکلی کلم قرمز بر روی میزان بقاء سلولی در سلول های سالم فیبروبلاست (HFF).

میزان بقاء سلولی با استفاده از تست MTT مورد بررسی قرار گرفت. سلول های HFF برای مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در معرض عصاره هیدروالکلی کلم قرمز قرار گرفتند. نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار بیان شدند (n=۹). آزمایش به صورت سه بار تکرار انجام شد.

- اثر عصاره کلم قرمز در زنده ماندن سلول های سرطانی MCF-7

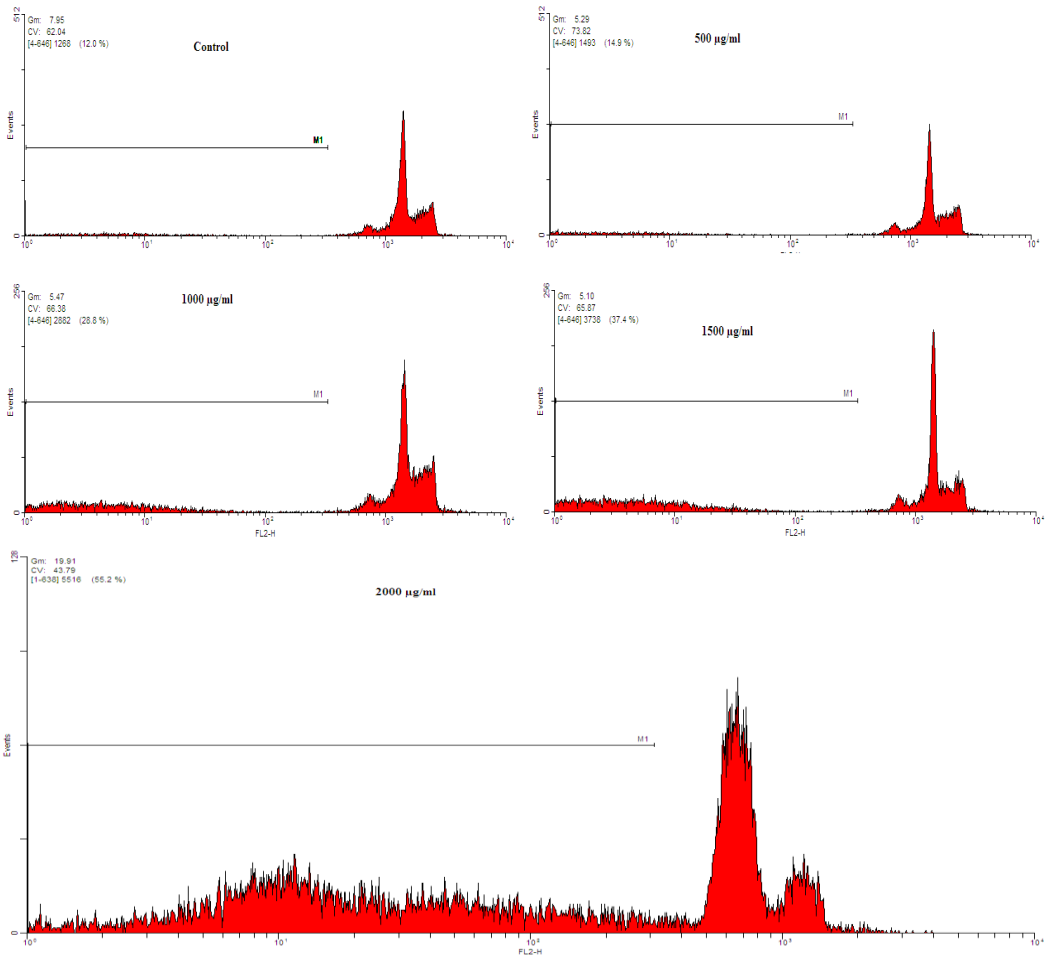
سلول های MCF-7 با عصاره کلم قرمز (۲۰۰۰-۱۰ میکروگرم بر میلی لیتر) به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت انکوبه شدند. زنده ماندن سلول ها با استفاده از روش MTT ارزیابی شد. نتایج نشان داد که عصاره کلم قرمز به صورت وابسته به زمان، زنده ماندن سلول ها را کاهش می دهد. پس از ۲۴ ساعت عصاره کلم در غلظت ۲۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر زنده ماندن سلول ها را تا اندازه ۵/۲± ۷۹٪ کاهش داد (p<۰/۰۵). پس از گذشت ۴۸ ساعت دوزهای ۲۰۰۰، ۱۵۰۰ و ۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر به ترتیب تعداد سلولها را تا مقادیر (۱/۲±۷۴، p<۰/۰۱)، (۳±۷۸، p<۰/۰۵) و (۱/۴±۸۰، p<۰/۰۵) کاهش دادند، در حالی که پس از ۷۲ ساعت، زنده ماندن سلول ها کاهش قابل توجهی در دوزهای ۲۰۰۰ (۱/۴±۶۰، p<۰/۰۰۱)، ۱۵۰۰ (۱/۶±۶۷، p<۰/۰۱)، ۱۰۰۰ (۴±۷۲، p<۰/۰۱) و ۵۰۰ (۱/۲±۷۷، p<۰/۰۵) داشت (نمودار ۲). با توجه به میزان درصد مرگ سلول ها مقدار IC50 به وسیله نرم افزار پریسم ۲۶۸۵ میکروگرم بر میلی لیتر محاسبه شد.

[1] Human Foreskin Fibroblast



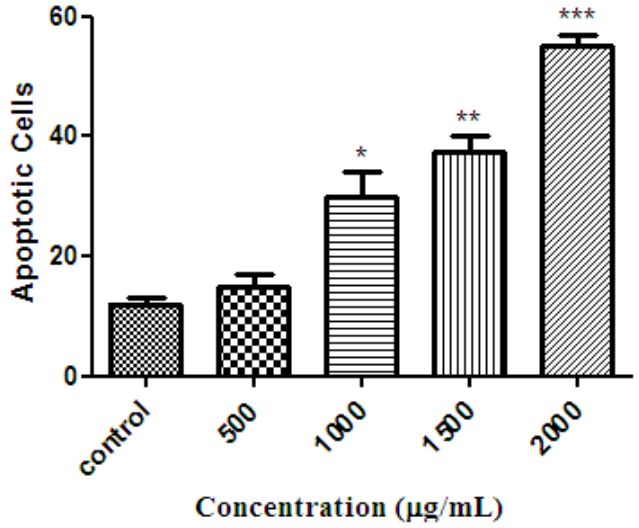
نمودار ۲- اثر عصاره هیدروالکلی کلم قرمز بر روی میزان بقاء سلولی در سلول های سرطانی MCF7 بعد از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت انکوباسیون. آزمایش به صورت سه بار تکرار انجام شد (*p<۰/۰۵، **p<۰/۰۱، ***p<۰/۰۰۱)

• اثر عصاره هیدروالکلی کلم قرمز در القاء آپوپتوزیز آپوپتوز در سلول های MCF-7 با استفاده از رنگ آمیزی PI مورد بررسی قرار گرفت. سلول ها برای مدت ۴۸ ساعت در معرض غلظت های مختلف عصاره کلم قرمز (۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۱۵۰۰ و ۲۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) قرار گرفتند. بررسی پیک های ایجاد شده قبل از فاز G1 که شاخصه آپوپتوزیز می باشد، نشان دهنده القاء آپوپتوز توسط این عصاره بود (نمودار ۳). بر اساس نمودار ۳ عصاره هیدروالکلی کلم قرمز در غلظت های ۱۰۰۰ (۴±۳۰٪، $p<۰/۰۵$)، ۱۵۰۰ (۲/۵±۳۷/۵٪، $p<۰/۰۱$)، و ۲۰۰۰ (۲±۵۵٪، $p<۰/۰۰۱$) باعث القاء آپوپتوزیز در سلول های MCF7 شد.



نمودار۳- ارزیابی فلوسایتومتریک DNA های قطعه قطعه شده در جریان آپوپتوزیز با استفاده از رنگ آمیزی PI

ارزیابی فلوسایتومتریک DNA های قطعه قطعه شده در جریان آپوپتوزیز با استفاده از رنگ آمیزی PI انجام گرفت. نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار بیان شدند. آزمایش به صورت سه بار تکرار انجام شد (*$p<۰/۰۵$، **$p<۰/۰۱$، ***$p<۰/۰۰۱$).



نمودار ۳- اثر عصاره هیدروالکلی کلم قرمز بر میزان سلولهای آپوپتوتیک

بحث

بر اساس آمار جهانی، سالانه حدود ۷ میلیون نفر در اثر ابتلاء به سرطان جان خود را از دست می دهند. سرطان های پستان، کبد و سرویکس، از سرطان های شایع در سطح جهان و ایران می باشند (۲۶). در ایران سرطان پستان و سرویکس بالاترین شیوع را در میان زنان دارا می باشند (۲۷). عوارض جانبی و مقاومت سلول های سرطانی به داروهای متداول شیمی درمانی از مشکلات رایج در درمان تومورها می باشد. این نکته نیاز به شناسایی ترکیبات ضد سرطان جدید را یادآور می شود. امروزه مطالعات فراوانی انجام می گیرد تا به تدریج داروهای گیاهی را جایگزین داروهای شیمی درمانی نمایند تا از عوارض جانبی ناشی از داروهای سنتزی کاسته شود. ترکیبات گیاهی از طریق تداخل در چرخه سلولی، تحریک آپاپتوز و یا از طریق به دام انداختن رادیکال های آزاد در درمان سرطان نقش دارند (۲۸). گونه براسیکا یا همان کلم که شامل گونه های مختلف کلم برگ، براکلی، گل کلم و کلم می باشد، در تمام دنیا به صورت وسیعی پراکنده هستند. گزارشات منتشر شده نشان می دهند که مصرف این گیاهان در کاهش خطر ابتلاء به بیماری های حاد مانند بیماری قلبی عروقی و سرطان مؤثر می باشند. اثربخشی این گیاهان مربوط به مواد فنولیک موجود در آن می باشد. پلی فنول ها خواص مختلف بیولوژیکی از جمله پایین آوردن قند خون، کاهش چربی خون، اثرات ضد سرطانی و اثرات ضد التهابی دارند. مطالعات نشان داده اند که خانواده کلم از طریق افزایش آپپتوز، توقف چرخه سلولی و مهار آنژیوژنز اثرات ضد سرطانی دارند (۲۹). مصرف کلم باعث کاهش متابولیت استروژن (۱۶-آلفا هیدروکسی استروژن) که در ایجاد بیماری سرطان پستان نقش دارد می شود. خانواده کلم دارای ترکیباتی مانند Indol-3-carbinol (I3C) و Solforaphan می باشند. مطالعات نشان داده اند که هر دو ترکیب، اثرات ضد سرطانی داروی پاکلیتاکسل را افزایش می دهند. در مطالعه جاکوب و همکاران (۲۰۱۱) در کشور چین مشاهده شد زنانی که به مقدار بیشتر از سبزیجات خانواده کلم استفاده می کنند، میزان خطر ابتلاء به سرطان پستان در آنها کمتر است (۲۹). مطالعات نشان داده اند که ترکیبات جدا شده از خانواده کلم از طریق مکانیسم های مختلف می توانند در درمان سرطان نقش داشته باشند. ایزوتیوسیانات موجود در این خانواده از طریق مهار هیستون د-استیلاز ترانسفرازها و DNA-متیل ترانسفرازها در سلول های سرطانی کشت داده شده اثرات ضد سرطانی را اعمال می کند (۳۰). همچنین گلوکوزینولات های موجود در این خانواده و محصولات ناشی از هیدرولیزشان شامل ایندول و مشتقات ایزوتیوسیانات ها به عنوان ترکیبات ضد سرطانی مورد توجه بوده و اثر چندین ترکیب سرطان زا را کاهش می دهند (۳۱-۳۳). نتایج محققین در سال ۲۰۰۵ نشان داد که گل

کلم[4] میزان آپپتوز را در سلول های سرطانی پستان (MDA-MB 231 و MCF-7) افزایش می دهد (۱۷). با توجه به اینکه خانواده کلم می توانند در پیشگیری و درمان سرطان نقش داشته باشند، در این مطالعه غلظت های مختلف عصاره کلم قرمز جهت بررسی اثرات سایتوتوکسیک آن بر سلول های سرطانی مورد ارزیابی قرار گرفت. در مطالعه حاضر عصاره کلم قرمز به صورت وابسته به دوز و وابسته به زمان میزان مرگ سلولی را افزایش داد. همچنین عصاره در غلظت های ۱۰۰۰، ۱۵۰۰ و ۲۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر به صورت وابسته به دوز باعث تحریک آپپتوز در سلول های سرطانی پستان شد. کلم قرمز منبع بسیار خوبی از فیبر است. فیبرهای حل نشدنی از یبوست و سرطان کولورکتال جلوگیری می کنند. فیبرهای محلول باعث کاهش قند و کلسترول خون شده که این خود عملی در جهت کاهش خطر ابتلاء به بیماری های قلبی و دیابت است. این گیاه خواص ضد سرطان، ضد افزایش قند خون و ضد افزایش کلسترول خون دارد. پودر این گیاه یا عصاره آن همراه با سیستئین در ترمیم سلول های کبد که به دنبال مصرف استامینوفن دچار سمیت شده اند، مؤثر می باشد (۳۴). همچنین مطالعات قبلی نشان داده اند که جزء سولفورافان موجود در کلم قرمز با خواص مشخص ضد سرطانی، یکی از ترکیبات مهم آن است. این جزء جدا شده از کلم قرمز توانسته است با تأثیر بر روی فعالیت تکثیر و اثر بر روی آپوپتوز سلول های سرطان حنجره در انسان اثرات ضد سرطانی خود را اعمال کند (۱۸). همپنین مطالعات نشان داده اند که عصاره کلم قرمز به صورت وابسته به دوز میزان آپاپتوز در سلول های سرطانی پستان از نوع MDA-MB-231 را افزایش می دهد (۱۹). کلم قرمز حاوی ۳۶ نوع مختلف از آنتوسیانین است. آنتوسیانین ها یک گروه از فلاوونویئدها هستند که در درمان سرطان مفید می باشند. از میان آنتوسیانین های موجود در کلم قرمز، دو نوع سیانیدین-۳- (فرولوئیل) (سیناپوئیل) دی گلوکوزید-۵-گلوکوزید[5] و سیانیدین-۳- (سیناپوئیل) (سیناپوئیل) دی گلوکوزید-۵-گلوکوزید[6] مقدارشان نسبت به سایرین بیشتر است. مطالعات نشان داده اند که آنتوسیانین ها علاوه بر اینکه در درمان سرطان مفید می باشند، در بهبود عملکرد مغز و قلب نیز نقش دارند (۲۷). تحقیقات اپیدمیولوژیک نشان داده است که مصرف مواد آنتوسیانینی باعث کاهش خطر بیماری های قلبی عروقی، دیابت، آرتریت و سرطان به دلیل خواص آنتی اکسیدانی و ضد التهابی آنها می شود. آنتوسیانین ها به صورت گسترده ای در میوه جات رنگی و سبزیجات از جمله انگور قرمز، سیب زمینی و کلم قرمز یافت می شوند. ساختمان فنلی آنتوسیانین مسئول خاصیت آنتی اکسیدانی آن است؛ به این معنی که می تواند گونه های اکسیژن فعال را از سلول ها جمع کرده و مانع آسیب به دیواره آن ها شود. اثرات آنتی اکسیدانی آنتوسیانین توسط مطالعات آزمایشگاهی با استفاده از چندین لاین سلولی مختلف از جمله سلول های کولون، اندوتلیال، کبد، پستان و سلول های سرطانی خون و کراتینوسیت ها بررسی شده است. در این بررسی ها آنتوسیانین چندین خاصیت از جمله آنتی توکسینی و اثر آنتی کارسینوژنیک از خود نشان داد. از مکانیسم های آن می توان به جمع آوری مستقیم اکسیژن فعال، افزایش ظرفیت جذب اکسیژن رادیکالی توسط سلول، تحریک بیان آنزیم های سم زدایی فاز ۲، کاهش فرم اکسیداتیو در DNA، کاهش پراکسیداسیون چربی، جلوگیری از موتاسیون به وسیله سموم محیطی و مواد کارسینوژنز و کاهش پرولیفراسیون سلولی به وسیله تعدیل مسیر سیگنالینگ اشاره کرد. اگرچه اغلب اثرات محافظتی آنتوسیانین ها به توانایی آن ها در جمع آوری اکسیژن فعال خلاصه می شود، اما آن ها توانایی باند شدن با فلزات و باند شدن با پروتئین ها را نیز دارند. میزان زیادی از خاصیت جمع کردن رادیکال های فعال اکسیژن توسط آنتوسیانین ها به وجود گروه های هیدروکسی بر می گردد (۳۵). در تحقیقات برون تنی مشاهده شد که آنتوسیانین از سرطان های مجاری

[4] cauliflower
[5] cyanidin 3-(feruloyl) (sinapoyl) diglucoside-5-glucoside
[6] cyanidin 3-(sinapoyl) (sinapoyl) diglucoside-5-glucoside

دستگاه گوارش و پوست جلوگیری می کند (۳۶). آنتوسیانین موجود در *Musa acuminata* bract در غلظت های مختلف خاصیت ضد پرولیفراسیون سلولی در سلول های MCF-7 دارد (۳۷). بنابراین در این مطالعه نیز احتمالا مکانیسم ضد سرطانی کلم قرمز مربوط به آنتوسیانین موجود در آن باشد. البته تست های بیشتری برای تعیین مکانیسم دقیق آن لازم است.

نتیجه گیری

عصاره کلم قرمز میزان مرگ و میر سلول های سرطانی را از طریق تحریک آپاپتوز افزایش می دهد، بنابراین گنجاندن آن در برنامه رژیم غذایی می تواند اثرات مفیدی در کاهش ابتلاء به سرطان داشته باشد. البته جهت تعیین مکانیسم دقیق اثر ضد سرطانی آن نیاز به مطالعات بیشتری می باشد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از مرکز تحقیقات فارماکولوژیک گیاهان دارویی دانشکده پزشکی مشهد، جهت تأمین هزینه های مالی این پژوهش تشکر و قدردانی می شود.

منابع

1. Dalkic E, Wang X, Wright N, Chan C. 2010. Cancer-dDrug aAssociations: aA cComplex sSystem. PLloSs Oone 2010;, 52010(4).: e10031.
2. Lacey JV Jr, Devesa SS, Brinton LA. Recent trends in breast cancer incidence and mortality. Environ Mol Mutagen 2002; 39(2-3): 82–88 .
3. Liu FS. Mechanisms of chemotherapeutic drug resistance in cancer therapy-- a quick review. Taiwanese Journal of Obstettrics and Gynecology 2009; 48(3): 239–244.
4. Zhou H, Zou P, Chen ZC, You Y. A novel vicious cycle cascade in tumor chemotherapy. Medical Hypotheses 2007; 69(6): 1230–1233.
5. Nicolson GL. Lipid replacement/antioxidant therapy as an adjunct supplement to reduce the adverse effects of cancer therapy and restore mitochondrial function. Pathology and Oncology Research 2005; 11(3): 139–144 .
6. Sak K. Chemotherapy and dietary phytochemical agents. Chemother Res Pract 2012;2012:282570.Chemotherapy Research and Practice 2012; 2012(2012): 11 pages.
7. Chu YF, Sun J, Wu X, Liu RH. Antioxidant and antiproliferative activities of common vegetables. Journal of Agricultural and Food Chemistry 2002; 50(2523): 7449-546910-6.
8. Wang H, Cao G, Prior RL. Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins. Journal of Agricultural and Food Chemistry 1997; 45: 304–309.
9. Fowke JH, Chung FL, Jin F, Qi D, Cai Q, Conaway C, et al. Urinary isothiocyanate level, Brassica, and human breast cancer. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2003; 12(12): 1536-9Cancer Res2003; 63(14):3980-6.
10. Repetto MG, Llesuy SF. Antioxidant properties of natural compounds used in popular medicine for gastric ulcers. Braz J Med Biol Res 2002; 35(5): 523–34.
11. Sterling M. Got anthocyanins. These plant pigments are more than coloring agents for fruit juices, wine and other beverages; they also contain an array of health-promoting benefits. NSN 2000;5(6): 231–4.
12. Grover Jk, Yadav SP, Vats V. Effect of feeding Murraya koeingii and Brassica juncea diet on [correction] kidney functions and glucose levels in streptozotocin diabetic mice. J Ethnopharmacol 2003; 85(1): 1-5.
13. Yokozawa T, Kim HY, Cho EJ, Yamabe N, Choi JS. Protective effects of mustard leaf (Brassica juncea) against diabetic oxidative stress. J Nutr Sci Vitaminol(Tokyo) 2003; 49(2) : 87–93.
14. Komatsu W, Miura Y, Yagasaki K. Suppression of hypercho-lesterolemia in hepatoma-bearing rats by cabbage extract and its component, S-methyl-L-cysteine sulfoxide. Lipids 1998; 33(5): 499-503.
15. Igarashi K, Kimura Y, Takenaka A. Preventive effects of dietary cabbage acylated anthocyanins on paraquat-induced oxidative stress in rats. Biosci Biotechnol Biochem 2000; 64(8): 1600-7.
16. Lee KJ, Sok DE, Kim YB, Kim MR. Protective effect of vegetable extracts on oxidative stress in brain of mice administered with NMDA. Food Res Inter 2002; 35(1): 55–63.
17. Brandi G, Schiavano GF, Zaffaroni N, De Marco C, Paiardini M, Cervasi B, et al., Mechanisms of action and antiproliferative properties of Brassica oleracea juice in human breast cancer cell lines. J Nutr 2005; 135(6):1503-9.
18. Devi JR, Thangam EB. Mechanisms of anticancer activity of sulforaphane from brassica oleracea in HEp-2 Human Epithelial Carcinoma Cell Line. Asian Pacific J Cancer Prev 2012; 13(5):, 2095-100.
19. Nam MK, Kang KJ. The Effect of Red Cabbage (Brassica oleracea L. var. capitata f.rubra) Extract on the Apoptosis in Human Breast Cancer MDA-

MB-231 Cells. J Korean Soc Food Sci Nutr 2013; 42(1): 8-16.
20. Hafidh RR, Abdulamir AS, Abu Bakar F, Jalilian FA, Jahanshiri F, Abas F, Jalilian FA, Jahanshiri F, Abas F, et al. Novel anticancer activity and anticancer mechanisms of Brassica oleracea L. var. capitata f. rubra. European Journal of Integrative Medicine 2013; 5(5): 450–464.
21. Mahdian D, Shafiee-Nick R, Mousavi SH. Different effects of adenylyl cyclase activators and PDE inhibitors on cervical cancer (Hela) and breast cancer (MCF-7) cells proliferation. Toxicol Mech Methods 2014; 24(4):307-14.
22. Mortazavian SM, Ghorbani A, Hesari TG. Effect of hydro-alcoholic extracts of viola tricolor and its fractions on proliferation of cervix carcinoma cells. Iranian Journal of Obstetrics Gynecology Infertility 2012; 15 (22): 9-16 .
23. Rakhshandeh H, Sadeghnia H, Ghorbani A. Sleep-prolonging effect of Coriandrum sativum hydro-alcoholic extract in mice. Nat Prod Rse 2012; 26(22): 2095-8.
24. Mousavi SH, Tavakkol-Afshari J, Brook A, Jafari-Anarkooli I. 2009. Direct toxicity of Rose Bengal in MCF-7 cell line: Role of apoptosis. Food and Chemical Toxicology, 2009; 47(4):. 855–859.
25. Parsaee H, Asili J, Mousavi SH, Soofi H, Emami S Ahmad, Tayarani-Najaran Z. Apoptosis induction of Salvia chorassanica root extract on human cervical cancer cell line. Iranian Journal of Pharmaceutical Research 2013; 12(1): 75-83.
26. Kamangar F, Dores GM, Anderson F. Patterns of Cancer Incidence, Mortality, and Prevalence Across Five Continents. Defining Priorities to Reduce Cancer Disparities in Different Geographic Regions of the World. Am J Clin Oncol.2006 10; 24(14) : 2137-2150(2.(
27. Farjadian S , Asadi E , Dorodchi M , Samsami Dehaghani AS, Tabei SZ , Kumar VP, et al and Ghaderi A. High risk HPV types in southern Iranian patients with cervical cancer. Pathol Oncol Res 2003 ; 9(2) :121-125.
28. Hanahan D, Weinberg R.A. The hallmarks of cancer. Cell 2000; 100(1):57-70.
29. Jacob J, Mahal HS, Mukherjee T , Kapoor S. Free radical reactions with the extract of brassica family. Food Chem 2011; 129(3): 1132-1138.
30. Wagner A.E, Terschluesen A.M, and Rimbach.G. Health promoting effects of Brassica-derived phytochemicals from chemopreventive and anti-inflammatory activities to epigenetic regulation. Oxid Med Cell LongevOxidative Medicine and Cellular Longevity 2013; 2013:964539.-12.
31. Talalay P, Fahey JW. Phytochemicals from cruciferous plant protect against Cancer by modulating Carcinogen metabolism. J Nutr 2001;131 (11 Suppl):3027S-33S.:3027-33.
32. Cawthon RM. Telomere measurement by quantitative PCR. Nucleic Acids Res 2002; 30(10):e47.
33. Riby JE, Xue L, Cahtterji U, Bjeldanes EL, Firestone GL, Bjeldanes LF. Activation and potentiation of interferon-gamma signaling by 3,3'-diindolylmethane in MCF-7 breast cancer cells. Mol Pharmacol 2006; 69(2): 430-9.
34. McNaughton SA, Marks GC. Development of a food composition database for the estimation of dietary intakes of glucosinolates, the biologically active constituents of cruciferous vegetables. Bri J Nutr 2003; 90(3):687-97.
35. El-Motaleb el-Mowafy MA.Treatment Effect of Red Cabbage and Cysteine Against Paracetamol Induced Hepatotoxicity In Experimental Rats. Journal of Applied Sciences Research 2012; 8(12): 5852-5859.
36. Spormann TM, Albert FW, Rath T, Dietrich H, Will F, Stockis JP, et al. Anthocyanin/polyphenolic-rich fruit juice reduces oxidative cell damage in an intervention study with patients on hemodialysis. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2008; 17(12): 3372-80 .
37. Wang, L.S,. and G.D. Stoner GD., Anthocyanins and their role in cancer prevention. Cancer Lett 2008; 269(2): 281-90.
38. Jenshi Roobha J, Saravanakumar S.M., Aravindhan K.M,. and Suganya devi P. In vitro evaluation of anticancer property of anthocyanin extract from Musa acuminate bract. Research in Pharmacy 2011, 1(4): 17-21.