بررسی اثرات سایتوتوکسیک فراکسیون بوتانولی گیاه *Allium affine* Ledeb بر روی رده‌های سلولی سرطان پستان و تخمدان

ملیحه کاظمی[۱]، بهزاد ذوالفقاری[۲]، محمد کیوانلو شهرستانکی[۳]، مسعود صادقی دینانی[۴]*

۱- دکترای داروسازی، دانشکده‌ی داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۲- استاد، گروه فارماکوگنوزی، دانشکده‌ی داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۳- دانشجوی دکتری، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده‌ی داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۴- استادیار، گروه فارماکوگنوزی، دانشکده‌ی داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
* آدرس مکاتبه: گروه فارماکوگنوزی، دانشکده‌ی داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
تلفن: ۳۷۹۲۷۱۲۹ (۰۳۱)، نمابر: ۳۶۶۸۰۰۱ (۰۳۱)
پست الکترونیک: m_sadeghi@pharm.mui.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۵/۱۲/۲۵ **تاریخ تصویب:** ۹۶/۳/۲۸

چکیده

مقدمه: از میان ترکیبات موجود در گیاهان جنس ***Allium***، استرویید ساپونین‌های استخراج شده از این گیاهان بر روی بسیاری از رده‌های سلولی سرطانی دارای اثرات سایتوتوکسیک می‌باشند. این تحقیق به بررسی اثرات سایتوتوکسیک فراکسیون بوتانولی غنی از استرویید ساپونین‌های گیاه ***Allium affine*** به عنوان یکی از گونه‌های مهم آلیوم در کشورمان پرداخته است.

روش بررسی: فراکسیون بوتانولی پیازهای گیاه به کمک روش عصاره‌گیری ۴ مرحله‌ای و به کمک حلال‌های با قطبیت متفاوت استخراج و به کمک دستگاه فریز درایر خشک شد. به منظور بررسی اثر فراکسیون بوتانولی گیاه بر روی رشد و تکثیر رده‌های سلولی **MCF-7**، **MDA-MB231** (سرطان پستان) و **OVCAR-3** (سرطان تخمدان) از تست **MTT** استفاده گردید. غلظت‌های مختلف از فراکسیون بوتانولی گیاه (۲۰۰-۰/۱ میکروگرم/ میلی‌لیتر) به سلول‌ها اضافه شد و ۴۸ ساعت بعد از سپری شدن زمان تیمار، شدت جذب محلول چاهک‌ها در طول موج ۵۷۰ نانومتر اندازه‌گیری و در صد سلول‌های زنده نسبت به گروه کنترل محاسبه شد.

نتایج: نتایج حاصل از آزمون **MTT** بعد از تیمار ۴۸ ساعته در تمامی رده‌های سلولی کاهش وابسته به غلظت فعالیت سوکسینات دهیدروژناز و مهار رشد سلول‌ها را نسبت به نمونه کنترل نشان داد ($P<0/01$). بهترین اثرات سایتوتوکسیک فراکسیون مورد بررسی در مورد رده سلولی سرطان تخمدان **OVCAR-3** (**IC50** برابر با ۰/۹۴± ۷/۱۳ میکروگرم/ میلی‌لیتر) مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: فراکسیون بوتانولی گیاه ***A. affine*** دارای اثرات سایتوتوکسیک بر روی سلول‌های سرطانی مورد بررسی بویژه رده سلولی سرطان تخمدان است. با توجه به اثرات مطلوب مشاهده شده به نظر می‌رسد که این فراکسیون حاوی استرویید ساپونین‌های با اثرات سایتوتوکسیک قابل توجه باشد.

گل‌واژگان: ***Allium affine***، استرویید ساپونین، تره قفقازی، سایتوتوکسیسیتی، سرطان پستان، سرطان تخمدان

مقدمه

پوشش گیاهی ایران به علت تنوع زیستی از زمان‌های گذشته همواره مورد توجه گیاه شناسان بوده است به طوریکه تنوع آب و هوا و اختلاف ارتفاع، رویش گونه‌های متنوع و ارزشمندی از گیاهان دارویی، صنعتی و خوراکی را فراهم کرده است [۱]. از جمله گیاهان ارزشمند ایران که از نظر دارویی و خوراکی دارای اهمیت بسیاری هستند می‌توان به گیاهان جنس آلیوم اشاره کرد. جنس آلیوم از خانواده Alliaceae می‌باشد و دارای حدود ۷۵۰ گونه گیاهی است که در طول تاریخ به صورت گسترده استفاده می‌شده‌اند [۲]. منشأ آلیوم‌ها آسیای مرکزی است، منطقه‌ی وسیعی از هند تا فلسطین که حدود ۳۰۰۰ سال قبل از میلاد مسیح از این گیاهان در این مناطق استفاده می‌شد و این گیاهان بخصوص سیر و پیاز از این مناطق به سایر نقاط دنیا معرفی و فرستاده شده‌اند. اهمیت این گیاهان تنها به خاطر خاصیت طعم‌دهندگی آنها نیست بلکه از زمان‌های دور به عنوان غذا و دارو نیز مورد استفاده قرار می‌گرفته‌اند [۴، ۳].

یکی از مهم‌ترین اثرات فارماکولوژیک آلیوم‌ها اثرات سایتوتوکسیک و ضدسرطان آنهاست. این بیماری دومین علت مرگ بعد از بیماری‌های قلبی و عروقی به شمار رفته و به عنوان اولین علت مرگ در افراد زیر ۸۵ سال مطرح است. امروزه ارتباط بین رژیم غذایی و پیشگیری و درمان سرطان کاملاً اثبات شده است. همچنین مطالعات اخیر نشان داده‌اند که استفاده از داروهای گیاهی از پیشرفت بسیاری از انواع سرطان‌ها جلوگیری نموده و در مقایسه با شیمی درمانی و رادیوتراپی باعث بروز عوارض جانبی کمتر و طول عمر بیشتر برای بیماران می‌شوند [۷-۵].

بر اساس نتایج حاصل از مطالعات گوناگون، گونه‌های مختلف جنس *Allium* یکی از منابع غنی ترکیبات دارویی گیاهی بویژه استروئیدهای ساپونینی، فلاونوییدها و ترکیبات سولفوره می‌باشند [۸] که تمامی این ترکیبات از جمله متابولیت‌های ثانویه با ارزش گیاهی به شمار آمده و اثرات فارماکولوژیک و فیزیولوژیک گوناگون آنها از جمله اثرات کاهنده‌ی فشار خون، کاهنده‌ی کلسترول، کاهنده‌ی قند خون، ضدباکتری و قارچ، ضدویروس، ضداسپاسم و ضدسرطان، طی مطالعات متعدد علمی به اثبات رسیده است [۹، ۳]. از میان ترکیبات یاد شده، بسیاری از ساپونین‌های استخراج شده از گیاهان جنس آلیوم بر روی رده‌های سلولی سرطانی دارای اثرات سایتوتوکسیک بوده‌اند [۱۱، ۱۰]. القا آپوپتوز توسط ساپونین‌های استخراج شده از منابع مختلف [۱۵-۱۲]، عملکرد ضدتومور ساپونین‌ها به دلیل مهار تکثیر سلول‌های سرطانی [۱۷، ۱۶] و همچنین اثرات ضدسرطان با مهار مهاجرت سلولی (migration) [۱۹، ۱۸] از جمله مهم‌ترین مکانیسم‌های پیشنهاد شده در مورد اثرات ضدسرطانی این ترکیبات می‌باشد.

گیاه *Allium affine* Ledeb (تره قفقازی، پیاز قفقازی) یکی از گونه‌های خوراکی جنس *Allium* و از گیاهان مهم کشورمان به شمار می‌آید. این گیاه بادوام، چندساله و بوته‌ای است و عمدتاً در ایران، قفقاز، شمال کشور عراق، لبنان، سوریه و ترکیه و بیشتر در دامنه کوهستان‌های گرم و خشک می‌روید. *A. affine* با نام محلی تره کوهی به عنوان یک سبزی خوراکی و ماده غذایی سرشار از ویتامین، به شکل تازه و یا به صورت چاشنی غذایی، در بسیاری از نقاط کشورمان بویژه در مناطق غربی و مرکزی از جمله استان‌های چهارمحال و بختیاری و اصفهان به شکل قابل توجهی مورد استفاده قرار می‌گیرد [۲۰]. علیرغم اهمیت این گیاه به عنوان یک سبزی خوراکی و یکی از گونه‌های مهم خانواده آلیوم‌ها، تاکنون هیچ مطالعه جامع فیتوشیمیایی و یا فارماکولوژیک به منظور استخراج و شناسایی ترکیبات موجود در این گیاه و اثرات درمانی آن صورت نگرفته است. این تحقیق به بررسی اثرات سایتوتوکسیک فراکسیون بوتانولی گیاه *A. affine* که غنی از ترکیبات ساپونینی است پرداخته و نتایج رضایت‌بخش آن را بر روی سه رده از سلول‌های سرطانی پستان و تخمدان گزارش می‌نماید تا در آینده با استخراج ترکیبات موجود در این فراکسیون و شناسایی آنها، ترکیبات مؤثره سایتوتوکسیک موجود در گیاه *A. affine* شناسایی و معرفی شود.

مواد و روش‌ها

عصاره‌گیری و تهیه فراکسیون بوتانولی

پیازهای گیاه *Allium affine* Ledeb در فصل بهار از بازار سبزیجات بروجن خریداری، توسط گیاه‌شناس شناسایی

و نمونه هرباریومی آن به شماره ۳۴۰۳ در هرباریوم دانشکده داروسازی اصفهان ثبت و نگهداری شد.

پیازهای گیاه در شرایط سایه و هوای آزاد خشک شده و سپس بلافاصله قبل از عصاره‌گیری توسط آسیاب برقی پودر شد تا سطح تماس بیشتری با حلال عصاره‌گیری ایجاد شود. بر روی پودر به دست آمده (۹۳۰ گرم) به ترتیب با حلال‌های n- هگزان، کلروفرم، کلروفرم- متانول (۹:۱) و متانول عصاره‌گیری به روش ماسراسیون انجام شد. هر مرحله عصاره‌گیری ۴ بار با استفاده از ۳ لیتر از حلال‌های یاد شده تکرار شد. در پایان تمامی عصاره‌های به دست آمده توسط دستگاه روتاری در خلأ در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد تغلیظ شد.

به منظور تهیه فراکسیون بوتانولی گیاه، عصاره متانولی به دست آمده در آب حل شده و سپس با استفاده از دکانتور و در ۳ مرحله به کمک حلال n- بوتانول دکانته و عصاره بین دو حلال توزیع شد. درنهایت فازهای بوتانولی حاصله با یکدیگر مخلوط و توسط دستگاه روتاری در خلأ تغلیظ شد. به منظور اطمینان از خشک شدن عصاره و عدم وجود آب و هر گونه حلال در آن، فراکسیون تغلیظ شده بوتانولی در پایان با استفاده از دستگاه فریز درایر کاملاً خشک شد و و پودر خشک حاصله تا زمان انجام آنالیز سلولی در ظرف درب بسته در یخچال نگداری شد.

نگهداری و کشت سلولی

رده‌های سلولی MCF-7، MDA-MB231 مربوط به سرطان پستان و رده سلولی OVCAR-3 مربوط به سرطان تخمدان از بانک ملی سلولی انسیتو پاستور ایران خریداری شده و در فلاسک ۲۵ سانتی‌متر مکعب در محیط کشت RPMI1640، سرم گوساله ۱۰ درصد، پنی‌سیلین ۱۰۰ واحد در سانتی‌متر مکعب و استرپتومایسین ۱۰۰ میکروگرم در سانتی‌متر مکعب در شرایط فشار گاز دی‌اکسیدکربن ۵ درصد و رطوبت ۹۵ درصد در انکوباتور CO_2 کشت داده شد. برای انجام تست MTT پس از رسیدن تراکم سلولی به ۷۵ درصد، محیط کشت این سلول‌ها تخلیه و سلول‌ها توسط محلول تریپسن-اتیلن دی‌آمین ترا استیک اسید (EDTA) از ته فلاسک جدا و با استفاده از دستگاه سانتریفیوژ با دور ۱۰۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شدند. رسوب سلولی حاصل در میزان ۱ سی‌سی محیط کشت به حالت سوسپانسیون درآورده شده و تعداد سلول‌های زنده با کمک رنگ تریپان بلو شمارش شدند.

تیمار سلول‌ها

تعیین سمیت سلولی با استفاده از تست MTT

به منظور بررسی اثر سایتوتوکسیک فراکسیون بوتانولی گیاه از تست MTT استفاده شد. برای انجام این تست سلول‌ها با دانسیته 5×10^3cell/ml به هر چاهک پلیت ۹۶ خانه‌ای منتقل و پس از ۲۴ ساعت و چسبیده شدن سلول‌ها به کف چاهک‌ها، پلیت‌های تهیه شده به زیر هود منتقل شده و محیط کشت چاهک‌ها توسط سمپلر با دقت خالی شد. سپس محیط کشت جدید حاوی غلظت‌های مختلف از فراکسیون بوتانولی گیاه *A. affine* (۲۰۰-۰/۱ میکروگرم/ میلی‌لیتر) به چاهک‌ها اضافه شد. برای هر غلظت سه چاهک در نظر گرفته شد و به چاهک‌های شاهد محیط کشت کامل و حلال اضافه شد.

۴۸ ساعت بعد از سپری شدن زمان هر تیمار، به هر چاهک مقدار ۲۰ میکرولیتر محلول MTT (غلظت نهایی ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در PBS) اضافه شد و پس از۴ ساعت نگهداری در انکوباتور CO_2، محیط کشت سلول‌ها تخلیه شد. برای انحلال رنگ ایجاد شده به هر کدام از چاهک‌ها ۲۰۰ میکرولیتر محلول دی متیل سولفوکسید اضافه و بعد از انحلال کامل، شدت جذب محلول هر چاهک در طول موج ۵۷۰ نانومتر اندازه‌گیری و درصد سلول‌های زنده متناسب با نسبت جذب هر چاهک نسبت به کنترل آن که هیچ تیماری بر روی آن انجام نشده است، محاسبه شد.

آنالیز آماری

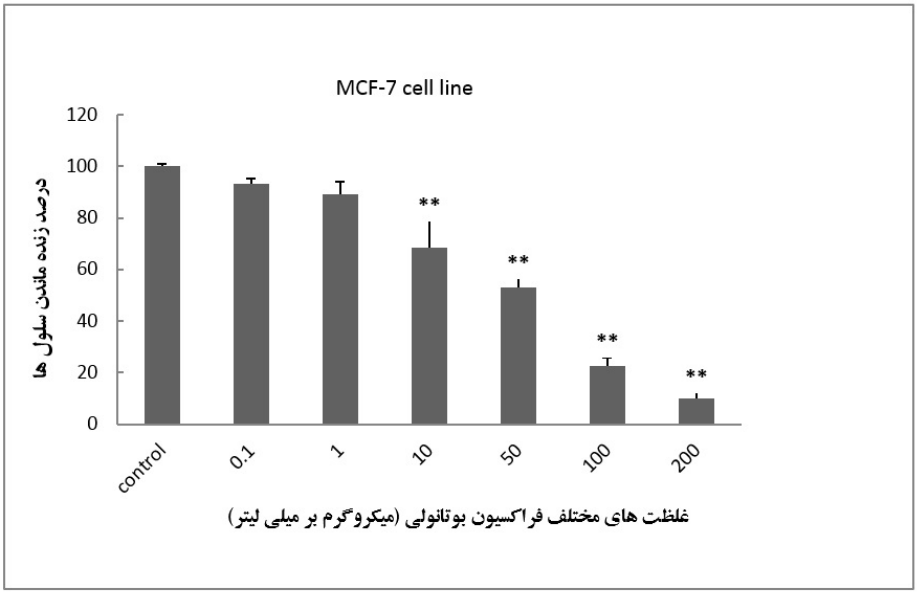
نتایج به دست آمده از ۳ مرحله تکرار آزمایش به صورت میانگین انحراف معیار ثبت و گزارش شد. نتایج نهایی به کمک نرم‌افزار SPSS (version 16, SPSS Inc.) و با استفاده از آزمون‌های آماری ANOVA یک طرفه و t تست و با سطح معناداری $P<$ ۰/۰۵ مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج

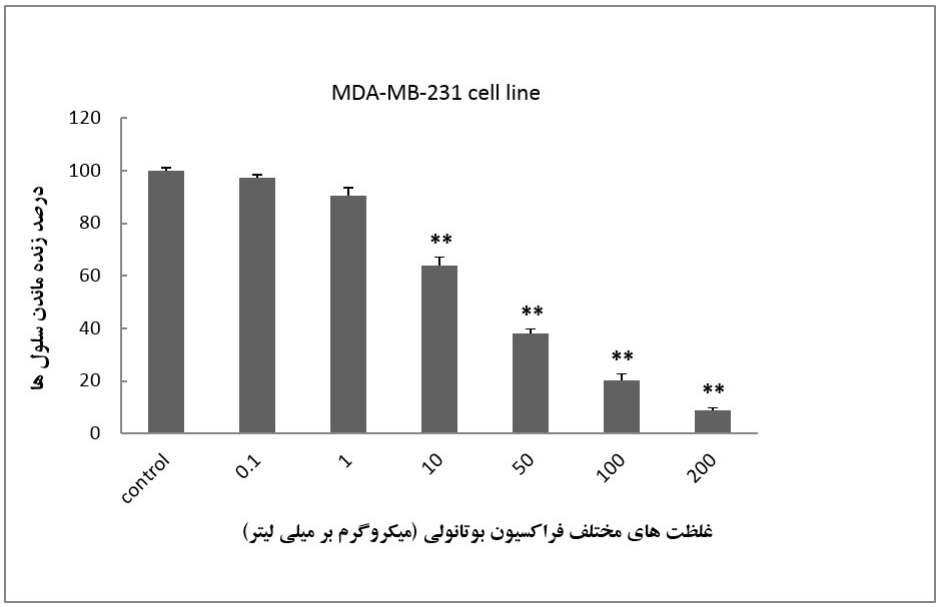
نتایج حاصل از آزمون MTT بعد از تیمار ۴۸ ساعته رده‌های سلولی MCF-7، MDA-MB231 و OVCAR-3 با فراکسیون بوتانولی گیاه *A. affine* کاهش وابسته به غلظت فعالیت سوکسینات دهیدروژناز را نسبت به نمونه کنترل نشان داد (شکل شماره‌های ۱، ۲ و ۳). در مقایسه با گروه کنترل، در رده سلولی MCF-7 مهار معنی‌دار تکثیر سلولی از غلظت ۱ میکروگرم / میلی‌لیتر شروع و در غلظت ۲۰۰ میکروگرم / میلی‌لیتر به حداکثر میزان خود رسید (P< ۰/۰۱). همانطور که در شکل شماره ۱ نشان داده شده است، درصد سلول‌های زنده در غلظت ۲۰۰ میکروگرم / میلی‌لیتر در این رده سلولی ۱۰/۴ ±۲/۳ درصد می‌باشد که نسبت به گروه کنترل اختلاف معنی‌داری را نشان می‌دهد. همچنین نتایج مطالعه نشان می‌دهد که غلظت مؤثر مهار پنجاه درصد (IC50) فراکسیون بوتانولی گیاه *A. affine* برای رده سلولی MCF-7 بعد از ۴۸ ساعت تیمار برابر با ۳/۰۵± ۴۵/۳۳ میکروگرم / میلی‌لیتر می‌باشد.

در رده سلولی MDA-MB231 نیز مهار رشد سلولی از غلظت ۱ میکروگرم / میلی‌لیتر به طور معنی‌داری آغاز شد و بیشترین تأثیر مهاری در غلظت ۲۰۰ میکروگرم / میلی‌لیتراتفاق افتاد (شکل شماره ۲)، به طوری که درصد سلول‌های زنده در این غلظت به ۸/۸۵±۰/۹۵ درصد رسید که نسبت به گروه کنترل اختلاف قابل ملاحظه‌ای را نشان می‌داد (P<۰/۰۱). نتایج مطالعه نشان می‌دهد که غلظت مؤثر مهار پنجاه درصد (IC50) فراکسیون بوتانولی گیاه *A. affine* برای رده سلولی MDA-MB231 بعد از ۴۸ ساعت تیمار برابر با ۰/۸۱± ۴۰/۱۳ میکروگرم / میلی‌لیتر می‌باشد.

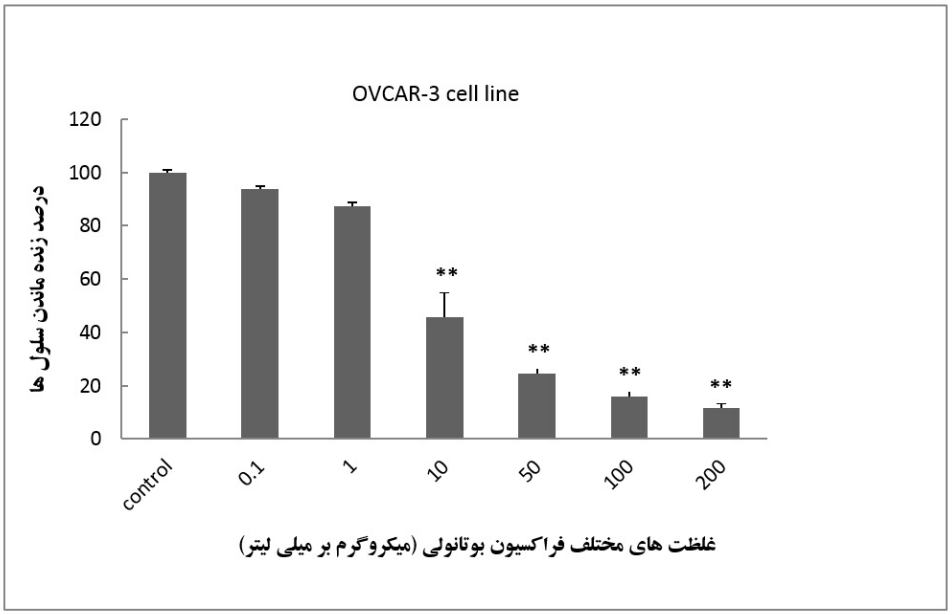
تیمار سلول‌های OVCAR-3 با غلظت‌های مختلف فراکسیون بوتانولی گیاه *A. affine* نیز در مقایسه با گروه کنترل کاهش معنی‌دار درصد سلول‌های زنده را نشان داد (P< ۰/۰۱). این تأثیر از غلظت ۱ میکروگرم / میلی‌لیتر شروع و به صورت وابسته به غلظت در غلظت ۲۰۰ میکروگرم / میلی‌لیتر به حداکثر میزان خود رسید (شکل شماره ۳). درصد



شکل شماره ۱- تأثیر فراکسیون بوتانولی گیاه *A. affine* در مهار رشد رده سلولی MCF-7 مربوط به سرطان پستان. سلول‌ها با غلظت‌های مختلف فراکسیون تیمار شدند. پس از ۴۸ ساعت درصد زنده ماندن سلول‌ها به کمک تست MTT اندازه‌گیری شد. نتایج براساس MEAN ± SD در مقایسه با کنترل به صورت در صد ارائه شده است (P <۰/۰۱ **).



شکل شماره ۲- تأثیر فراکسیون بوتانولی گیاه *A. affine* در مهار رشد رده سلولی MDA-MB231 مربوط به سرطان پستان. سلول‌ها با غلظت‌های مختلف فراکسیون تیمار شدند. پس از ۴۸ ساعت درصد زنده ماندن سلول‌ها به کمک تست MTT اندازه‌گیری شد. نتایج براساس MEAN ± SD در مقایسه با کنترل به صورت در صد ارائه شده است (P <۰/۰۱ **).



شکل شماره ۳- تأثیر فراکسیون بوتانولی گیاه *A. affine* در مهار رشد رده سلولی OVCAR-3 مربوط به سرطان تخمدان. سلول‌ها با غلظت‌های مختلف فراکسیون تیمار شدند. پس از ۴۸ ساعت درصد زنده ماندن سلول‌ها به کمک تست MTT اندازه‌گیری شد. نتایج براساس MEAN ± SD در مقایسه با کنترل به صورت در صد ارائه شده است (P <۰/۰۱ **).

سلول‌های زنده در این غلظت به ۱۱/۵۸±۱/۷۰ درصد رسید که نسبت به گروه کنترل اختلاف قابل ملاحظه‌ای را نشان می‌داد. نتایج مطالعه نشان می‌دهد که غلظت مؤثر مهار پنجاه درصد (IC50) فراکسیون بوتانولی گیاه *A. affine* برای رده سلولی OVCAR-3 بعد از ۴۸ ساعت تیمار برابر با ۷/۱۳ ±۰/۹۴ میکروگرم / میلی‌لیتر می‌باشد که بهترین تأثیر سایتوتوکسیک در میان رده‌های سلولی مورد بررسی می‌باشد.

بحث

در بررسی توانایی زیستی سلول‌های MCF-7، MDA-MB231 و OVCAR-3 با استفاده از آزمون MTT، فراکسیون بوتانولی گیاه *A. affine* موجب کاهش چشمگیر توانایی زیستی سلول‌های سرطانی پستان و تخمدان بویژه در مورد رده سلولی سرطان تخمدان OVCAR-3 (IC50 برابر با ۷/۱۳ ±۰/۹۴ میکروگرم/ میلی‌لیتر) شد که فرضیه مطالعه مبنی بر وجود اثرات سایتوتوکسیک در فراکسیون غنی از ساپونین‌های گیاه را تأیید می‌نماید.

نتایج به دست آمده از گیاه *A. affine* با نتایج سایر مطالعات در مورد گیاهان جنس آلیوم و اثرات سایتوتوکسیک این گیاهان نیز همخوانی داشته و مورد تأیید قرار می‌گیرد. برای مثال استفاده از سیر (*A. sativum*) به عنوان یک عامل ضدسرطان از سال ۱۹۵۰، زمانی که در شرایط آزمایشگاهی اثر مهارکننده عصاره غنی از تیوسولفینات‌های این گیاه بر رشد سلول‌های تومور مشخص شد آغاز گردید. مطالعات مختلف نشان داده‌اند که مصرف سیر و پیاز موجب کاهش خطر ابتلا به سرطان سارکوم در بافت‌های مختلف و دستگاه‌های بدن مثل معده، روده بزرگ، مری، پروستات، مثانه، کبد، ریه، پستان، پوست و مغز می‌شود. به نظر می‌رسد این اثرات به واسطه‌ی مکانیسم‌های مختلفی انجام می‌شود که هنوز به خوبی شناخته نشده‌اند و می‌توان گفت که در مجموع سیر و پیاز اثرات ضدسرطانی خود را به صورت غیرمستقیم اعمال می‌کنند [۲۱].

در مورد گیاه موسیر (*A. hirtifolium*) به عنوان یکی دیگر از گونه‌های مهم جنس آلیوم، اگرچه مکانیسم مهاری آن بر رشد سلول‌های سرطانی به خوبی مشخص نیست اما نتایج برخی مطالعات نشان داده است که کوئرستین موجود در آن، از طریق افزایش القای p53 و کاهش پروتئین‌های آنتی‌آپوپتوزی Survivin وBcl-2 به بروز اثرات این گیاه کمک می‌نماید [۲۲]. همچنین آلیسین موجود در موسیر نیز باعث تحریک تشکیل جسم آپوپتوتیک، توقف سیکل سلولی، متراکم شدن هسته، نردبانی شدن DNA و هم چنین فعال شدن کاسپاز ۳، ۸ و ۹ می‌شود [۲۳].

مطالعات متعددی نیز در خصوص اثرات سایتوتوکسیک استرویید ساپونین‌ها به عنوان یکی از مهم‌ترین دسته ترکیبات موجود در گیاهان جنس آلیوم وجود دارد که به عنوان نمونه می‌توان به اثرات سایتوتوکسیک استرویید ساپونین‌های استخراج شده از گیاهانی چون *A. Umbilicatum* و *A. vavilovii* اشاره نمود [۹، ۱۱،۲۴]. از سوی دیگر با توجه به مطالعات فیتوشیمیایی انجام شده بر روی گیاه *A. affine* به نظر می‌رسد که این گیاه عمدتاً حاوی ترکیبات ساپونین‌های استروییدی بر مبنای دیوسجنین، تیگوجنین و روسکوجنین است [۱۰] که اثرات سایتوتوکسیک مشاهده شده می‌تواند ناشی از وجود این ترکیبات در فراکسیون مورد بررسی باشد. در مجموع با توجه به مطلوب بودن نتایج حاصل از این مطالعه، استخراج و شناسایی ترکیبات موجود در فراکسیون بوتانولی گیاه *A. affine* بویژه استرویید ساپونین‌های موجود در آن و بررسی اثرات سایتوتوکسیک ترکیبات خالص شده نهایی حایز اهمیت بوده و می‌تواند منجر به شناسایی ترکیبات مؤثره دارویی موجود در این گیاه و انجام مطالعات تکمیلی در مورد آنها شود.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی شماره ۳۹۳۶۶۳ مصوب معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان می‌باشد. بدینوسیله از حمایت‌های مالی و معنوی انجام شده قدردانی می‌شود. از جناب آقای دکتر محمود آقایی بابت راهنمایی و حمایت بی‌دریغشان سپاسگزاری می‌شود.

منابع

1. Noroozi J, Akhani H and Breckle SW. Biodiversity and phytogeography of the alpine flora of Iran. *Biodivers. Conserv.* 2008; 17 (3): 493-521.

2. Friesen N, Fritsch RM and Blattner FR. Phylogeny and new intrageneric classification of *Allium* (Alliaceae) based on nuclear ribosomal DNA its sequences. *Aliso* 2006; 22 (1): 372-95.

3. Lanzotti V. Bioactive Saponins from *Allium* and *Aster* Plants. *Phytochem. Rev*. 2005; 4 (2-3): 95-110.

4. Jedelska J. Pharmaceutical Value of Onions (*Allium L.*) and related species of Central Asia. Philipps universitat. Marburg. 2007.

5. Griggs A and Loscalzo C. Cecil Essentials of Medicine: Hematologic & Oncologic Disease. Translated by: Ahmadi I, Sadeghy R. 6th ed. Tabib publication. 2004, pp: 148.

6. Matsuda T, Maekawa K, Asano K and Hisamitsu T. Suppressive Effect of Juzen-Taiho-To on Lung Metastasis of B16 Melanoma Cells in Vivo. *Evid. Based Complement. Alternat. Med*. 2011; 2011: 1-5.

7. Prakash E, Saxena AK and Gupta DK. Cytotoxic Activities of Ethanolic Extract of *Allium Sativum* against Colon Cancer Cell Lines. *IJIRSET* 2016; 5 (3): 3041-45.

8. Sang SM, Mao SL, Lao AN, Chen ZL and Ho CT. New steroid saponins from the seeds of *Allium tuberosum* L. *Food Chem.* 2003; 83 (4): 499-506.

9. Zolfaghari B, Sadeghi M, Troiano R, Lanzotti V. Vavilosides A1/A2–B1/B2, new furostane glycosides from the bulbs of *Allium vavilovii* with cytotoxic activity. *Bioorg. Med. Chem.* 2013; 21 (7): 1905-10.

10. Sobolewska D, Michalska K, Podolak I and Grabowska K. Steroidal saponins from the genus *Allium*. *Phytochem. Rev.* 2016; (15): 1-35.

11. Zolfaghari B, Sadeghi M, Troiano R and Lanzotti V. 3-Keto umbilicagenin A and B, new sapogenins from *Allium umbilicatum* Boiss. *Fitoterapia* 2015; (102): 198–202.

12. Susanto H, Fakhrodin N, Murti YB and Siswomiharjo W. Saponins from *Plumeria acuminata* Ait induce cell growth inhibition and apoptosis of oral squamous carcinoma cells. *Chin. J. Dent. Res.* 2010; 13 (2): 153-6.

13. Arabski M, Wegierek-Ciuk A, Czerwonka G, Lankoff A and Kaca W. Effects of saponins against clinical *E.coli* strains and eukaryotic cell lines. *J. Biomed. Biotechnol.* 2012; (2012): 1-6.

14. Perez-Labrada K, Brouard I, Estevez S, Marrero MT, Estevez F, Bermejo J and Rivera DG. New insights in to the structure-cytotoxicity relationship of spirostan saponins and related glycosides. *Bioorg. Med. Chem.* 2012; 20 (8): 2690-700.

15. Nag SA, Qin JJ, Wang W, Wang MH, Wang H and Zhang R. Ginsenosides as anticancer agents: in vitro and in vivo activities, structure-activity relationships, and molecular mechanisms of action. *Front Pharmacol*. 2012; (3): 1-18.

16. Zhang W, Chen G and Deng CQ. Effects and mechanisms of total *Panax notoginseng* saponins on proliferation of vascular smooth muscle cells with plasma pharmacology method. *J. Pharm. Pharmacol*. 2012; 64 (1): 139-45.

17. Si YC, Zhang JP, Xie CE, Zhang LJ, and Jiang XN. Effects of *Panax notoginseng* saponins on proliferation and differentiation of rat hippocampal neural stem cells. *Am. J. Chin. Med.* 2011; 39 (5): 999-1013.

18. Sun L, Lin S, Zhao R, Yu B, Yuan S and Zhang L. The saponin monomer of dwarf lilyturf tuber, DT-13, reduces human breast cancer cell adhesion and migration during hypoxia via regulation of tissue factor. *Biol. Pharm. Bull.* 2010; 33 (7): 1192-8.

19. Lu MC, Lai TY, Hwang JM, Chen HT, Chang SH, Tsai FJ, Wang HL, Lin CC, Kuo WW and

Huang CY. Proliferation and migration-enhancing effects of *ginseng* and ginsenoside Rg1 through IGF-I- and FGF-2-signaling pathways on RSC96 Schwann cells. *Cell Biochem. Funct.* 2009; 27 (4): 186-92.

20. Sadeghi M, Safaeian L, Aghaye Ghazvini M and Rmezani M. Evaluation of fibrinolytic and antioxidant effects of *Allium affine* hydroalcoholic extract. *RPS.* 2017; 12 (4): 299-306.

21. Corzo-Martinez M, Corzo N, Villamiel M. Biological properties of onions and garlic. *Trends Food Sci. Technol*. 2007; 1-17.

22. Ghodrati Azadi H, Riazi GH, Ghaffari SM, Ahmadian S, Khalife TJ. Effects of *Allium hirtifolium* (Iranian shallot) and its allicin on microtubule and cancer cell lines. *Afr. J. Biotechnol.* 2002; 8 (19): 5030-37.

23. Oommen S, John Anto R, Srinivas G, Karunagaran D. Allicin (from garlic) induces caspase-mediated apoptosis in cancer cells. *Eur. J. Pharmacol.* 2004; 485 (1-3): 97-103.

24. Zolfaghari B, Sadeghi M, Troiano R and Lanzotti V. 3, 4-Seco-spirostane sapogenins with cytotoxic activity from *Allium umbilicatum* Boiss. *Phytochem. Lett.* 2015; (12): 291 - 5.

Cytotoxic Effects of *Allium affine* Ledeb Butanolic Fraction on Breast and Ovary Cancer Cell Lines

Kazemi M (Pharm.D.)[1], Zolfaghari B (Ph.D.)[2], Keivanloo Shahrestanaki M (Ph.D. Student)[3], Sadeghi Dinani M (Ph.D.)[2]*

1- School of Pharmacy, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
2- Department of Pharmacognosy, School of Pharmacy, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
3- Department of clinical Biochemistry, School of Pharmacy, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
*Corresponding author: Department of Pharmacognosy, School of Pharmacy, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
Tel: +98- 31- 37927129, Fax: +98- 31 - 36680011
Email: m_sadeghi@pharm.mui.ac.ir

Abstract

Background: Among the secondary metabolites isolated from *Allium* species, steroidal saponins are more important for their cytotoxic activities on a variety of cancer cell lines. Current study has investigated the cytotoxic activity of saponin-riched butanolic fraction of *Allium affine*, an important edible *Allium* species of Iran.

Objective: This study was conducted to evaluate cytotoxic activity of saponin-riched fraction of *Allium affine* Ledeb on breast and ovarian cancer cell lines.

Methods: Bulbs of the plant were extracted respectively by hexane, chloroform, chloroform-methanol (9-1) and methanol in a stepwise method with increasing solvent polarity. The methanol extract was then partitioned between water and butanol and the final dried butanolic fraction was used for further cytotoxicity assay. MCF-7, MDA-MB231 and OVCAR-3 cell lines were tested for cytotoxic activity, using different concentrations of butanolic fraction (0.1-200 µg/ml) by MTT assay. After the incubation time (48 h), the percentage of the viable cells was determined by ELISA reader instrument in 570 nm.

Results: All of the cell lines tested in this investigation exhibited a dose-dependent decrease in succinate dehydrogenase activity against the control and significant dose-dependent inhibition of the growth in all concentrations and cell lines were observed ($P<0.01$). The most cytotoxic activity was observed for OVCAR-3 cell line (IC_{50}= 7.13±0.94 µg/ml).

Conclusion: The butanolic fraction of *A. affine* exhibited a significant cytotoxic activity on investigated cell lines, especially OVCAR-3, which is in agreement with other studies conducted on different *Allium* species. According to the results, it seems that the butanolic fraction of this plant contains cytotoxic components, especially steroidal saponins, and the phytochemical study of the constituents is suggested.

Keywords: ***Allium affine*, Breast Cancer, Cytotoxicity, Ovarian Cancer, Steroidal Saponin**