مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد
دوره بیست و هشتم، شماره دوازده، اسفند۱۳۹۹
تاریخ دریافت:۱۳۹۶/۱۱/۱۸
تاریخ پذیرش:۱۳۹۷/۰۲/۲۲

بررسی اثرات ضد سرطانی و ایمونومدولاتوری شیره انجیر

حمیده اعظمی[۱]، سعید ملک‌حسینی[۲]، مریم مجاهدتقی[۳]، محمدرسول زارعی‌نژاد[۴]، زهرا امیرغفران[۱۵*]

مقاله پژوهشی

مقدمه: تاکنون مطالعات محدودی در زمینه اثرات ضدسرطانی و ایمونومدولاتوری شیره میوه انجیر انجام شده‌است. هدف از مطالعه تجربی حاضر بررسی تاثیر شیره انجیر بر سلول‌های سرطانی و بر تکثیر لنفوسیت‌ها و تولید سیتوکاین از آن‌ها می‌باشد.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی پس از تهیه عصاره متانولی از شیره انجیر، تاثیر آن بر رده‌های سرطانی مختلف شامل Fen (سرطان مثانه)، K562 (لوسمی میلوئیدی)، Hela (سرطان سرویکس)، Jurkat (لوسمی لنفوئیدی) و Raji (لنفوم) به روش کالری‌متری MTT بررسی شد. برای بررسی تأثیر عصاره بر تکثیر لنفوسیت‌ها و زنده‌مانی آن‌ها از روش‌های سنجش تکثیر سلولی BrdU و فلوسیتومتری استفاده گردید. تولید سیتوکاین‌ها با روش الیزا اندازه‌گیری شد. نتایج به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار version 16 SPSS و آزمون‌های آماری استیودنت تی تست و آنالیز واریانس یک طرفه مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج: عصاره شیره انجیر بیشترین تاثیر مهاری را بر رشد سلول‌های K562 (IC_{50}=۲۳۴µg/ml) و کمترین تاثیر را بر سلول‌های Hela (IC_{50}>۱۰۰۰µg/ml) نشان داد ($p<۰/۰۵$). در بررسی ویژگی ایمونومدولاتوری عصاره بر لنفوسیت‌ها، با افزایش غلظت عصاره کاهش تکثیر لنفوسیتی مشاهده شد. به‌طوری‌که میزان ایندکس پرولیفراسیون از ۲/۰۶±۱/۰ در غلظت ۰/۱ به ۰/۲±۰/۱۳ در غلظت ۸۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر عصاره رسید ($p<۰/۰۰۱$). در آزمایش فلوسیتومتری اثر کشندگی معناداردر غلظت ۴۰۰ میکروگرم درمیلی‌لیتر و بیشتر ازآن دیده شد. عصاره شیره انجیر در غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر قادر به مهار و کاهش معنادار ترشح اینترفرون گاما و اینترلوکین ۴ بود.

نتیجه‌گیری: شیره انجیر دارای اثرات سیتوتوکسیک بر سلول‌های سرطانی به‌خصوص رده لوسمیک K562 بود که تاییدکننده اثرات ضدسرطانی آن است و هم‌چنین در غلظت‌های کمتر توانست تکثیر لنفوسیت‌ها و تولید سیتوکاین را کاهش دهد که مفید بودن احتمالی آنرا در مهار سیستم ایمنی در بیماری‌های مرتبط نشان می‌دهد.

واژه‌های کلیدی: شیره انجیر، سرطان، ایمونومدولاتوری

ارجاع: اعظمی حمیده، ملک حسینی سعید، مجاهد تقی مریم، زارعی‌نژاد محمدرسول، امیرغفران زهرا. **بررسی اثرات ضدسرطانی و ایمونومدولاتوری شیره انجیر.** مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد ۱۳۹۹؛ ۲۸ (۱۲): ۹۹-۳۲۸۸

۱ –دکتری پزشکی، گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران.
۲–کارشناس ارشد، گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران.
۳ -کارشناس، گروه فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران.
۴– کارشناسی ارشد، گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران.
۵– استاد، گروه ایمونولوژی و مرکز تحقیقات بیماری‌های خود ایمنی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران.
*(نویسنده مسئول)؛ تلفن: ۰۹۱۷۷۱۷۰۸۶۱، پست الکترونیکی: amirghofz@gmail.com، صندوق پستی : ۷۱۳۴۸-۴۵۷۹۴

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-25]

[DOI: 10.18502/ssu.v28i12.5776]

مقدمه

گیاهان دارویی همواره در طول تاریخ نقش بسیار مهمی در بهداشت و سلامت انسان ایفا نموده‌اند. امروزه تمایل جهانی به‌سمت استفاده از فیتوکمیکال‌های طبیعی موجود در گیاهان، میوه‌ها، عصاره‌ها و مشتقات آن‌ها رو به فزونی است. مواد گیاهی طبیعی منبع بسیار مهمی در درمان بیماری‌های مختلف از جمله سرطان بوده‌اند. یکی از گیاهانی که به‌طور سنتی برای درمان بیماری‌های مختلف از جمله مشکلات گوارشی، التهابات و سرطان استفاده می‌شد و دارای اثرات محافظتی کبدی و ضدمیکروبی می‌باشد گیاه انجیر است. درخت انجیر که نام علمی آن Ficus و از خانواده "Moraceae"می‌باشد دارای ۶۰۰ گونه است که اغلب انواع آن وحشی یا زینتی هستند (۱). گیاه *Ficus carica* همان انجیر معمولی است که میوه آن را مصرف می‌کنیم و ایران به‌عنوان یکی از بزرگ‌ترین تولیدکنندگان آن به‌شمار می‌رود (۲). استان‌های مهم تولیدکننده انجیر در ایران به‌ترتیب استان فارس، لرستان، کرمان، خراسان، کرمانشاه و سمنان می‌باشند. این میوه به‌طور گسترده‌ای هم به‌عنوان یک منبع غذایی و هم به‌عنوان یک منبع داروئی در دنیا مصرف می‌شود. میوه انجیر خشک و تازه منبع غنی از مواد معدنی و آنتی‌اکسیدانت می‌باشد (۳). انجیر از نظر طب قدیم ایران گرم و تر است و در مواردی مانند کاهش تب، افزایش تعریق، رفع التهاب مجاری دستگاه تنفسی و کلیه، درمان سرماخوردگی و بیماری‌های التهابی، معالجه بیماری‌های پوستی و بالاخره سرطان کاربرد داشته است (۴). با توجه به محدود بودن مطالعات تجربی و اطلاعات در زمینه اثرات ضد توموری و ایمونومدولاتوری انجیر در این مطالعه تاثیر شیره انجیر سیاه بر چند رده سلولی سرطانی و بر تکثیر لنفوسیت‌ها بررسی گردیده است و به‌علاوه تولید دو سیتوکاین اینترلوکین ۴ (IL-4) و اینترفرون گاما (IFNγ) توسط لنفوسیت‌های تحریک شده با ماده میتوژن اندازه‌گیری شده است. اینترلوکین ۴ سیتوکاینی است که از زیرگروه لنفوسیت‌های Th2 ترشح می‌شود و در رشد و در رشد و القای فعالیت لنفوسیت‌های B در جهت تولید آنتی‌بادی نقش دارد (۵). اینترفرون گاما نیز از زیرگروه Th1 تولید می‌شود و سیتوکاین اصلی فعال‌کننده ماکروفاژها برای مقابله با عوامل میکروبی داخل سلولی و سلول‌های توموری می‌باشد (۶). مطالعه حاضر می‌تواند اطلاعات مناسبی را در مورد خواص ایمونومدولاتوری و ضد توموری میوه انجیر در اختیار ما قرار دهد.

روش بررسی

آماده‌سازی عصاره شیره انجیر: ابتدا شیره انجیر از درختان انجیر سفید (Ficuscarica) در منطقه استهبان در استان فارس در فصل پاییز جمع‌آوری گردید. سپس توسط کارشناس گروه فارماکولوژی عصاره متانولی از آن تهیه گردید. عصاره تهیه شده در دی متیل سولفوکسید (DMSO) (سیگما، آمریکا) حل گردید و آنگاه غلظت ۲۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از آن در محیط کشت RPMI (گیبکو، آلمان) تهیه گردید. از محلول به‌دست آمده غلظت‌های نهایی مختلف از ۱-۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر در محیط کشت RPMI تهیه گردید.

رده‌های سلولی و کشت سلولی: در این مطالعه از پنج رده سلولی سرطانی شامل رده سلولی Fen (سرطان مثانه)، رده سلولی K562 (لوسمی میلوئیدی)، Hela (سرطان سرویکس)، Jurkat (لوسمی لنفوئیدی) و Raji (لنفوم سلول‌های B) استفاده گردید. تمام رده‌های سلولی فوق در فلاسک کشت سلولی حاوی محیط کشت RPMI 1640 غنی شده با سرم جنین گوساله غیر فعال شده ده درصدی و آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین به میزان ۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر و استرپتومایسین به‌میزان ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر (شفافارمد، ایران) و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و محیط مرطوب شامل ۵ درصد CO_2 کشت داده شدند. برای سلول‌هایی که حالت چسبنده داشتند مانند Hela و Fen، جهت تهیه سلول از عمل تریپسینه کردن استفاده شد. با تست رنگ‌آمیزی تریپان بلو مشخص شد که ۹۵ درصد سلول‌ها زنده‌اند.

تست MTT: به‌منظور بررسی اثر مهاری شیره انجیر بر میزان رشد رده‌های سلولی، ابتدا تعداد معین شده از هر سلول در هر چاهک با غلظت‌های ۱۰ تا ۸۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر عصاره به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-25]

[DOI: 10.18502/ssu.v28i12.5776]

گردید. سپس ۱۰ میکرولیتر از محلول ۵ میکروگرم در میلی‌لیتر MTT (سیگما) به هر چاهک پلیت اضافه شد. پلیت ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه قرار داده شد و در انتها محیط کشت خارج شده و ۱۵۰ میلی‌لیتر محلول DMSO جهت حل شدن کریستال‌های فورمازان اضافه شد. سلول‌های تیمار شده با DMSO (حلال‌شیره) به‌عنوان کنترل منفی و سلول‌های تیمار شده با داروی سیتوتوکسیک سیس‌پلاتین (به میزان ۵۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) به‌عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شدند. در انتها جذب نوری چاهک‌ها با دستگاه قرائت‌کننده الیزا در طول موج ۵۷۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. درصد مهار رشد برای غلظت‌های مختلف عصاره روی هر رده سلولی در مقایسه با کنترل حلال محاسبه و سپس نمودار درصد مهار رشد در مقابل غلظت رسم و با کمک برنامه Curve expert غلظتی از عصاره که پنجاه درصد سلول‌ها از بین رفته باشند (IC_{50}) محاسبه گردید.

تست تکثیر لنفوسیتی: به‌منظور بررسی تأثیر عصاره بر تکثیر لنفوسیت‌ها از روش برومو دی اکسی یوریدین (BrdU) (روشه، آلمان) استفاده گردید. در این روش از برومو دی اکسی یوریدین که آنالوگ تیمیدین است به‌عنوان شاخصی برای اندازه‌گیری میزان تکثیر سلولی استفاده می‌شود. این مولکول درمرحله سنتز DNA وارد سلول‌های جدید شده و با آنتی‌بادی ضد BrdU نوعی فراورده رنگی به‌وجود می‌آورد که میزان جذب نوری آن باروش رنگ سنجی قابل اندازه‌گیری است. ابتدا خونگیری از پنج فرد داوطلب سالم به میزان ۵ سی سی صورت گرفت. سپس لایه لنفوسیتی با استفاده از فایکول جداسازی شد. شمارش سلولی انجام گردید و تعداد سلول در محیط کشت حاوی ده درصد سرم جنین گوساله به نحوی تنظیم گردید که در هر چاهک 10^5 سلول در حجم ۸۰ میکرولیتر برده شود. سپس ۱۰ میکرولیتر فیتوهماگلوتینین (PHA) (گیبکو) که ۱ به ۱۷۵ رقیق شده بود به هر چاهک به‌جز چاهک کنترل منفی اضافه گردید تا لنفوسیت‌ها فعال گردند. همزمان ۱۰ میکرولیتر عصاره با غلظت‌های متفاوت اضافه شد و پلیت به‌مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور گذاشته شد. سپس ۱۰ میکرولیتر BrdU به آن اضافه شد و ۱۸ ساعت در انکوباتور قرار گرفت و در انتها محلول آنتی‌بادی ضد BrdU اضافه شد. آنگاه جذب نوری در طول موج ۴۵۰ نانومتر خوانده شد. سلول‌هایی که نه فیتو هماگلوتینین و نه عصاره گرفته بودند به‌عنوان کنترل منفی و سلول‌هایی که تنها فیتوهماگلوتینین بدون اضافه نمودن عصاره گرفته بودند به‌عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شدند.

بررسی زنده بودن لنفوسیت‌ها به روش رنگ‌آمیزی با پروپیدیوم یدید: لنفوسیت‌ها مشابه تست تکثیر لنفوسیتی در حضور محرک و عصاره به مدت ۴۸ ساعت کشت داده شدند. سپس ۱۰ میکرولیتر محلول پروپیدیوم یدید (۱ میکروگرم در میلی‌لیتر)(سیگما) به لوله‌ها اضافه شده و با دستگاه فلوسایتومتری میزان ورود رنگ پروپیدیوم یدید به درون سلول‌های مرده مورد ارزیابی قرار گرفت. سلول‌هایی که نه فیتوهماگلوتینین و نه عصاره گرفته بودند به‌عنوان کنترل منفی و سلول‌هایی که تنها فیتوهماگلوتینین بدون اضافه نمودن عصاره گرفته بودند به‌عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شدند.در این روش به گروهی از سلول‌های تحریک شده داروی سیتوتوکسیک سیس‌پلاتین اضافه گردید.

ارزیابی تولید سیتوکاین‌های اینترفرون گاما و اینترلوکین ۴ به روش الیزا: لنفوسیت‌ها مشابه تست تکثیر لنفوسیتی در حضور محرک و عصاره به‌مدت ۴۸ ساعت کشت داده شدند. سپس پلیت به‌مدت ۵ دقیقه با دور ۱۵۰۰ سانتریفوژ شد و سوپ رویی سلول‌ها به آرامی جدا گردید و در دمای ۸۰- درجه ساتی‌گراد فریز گردید. میزان تولید سیتوکاین‌های اینترفرون گاما و اینترلوکین ۴ تولید شده از لنفوسیت‌های خون محیطی تحریک شده با فیتوهماگلوتینین با روش الیزا با استفاده از کیت تجاری (ایبیوساینس، آمریکا) و طبق دستورالعمل کیت مورد ارزیابی قرار گرفت. میزان هر یک از سیتوکاین‌ها، با استفاده از منحنی استاندارد تعیین گردید. قابل ذکر است که حساسیت کیت‌های مورد استفاده جهت اینترفرون گاما و اینترلوکین ۴ به ترتیب ۴ و ۲ پیکوگرم در میلی‌لیتر بود.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-25]

[DOI: 10.18502/ssu.v28i12.5776]

تجزیه و تحلیل آماری

در این مطالعه تجربی نتایج به‌صورت Mean ± SE حداقل دو آزمایش گزارش شده است. معنی‌دار بودن نتایج با استفاده از نرم افزار گراف پد و آزمون‌های آماری استیودنت تی تست و آنالیز واریانس یک طرفه ارزیابی و ($p\leq ۰/۰۵$) به عنوان تفاوت معنی‌دار در نظر گرفته شده است.

ملاحظات اخلاقی

این طرح در کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی شیراز با کد IR-SUMS.REC.1393.7282 مورد تایید قرار گرفته است.

نتایج

تاثیر عصاره شیره انجیر بر میزان رشد رده‌های سلولی به روش MTT: در این مطالعه اثر عصاره شیره انجیر بر رده‌های سلولی مختلف به‌روش MTT بررسی گردید. همانطور که در نمودار ۱ مشاهده می‌گردد این عصاره با افزایش غلظت تاثیر بیشتری بر مهار رشد سلول‌ها داشته است. هم‌چنین مطابق نمودار مشاهده می‌گردد که عصاره شیره انجیر تاثیر بیشتری بر مهار رشد سلول‌های K562 نسبت به سایر رده‌های سلولی داشته است. در جدول ۱ نتایج حاصل از محاسبه IC_{50} نشان داده شده است. در نمودار ۲ نیز این نتایج به‌صورت هیستوگرام نمایش داده شده است. براساس نمودار ۲ و جدول ۱، شیره انجیر در غلظت ۲۳۴ میکروگرم در میلی‌لیتر قادر به مهار رشد ۵۰ درصد از سلول‌های K562 شده است. در مورد سایر رده‌ها، در غلظت ۳۸۹ میکروگرم در میلی‌لیتر رده Jurkat، غلظت ۵۲۸ میکروگرم در میلی‌لیتر رده Fen، غلظت ۸۱۲ میکروگرم در میلی‌لیتر رده Raji و در غلظت بیش از هزار میکروگرم در میلی‌لیتر ۵۰ درصد رشد سلول‌های رده Hela را مهار نمود. به این ترتیب این شیره دارای بیشترین اثر مهاری بر رشد سلول‌های K562 و دارای کمترین اثر مهاری بر رشد سلول‌های Hela بود.

تاثیر غلظت‌های مختلف عصاره شیره انجیر بر تکثیر لنفوسیت‌های خون محیطی به روش Brdu: در این روش لنفوسیت‌ها با فیتوهماگلوتینین که میتوژن محرک سلول‌های T است تحریک شدند و در مجاورت غلظت‌های مختلف عصاره به مدت ۴۸ ساعت قرار گرفتند. همانگونه که در نمودار ۲ نشان داده شده است با افزایش غلظت عصاره، تکثیر لنفوسیتی نیز کاهش یافته است به‌طوریکه میزان ایندکس پرولیفراسیون از۰/۰۶±۱/۲ در غلظت ۰/۱ میکروگرم در میلی‌لیتر به ۰/۱۳±۰/۲ در غلظت ۸۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر عصاره رسیده است.

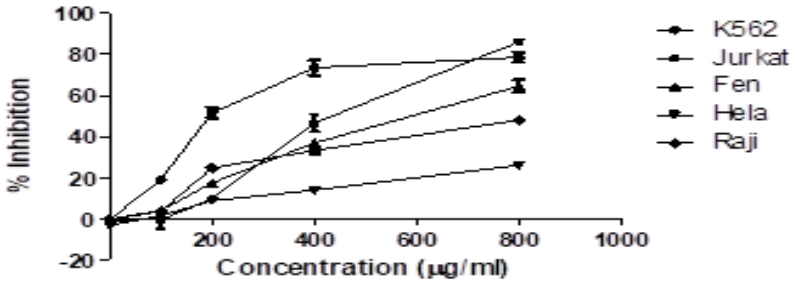
تاثیر غلظت‌های مختلف عصاره شیره انجیر برمیزان زنده بودن لنفوسیت‌های خون محیطی به روش رنگ‌آمیزی با پروپیدیوم یدید: در این روش پس از آنکه لنفوسیت‌ها با فیتوهماگلوتینین تحریک شدند در مجاورت غلظت‌های مختلف عصاره به مدت ۴۸ ساعت قرار گرفتند و سپس با پروپیدیوم یدید رنگ‌آمیزی و توسط دستگاه فلوسیتومتری مورد آنالیز قرار گرفتند. براساس نمودار ۳ همانطور که مشاهده می‌شود عصاره مورد نظر تنها در غلظت ۴۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر و بیشتر از آن به‌صورت معناداری ($p<۰/۰۵$) اثر کشندگی در لنفوسیت‌های خون محیطی داشته است. در این غلظت ۱۰/۴±۲۶/۲۵ درصد از سلول‌ها از بین رفته‌اند. همانگونه که در این نمودار نشان داده شده است تفاوت معنی‌داری در درصد سلول‌های مرده (PI positive) بین سلول‌های تیمار شده با غلظت‌های کمتر از ۴۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر عصاره و گروه سلول‌های کنترل منفی و مثبت مشاهده نمی‌گردد. این نتایج نشانگر آن است که عصاره در غلظت‌های کمتر از ۴۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر دارای اثر مهاری بر رشد سلول‌ها و در غلظت‌های بالا تر دارای اثر توکسیک می‌باشد. در نمودار ۴ نمودارهای نقطه‌ای (dot plot) مربوط به یک بار آنالیز سلول‌های رنگ‌آمیزی شده با پروپیدیوم یدید به‌عنوان نمونه نشان داده شده است.

تاثیر غلظت‌های مختلف عصاره شیره انجیر بر میزان تولید سایتوکاین‌های اینترفرون گاما و اینترلوکین ۴: در این روش پس از آنکه لنفوسیت‌ها با فیتوهماگلوتینین تحریک شدند در مجاورت غلظت‌های مختلف عصاره به‌مدت ۴۸ ساعت قرار

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-25]

[DOI: 10.18502/ssu.v28i12.5776]

گرفتند و سپس میزان تولید سایتوکاین‌های اینترفرون گاما و اینترلوکین ۴ از لنفوسیت‌های خون محیطی تحریک شده با فیتوهماگلوتینین به‌روش الیزا مورد ارزیابی قرار گرفت. مطابق با نمودار ۵، مشاهده می‌شود که هر سه غلظت ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از شیره انجیر قادر به مهار و کاهش معنادار ترشح اینترفرون گاما از لنفوسیت‌های خون محیطی تحریک شده در مقایسه با کنترل مثبت بوده‌اند. به‌طوریکه میزان این سیتوکاین از مقدار ۲۴۵±۲/۲ پیکوگرم در میلی‌لیتر در کنترل مثبت به ۱۵±۰/۶ پیکوگرم در میلی‌لیتر در غلظت ۴۰۰ میکروگرم عصاره کاهش یافته است. در مورد اینترلوکین ۴ نیز براساس نمودار ۶ میزان تولید این سایتوکاین نیز در هر سه غلظت به‌طور معناداری نسبت به کنترل مثبت کاهش یافته است. میزان این سیتوکاین که در کنترل مثبت ۴۷/۳±۰/۴ پیکوگرم در میلی‌لیتر بوده است در غلظت ۴۰۰ میکروگرم عصاره به ۱۸/۹±۱/۲ پیکوگرم در میلی‌لیتر رسید.

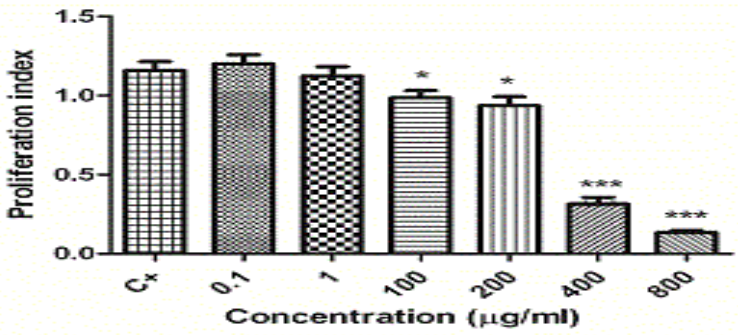


نمودار ۱: اثر مهاری عصاره شیره انجیر بر رده های‌سلولی مختلف در زمان ۴۸ ساعت.

جدول ۱: میزان IC_{50} عصاره شیره انجیر بر رشد رده‌های سلولی در مقایسه با یکدیگر

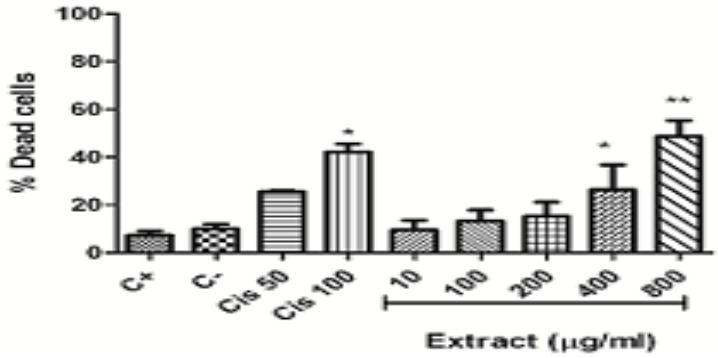
Cell line	IC_{50} (µg/ml)
K562	234
Jurkat	389
Fen	528
Hela	>1000
Raji	812

IC_{50}, Inhibitory concentration 50%

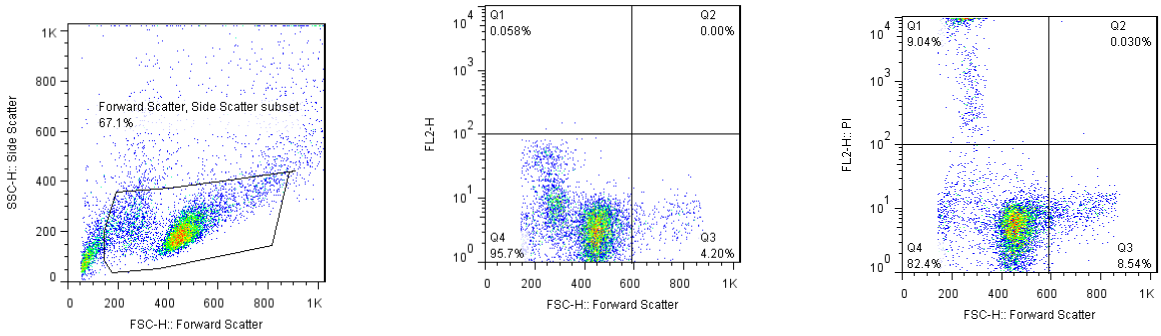


نمودار ۲: اثر غلظت‌های مختلف عصاره شیره انجیر بر تکثیر لنفوسیت‌های خون محیطی تحریک شده با فیتوهماگلوتینین به روش BrdU. کنترل مثبت حاوی سلول و فیتوهماگلوتینین بدون عصاره می‌باشد. $p^{*}<۰/۰۵$ و $p^{***}<۰/۰۰۱$ در مقایسه با کنترل مثبت.

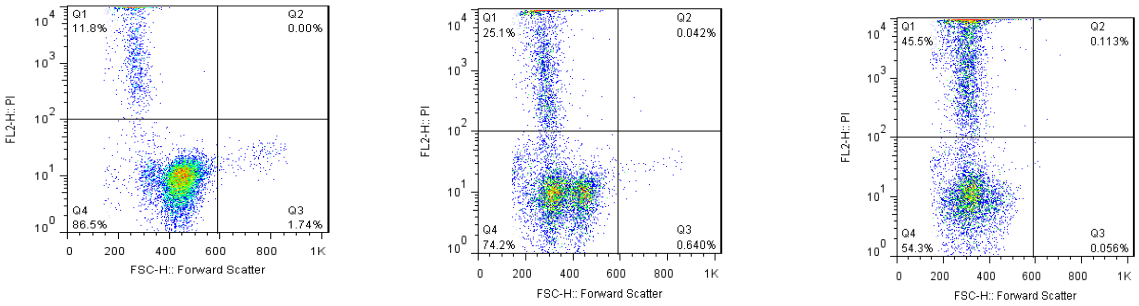
[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-25]
[DOI: 10.18502/ssu.v28i12.5776]



نمودار ۳: اثر غلظت‌های مختلف عصاره شیره انجیر بر میزان از بین رفتن لنفوسیت‌های خون محیطی تحریک شده با فیتوهماگلوتینین به روش فلوسیتومتری با رنگ‌آمیزی پروپیدیوم یدید. کنترل منفی (C-) فاقد عصاره و فیتوهماگلوتینین و کنترل مثبت (C+) حاوی فیتوهماگلوتینین و فاقد عصاره می‌باشد.
سیس‌پلاتین ;Cis. ۰/۰۵>p* و ۰/۰۱>P** در مقایسه با کنترل مثبت



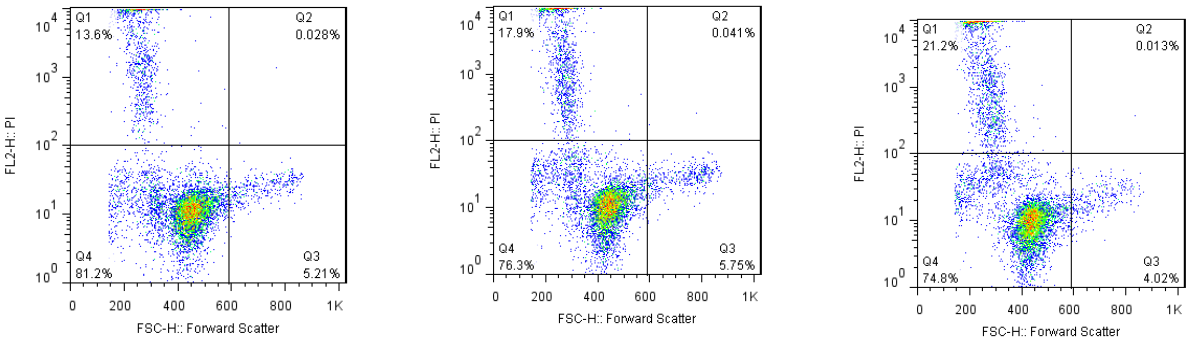
Gating | Unstained | Positive control



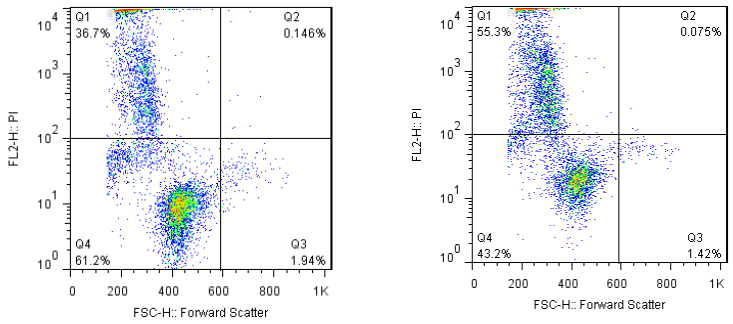
Negative control | Cisplatin (50 µg/ml) | Cisplatin (100 µg/ml)

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-25]

[DOI: 10.18502/ssu.v28i12.5776]



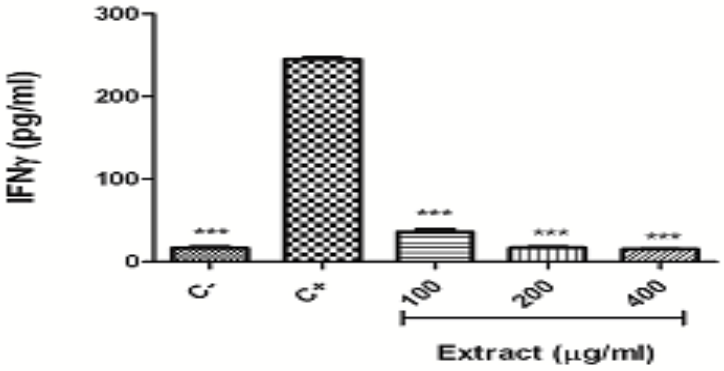
Extract (10 µg/ml) Extract (100 µg/ml) Extract (200 µg/ml)



Extract (400 µg/ml) Extract (800 µg/ml)

نمودار ۴: نمودار فلوسایتومتری تاثیر غلظت‌های مختلف عصاره شیره انجیر بر بقای لنفوسیت‌های خون محیطی رنگ‌آمیزی شده باپروپیدیوم یدید. کنترل منفی فاقد عصاره و فیتوهماگلوتینین و کنترل مثبت حاوی فیتوهماگلوتینین و فاقد عصاره می‌باشد.

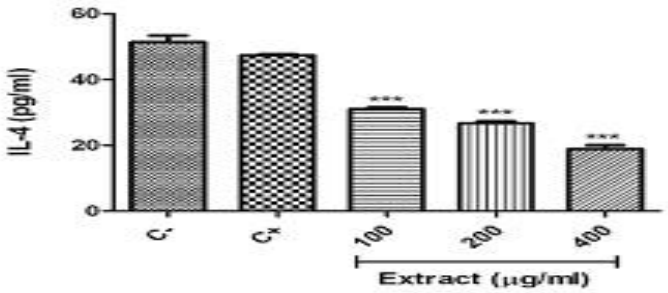
سلول‌ها در مربع سمت چپ بالا به عنوان مرده (PI positive) در نظر گرفته شده‌اند.



نمودار ۵: اثر غلظت‌های مختلف عصاره شیره انجیر بر میزان تولید اینترفرون گاما از لنفوسیت‌های خون محیطی تحریک شده با فیتوهماگلوتینین. کنترل منفی (C-) فاقد عصاره و فیتوهماگلوتینین و کنترل مثبت (C+) حاوی فیتوهماگلوتینین و فاقد عصاره می‌باشد. $p < ۰/۰۰۱$ *** در مقایسه با کنترل مثبت.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-25]

[DOI: 10.18502/ssu.v28i12.5776]



نمودار ۶: اثر غلظت‌های مختلف شیره گیاه انجیر بر میزان تولید اینترلوکین ۴ از لنفوسیت‌های خون محیطی تحریک شده با فیتوهماگلوتینین.
کنترل منفی (C-) فاقد عصاره و فیتوهماگلوتینین و کنترل مثبت (C+) حاوی فیتوهماگلوتینین و فاقد عصاره می‌باشد.
*** $p < ۰/۰۰۱$ در مقایسه با کنترل مثبت

بحث

گیاهان دارویی با سابقه طولانی در ایران در درمان بیماری‌های مختلف استفاده می‌شوند. انسان متمدن امروزی با توجه به پیشرفت علم و تولید داروها و مواد شیمیایی به‌دلیل عوارض جانبی کمتر و بهره اقتصادی بیشتر و تمایل به استفاده از فرآورده‌های طبیعی در درمان بیماری‌ها دوباره در دامن طبیعت به جستجوی گیاهان دارویی و سنتی بازگشته است. تحقیقات مختلف نشان داده است که برخی از گیاهان دارویی دارای خواص ایمونومدولاتوری هستند. هم‌اکنون فرآورده‌های متعددی با منشاء گیاهی به‌عنوان محرک سیستم ایمنی در اشکال دارویی مختلف در بازار موجود است. هم‌چنین فراورده‌هایی با خواص ضد التهابی مورد استفاده قرار می‌گیرند. از طرفی دیگر افزایش تعداد مبتلایان به سرطان در سطح جهان، سرطان را به‌عنوان یک معضل بهداشتی در سطح جهانی مطرح نموده و مبارزه با آن را جزء اولویت‌های بهداشتی درمانی قرار گرفته است (۷). تاکنون تحقیقات گسترده‌ای جهت دستیابی به داروهای ضد سرطان از منابع گیاهی صورت گرفته است، به‌عنوان مثال ترکیبات موجود در گیاه پروانش (*Vinca rosea*) شامل ۳۰ آلکالوئید است که از میان آن‌ها وین‌کریستین و وین‌بلاستین کاربرد بالینی پیدا نموده‌اند (۸). در مطالعه‌ای که متولی‌زاده اردکانی و همکاران انجام داده‌اند کتاب‌های الحاوی (رازی)، قانون در طب (ابن سینا)، مخزن الادویه (عقیلی خراسانی) و اختیارات بدیعی (انصاری شیرازی) مورد بررسی قرار است و داروهای مورد استفاده در طب سنتی جهت درمان سرطان را استخراج کرده‌اند. در این مطالعه، ۱۰۲ گیاه داروئی برای در مان سرطان معرفی شده‌اند که یکی از این گیاهان انجیر می‌باشد (۹). میوه تازه و خشک شده انجیر هر دو شامل مقادیر زیادی ترکیبات پلی‌فنولیک هستند و منبعی غنی از آنتی‌اکسیدان‌ها برای انسان می‌باشند (۱۰). در مطالعات مختلف گیاهانی که دارای عملکرد آنتی‌اکسیدانی بوده‌اند اثرات ضد سرطانی نیز از خود نشان داده‌اند و توانسته‌اند تکثیر برخی رده‌های سلول‌های سرطانی را مهار کنند (۱۱-۱۲)، بر همین اساس می‌توان بیان داشت که گیاه انجیر با توجه به اثر قوی آنتی‌اکسیدانی، می‌تواند اثر ضد سرطانی مناسبی نیز داشته باشد. در مطالعه حاضر شیره انجیر توانست بر رشد رده‌های سلولی Fen، K562، Hela، Jurkat و Raji تاثیر بگذارد. نتایج حاصل نشان‌دهنده رابطه مستقیم میان غلظت عصاره با مهار رشد سلول‌ها بود و البته عصاره شیره انجیر بیشترین تاثیر مهاری را بر رشد سلول‌های K562 که یک رده سلولی سرطان لنفوئیدی خون است داشت. به‌طوریکه این عصاره در غلظت ۲۳۴ میکروگرم در میلی‌لیتر رشد ۵۰ درصد از سلول‌های K562 را مهار نمود. کمترین اثر مهاری این شیره بر سلول‌های Hela با IC_{50} بیش از هزار میکروگرم در میلی‌لیتر بود. در یک مطالعه دیگر که توسط خدارحمی و همکاران انجام گردیده است نیز اثر عصاره شیره درخت انجیر بر رده سلولی Hela مورد بررسی قرارگرفته است و اثرات سیتوتوکسیک این عصاره با IC_{50} معادل ۱۷ میکروگرم در میلی‌لیتر گزارش شده است. این تفاوت از یک سو می‌تواند به‌دلیل اختلاف در ترکیبات موثره گیاه که در مناطق مختلف رویش می‌یابد باشد و از سوی دیگر

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-25]
[DOI: 10.18502/ssu.v28i12.5776]

به احتمال زیاد مرتبط با نوع عصاره است چرا که در مطالعه خدارحمی و همکاران عصاره مورد بررسی شیره درخت انجیر بوده است در حالی‌که در مطالعه حاضر شیره میوه انجیر مورد بررسی قرار گرفته است (۱۳). در مطالعه‌ای که قندهاری و همکار انجام داده‌اند عصاره انجیر باعث کاهش اندازه تومور پستان در رت گردید (۱۴). در مطالعه تزکان نیز اثر شیره انجیر بر بیان مولکولی به نام Led-7d گزارش شده است که می‌تواند نشانگر اثر ضد متاستازی این عصاره باشد (۱۵). شیره انجیر در همراهی با اشعه فرابنفش میزان زنده بودن سلول‌های ملانومایی A375 را نیز کاهش داده است (۱۶). به‌منظور بررسی تأثیر ایمونومدولاتوری عصاره، ابتدا تاثیر آن بر تکثیر لنفوسیت‌ها بررسی شد که نتایج نشان‌دهنده کاهش تکثیر لنفوسیتی با افزایش غلظت عصاره بود. به منظور بررسی آنکه این اثر ناشی از مهار تکثیر و رشد لنفوسیت‌ها و یا به دلیل اثرات سیتوتوکسیک عصاره است، زنده بودن لنفوسیت‌ها به روش رنگ‌آمیزی با پروپیدیوم یدید پس از قرار گرفتن در برابر غلظت‌های مختلف عصاره به‌وسیله دستگاه فلوسیتومتری بررسی و میزان ورود رنگ پروپیدیوم یدید به درون سلول‌های مرده مورد ارزیابی قرار گرفت. عصاره مورد نظر تنها در غلظت ۴۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر و بیشتر از آن به‌صورت معناداری ($p<۰/۰۵$) اثرکشندگی در لنفوسیت‌های خون محیطی داشت و تفاوت معنی‌داری در درصد سلول‌های مرده بین سلول‌های تیمار شده با غلظت‌های کمتر از ۴۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر عصاره و گروه سلول‌های کنترل مشاهده نگردید. این نتایج نشان می‌دهد که عصاره در غلظت‌های کمتر از ۴۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر دارای اثر مهاری بر رشد سلول‌ها و در غلظت‌های بالاتر دارای اثر سیتوکسیک می‌باشد. بر حسب اطلاعات ما تاکنون تاثیر شیره انجیر بر لنفوسیت‌های خون محیطی بررسی نشده است اما در یک مطالعه روی نوع دیگری از انجیر اثرات تحریکی مشاهده گردیده است. مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۶ بر روی اثر ایمونومدولاتوری عصاره متانولی ریشه *Ficus benghalensis* در موش‌ها انجام شده است غلظت‌های مختلف عصاره متانولی در موش موجب افزایش فعالیت ایمنی سلولی و هومورال شد که این افزایش فعالیت در ارتباط مستقیم با دوز عصاره بود. هم‌چنین در مطالعه آزمایشگاهی، این عصاره قادر به افزایش فعالیت فاگوسیتی سلول های نوتروفیل انسانی بود (۱۷). در یک مطالعه درون تنی که ویکاس و همکاران بر روی موش با گروه شاهد و مداخله انجام دادند بیان شده است که عصاره اتانولی برگ گیاه انجیر اثر تحریکی بر روی فعالیت سیستم ایمنی سلولی و هومورال دارد (۱۸). این نتایج نشانگر اثرات متفاوت اجزای مختلف درخت انجیر بر سیستم ایمنی می‌باشد. ترشح سیتوکین‌ها از اولین نشانه های پاسخ سلول‌های T به‌مواد محرک ایمنی است. سلول‌های T کمکی (T helper) بعد از تمایز به دو گروه Th1 و Th2 در طی پاسخ اولیه سیتوکین‌های متفاوتی را تولید می‌کنند. سلول‌های Th1 تولیدکننده اینترفرون گاما می‌باشند که از عوامل مهم فعال‌سازی ماکروفاژها می‌باشد. سلول‌های Th2 نیز اینترلوکین ۴ می‌سازند که در پاسخ ایمنی هومورال نقش مهمی را ایفا می‌نمایند. طیف سیتوکین‌های تولید شده توسط زیر گروه‌های سلول‌های T کمکی نقش مهمی در کنترل پاسخ‌های ایمنی ایفا می‌کند. در این مطالعه میزان تولید سایتوکاین‌های اینترفرون گاما و اینترلوکین ۴ از لنفوسیت‌های خون محیطی تحریک شده با فیتوهماگلوتینین با روش الیزا اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که هر سه غلظت ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از شیره انجیر قادر به مهار و کاهش معنادار ترشح اینترفرون گاما از لنفوسیت‌های خون محیطی تحریک شده در مقایسه با کنترل مثبت بودند. در مورد اینترلوکین ۴ نیز میزان تولید این سایتوکاین در هر سه غلظت به‌طور معناداری نسبت به‌کنترل مثبت کاهش یافت. قابل ذکر است که به دلیل آنکه غلظت ۴۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر عصاره در رنگ‌آمیزی با رنگ پروپیدیوم یدید اثرات توکسیک نشان داد لذا کاهش تولید سایتوکاین‌ها در این غلظت احتمالاً مرتبط با اثرات توکسیک عصاره است. بر حسب اطلاعات ما تاکنون تاثیر شیره انجیر بر لنفوسیت‌های خون محیطی بررسی نشده است. در یک مطالعه توسط تیان و همکاران تاثیر پلی‌ساکاریدهای استخراج شده از انجیر بر افزایش تولید اینترلوکین ۱۲ و اینترفرون گاما از

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-25]

[DOI: 10.18502/ssu.v28i12.5776]

سلول‌های دندریتیک نشان داده شده است (۱۹). هم‌چنین تاثیر پلی ساکاریدهای انجیر بر افزایش اینترلوکین یک و فاکتور نکروز دهنده تومور (TNF) در ماهی گزارش شده است (۲۰). قابل ذکر است که تاثیر ضد توموری عصاره شیره انجیر در غلظت نسبتاً بالا مشاهده گردید که این امر از یک طرف محدودیت استفاده از آن را می‌تواند نشان دهد و از طرف دیگر لزوم شناسایی ترکیبات موثره را گوشزد می‌نماید چراکه امکان دارد ترکیبات موثره در مقادیر کم در عصاره موجود باشند.

نتیجه‌گیری

در انتها به‌عنوان نتیجه‌گیری می‌توان بیان داشت که شیره انجیر دارای اثرات سیتوتوکسیک بر رده‌های سلولی سرطانی مورد مطالعه به‌خصوص رده لوسمیک K562 بود و لذا می‌تواند در مطالعات آینده جهت از بین بردن سلول‌های سرطانی مورد توجه قرار گیرد. در مورد اثرات ایمونومدولاتوری شیره انجیر نیز می‌توان بیان داشت که این عصاره مهارکننده مناسبی برای فعالیت سیستم ایمنی به‌خصوص لنفوسیت‌ها می‌باشد و می‌تواند در بیماری‌های التهابی و مرتبط با سیستم ایمنی مورد توجه و مطالعه بیشتر قرار بگیرد.

سپاس‌گزاری

این مقاله از پایان‌نامه دکتری عمومی خانم حمیده اعظمی استخراج و با حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی شیراز (طرح ۷۲۸۲) به انجام رسیده است.

حامی مالی: معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شیراز

تعارض در منافع: وجود ندارد.

References:

1-Badgujar SB, Patel VV, Bandivdekar AH, Mahajan RT. ***Traditional Uses, Phytochemistry and Pharmacology of Ficus Carica: A Review.*** Pharm Biol 2014; 52(11): 1487-503

2-Barolo MI, Ruiz Mostacero N, López SN. ***Ficus Carica L. (Moraceae): An Ancient Source of Food and Health***. Food Chem 2014; 161: 119-27.

3-Vinson JA, Zubik L, Bose P, Samman N, Proch J. ***Dried Fruits: Excellent in Vitro and in Vivo Antioxidants***. J Am College Nutr 2005; 24: 44-50.

4-Badgujar SB, Patel VV, Bandivdekar AH, Mahajan RT. ***Traditional Uses, Phytochemistry and Pharmacology of Ficus Carica: A Review.*** Pharm Biol 2014; 52(11): 1487-503.

5-Touzot M, Cacoub P, Bodaghi B, Soumelis V, Saadoun D. ***IFN-α Induces IL-10 Production and Tilt the Balance Between Th1 and Th17 in Behçet Disease.*** Autoimmun Rev 2015; 14(5): 370-5.

6-Walsh GM. ***Biologics Targeting IL-5, IL-4 or IL-13 for the Treatment of Asthma- An Update.*** Expert Rev Clin Immunol 2017; 13(2): 143-49.

7-Mousavi SM, Montazeri A, Mohagheghi MA, Jarrahi AM, Harirchi I, Najafi M, et al. ***Breast Cancer in Iran: An Epidemiological Review.*** Breast J 2007; 13(4): 383-91.

8-Esmaeilbeig M, Kouhpayeh SA, Amirghofran Z***. An Investigation of the Growth Inhibitory Capacity of Several Medicinal Plants from Iran on Tumor Cell Lines***. Iran J Cancer Prev. 2015; 8(5): e4032.

9-Motavalizadeh Ardakani A, Hashemi M, Safakish M, Alam Bagheri A, Baradaran Shekohi S, Mosadegh M. ***Cancer Therapy in Iranian Traditional Medicine***. J Trad Med Islam Iran 2012; 3(S1): 1-15.[Persian]

10-Marrelli M, Menichini F, Statti GA, Bonesi M, Duez P, Menichini F, Conforti F. ***Changes in the Phenolic and Lipophilic Composition, In the Enzyme***

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-25]

[DOI: 10.18502/ssu.v28i12.5776]

Inhibition and Antiproliferative Activity of Ficus Carica L. Cultivar Dottato Fruits During Maturation. Food Chem Toxicol 2012; 50(3-4): 726-33.

11-Ju EM, Lee SE, Hwang HJ, Kim JH. ***Antioxidant and Anticancer Activity of Extract from Betula Platyphylla Var. Japonica***. Life Sci 2004; 74(8): 1013-26.

12-Son Y-O, Kim J, Lim J-C, Chung Y, Chung G-H, Lee JC***. Ripe Fruits of Solanum Nigrum L. Inhibits Cell Growth and Induces Apoptosis in MCF-7 cells.*** Food Chem Toxicol 2003; 41(10): 1421-8

13-Khodarahmi GA, Ghasemi N, Hassanzadeh F, Safaie M. ***Cytotoxic Effects of Different Extracts and Latex of Ficus Carica L. on Hela Cell Line.*** Iran J Pharmaceut Res 2011; 10(2): 273.

14-Ghandehari F, Fatemi M. ***The Effect of Ficus Carica Latex on 7, 12-Dimethylbenz (A) Anthracene-Induced Breast Cancer in Rats***. Avicenna J Phytomed 2018; 8(4): 286-295.

15-Tezcan G, Tunca B, Bekar A, Yalcin M, Sahin S, Budak F, et al. ***Ficus Carica Latex Prevents Invasion Through Induction of Let-7d Expression in GBM Cell Lines***. Cell Mol Neurobiol 2015; 35(2): 175-87.

16-Menichini G, Alfano C, Provenzano E, Marrelli M, Statti GA, Somma F, Menichini F, Conforti F. Fig Latex (Ficus Carica L. ***Cultivar Dottato) in Combination with UV Irradiation Decreases the Viability of A375 Melanoma Cells in Vitro***. Anticancer Agents Med Chem 2012; 12(8): 959-65.

17-Gabhe S, Tatke P, Khan T. ***Evaluation of the Immunomodulatory Activity of the Methanol Extract of Ficus Benghalensis Roots in Rats***. Indian J Pharmacol 2006; 38(4): 271.

18-Patil VV, Bhangale SC, Patil VR. ***Studies on Immunomodulatory Activity of Ficus Carica***. Int J Pharm Pharm Sci 2010; 2(4): 97-9.

19-Tian J, Zhang Y, Yang X, Rui K, Tang X, Ma J, Chen J, Xu H, Lu L, Wang S. ***Ficus Carica Polysaccharides Promote the Maturation and Function of Dendritic Cells.*** Int J Mol Sci 2014; 15(7): 12469-79.

20-Yang X, Guo JL, Ye JY, Zhang YX, Wang W. ***The Effects of Ficus Carica Polysaccharide on Immune Response and Expression of Some Immune-Related Genes in Grass Carp, Ctenopharyngodon Idella.*** Fish Shellfish Immunol 2015; 42(1): 132-7.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-25]

[DOI: 10.18502/ssu.v28i12.5776]

Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences
Vol 28| NO 12 | Mar 2021
Received: 7 Feb 2018
Accepted: 12 May 2018

Antitumor Activity and Immunomodulatory Effects of *Ficus carica* Latex

Hamideh Azami[1], Saeed Malek–Hosseini[2], Maryam Mojahed Taghi[3]
Mohammadrasul Zareinejad[4], Zahra Amirghofran[†1,5]

Original Article

Introduction: There are limited studies on the anti-cancer and immunomodulatory effects of the fig fruit latex. In this study, we aimed to investigate the effect of fig fruit latex on several cancer cell lines as well as its effect on lymphocytes proliferation and cytokines secretion.

Methods: After preparing a methanolic extract from fig latex, its effect on various cancer cell lines including Fen (bladder cancer), K562 (myeloid leukemia), Hela (cervix carcinoma), Jurkat (lymphoid leukemia) and Raji (lymphoma) was examined by MTT colorimetric assay. For evaluating the effects of extract on lymphocyte proliferation and viability, BrdU assay and flow cytometry staining were used. Cytokine secretion was measured by ELISA assay.

Results: The extract showed the strongest activity against K562 cell line (IC_{50}, 234 µg/ml) and the least activity against Hela cells (IC_{50} >1000 µg/ml). On evaluation of the immunomodulatory effect of fig by BrdU assay, a reduction in lymphocytes proliferation by increasing the concentration of the extract was observed; proliferation index from 1.2±0.06 at 0.1 µg/ml of the extract reached to 0.13±0.2 at 800 µg/ml. In flow cytometry analysis, a significant cytotoxic effect at concentrations ≥400 µg/ml was observed. The extract at 100 and 200µg/ml had the ability to reduce secretion of interferon (IFN)-γ and interleukin (IL)-4 cytokines.

Conclusion: Fig latex extract showed cytotoxicity on different cells particularly K562 leukemia cells which implied its anticancer activity. This extract at lower concentrations reduced lymphocytes proliferation and cytokine production which showed its immunoinhibitory effects and suggested its possible beneficial in treatment of immune-mediated diseases.

Keywords: *Ficus carica*, Fig latex, Cancer, Immunomodulatory.

Citation: Azami H, Malek-Hosseini S, Mojahed Taghi M, Zareinejad M.R, Amirghofran Z. **Antitumor Activity and Immunomodulatory Effects of *Ficus carica* Latex.** J Shahid Sadoughi Uni Med Sci 2021; 28(12): 3288-99.

[1,2,4]Department of Immunology, School of Medicine, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran.
[3]Department of Pharmacology, School of Medicine, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran.
[5]Department of Immunology and Autoimmune Diseases Research Center, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran.
***Corresponding author: Tel:** 09171710861**, email:** amirghofz@sums.ac.ir

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-25]

[DOI: 10.18502/ssu.v28i12.5776]