اثر عصاره هیدروالکی برگ‌های مورینگا اولیفرا در مدل موشی سرطان کولون القاشده با رده سلولی CACO2

دریافت: ۱۴۰۰/۰۱/۲۴ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۲/۱۵

عادله بلوچی[۱]، محمد فضیلتی[۲]، سعید حبیب الهی[۳]، حبیب‌الله ناظم[۲]، سیدمحمدحسین حجازی[۴*]

۱. دانشجوی دکتری تخصصی بیوشیمی، دانشگاه پیام نور اصفهان، اصفهان، ایران ۲. استاد، گروه زیست شناسی، دانشگاه پیام نور اصفهان، اصفهان، ایران ۳. استادیار، گروه شیمی، دانشگاه پیام نور اصفهان، اصفهان، ایران ۴. استاد، گروه قارچ و انگل شناسی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

چکیده

مقدمه و هدف: ناتوانی داروهای شیمیایی در درمان کامل بیماران مبتلا به سرطان کولون، باعث شده تا این بیماری به یکی از کشنده‌ترین سرطان‌های جهان در هر دو جنس تبدیل شود. گیاهان دارویی عناصر مهم سیستم پزشکی بومی هستند. بسیاری از ترکیبات گیاهی در حال‌حاضر به‌عنوان عوامل ضد سرطان قوی ساخته می‌شوند. با این حال، برخی از عوامل ضد سرطان، هنوز از گیاهان استخراج می‌شوند، زیرا ساختارهای پیچیده‌ای دارند که نمی‌توان آنها را از نظر شیمیایی در مقیاس تجاری سنتز کرد. هدف از این مطالعه بررسی اثرات عصاره هیدروالکلی مورینگا روی سرطان کولون است.

روش کار: در این مطالعه، برگ‌های مورینگا اولیفرا تهیه و مورد تأیید قرار گرفت و عصاره هیدروالکلی آن استخراج شد. محتوای تام فنولی و فلاونوئیدی عصاره اندازه‌گیری شد، سپس با استفاده از روش HPLC، ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی غالب عصاره تأیید و قدرت آنتی اکسیدانی عصاره اندازه‌گیری شد. سپس اثرات سمی عصاره در میزان زنده ماندن سلول سرطان کولون (CACO2) با تست MTT بررسی شد. پس از القای تومور در موش‌های سوری، حجم تومورها پس از تزریق عصاره ارزیابی شد.

یافته‌ها: فلاونوئیدهای با خاصیت آنتی اکسیدانی شناسایی‌شده در این مطالعه شامل کوئرستین، اسید گالیک و اسید کافئیک بودند. نتایج MTT نشان داد که مورینگا در دوز ۱۰۲۴ میکرومولار نمی‌تواند منجر به کشتن ۵۰٪ سلول‌های CACO2 شود؛ ولی با تزریق به تومور، اثرات مثبتی در کاهش حجم تومور دارد. اثرات عصاره در تومور وابسته به دوز و زمان بود.

نتیجه‌گیری: عصاره مورینگا با دارا بودن فلاونوئیدهای مختلف می‌تواند به عنوان یک منبع گیاهی مفید در درمان سرطان کولون مورد استفاده قرار گیرد.

کلیدواژه‌ها: مورینگا اولیفرا، سرطان کولون، CACO2، آنتی اکسیدان

* **نویسنده مسئول:** استاد، گروه قارچ و انگل شناسی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

ایمیل: hejazihossein77@gmail.com **تلفن:** ۰۹۱۳۳۱۱۸۷۱۱ **نمابر:**۰۳۱۳۴۴۸۵۶۱۸

مقدمه

رشد خارج از کنترل سلول‌های بدن، می‌تواند منجر به سرطان شود. سرطان روده بزرگ (کولون) یکی از اصلی‌ترین دلایل مرگ و میر است. بر اساس آمار سال ۲۰۲۱ در آمریکا، سرطان کولون با ۱۰۴۲۷۰ مورد جدید، پس از سرطان‌های پستان، پروستات، ریه و ملانوما رتبه پنجم از نظر موارد جدید ابتلا را به خود اختصاص داده‌است. با این وجود میزان مرگ و میر این سرطان بالا است و تخمین زده می‌شود که در سال ۲۰۲۱ تعداد ۵۲۹۸۰ مورد از بیماران مبتلا به سرطان کولون دچار مرگ می‌شوند که پس از سرطان ریه از نظر کشندگی دومین رتبه را به خود اختصاص داده‌است. همچنین مشخص شده که با وجود اینکه آمار مربوط به شناسایی سرطان روده بزرگ در زنان (۵۱۶۸۰ نفر) و مردان (۵۲۵۹۰ نفر) از نظر آماری برابر است، اما میزان مرگ در مردان (۲۸۵۲۰ نفر) به‌طور معناداری بیشتر از زنان (۲۴۴۶۰ نفر) است (۱).

سرطان پس از حوادث ترافیکی و بیماری‌های قلبی و عروقی، به عنوان سومین علت مرگ در بین مردم ایران شناخته شده‌است. در سال ۱۳۹۴ تعداد افراد فوت‌شده بر اثر سرطان، ۵۴ هزار ثبت شده‌است (۲). بر اساس دومین مطالعه کوهورت برای ثبت سرطان مبتنی بر کل جمعیت ایران در سال ۱۳۹۴ مشخص شد که ۱۱۲۰۶۰ مورد جدید سرطان در ایران شامل ۶۰۴۳۲ مرد (۵۳/۹٪) و ۵۱۶۲۸ زن (۴۶/۱٪) وجود داشت. بر اساس این آمار شایع‌ترین سرطان‌های مردان در ایران شامل سرطان معده (ASR[1]: ۲۱/۲۴%)، سرطان پروستات (۱۸/۴۱٪)، سرطان کولورکتال (۱۶/۵۷٪)، سرطان مثانه (۱۴/۳۰٪)، و سرطان ریه (۱۲/۷٪) و پنج سرطان شایع در زنان ایران شامل سرطان پستان (۳۴/۵۳٪)، سرطان کولورکتال (۱۱/۸۶٪)، سرطان معده (۹/۴۴٪)، سرطان تیروئید (۶/۹۸٪) و لوسمی (۵/۴٪) بود. سرطان کولورکتال در مردان ایرانی سومین رتبه بیشترین شیوع را به خود اختصاص داده‌است؛ این در حالی است که در زنان سرطان کولورکتال پس از سرطان پستان دومین رتبه بیشترین شیوع را به خود اختصاص داده‌است (۲).

عوامل مختلفی در ایجاد سرطان روده بزرگ نقش دارند که از جمله می‌توان به عدم فعالیت بدنی، مصرف زیاد الکل، پیری، سابقه خانوادگی، رژیم‌های پرچرب بدون فیبر و گوشت قرمز، دیابت و بیماری‌های التهابی روده مانند کولیت اولسراتیو و بیماری کرون اشاره نمود (۳).

با توجه به پیشرفت بیماری، سرطان روده بزرگ به مراحل 0 ، I ، II ، III و IV دسته‌بندی شده‌است. درمان مراحل 0 تا III به طور معمول شامل جراحی است؛ در حالی‌که برای مرحله IV و سرطان روده بزرگ عودکننده، از درمان ترکیبی جراحی و شیمی‌درمانی استفاده می‌کنند (۴). بسته به مرحله سرطان و ویژگی‌های بیمار، چندین داروی شیمیایی و رژیم‌های غذایی برای مدیریت سرطان روده بزرگ توصیه شده‌است. داروهایی جدیدی مانند Folfox و Folfiri که جز اصلی آنها داروی ۵-فلورویوراسیل (5-FU) است، همراه با Bevacizumab، Panitumumab یا Cetuximab استفاده می‌شود (۵).

مکانیسم داروهای شیمی‌درمانی به گونه‌ای است که روی سلول‌های فعال مانند سلول‌های سرطانی اثر می‌گذارد که سریع‌تر از سلول‌های طبیعی رشد کرده و تقسیم می‌شوند. اما برخی از سلول‌های سالم نیز از جمله سلول‌های خونی، دستگاه گوارش، سلول‌های فولیکول مو و سلول‌های بیضه فعال هستند. در صورت آسیب دیدن سلول‌های سالم، عوارض جانبی شیمی‌درمانی مشاهده می‌گردد. از جمله این عوارض جانبی می‌توان به خستگی، سر درد، درد عضلانی، درد معده، اسهال، استفراغ، گلو درد، ناهنجاری‌های خونی، یبوست، آسیب به سیستم عصبی، اختلال حافظه، از دست دادن اشتها و ریزش مو اشاره کرد (۶).

از آنجایی که گیاهان حاوی ترکیبات شیمیایی بسیاری هستند که اثرات درمانی آنها تأیید شده‌است و از طرفی عوارض جانبی بسیار کمتری نسبت به داروهای شیمیایی دارند، در طول تاریخ در درمان بیماری‌های مختلف استفاده شده‌اند. یکی از این گیاهان، مورینگا[2] است که به دلیل ارزش غذایی و مزایای آن در بهبود و درمان بسیاری از بیماری‌ها، در طب سنتی لقب درخت معجزه به آن داده‌اند (۷).

گیاه مورینگا که در کتب طب سنتی با نام‌های «بان»، «شجرۀ البان» و «شوع» و دانۀ آن «حب البان» شناخته شده، از تیره کلم‌سانان می‌باشد که شامل حدود سیزده گونه با برگ‌های مرکب و میوه پوشینه نیام مانند هستند (۸). مورینگا غنی از ترکیبات مختلفی اعم از قند ساده، رامنوز و گروه‌های منحصر به فردی از ترکیبات به نام گلوکز اینولات‌ها و ایزوتیوسیانات‌ها می‌باشد. ساقه این گیاه حاوی دو نوع آلکالوئید

۱. میزان شیوع استانداردشده بر اساس سن در هر ۱۰۰ هزار نفر

[2]Moringa oleifera

به نام‌های مورینگی و مورینگینی است. صمغ خالص‌سازی‌شده حاصل از مورینگا حاوی آرابینوز، گالاکتوز، اسید گلوکورونیک، رامنوز، مانوز و زایلوز است. خاکستر این گیاه غنی از پتاسیم و کلسیم است (۹). گل‌های آن حاوی اسید آمینه، سوکروز، دی گلوکز، مقادیر بسیار جزیی آلکالوئید، موم، کوئرستین و کامپفرول است و پیگمان‌های فلاونوئید نیز در آن مورد تأیید قرار گرفته‌است (۱۰). از فاز اتیل استات عصاره اتانولی غلاف مورینگا، ترکیبات ضد فشار خون تیوکاربامات و ایزوتیوسیانات گلیکوزاید استخراج شده‌است (۱۱).

ترکیبات استرولی فراکشن‌های اصلی روغن حاصل از دانه مورینگا به صورت قابل توجهی با سایر روغن‌های خوراکی موجود متفاوت است. ترکیب اسید چرب روغن دانه‌های این گیاه نشان می‌دهد که دانه‌ها در دسته روغن‌های با محتوای اسید اولئیک بالا قرار می‌گیرد و همچنین این گیاه منبع خوبی از توکوفرون‌های مختلف α و δ می‌باشد (۱۲).

وجود ترکیبات آنتی اکسیدانی فراوانی در مورینگا تأیید شده‌است. یکی از این اجزاء، ترکیبات فنولی و فلاونوئیدها هستند. مکانیسم آنتی‌اکسیدانی این مواد، مهار تشکیل گونه‌های فعال اکسیژن از طریق مهار آنزیم‌های تشکیل‌دهنده رادیکال‌ها، برداشت عناصر ضروری دخیل در تولید رادیکال آزاد، حذف رادیکال‌ها و کاهش آنها می‌باشد (۱۳). گروهی دیگر از ترکیبات مورینگا، ایزوتیوسیانات‌ها هستند. طبق مطالعات، پودر مورینگا دارای خاصیت محافظتی علیه زخم‌های گوارشی است و حتی اثر قوی‌تر از امپرازول دارد و این به دلیل ترکیبات ایزوتیوسیاناتی است که هم ضد التهاب و هم تنظیم‌کننده سیستم ایمنی می‌باشد (۱۳). عصاره مورینگا به دلیل اثر بر روی ماکروفاژ و نوتروفیل و مهار فاگوسیتوز، دارای خاصیت سرکوب‌کننده سیستم ایمنی است (۱۳).

امروزه افزایش مقاومت سرطان‌ها به شیمی درمانی، یکی از مشکلات بخش درمان است (۱۴). بنابراین تحقیق برای توسعه داروهای مؤثر بدون ایجاد مقاومت و با اثرات جانبی کمتر، از اهمیت زیادی برخوردار است. با توجه به اینکه در حال حاضر بسیاری از داروهای شیمیایی حاصل فرآورده‌های به‌دست‌آمده با منشأ طبیعی از جمله گیاهان یا مشتقی از آنها هستند (۱۵) این امیدواری وجود دارد که تحقیقات روی گیاهان دارای خواص ضد سرطانی در آینده منجر به کشف داروهای جدید با منشأ گیاهی گردد. با توجه به مطالب ذکرشده، در این مطالعه گیاه مورینگا اولیفرا انتخاب شد که اثرات آن در سرطان‌های مختلف اثبات شده‌است. هدف این مطالعه شناسایی و تأیید ترکیبات مؤثر آنتی اکسیدانی عصاره مورینگا و بررسی اثرات آنها روی سلول‌های سرطانی کولون و سرطان مدل موشی کولون است.

روش کار

در مطالعه حاضر، برگ‌های گیاه مورینگا اولیفرا تهیه (شرکت گیاه دارو بارش جهرم، شیراز) و توسط متخصص گیاه‌شناسی دانشگاه اصفهان ارزیابی و تأیید شد. پس از تأیید گونه مورینگا، برگ‌های تهیه شده، شستشو و مواد زاید آنها جداسازی شد. پس از خشک‌کردن، برگ‌ها در ظرف شیشه‌ای تمیز و دربسته به آزمایشگاه منتقل شد.

تهیه عصاره با روش سوکسله

برای تهیه پودر یکدست، ابتدا برگ‌های مورینگا اولیفرا (۲۵ گرم) در آون (دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد) به مدت ۲۴ ساعت خشک شد. سپس عمل آسیاب‌کردن برگ‌ها توسط آسیاب برقی انجام و پودر تهیه‌شده با عبور از الک با اندازه مش ۸۰ غربال شد. در مرحله استخراج، از متانول ۹۹٪ (نسبت ۱ به ۱۰) استفاده شد. ابتدا نمونه‌ها داخل کاغذ صافی واتمن پیچیده شدند و سپس کاغذ داخل سوکسله قرار گرفت و متانول به آنها اضافه شد. پس از اتمام استخراج، متانول اضافی با دستگاه تقطیر در خلأ (روتاری) در دمای ۵۰ درجه سانتیگراد تبخیر و درصد خلوص عصاره بالا رفت. عصاره به دست‌آمده در داخل بطری با در بسته در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

تعیین محتوای فنولی و فلاونوئیدی کل عصاره

برای تعیین محتوای کل ترکیبات فنولی عصاره تهیه‌شده از معرف فولین سیوکالتیو استفاده شد (۱۶). ابتدا عصاره، آب مقطر، و معرف فولین سیوکالتیو به ترتیب به نسبت‌های ۲۰ میکرولیتر، ۱/۱۶ میلی‌لیتر و ۱ میلی‌لیتر با هم ترکیب و به مدت ۸ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شدند. سپس ۳۵۰ میکرولیتر محلول کربنات سدیم (۲۰٪ وزنی) به آنها اضافه شد و پس از انکوباسیون به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴۰ درجه سانتیگراد، جذب نمونه‌ها در طول موج ۷۶۵ نانومتر ثبت شد. منحنی استاندارد با استفاده از گالیک اسید رسم شد و میزان ترکیبات فنولی بر مبنای اسید گالیک و به‌صورت میلی‌گرم در گرم عصاره بیان شد.

در مطالعه حاضر، روش Meda و همکاران برای تعیین

مقدار فلاونوئید کل عصاره استفاده شد (۱۷). بدین منظور محلول ۲٪ آلومینیوم کلرید در حلال متانول به عصاره به نسبت ۱ به ۱ افزوده شد و پس از انکوباسیون در دمای اتاق به مدت ۳۰ دقیقه، میزان جذب نمونه در طول موج ۴۱۵ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر تعیین شد. منحنی استاندارد با استفاده از کوئرستین رسم شد. مقدار کل فلاونوئید عصاره بر مبنای کوئرستین و به‌صورت میلی‌گرم در گرم عصاره بیان شد.

شناسایی و تأیید ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی عصاره مورینگا با روش کروماتوگرافی HPLC

در این پژوهش، استاندارد سه ترکیب فنولی و فلاونوئیدی با نام‌های کوئرستین، اسید گالیک و کافئیک اسید از شرکت سیگما تهیه شدند و پس از آماده‌سازی آنها (ترکیب ۰/۰۰۱ گرم استاندارد با ۵ میلی‌لیتر متانول) و صاف کردن مخلوط توسط فیلتر ۰/۲ میکرون، به دستگاه HPLC تزریق شدند. سپس عصاره مورینگا (۵ میلی لیتر) پس از صاف شدن توسط فیلتر به داخل دستگاه تزریق شد. فاز متحرک شامل ۵۰٪ متانول و ۵۰٪ استونیتریل با سرعت جریان ۰/۹ میلی‌لیتر در دقیقه در دمای اتاق از ستون C18 با مشخصات (۲۵۰mm, 5µm ×۴/۶) عبور داده‌شد. جذب نمونه‌ها در طول‌موج ۳۷۰ nm اندازه‌گیری شد. آنالیز نمونه‌ها توسط آشکارساز Agilent 1100 انجام شد (Agilent 1100 SY-8100 UV/VIS Detector) و پس از مقایسه زمان بازداری حاصل از نمونه‌های استاندارد و عصاره برگ مورینگا اولیفرا، ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی (کوئرستین، اسیدگالیک و اسید کافئیک) شناسایی و میزان آن با رسم منحنی کالیبراسیون کوئرستین، اسید گالیک و اسیدکافئیک محاسبه شد.

سنجش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی با روش رادیکال آزاد DPPH (۲ و ۲ دی فنیل ۱- پیکریل هیدرازیل)

عصاره برگ مورینگا در حلال متانول به نسبت ۱۰ میلی‌گرم و ۲۵ میلی‌لیتر حل شد. محلول DPPH و غلظت‌های متفاوت عصاره به نسبت‌های ۱ به ۴ میلی‌لیتر در ۵ لوله آزمایش با هم ترکیب شدند و به مدت ۱۵ دقیقه در محیط تاریک انکوبه شدند. نمونه شاهد هم فقط حاوی ۱ میلی لیتر DPPH و ۲ میلی‌لیتر متانول بود. پس از صفر کردن اسپکتروفتومتر در مقابل متانول، میزان جذب تمامی نمونه‌ها در طول موج ۵۱۷ نانومتر تعیین و درصد مهار نمونه‌ها محاسبه شد (۱۸).

سنجش قدرت احیاء ترکیبات آنتی اکسیدان (FRAP)

برای سنجش قدرت احیاءکنندگی ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی عصاره، ۱ میلی‌لیتر عصاره مورینگا اولیفرا در غلظت‌های متفاوت (۱۰۰-۸۰-۴۰-۲۰) میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تهیه و به محلولی مخلوط (۲/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات ۰/۲ مولار و ۲/۵ میلی‌لیتر فری سیانید پتاسیم) اضافه شد و در نهایت میزان جذب در طول موج ۷۰۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفوتومتر اندازه‌گیری شد (۱۹).

کشت سلولی و تست MTT

پس از تهیه، سلول‌های CACO2 (انستیتو پاستور تهران، ایران) در محیط DMEM محتوی گلوتامکس، ۱۰٪ سرم جنین گاوی (FBS) و یک درصد استرپتومایسین-پنی‌سیلین کشت و در انکوباتور CO2 با دمای ۳۷ °C ، CO2 ٪۵ و رطوبت اشباع تا رسیدن به تراکم ۸۰ درصدی نگهداری شدند. این سلول‌ها در مرحله اول برای تست MTT استفاده شد و در مرحله بعدی برای القای سرطان در موش‌های C57BL/6 به‌کار رفت.

از روش MTT برای بررسی میزان بقای سلولی و تعیین IC50 استفاده شد. ابتدا سلول‌ها شمارش گردیده و در یک پلیت ۹۶ خانه‌ای به میزان cell/well ۱۵۰۰۰ریخته و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور CO2 قرار داده‌شد. سپس غلظت‌های ۱۶، ۳۲، ۶۴، ۱۲۸، ۲۵۶، ۵۱۲ و ۱۰۲۴ میکرومولار عصاره در محیط کشت حاوی ۶ درصد FBS تهیه و به میزان ۱۰۰ میکرولیتر جایگزین محیط موجود در چاهک‌ها شد و ۲۴ ساعت در انکوباتور CO2 قرار گرفت. بعد از زمان موردنظر، محتوای چاهک‌ها تخلیه و ۱۰۰ میکرولیتر از محلول MTT (mg/ml ۰/۵) به چاهک‌ها اضافه گردید. بعد از ۴ ساعت قرارگیری در انکوباتور CO2، محتویات تخلیه و ۱۰۰ میکرولیتر DMSO به منظور حل‌کردن کریستال‌های فورمازان اضافه و بعد از ۱۰ دقیقه، شدت رنگ تولیدشده در ۵۷۰ نانومتر با الایزا ریدر خوانش گردید. تکرارها به صورت هشت‌تایی بودند. چاهک‌های حاوی سلول و فاقد عصاره به عنوان کنترل در نظر گرفته شدند.

حیوانات

تعداد ۲۴ موش نر C57BL/6 در حدود وزنی ۳۰ گرم و سن ۴-۳ هفته از مؤسسه رویان اصفهان خریداری شدند. حیوانات تحت شرایط کنترل‌شده، در دمای ۲±۲۲ درجه سانتی‌گراد در قفس‌های بزرگ و مدت زمان روشنایی و تاریکی هر ۱۲ ساعت بدون محدودیت در دسترسی به آب و غذا به مدت ۷ روز نگهداری و سپس به طور تصادفی در ۴ گروه تقسیم و در قفس‌های جداگانه قرار گرفتند. ۱- گروه کنترل: شامل ۶ موش سرطانی بدون دریافت عصاره، ۲- گروه تیمار اول: شامل ۶ موش سرطانی با ۱۴ تزریق داخل توموری عصاره با غلظت ۰/۰۸ گرم بر کیلوگرم وزن بدن در دو هفته، ۳- گروه تیمار دوم: شامل ۶ موش سرطانی با ۱۴ تزریق داخل توموری عصاره با غلظت ۰/۰۴ گرم بر کیلوگرم وزن بدن در دو هفته، ۴- گروه تیمار سوم: شامل ۶ موش سرطانی با ۱۴ تزریق داخل توموری عصاره با غلظت ۰/۰۲ گرم بر کیلوگرم وزن بدن در دو هفته.

ایجاد مدل سرطان کولون در موش سوری

القای سرطان با تزریق زیرجلدی یک میلیون سلول CACO2 آماده‌شده در ۲۰۰µL محلول PBS استریل به نمودار سوسپانسیون انجام شد. پس از تأیید تشکیل تومورها، مراحل تزریق عصاره به تومورها انجام و پس از طی یک دوره ۲۸ روزه، در نهایت موش‌ها با رعایت اصول اخلاقی کار با حیوانات و توسط کتامین (۶۰ mg/kg) و زایلازین (۱۰ mg/kg) بیهوش و سپس کشته‌شدند و نمونه‌های مورد نیاز برای آزمایش‌های بعدی تهیه شدند.

تجزیه و تحلیل آماری

آنالیز داده‌ها با SPSS V.22 انجام شد. در ابتدا نرمال بودن داده‌ها توسط تست Shapiro-Wilk normality بررسی شد. سپس برای مقایسه داده‌های نرمال بین دو گروه از آزمون Independent T-test و برای مقایسه داده‌های نرمال بین سه و بیش از سه گروه از تست One way ANOVA و همچنین تست تعقیبی Tukey استفاده شد. داده‌ها به‌صورت mean±SD گزارش شدند. $p<0/05$ معادل اختلاف معنی‌دار در نظر گرفته شد.

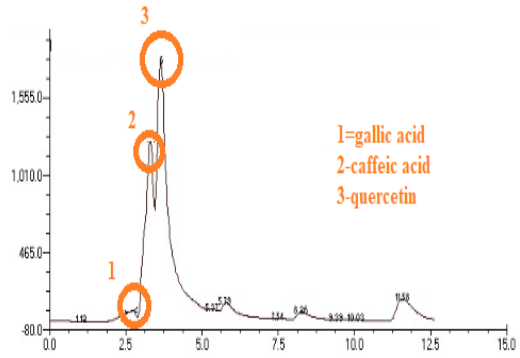
نتایج

محتوی تام فنول و فلاونوئید عصاره

میزان فلاونوئید تام ۲/۱۵±۵۸/۵ میلی‌گرم اسید کوئرستین بر گرم عصاره خشک و میزان فنول تام ۰/۸±۲۲/۶۵ میلی‌گرم اسید گالیک بر گرم عصاره خشک مشاهده شد.

بررسی ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی عصاره با روش HPLC

در ابتدا استانداردهای اسید کافئیک، کوئرستین و اسید گالیک به دستگاه داده شد و مشخص شد که به ترتیب در زمان‌های بازداری ۳/۶۱، ۳/۷۸ و ۳/۵۹ از ستون کروماتوگرافی خارج شدند. با مقایسه نتایج HPLC عصاره برگ مورینگا الیفرا با نتایج استانداردهای مورد مطالعه، ترکیبات کوئرستین، اسید گالیک و اسید کافئیک شناسایی شدند (نمودار ۱).



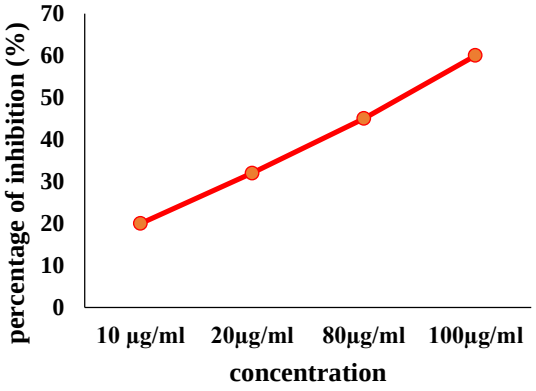
نمودار ۱. کروماتوگرام حاصل از کروماتوگرافی عصاره برگ مورینگا اولیفرا. با مقایسه نتایج حاصل از این کروماتوگرام با نتایج استانداردها

میزان ترکیبات شناسایی‌شده بر حسب mg/100g به ترتیب برای کوئرستین، اسید کافئیک و اسید گالیک برابر با ۰/۷۸۹± ۲/۹۸، ۰/۱۲۳± ۲/۹۰ و ۰/۹۷۸± ۱/۹۹ به دست آمد.

بررسی اثر آنتی اکسیدانی عصاره با روش حذف رادیکال‌های آزاد DPPH

با افزایش غلظت عصاره، تعداد بیشتری از رادیکال‌های آزاد احیا شده و در نتیجه میزان جذب کاهش می‌یابد و چون میزان جذب نمونه با میزان مهار رابطه عکس دارد، با افزایش غلظت عصاره، میزان مهار افزایش می‌یابد. میزان مهار رادیکال‌های آزاد DPPH حدود ۰/۸۱±۴۵ به‌دست آمد. با توجه به نمودار ۲ مشخص شد که با افزایش غلظت عصاره میزان مهار رادیکال

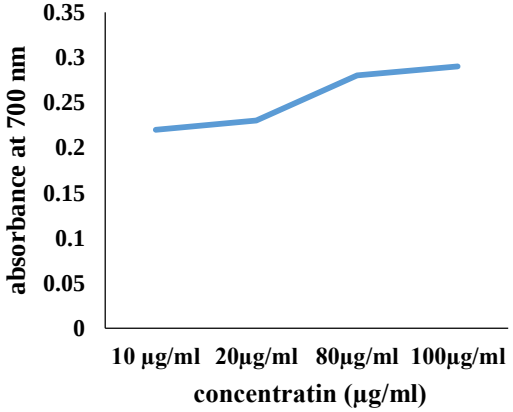
آزاد DPPH به‌طور معنی‌داری افزایش می‌یابد (p<۰/۰۵).



نمودار ۲. فعالیت حذف رادیکال‌های آزاد DPPH عصاره برگ مورینگا الیفرا در غلظت‌های متفاوت

سنجش قدرت احیاء ترکیبات آنتی اکسیدان (FRAP[1])

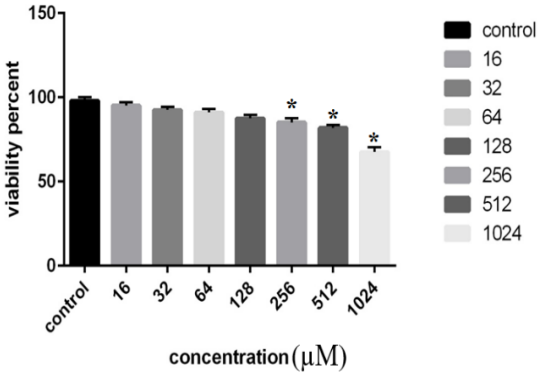
برای سنجش قدرت احیاکنندگی، از تبدیل Fe^{3+} به Fe^{2+} در حضور عصاره‌های متانولی استفاده شد. در این مطالعه، عصاره برگ مورینگا، قدرت احیاء بیشتری را نسبت به اسید آسکوربیک به‌عنوان یک آنتی اکسیدان نشان دادند (نمودار ۳). همچنین مشخص گردید که با افزایش غلظت عصاره قدرت احیاء نیز افزایش می‌یابد. بین قدرت احیا و محتوای فنولی و فلاونوئیدی رابطه خطی و مستقیم وجود داشت.



نمودار ۳. قدرت احیاکنندگی غلظت‌های مختلف عصاره برگ مورینگا اولیفرا (با افزایش غلظت عصاره برگ تبدیل Fe^{3+} به Fe^{2+} (قدرت احیاء ترکیبات فنلی) افزایش یافته و جذب محلول در طول موج ۷۰۰ نانومتر افزایش یافت.

تست MTT

تیمار سلول‌های CACO2 با غلظت‌های ۱۶، ۳۲، ۶۴، ۱۲۸، ۲۵۶، ۵۱۲ و ۱۰۲۴ میکرومولار از عصاره مورینگا، کاهش رشد وابسته به دوز را نشان داد. این نتایج مشخص کرد که عصاره مورینگا در هیچ یک از دوزهای مورد استفاده منجر به کشته شدن ۵۰٪ از سلول‌های CACO2 نشده است. ولی دوزهای ۲۵۶، ۵۱۲ و ۱۰۲۴ میکرومولار از عصاره مورینگا، میزان زنده مانی سلول‌ها نسبت به گروه کنترل را به طور معنی‌دار کاهش داد (p<۰/۰۵).

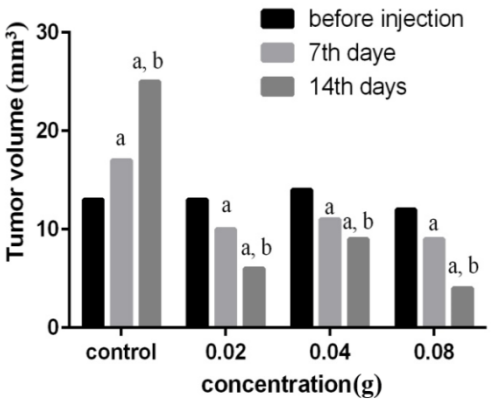


نمودار ٤. میزان درصد زنده‌مانی سلولی رده CACO2 در مجاور غلظت‌های مختلف مورینگا الیفرا به روش MTT. *: مقایسه با گروه کنترل

نتایج آزمایش in vivo

طبق نمودار ۵ مشخص شد که با تزریق عصاره مورینگا در هر ۳ دوز ۰/۰۲، ۰/۰۴ و ۰/۰۸ گرم به تومورها پس از گذشت یک هفته و دو هفته، میزان حجم تومور کاهش معنادار داشته است (p<۰/۰۰۱)؛ میزان حجم تومور در دوز ۰/۰۸ گرم کاهش بیشتری نسبت به دو دوز دیگر داشت (p<۰/۰۰۱).

[1] Ferric reducing antioxidant power assay



نمودار ۵. مقایسه حجم تومور در دوزهای مختلف مورینگا در مدل حیوانی. a: در مقایسه با قبل از تزریق؛ b: در مقایسه با روز هفتم؛ ($p<۰/۰۰۱$).

بحث

سرطان بیماری است که در آن سلول‌های بدن به‌طور غیرعادی تقسیم و تکثیر شده و به بافت‌های سالم منتشر می‌شوند. با توجه به افزایش شیوع مرگ‌ومیر ناشی از سرطان‌های مختلف و نقصان روش‌های شیمی درمانی و پرتو درمانی در فرم‌های پیشرفته سرطان، نیاز به شیوه‌های جدید درمان احساس می‌شود. مانع اصلی دیگر شیمی درمانی این است که به سلول‌های طبیعی آسیب می‌زند، زیرا داروهای شیمی درمانی ترکیبات غیر هدفمند هستند که توانایی تمایز بین سلول‌های توموری و طبیعی را ندارند. این دلایل، اغلب بر اثربخشی درمان تأثیر گذاشته و درمان قطعی بیماران مبتلا به سرطان را غیر ممکن می‌سازد (۲۰).

یکی از موارد ضروری در درمان سرطان، ریشه‌کن کردن سلول‌های سرطانی با توقف چرخه سلولی و یا القای آپوپتوز با حداقل سمیت در سلول‌های طبیعی است (۲۰). به همین دلیل استفاده از داروهای گیاهی با کمترین اثر سمی در سلول‌های طبیعی می‌تواند گامی مفید در رسیدن به این مهم باشد. طبق گزارش سازمان بهداشت جهانی، برخی از کشورها هنوز هم به درمان‌های گیاهی به‌عنوان منبع اصلی دارو متکی هستند و کشورهای در حال توسعه نیز از مزایای ترکیبات طبیعی برای اهداف درمانی به‌طور فزاینده‌ای استفاده می‌کنند (۲۱). مواد شیمیایی موجود در گیاهان از جمله متابولیت‌های ثانویه نظیر ترکیب‌های فنولیک، ترپنوئیدها و آلکالوئیدها به‌طور گسترده در صنایع غذایی و دارویی به‌طور ویژه در درمان سرطان استفاده می‌شوند. از طرفی بسیاری از داروهای ضد سرطان که از منابع طبیعی مشتق شده‌اند با موفقیت به داروهای فعلی ضد سرطان مانند پاکلی تاکسل، وین کریستین و وین بلاستین تبدیل شده‌اند (۲۲).

گیاه مورینگا اولیفرا دارای بسیاری از ترکیبات درمانی با ویژگی‌های مفید برای تندرستی از جمله خواص ضد اکسیدانی و خواص ضد سرطانی است (۲۳). عصاره این گیاه با تداخل در تومورزایی، رشد و پیشرفت سلول‌های سرطانی، پتانسیل ضد توموری دارد (۲۳). نتایج تحقیقات نشان می‌دهد که عصاره مورینگا با ۷۷٪ مهار تولید رادیکال‌های آزاد و اثرات آسیب‌پذیر گونه‌های فعال اکسیژن از توانایی آنتی اکسیدانی بسیار بالایی برخوردار بوده و می‌تواند به کاهش استرس اکسیداتیو کمک کند (۲۴). با توجه به اینکه رادیکال‌های آزاد و استرس اکسیداتیو می‌توانند منجر به بیماری‌هایی ازجمله سرطان شوند، یافتن ترکیباتی که می‌توانند باعث کاهش استرس اکسیداتیو و رادیکال‌های آزاد در بدن شوند، می‌تواند منجر به یافتن درمان‌های جدید برای سرطان باشد. ویژگی‌های آنتی اکسیدانی مورینگا به دلیل وجود مقادیر زیاد فلاونوئیدها و اسیدهای فنولیک در عصاره‌های گیاهی است که توانسته است این گیاه و محصولات گیاهی آن را به‌عنوان گروهی از آنتی اکسیدان‌های طبیعی با اثرات مفید بر سلامت و تندرستی انسان معرفی کند که دارای کاربردهای دارویی فراوانی هستند (۲۵).

در مطالعه Ahmed A Abd-Rabou و همکاران مشخص شد که افزایش غلظت تیمار با عصاره برگ مورینگا باعث کاهش زنده ماندن سلول‌های سرطان کولون Caco-2 و HCT 116 به ترتیب تا ۵۷/۸۳٪ و ۷۶/۳۷٪ می‌شود، که این نتایج نشان می‌دهد تعامل طولانی مدت با این محصول طبیعی، تأثیر مخرب سلول‌های کولون را کاهش می‌دهد. این در حالی بود که اثرات مهاری عصاره روی سلول‌های نرمال نسبت به سلول‌های سرطان کولورکتال به‌طور معنی‌داری کمتر بود (۲۳). نتایج مطالعه حاضر نیز در راستای مطالعات گذشته بود که میزان زنده ماندن سلول‌های سرطان کولون Caco-2 در غلظت ۱۰۲۴ میکرومولار از عصاره برگ مورینگا به ۶۷٪ کاهش پیدا کرد. این کاهش زنده ماندن نسبت به گروه کنترل (۱۰۰٪) کاهش معنی‌دار داشت. با توجه به این اطلاعات مشخص می‌شود که عصاره مورینگا توانایی افزایش مرگ در سلول‌های سرطانی کولون را دارد.

کاهش زنده ماندن سلول‌ها طبق مقالات گذشته به القای آپوپتوز نسبت داده‌شده است. Abd-Rabou و همکاران با مقایسه القای آپوپتوز در سلول‌های سرطان کولون HCT 116 در مقایسه با سلول‌های نرمال توسط عصاره مورینگا نشان دادند که عصاره مورینگا می‌تواند باعث القای آپوپتوز در سلول سرطان کولون بین ۲۲۰-۱۸۰٪ در مقایسه با مقدار ۱۰۰٪ در سلول کنترل شود (۲۳). نتایج ما نیز در راستای گزارشات پیشین بود که عصاره برگ مورینگا باعث افزایش محسوسی در تعداد کل سلول‌های آپوپتوتیک سرطان‌های روده بزرگ می‌گردد (۲۳). اثرات مهاری شگفت‌انگیز عصاره برگ‌ها و ریشه مورینگا بر سلول‌های سرطان پستان MCF7 و سلول‌های کولورکتال HCT 116/ Caco-2 نیز مشاهده شده‌است که به وجود برخی ترکیبات طبیعی در عصاره از جمله eugenol، D-allose و ایزوپروپیل ایزوتیوسینات نسبت داده می‌شود (۲۳).

در رابطه با اثرات عصاره مورینگا در القای آپوپتوز Ghosh و همکاران نیز گزارش کردند که این اثر عصاره به دلیل افزایش بیان پروتئین آپوپتوزی Bax به‌واسطه ترکیب Eugenol در عصاره است (۲۶). پس از روشن‌شدن مکانیسم القای آپوپتوز توسط Eugenol، Abd-Rabou و همکاران مکانیسم احتمالی عملکرد Eugenol را با تنظیم کاهشی پروتئین E2F1 گزارش کردند (۲۷). در مطالعات گذشته مشخص شده‌است که میزان افزایش آپوپتوز تدریجی و وابسته به دوز است (۲۳). این اثرات در این مطالعه نیز اثبات شد که افزایش دوز عصاره برگ مورینگا منجر به کاهش زنده‌ماندن سلول‌های سرطان کولون می‌گردد. در این مطالعه نیز تنها دوزهای ۱۰۲۴، ۵۱۲ و ۲۵۶ میکرومولار از عصاره برگ مورینگا توانست باعث تفاوت معنی‌دار نسبت به گروه کنترل گردد؛ در حالی که در دوزهای پایین‌تر تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. بنابراین می‌توان چنین پیشنهاد کرد که افزایش آپوپتوز در حضور عصاره‌های مورینگا می‌تواند ناشی از تنظیم کاهشی E2F1 و تنظیم افزایشی پروتئین‌های Bax باشد (۲۷).

Tragulpakseerojn و همکاران با استخراج ترکیبات عصاره مورینگا با روش HPLC گزارش کردند که این تکنیک برای جداسازی ترکیبات فلاونوئیدی گلیکوزیدها، آستراگالین و ایزوکوئرستین از برگ‌های اولیفرا بسیار مؤثر و مفید است (۲۸). در این مطالعه نیز با استفاده از تکنیک HPLC، سه ماده فلاونوئیدی و فنولی کوئرستین، اسید کافئیک و اسید گالیک از عصاره برگ‌های مورینگا شناسایی و تعیین غلظت شدند. در مطالعات گذشته به نقش کوئرستین در مهار سلول‌های سرطانی پستان، کولون، پروستات، تخمدان، اندومتر و ریه اشاره شده‌است (۲۹). ویژگی ضد سرطانی این ماده ناشی از اثر چشمگیر آن روی افزایش آپوپتوز، مهار ساخت DNA، مهار رشد و تغییر مسیرهای پیام‌رسانی سلول‌های سرطانی است (۳۰). اثرات آنتی اکسیدانی و ضد تکثیری ایزوکوئرستین نیز روی سلول‌های سرطانی اثبات شده‌است (۳۱). بنابراین، وجود ایزوکوئرستین و کوئرستین در برگ اولیفرا ممکن است مسئول خواص امیدوارکننده در پیشگیری و درمان سرطان کولون نیز باشد که به طور معنی‌داری باعث مهار تکثیر سلول HCT116 در مطالعه Tragulpakseerojn و همکاران (۲۸) و سلول‌های سرطان کولون CACO2 در مطالعه حاضر شدند.

پیشرفت و تهاجم سرطان‌ها از جمله سرطان روده بزرگ با استفاده از مسیرهای PI3K/Akt و RAS/RAF/MEK/ERK انجام می‌شود (۳۲). فعال‌شدن همزمان مسیر Akt و ERK منجر به پیشرفت سرطان و متاستاز می‌شود. بنابراین مسیرهای ERK و Akt برای تکثیر و بقای سلول‌های سرطانی مهم هستند. مشخص شده که عصاره برگ اولیفرا روی این مسیرهای پیام‌رسانی در سرطان روده بزرگ اثر می‌گذارد. نتایج گذشته نشان داده‌است که عصاره برگ مورینگا در سلول‌های سرطانی کولون HCT116 به طور چشمگیری فسفریلاسیون ERK1/2 را مهار و بیان Akt را تا حدودی کاهش می‌دهد. با توجه به این داده‌ها مشخص می‌گردد که گیاه مورینگا می‌تواند منجر به القای آپوپتوز در سلول‌ها گردد و از این طریق از تکثیر سلول‌های سرطان کولون ممانعت می‌کند (۲۸).

اخیرا در رابطه با اثرات مورینگا در القای آپوپتوز به مسیری وابسته به افزایش گونه‌های فعال اکسیژن اشاره شده‌است که با توجه به خواص آنتی‌اکسیدانی مورینگا متناقض است (۳۳). Reda و همکاران اثرات سمی مورینگا در سه رده سلولی سرطان کولون (HCT116، CACO2، HCT116 P53-/-) بررسی کردند. آنها اثبات کردند که عصاره مورینگا به‌واسطه افزایش استرس اکسیداتیو، بر هم‌خوردن یکپارچگی غشا و توقف چرخه سلولی در فاز subG0 باعث القای مرگ سلولی می‌شود (۳۴). برای توجیه این اثرات باید به مطالعات گذشته رجوع کرد. در مطالعه Abd-Rabou و همکاران مشخص شد که اثرات مهاری عصاره مورینگا روی سلول‌های نرمال نسبت

به سلول‌های سرطان کولورکتال به طور معنی‌داری کمتر است و همچنین اثرات القای آپوپتوز این عصاره در سلول سرطان کولون در مقایسه با سلول کنترل ۱۰۰٪ بیشتر است (۲۳). پس می‌توان چنین پیشنهاد کرد که مسیر القای آپوپتوز به‌واسطه استرس اکسیداتیو، به‌طور غالب در سلول‌های سرطانی مشاهده شده‌است.

در این مطالعه اثرات عصاره مورینگا روی تومورها در in vivo هم ارزیابی شد و با تزریق عصاره مورینگا در ۳ دوز ۰/۰۲، ۰/۰۴، و ۰/۰۸ گرم به تومورها پس از گذشت یک هفته و دو هفته، مشخص شد که میزان حجم تومور کاهش معنادار دارد. در مطالعه حاضر، کاهش حجم تومورها وابسته به دوز و زمان بود به‌طوری که میزان حجم تومور در دوز ۰/۰۸ گرم نسبت به دو دوز دیگر و در هفته دوم نسبت به هفته اول کاهش بیشتری داشت. در مطالعه Cuellar-Nunez و همکاران برای اولین بار اثر مهاری برگ‌های مورینگا در یک مدل in vivo از سرطان روده بزرگ القا شده توسط از AOM/DSS گزارش شد (۳۵). آنها با استفاده از تکنیک HPLC توانستند ۹ ترکیب فنولی را در برگ‌های مورینگا شناسایی کنند. آنها گزارش کردند که برگ‌های مورینگا می‌تواند باعث کاهش فعالیت آنزیم‌های مضر از جمله glucosidase-β، glucuronidase-β، tryptophanase و urease در مدفوع و همچنین کاهش ۵۰ درصدی شیوع سرطان در موش‌های CD-1 گردند. این یافته‌ها حاکی از آن است که ترکیبات فعال زیستی مورینگا مانند فیبر غذایی کامل و ترکیبات فنلی ممکن است از نظر شیمیایی دارای اثرات پیشگیری کننده در ابتلا به سرطان باشند (۳۵).

نتیجه‌گیری

با توجه به یافته‌های این مطالعه می‌توان نتیجه گرفت که عصاره برگ‌های مورینگا اولیفرا با داشتن ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی (کوئرستین، اسید کافئیک و اسید گالیک) که در این مطالعه شناسایی و تأیید شدند، می‌تواند اثرات مفیدی در کاهش زنده‌ماندن سلول‌های سرطانی CACO2 و همچنین در کاهش حجم تومورهای کولون در محیط in vivo داشته‌باشد. همچنین اثرات عصاره مورینگا روی تومور وابسته به زمان و دوز است. برای تأیید نتایج حاصل از این مطالعه نیاز به مطالعات in vivo بیشتری در این زمینه است.

تشکر و قدردانی

این مطالعه توسط کمیته اخلاق در علوم‌زیستی دانشگاه پیام‌نور مورد بررسی و با کد IR.PNU.REC.1399.142 مورد تأیید قرار گرفت.

تضاد منافع

نویسندگان مقاله هیچ‌گونه تعارضی در منافع نداشتند.

Reference

1. Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, Jemal A. Cancer Statistics, a Cancer Journal for Clinicians. 2021;71(1):7-33.
2. Roshandel G, Ghanbari Motlagh A, Partovipour E, Salavati F, Hasanpour Heidari S, Mohammadi G, et al. Cancer incidence in Iran in 2014: Results of the Iranian National Population-based Cancer Registry. Cancer Epidemiology. 2019;61:50-8.
3. Aiello P, Sharghi M, Mansourkhani SM, Ardekan AP, Jouybari L, Daraei N, et al. Medicinal plants in the prevention and treatment of colon cancer. Oxidative Medicine and Cellular Longevity. 2019; 2019(10):1-53.
4. Mulder SA, Kranse R, Damhuis RA, de Wilt JH, Rob JT, Kuipers EJ, et al. Prevalence and prognosis of synchronous colorectal cancer. Cancer Epidemiology. 2011;35(5):442-7.
5. Schmoll H, Van Cutsem E, Stein A, Valentini V, Glimelius B, Haustermans K, et al. ESMO Consensus Guidelines for management of patients with colon and rectal cancer. a personalized approach to clinical decision making. Annals of Oncology. 2012;23(10):2479-516.
6. Jyoti D. Side effects chemotherapy. Available from: http://www.cancer.net. 2019.
7. Anwar F, Latif S, Ashraf M, Gilani AH. Moringa oleifera: a food plant with multiple medicinal uses. Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives. 2007;21(1):17-25.
8. Mir Heidar H. Plant knowledge.7th ed .Tehran: Daftare Nashre Farhange-Islami; 1994. (in Persian)
9. Verma VK, Singh N, Saxena P, Singh R. Anti-ulcer and antioxidant activity of Moringa oleifera (Lam) leaves against aspirin and ethanol induced

gastric ulcer in rats. International Research Journal of Pharmacy2012;2(2):46-57.
10. Duraivel S, Shaheda A, Rabbani Basha S, Eesaf Pasha S, Jilani S. Formulation and evaluation of anti-wrinkle activity of cream and nanoemulsion of moringaoleifera seed oil. IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences. 2014;9(4):58-73.
11. Vats S, Gupta T. Evaluation of bioactive compounds and antioxidant potential of hydroethanolic extract of Moringa oleifera Lam. from Rajasthan, India. Physiology and Molecular Biology of Plants. 2017;23(1):239-48.
12. Gupta A, Gautam MK, Singh RK, Kumar MV, Rao CV, Goel R, et al. Immunomodulatory effect of Moringa oleifera Lam. Indian Journal of Experimental Biology. 2010 ;48(11):1157-60.
13. Baldisserotto A, Buso P, Radice M, Dissette V, Lampronti I, Gambari R, et al. Moringa oleifera leaf extracts as multifunctional ingredients for "natural and organic" sunscreens and photoprotective preparations. Journal of Molecules. 2018;23(3):664.
14. Wang X, Zhang H, Chen X. Drug resistance and combating drug resistance in cancer. Cancer Drug Resistance. 2019;2(2):141-60.
15. Katiyar C, Gupta A, Kanjilal S, Katiyar S. Drug discovery from plant sources: An Integrated Aapproach. 2012;33(1):10.
16. Moyo B, Oyedemi S, Masika P, Muchenje V. Polyphenolic content and antioxidant properties of Moringa oleifera leaf extracts and enzymatic activity of liver from goats supplemented with Moringa oleifera leaves/sunflower seed cake. Meat Science. 2012;91(4):441-7.
17. Meda A, Lamien CE, Romito M, Millogo J, Nacoulma OG. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. Food Chemistry. 2005;91(3):571-7.
18. Fakurazi S, Hairuszah I, Nanthini U. Moringa oleifera Lam prevents acetaminophen induced liver injury through restoration of glutathione level. Food and Chemical Toxicology. 2008;46(8):2611-5.
19. Oyaizu M. Studies on products of browning reaction antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. The Japanese Journal of Nutrition and Dietetics. 1986;44(6):307-15.
20. Tian Z, Lin G, Zheng RX, Huang F, Yang MS, Xiao PG. Anti-hepatoma activity and mechanism of ursolic acid and its derivatives isolated from Aralia decaisneana. World Journal of Gastroenterology.2006;12(6):874.
21. Rajeswara Rao B, Singh K, Sastry K, Singh C, Kothari S, Rajput D, et al. Cultivation technology for economically important medicinal plants. Advances in Medicinal Plants. 2015; 6(10): 4103-4112.
22. Manosroi J, Dhumtanom P, Manosroi A. Anti-proliferative activity of essential oil extracted from Thai medicinal plants on KB and P388 cell lines. Cancer Letters. 2006;235(1):114-20.
23. Abd-Rabou AA, Abdalla AM, Ali NA, Zoheir KM. Moringa oleifera root induces cancer apoptosis more effectively than leave nanocomposites and its free counterpart. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention. 2017;18(8):2141.
24. Khalafalla MM, Abdellatef E, Dafalla HM, Nassrallah AA, Aboul-Enein KM, Lightfoot DA, et al. Active principle from Moringa oleifera Lam leaves effective against two leukemias and a hepatocarcinoma. African Journal of Biotechnology. 2010;9(49):8467-71.
25. Meyers KJ, Watkins CB, Pritts MP, Liu RH. Antioxidant and antiproliferative activities of strawberries. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2003;51(23):6887-92.
26.Ghosh R, Ganapathy M, Alworth WL, Chan DC, Kumar AP. Combination of 2-methoxyestradiol (2-ME2) and eugenol for apoptosis induction synergistically in androgen independent prostate cancer cells. The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology. 2009;113(1-2):25-35.
27. Al-Sharif I, Remmal A, Aboussekhra A. Eugenol triggers apoptosis in breast cancer cells through E2F1/survivin down-regulation. BMC Cancer. 2013;13(1):1-10.
28. Tragulpakseerojn J, Yamaguchi N, Pamonsinlapatham P, Wetwitayaklung P, Yoneyama T, Ishikawa N, et al. Anti-proliferative effect of Moringa oleifera Lam (Moringaceae) leaf extract on human colon cancer HCT116 cell line. Tropical Journal of Pharmaceutical Research. 2017;16(2):371-8.
29. Baghel SS, Shrivastava N, Baghel RS, Agrawal P, Rajput S. A review of quercetin: antioxidant and anticancer properties. World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. 2012;1(1):146-60.
30. Naidu P, Kinthada P, Kalyani P, Muralidhar P. Characterization and biological activities of quercetin thiosemicarbazone derivatives: potential anti cancer drugs. International Journal of Biomedical Science . 2012;3(2):24-7.

31. Valentova K, Vrba J, Bancírova M, Ulrichova J, Kren V. Isoquercitrin: pharmacology, toxicology, and metabolism. Food and Chemical Toxicology. 2014;68:267-82.
32. Ye Q, She Q. Integration of AKT and ERK signaling pathways in cancer: biological and therapeutic implications. Journal of Pharmacology and Clinical Toxicology. 2013;1(2):1009.
33. Guon TE, Chung HS. Moringa oleifera fruit induce apoptosis via reactive oxygen species dependent activation of mitogen activated protein kinases in human melanoma A2058 cells. Oncology Letters. 2017;14(2):1703-10.
34. Reda F, Borjac J, Fakhouri R, Usta J. Cytotoxic effect of Moringa oleiferaon colon cancer cell lines. Acta horticulturae. 2017; 1158:45-54.
35. Cuellar Nunez M, Luzardo Ocampo I, Campos Vega R, Gallegos Corona M, De Mejia EG, Loarca Pina G. Physicochemical and nutraceutical properties of moringa (Moringa oleifera) leaves and their effects in an in vivo AOM/DSS-induced colorectal carcinogenesis model. Journal of Food Research International. 2018;105:159-68.

The effect of hydroalcoholic extract of Moringa oleifera leaves in a mouse model of colon cancer induced by CACO2 cell line

Received: 13 Apr 2021 Accepted: 5 May 2021

Adeleh Balouchi[1], Mohammad Fazilati[2], Saeed Habibollahi[3], Habibollah Nazem[2], Seyed Mohammad Hossein Hejazi[4]*

1. PhD student of Biochemistry, Payame Noor University Isfahan, Isfahan, Iran 2. Professor, Department of Biology, Payame Noor University Isfahan, Isfahan, Iran 3. Assistant Professor, Department of Chemistry, Payame Noor University Isfahan, Isfahan, Iran 4. Professor, Department of Mycology and Parasitology, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

Abstract

Introduction: The inability of chemical drugs to completely treat patients with colon cancer has made it one of the deadliest cancers in the world in both sexes. Medicinal plants are important elements of the indigenous medical system. Many plant compounds are currently being developed as potent anticancer agents. However, some anticancer agents are still extracted from plants because they have complex structures that cannot be chemically synthesized on a commercial scale. The aim of this study was to evaluate the effects of Moringa hydroalcoholic extract on colon cancer.

Materials and Methods: Moringa leaves were purchased and approved, and then its hydroalcoholic extract was extracted. The total phenolic and flavonoid content of the extract was measured, and then the dominant phenolic and flavonoid compounds of the extract were confirmed by HPLC method. The antioxidant power of the extract was measured. Then, the toxic effects of the extract on colon cancer cell viability (CACO2) were investigated by MTT assay. After tumor induction in mice, tumor volume was assessed after extract injection.

Results: The flavonoids with antioxidant properties identified in this study included quercetin, gallic acid and caffeic acid. MTT results showed that Moringa at a dose of 1024 µM could not kill 50% of CACO2 cells, but by injecting it into the tumor, it had positive effects on reducing tumor volume. The effects of the extract on the tumor were dose and time dependent.

Conclusion: Moringa extract with different flavonoids can be used as a useful plant source in the treatment of colon cancer.

Keywords: Antioxidant, CACO2, Colon Cancer, Moringa Oleifera

***Corresponding Author:** Professor, Department of Mycology and Parasitology, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

Email: hejazihossein77@gmail.com **Tel:** +98 9133118711 **Fax:** +98 3134485618