Research Paper

Comparing the Effects of *Aloe Vera* Leaf Extract On K562 Tumor Cell and Peripheral Blood Mononuclear Cells

Minoo Shaddel[1], *Hamid Shamsi[1,2], Payman Tavakoli[2], Seyyed Meysam Abtahi Foroushani[2], Roya Shamsi[3]

1. Department of Parasitology and Mycology, School of Medicine, AJA University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
2. Department of Microbiology, Faculty of Veterinary medicine, Urmia University, Urmia, Iran.
3. Department of Clinical Nutrition and Dietetics, School of Nutrition Sciences and Food Technology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Use your device to scan and read the article online

Citation Shaddel M, Shamsi H, Tavakoli P, Abtahi Foroushani SM, Shamsi R. [The Effects of Aloe Vera Leaf Extract on the K562 Human Tumor Cell Line and PBMC Cells (Persian)]. Quarterly of "The Horizon of Medical Sciences". 2019; 25(3):216-229. https://doi.org/10.32598/hms.25.3.216

https://doi.org/10.32598/hms.25.3.216

CC BY NC

Received: 16 Oct 2018
Accepted: 09 Apr 2019
Available Online: 01 Jul 2019

Key words:
Aloe Vera leaf extract, K562, MTT

ABSTRACT

Aims *Aloe Vera* is among the crucial medicinal plants, with proven anti-cancer effects. This study aimed to investigate the effect of plant extracts of Aloe Vera Leaf (AVL) on the proliferation of cell lines K562 (erythroleukemia) and Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs).

Methods & Materials The inner parts of the plant, including the gelatinous substance, were emptied, and the outer layer was used to prepare the lyophilized extract. The extract was dissolved in DMSO. K562 cells and PBMCs were cultured with 9.375, 18.75, 37.5, 75, 150, and 300 µg/mL concentrations of AVL for 24, 48, or 72 hours. After cultivation, the IC50 was determined for the K562 and normal PBMCs, using the MTT assay (4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide). Doxorubicin was used as a positive control.

Findings The obtained data suggested that the viability of cells in both the leukemic cell line and normal PBMCs significantly decreased by the treatment with the extract in a dose-dependent manner; however, the AVL toxicity for PBMC was significantly more than K562. IC50 for the standard drug was also significantly less than AVL extract.

Conclusion AVL possesses cytotoxic effects for K562 and PBMCs. Nevertheless, it has no selective benefits and has more cytotoxic effects on PBMCs.

Extended Abstract

1. Introduction

Considering the susceptibility and treatment problems of malignant diseases, as well as their high treatment costs, this study was designed. We examined the traditional usage of Aloe Vera (AV) plant.

Winters et al. (1980) explored the effects of AV extracts on human tumor cells. They reported anti-tumor and protective effects of it on healthy human embryonic lung cells.

AV is among the most important species of medical plants. Many studies have reported the anti-tumor effect of its leaves. This study aimed to evaluate the effect of Aloe Vera Leaf (AVL) extract on the proliferation of K562 erythroleukemic cell lines and Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs).

***Corresponding Author:**
Hamid Shamsi, DVM.
Address: Department of Microbiology, Faculty of Veterinary medicine, Urmia University, Urmia, Iran.
Tel: +98 (873)8720789
E-mail: Shamsi.hamid@gmail.com

2. Methods

This experimental (descriptive-cross sectional) study was conducted using PBMCs, in the Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, in 2016. To isolate PBMCs, 15 mL of heparinized blood (200 u/mL) was obtained from 3 volunteers who were informed about the test (healthy, 25 years old, 75 kg). The inner contents of the AV plant, including the gel, were drained and a lyophilized aqueous extract was prepared. The obtained extract was dissolved in DMSO. The AVL extract, at the concentrations of 9.375, 18.75, 37.5, 75, 150, and 300 µg/mL, was exposed to K562 cells and PBMCs at 24, 48, and 72 hours after the treatment. After incubation, IC50 values in K562 cells and PBMCs were measured by the MTT assay. Doxorubicin, as a positive control.

3. Results

The obtained data suggested a decrease in the viability of K562 cells and normal PBMCs after the treatment with the extract, as a concentration-dependent method. However, the toxicity of AVL extract to PBMCs was significantly higher than that of the K562 cells. The IC50 for the standard drug was significantly lower than that of the AVL extract (Figure 1, 2, 3, 4 & 5).

4. Discussion

Chen et al. (2005) studied the inhibitory effect of Cyanidin (a major constituent of the AVL) on tumor cell growth and its induced apoptosis. Their results were consistent with those of the present study regarding cancer cell killing. Moreover, Yeh et al. (2009) investigated the effect of cytotoxic triterpenes (extracted from Antrodia camphorate) on some colon cancer cells, including HT-29, HCT-116, and SW-480. They reported the cytotoxic and apoptotic effects of this compound, which is in agreement with our results in terms of killing cancer cells; it indicates that triterpenes compounds have cancer-killing effects. Their study; however, revealed that triterpenes were not toxic to mam-

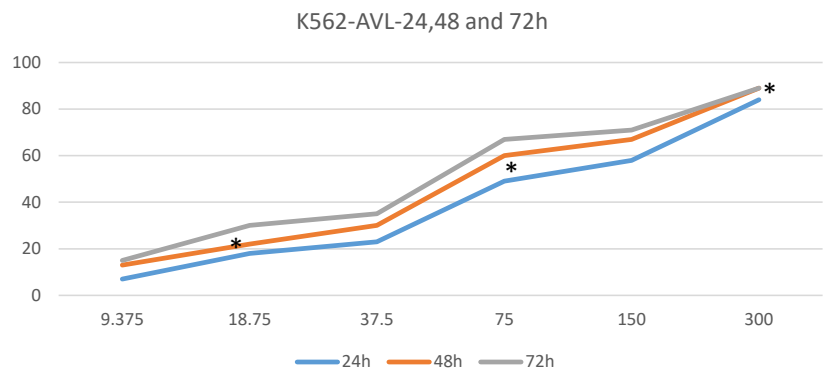


Figure 1. Inhibitory effects on K562 cells at different concentrations (µg/mL) and 24, 48, and 72 h after exposure
*The significant difference level was set at P<0.05

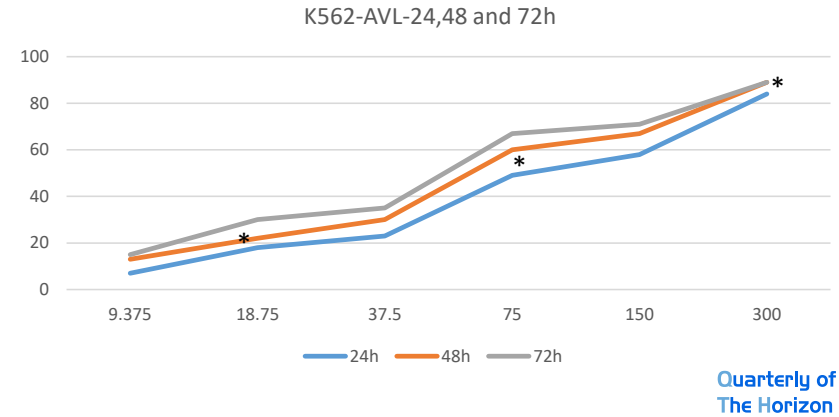
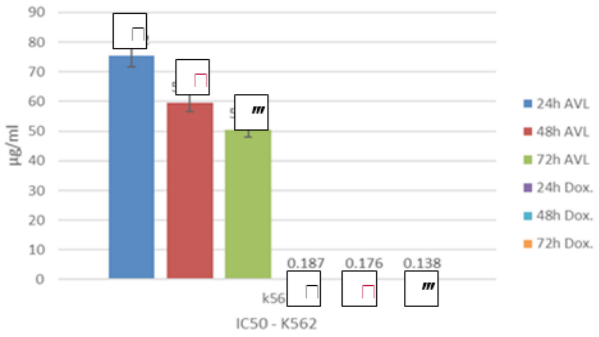


Figure 2. The inhibitory effect on PBMCs at different concentrations (µg/mL) and 24, 48, and 72 h after exposure
*The significant difference level was set at P<0.05

	24 h	48 h	72 h
	IC50 (µg/ml) ±S.E	IC50 (µg/ml) ±S.E	IC50 (µg/ml) ±S.E
AVL			
K562	75.32 ± 1.4	59.61 ± 2.37	50.56 ± 1.18
PBMC	34 ± 1.73	22.99 ± 2.04	20.56 ± 1.12
Dox			
K562	0.187 ± 4×10^{-4}	0.176 ± 8.6×10^{-4}	0.138 ± 8.5×10^{-5}
PBMC	0.645 ± 7.9×10^{-4}	0.521 ± 3.1×10^{-4}	0.506 ± 7.3×10^{-5}

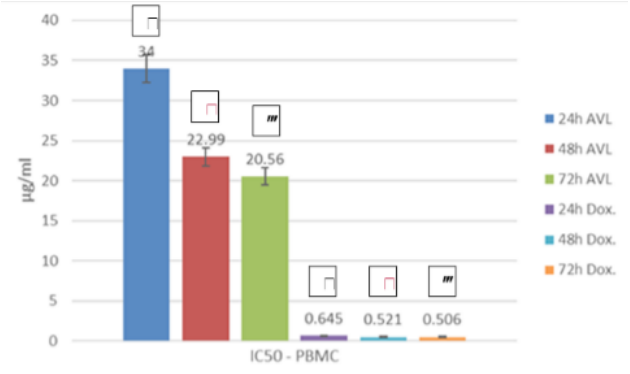
Figure 3. IC50 values in the control and intervention groups at 24, 48, and 72 hours

Quarterly of
The Horizon of Medical Sciences



Quarterly of
The Horizon of Medical Sciences

Figure 4. Comparing IC50 effect in the control and intervention groups on K562 cells at 24, 48, and 72 h after exposure



Quarterly of
The Horizon of Medical Sciences

Figure 5. Comparing IC50 effect in the control and intervention groups on PBMCs at 24, 48, and 72 h after exposure

mary epithelial (MCF10A) and primary foreskin fibroblast (HS68) cells.

It is recommended that the effects of each component of the AVL extract be studied separately, and the results be compared to determine which components have the most anti-cancer properties. Apart from the laboratory costs, there was no limitation conducting this study.

5. Conclusion

The AVL extract was toxic to K562 erythroleukemic cells and PBMCs; however, its toxicity was more significant in PBMCs. The standard drug doxorubicin effect revealed a significant difference between the IC50 of K562 cells and PBMCs; whereas its effect on K562 cells was four times higher.

Ethical Considerations

Compliance with ethical guidelines

All ethical principles were fully respected and necessary permissions were obtained.

Funding

This study received financial support from AJA University of Medical Sciences.

Authors' contributions

Minoo Shaddel and Hamid Shamsi each had a contribution rate of 35%; Payman Tavakoli, Seyyed Meysam Abtahi Foroushani, and Roya Shamsi each had a contribution rate of 10%.

Conflicts of interest

The authors declare no conflict of interest

Acknowledgements

The authors would like to thank laboratory officials at Urmia University and AJA University of Medical Sciences.

This Page Intentionally Left Blank

بررسی اثرات عصاره پوسته آلوئه‌ورا بر رده سلولی توموری k۵۶۲ و سلول‌های PBMC

مینو شاددل[۱]، *حمید شمسی[۲،۱]، پیمان توکلی[۲]، سید میثم ابطحی فروشانی[۲]، رؤیا شمسی[۳]

۱- گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارتش جمهوری اسلامی ایران (آجا)، تهران، ایران.
۲- گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.
۳- گروه تغذیه بالینی و رژیم درمانی، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.

تاریخ دریافت: ۲۴ مهر ۱۳۹۷
تاریخ پذیرش: ۲۱ فروردین ۱۳۹۸
تاریخ انتشار: ۱۰ تیر ۱۳۹۸

چکیده

اهداف آلوئه‌ورا یکی از گونه‌های مهم گیاهان دارویی به‌شمار می‌رود که اثر ضدتوموری عصاره طبیعی برگ‌های آن نشان داده شده است. این مطالعه با هدف بررسی تأثیر انتخاب عصاره پوسته گیاه آلوئه‌ورا بر روند تکثیر رده سلول‌های K562 (اریترولوکمی) و PBMC (سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی) طراحی شد.

مواد و روش‌ها محتویات داخلی گیاه آلوئه‌ورا که شامل ژل است، تخلیه و از پوسته این گیاه عصاره لیوفیلیزه تهیه شد. این عصاره در DMSO حل شد. عصاره پوسته گیاه آلوئه‌ورا در غلظت‌های ۹/۳۷۵، ۱۸/۷۵، ۳۷/۵، ۷۵، ۱۵۰ و ۳۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در مجاورت سلول‌های اریترولوکمی و سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی در سه زمان ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت قرار گرفت. پس از زمان انکوباسیون، مقادیر IC50 در رده سلولی اریترولوکمی و سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی عادی به وسیله MTT اندازه‌گیری شدند. از داروی دوکسوروبیسین به عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

یافته‌ها داده‌ها حاکی از کاهش درصد زنده‌مانی هر دو رده سلولی اریترولوکمی و سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی عادی بعد از تیمار با عصاره به صورت وابسته به غلظت بودند، اما سمیت عصاره پوسته آلوئه‌ورا برای سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی به صورت قابل ملاحظه‌ای بیشتر از سلول‌های اریترولوکمی است. IC50 برای داروی استاندارد به طور قابل توجهی کمتر از عصاره پوسته آلوئه‌ورا بود.

نتیجه‌گیری عصاره پوسته گیاه آلوئه‌ورا اثر کشندگی روی هر دو رده سلولی اریترولوکمی و سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی داشت. با وجود این، به طور انتخابی عمل نکرده و درجه سمیت آن برای سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی بیشتر بود.

کلیدواژه‌ها:
عصاره پوسته آلوئه‌ورا، PBMC، رده سلولی 562K، تست MTT

مقدمه

سرطان نه‌تنها یکی از شایع‌ترین بیماری‌ها در سطح جهان (یکی از چهار علت مرگ‌ومیر در آمریکا) است، بلکه مهم‌ترین عامل مرتبط با سن است که با تغییرات اپیدمیولوژیک تأثیرگذار در سلامت عمومی و اقتصاد جامعه همراه است [۱]. میزان مرگ ناشی از سرطان در سال ۲۰۰۷ حدود ۱۳ درصد گزارش شده است [۲]. سرطان های خونی دسته بزرگی از بیماری‌های خونی را تشکیل می‌دهند که انسان‌ها را از هر جنس، نژاد، سن و طبقه اجتماعی مبتلا می‌کنند. از جمله آن‌ها لوسمی‌ها هستند که شایع‌ترین نوع بدخیمی‌های خونی محسوب می‌شوند.

لوسمی یک اصطلاح گسترده است که طیفی از بیماری‌ها را پوشش می‌دهد که از کلمات یونانی به معنی سفید و خون گرفته شده است. این سرطان، کلاسی از سارکوماست که به صورت سلول‌های منفرد در خون رشد می‌کند و یکی از چهار سرطان شایع در میان کودکان محسوب می‌شود [۳، ۴]. این بیماری در اثر تکثیر و تکامل ناقص گویچه‌های سفید خون و پیش‌سازهای آن‌ها در خون و مغز استخوان ایجاد می‌شود. در این بیماری تولید طبیعی گویچه‌های سفید خون متوقف شده و توانایی فرد در مقابله با بیماری از بین می‌رود. همچنین سلول‌های لوسمی، تولید دیگر سلول‌های خونی که مغز استخوان می‌سازد را نیز تحت تأثیر قرار می‌دهند [۴].

بسیاری از سرطان‌ها در ابتدا به شیمی‌درمانی پاسخ می‌دهند ولی پس از مدتی مقاومت خود را به شیمی‌درمانی توسعه می‌بخشند. از طرفی داروهای استفاده‌شده در شیمی‌درمانی، عوارض جانبی نامطلوبی را ایجاد می‌کنند. بنابراین توسعه یک روش مؤثر، ارزان‌قیمت و سازگار با محیط زیست و کم‌عارضه برای درمان سرطان ضروری است.

* نویسنده مسئول:
دکتر حمید شمسی
نشانی: ارومیه، دانشگاه ارومیه، دانشکده دامپزشکی، گروه میکروبیولوژی.
تلفن: ۸۷۲۰۷۸۹ (۸۷۳) ۹۸+
پست الکترونیکی: Shamsi.hamid@gmail.com

استفاده از گیاهان دارویی و ترکیبات گیاهی جدید از جمله استراتژی‌های نوین درمانی در دنیا محسوب می‌شود، زیرا اعتقاد بر این است که این ترکیبات علاوه بر اینکه می‌توانند نقش مهمی در درمان و کنترل بیماری‌ها داشته باشند، به علت ماهیت طبیعی خود اثرات جانبی بسیار کمتری نسبت به داروهای شیمیایی دارند [۵].

گیاه آلوئه‌ورا یکی از گونه‌های مهم دارویی به‌شمار می‌رود و با داشتن ۳۶۰ گونه در خانواده لیلیاسئا قرار می‌گیرد و خواص ضدباکتریایی، ضدقارچی، ضدویروسی، ضدالتهابی و ضدتوموری دارد و در بسیاری از عارضه‌ها از جمله التهاب مفاصل، آسم، بیماری‌های گوارشی، مشکلات دندانی و مشکلات پوستی مفید است [۶].

آلوئه‌ورا اجزای مختلفی دارد که هرکدام از آن‌ها اثرات به‌خصوصی را از خود نشان می‌دهند. ازجمله می‌توان به تقویت و تعدیل دستگاه ایمنی بدن در بیماری‌های التهابی و ویروسی (مانند تبخال)، درمان سرطان و ترمیم زخم به‌ویژه در آسیب‌های ناشی از سوختگی اشاره کرد [۷]. بخش لعاب‌دار داخلی این گیاه که شامل قسمت ژل‌مانند است، از ۹۸ تا ۹۹ درصد آب تشکیل شده که در بیماری بازگشت اسید معده به مری استفاده می‌شود [۶، ۸].

مابقی شامل ترکیبات فعالی ازجمله امودین، آلوئزین، آلو امودین، ویتامین‌ها و غیره هستند [۶]. امودین و آلو امودین ضمن اینکه اثر هم‌افزایی روی یکدیگر دارند، خواص ایمونومودولیتوری دارند و روی افزایش تولید آنتی‌بادی علیه کوکساکی ویروس، انواع اکسیژن فعال‌شده و واکنش‌های ناشی از رادیکال‌های آزاد که در فرایندهای التهابی ایجاد می‌شوند و موجب نکروز کبدی در موش می‌گردند، نیز تأثیر دارند [۸].

مطالعات بافت‌شناسی در موش‌های درمان‌شده با آلو امودین نشانگر کاهش در اینفیلتراسیون لنفوسیتی و سلول‌های کوپفر کبدی است. همچنین آلو امودین رفتار دوگانه‌ای در رشد سلول‌ها از خود نشان می‌دهد؛ برای مثال این ماده روی سلول‌های اولیه کبدی موجب تحریک رشد می‌شود. در حالی که به دلیل القای آپوپتوز در رده سلولی SCC کبدی و تومورهای نورواکتودرمال (CH_{27})، موجب مرگ میتوکندری‌ها و سپس خود سلول‌ها شده است. عمل تحریک سیستم ایمنی در آلوئه‌ورا بیشتر مربوط به پلی‌ساکاریدها بوده و بیشترین تأثیر در پلی‌ساکاریدهایی با میانگین وزن مولکولی ۸۰ کیلو دالتون مشاهده شده است [۸].

Diethylhexyl phthalate که از آلوئه‌ورا استخراج می‌شود، خاصیت آنتی‌لوسمیک و آنتی‌موتاژنیک دارد و آپوپتوز سلولی را القا می‌کند. به نظر می‌رسد مهم‌ترین سازوکار ایجاد این اثر از طریق CD95 است [۸]. قسمت پوسته این گیاه نیز شامل ترکیباتی ازجمله pro-، cyanidine، triterpenes، alkaloids و anthocyanidine، saponin، tannin، phenol، flavans و proanthocyanidol است [۹].

در سال ۱۹۸۰ وینترز[1] و همکارانش، اثر ضدتوموری عصاره طبیعی برگ‌های گیاه آلوئه‌ورا را بررسی کردند که در طی آن گزارش شد ضمن اینکه اثرات ضدتوموری از خود نشان داده است، اثر محافظتی نیز بر سلول‌های سالم ریوی جنینی انسانی داشته است و این در حالی است که عصاره تجاری این گیاه فاقد این اثر دوگانه است [۱۰].

لوزیو و همکارانش در سال ۱۹۵۷ رده سلولی اریترولوکمی[2] را از مایع جنینی یک بیمار مبتلا به لوسمی میلوئید مزمن در فاز بحران بلاست کشف و تخلیص کردند. این سلول‌ها، سلول‌های گرد و غیرچسبنده‌اند که با رنگ‌آمیزی رایت‌گیمسا به صورت سلول‌های با قطر ۲۰ میکرومتر و با سیتوپلاسم بازوفیلیک فاقد گرانول هستند که دو یا چند هسته دارند. تعداد کروموزوم‌ها در این سلول‌ها تقریباً ۱/۵ برابر تعداد کروموزوم‌های طبیعی و حدود ۷۰ است و حاوی کروموزوم فیلادلفیا و انکوژن BCR / ABL هستند.

رده سلولی اریترولوکمی به عنوان مدل مناسبی برای مطالعات آزمایشگاهی لوسمی مزمن مغز استخوان[3] است [۱۱]. در راستای مطالب ذکرشده، طراحی این مطالعه با هدف بررسی تأثیر احتمالی عصاره پوسته گیاه آلوئه‌ورا بر روند تکثیر رده سلولی اریترولوکمی و سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی[4] انجام شد.

مواد و روش‌ها

برگ‌های بزرگ و تازه این گیاه پس از تهیه از مراکز فروش و تأیید جنس و گونه گیاه به آزمایشگاه فارماکولوژی واقع در دانشکده داروسازی دانشگاه علوم‌پزشکی شهید بهشتی منتقل شد. محتویات درون گیاه (ژل) جدا شد و درنهایت پوسته باقی‌مانده با دستگاه خردکن برقی خرد شد و به صورت لیوفیلیزه با عنوان عصاره پوسته آلوئه ورا[5] درآمد و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

متعاقباً عصاره لیوفیلیزه یک شب در دی‌متیل سولفواکسید[6] حل شد، سپس به مدت ۵ دقیقه و ۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد و درنهایت پلیت تشکیل شده دور ریخته شد و محلول در تمام آزمایشات استفاده شد [۱۲، ۱۳]. برای AVL به عنوان گروه تیمار، از غلظت استوک ۶۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر

1. Winters
2. K562
3. Chronic Myeloid Leukemia (CML)
4. Peripheral Blood Mononuclear Cell (PBMC)
5. Aloe Vera Leaf Extract (AVL)
6. Dimethyl Sulfixide (DMSO)

و برای داروی دوکسوروبیسین که به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد، از غلظت ۱۰۰ µg/ml استفاده شد.

کشت سلول‌های سرطانی اریترولوکمی

سلولهای سرطانی اریترولوکمی از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه شد و در محیط کشت RPMI1640 با ۱۰ درصد FBS و با سرم جنین گاوی، ۱۰۰ IU/ml پنی‌سیلین و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر استرپتومایسین در انکوباتور با شرایط ۵ درصد CO2 و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شدند [۱۴].

جداسازی سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی

مقدار ۱۵ میلی‌لیتر خون هپارینه (۲۰۰ U/ml) گرفته‌شده از سه داوطلب و مطلع از انجام آزمایش (سالم و با سن ۲۵ سال و وزن ۷۵ کیلوگرم) با همین میزان RPMI1640رقیق شد و سپس به میزان ۸ میلی‌لیتر خون رقیق‌شده روی ۱۵ میلی‌لیتر فایکول ریخته شد و با سرعت ۲۴۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی که در حد فاصل فایکول و خون رقیق‌شده به صورت یک لایه ابری قرار دارند، به وسیله پیپت پاستور به‌آرامی جمع‌آوری شدند و به منظور حذف فایکول همراه آن با پنج میلی‌لیتر محیط کشت RPMI1640 مخلوط و با سرعت ۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید.

درنهایت سلول‌های به‌دست‌آمده به منظورحذف پلاکت‌ها دوباره با محیط کشت RPMI1640مخلوط و با سرعت ۱۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. تعداد و میزان زنده‌مانی سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی به‌دست‌آمده با استفاده از رنگ تریپان بلو تعیین شد [۱۵].

تست MTT برای اریترولوکمی و سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی

از روش MTT برای اندازه‌گیری میزان زنده‌مانی سلول‌های اریترولوکمی و سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی استفاده شد. اساس روش MTT بر پایه توانایی سلول‌های زنده در تبدیل نمک تترازولیوم محلول به فورمازان نامحلول با آنزیم سوکسینات دهیدروژناز میتوکندریایی است. دی‌متیل‌سولفوکساید فورمازان نامحلول را حل کرده و شدت رنگ ایجادشده با دستگاه الایزا قابل سنجش است.

به طور خلاصه، ابتدا سلول‌های اریترولوکمی سانتریفیوژ شمارش شده سپس مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از سلول‌های اریترولوکمی با تراکم ۱۰ هزار و سلول نرمال خون (سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی) به تعداد ۱۰ هزار، هرکدام به صورت مجزا در محیط کشت RPMI1640 حاوی ۱۵ درصد FBS به چاهک‌های میکروپلیت ۹۶خانه‌ای، با غلظت‌های مختلف AVL (در غلظت‌های ۹/۳۷۵، ۱۸/۷۵، ۳۷/۵، ۷۵، ۱۵۰ و ۳۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت اضافه شد.

پس از گذشت زمان‌های مدنظر، به میزان ۲۰ میکرولیتر از محلول ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر MTT به تمامی چاهک‌ها اضافه شد. سپس پلیت‌ها ۴ ساعت دیگر در انکوباتور با شرایط ۵ درصد CO2 و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. در پایان، کریستال‌های رنگ فورمازان رسوب‌یافته در سیتوپلاسم سلول‌ها با افزودن ۱۰۰ میکرولیتر دی‌متیل سولفواکسید به هر چاهک، حل شدند و شدت رنگ به روش الایزا در طول موج ۴۹۲ نانومتر ثبت شد. از داروی دوکسوروبیسین به غلظت یک‌دهم میلی‌مولار به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. برای مقایسه دو داده نقطه‌ای از آزمون تی استودنت و چند داده از تحلیل واریانس یک‌طرفه[7] استفاده شد.

همچنین با استفاده از روش رگرسیون خطی، IC50 (نصف حداکثر غلظت مهاری) برای سلول‌های اریترولوکمی و سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی با درنظرگرفتن P<۰/۰۵ به عنوان سطح معنی‌دار در تمامی آزمون‌ها محاسبه شد.

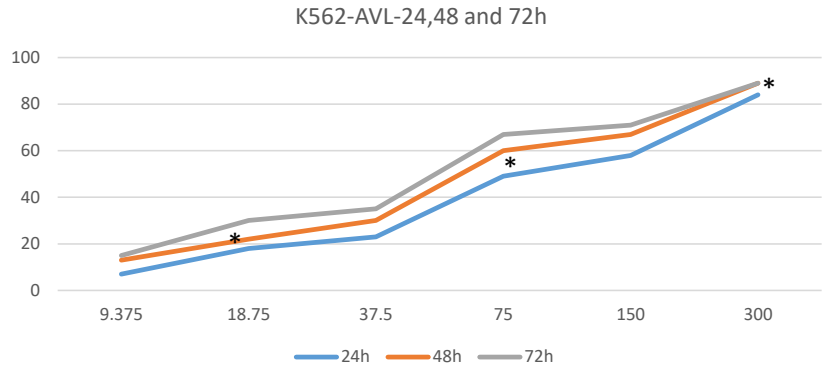
یافته‌ها

همان‌طور که در تصاویر نشان داده شده است AVL بر روی رده سلولی اریترولوکمی (تصویر شماره ۱) و همچنین سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی (تصویر شماره ۲) اثرات سمی دارد و سبب کاهش زنده‌مانی آن‌ها در هر سه زمان ۲۴ و ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از تیمار می‌شوند (سطوح معنی‌دار در تصویر شماره ۱ و ۲ به صورت P<۰/۰۵ و نسبت به سلول‌های کنترل نشان داده شده است). با توجه به نتایج ارائه‌شده در تصویر شماره ۱، AVL اثرات سمی وابسته به غلظت بر روی سلول‌ها دارند و با افزایش غلظت زنده‌مانی کاهش می‌یابد.

درصد زنده‌مانی سلول‌های اریترولوکمی تیمار شده با غلظت‌های مختلف طبیعی برگ‌های گیاه آلوئه‌ورا نشان داد غلظت‌های ۱۸/۷۵ با ۳۷/۵، ۷۵ با ۱۵۰ (میکروگرم / میلی‌لیتر) اختلاف معنی‌داری ندارند. دیگر غلظت‌ها نسبت به یکدیگر اختلاف معناداری داشتند. درصد زنده‌مانی سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی تیمارشده با غلظت‌های مختلف AVL نشان داد اختلاف معنادار داشتند. درصد زنده‌مانی سلول‌های اریترولوکمی تیمارشده در زمان‌های مختلف ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، اختلاف معنی‌داری نشان ندادند.

درصد زنده‌مانی بین سلول‌های اریترولوکمی و سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی تیمارشده در غلظت‌های مختلف AVL نشان داد اختلاف معناداری دارند و سمیت عصاره به طور معنادار برای سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی نسبت به سلول‌های

7. One-way ANOVA



افق دانش

تصویر ۱. ارزیابی اثر مهاری روی سلول‌های اریترولوکمی در غلظت‌های سریالی (میکروگرم / میلی‌لیتر) در ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از مواجهه با تیمار AVL (* نشانه اختلاف معنی‌دار در سطح P<۰/۰۵نسبت به غلظت قبلی است)

اریترولوکمی بیشتر است.

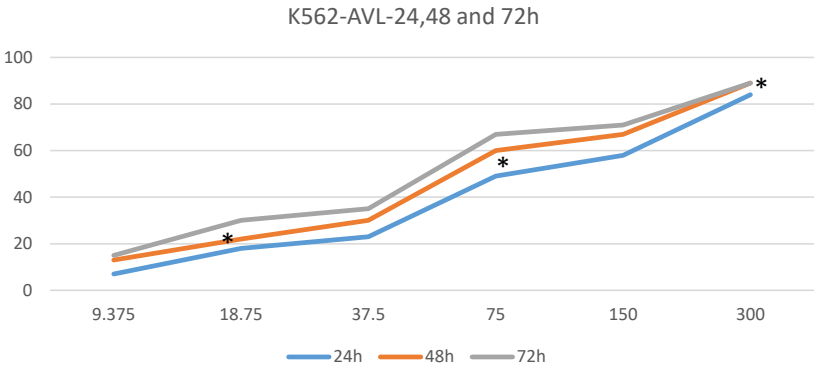
همان‌طور که در تصویر شماره ۳ مشخص است، IC50 داروی دوکسوروبیسین برای سلول‌های اریترولوکمی و تک‌هسته‌ای خون محیطی به طور معناداری نسبت به AVL کمتر بود و بر خلاف AVL، نسبت به زمان‌های مختلف تفاوت معناداری نداشت. اختلاف معناداری مابین IC50 دوکسوروبیسین بر سلول‌های اریترولوکمی با سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی نشان داده شد (تصویر شماره ۴ و ۵).

بحث

امروزه مطالعات مختلفی در زمینه تأثیر عصاره‌های گیاهی بر انواع سرطان صورت گرفته است؛ به طوری که عصاره گیاهی و یا ترکیبات مشتق از گیاهان منبع باارزشی برای یافتن داروهای جدید ضدسرطان است. برای دستیابی به داروهای گیاهی ضدسرطان مؤثر با ضریب درمانی بالا، نیاز به آزمون‌ها و ارزیابی‌های غربالگری است تا بتوان پس از شناسایی، اقدام به بررسی و دسته‌بندی عصاره‌های مؤثر و سازوکار اثر آن‌ها کرد. سلول‌هایی اریترولوکمی جزء سلول‌های سرطانی خون با منشأ میلوئیدی و از رده سلول‌های اریترولوکمیایی‌اند و برای نخستین‌بار از یک خانم ۵۳ساله و مبتلا به لوسمی مزمن مغز استخوان جداسازی شده‌اند.

رده سلولی اریترولوکمی خصوصیات سلول‌های بنیادی سرطانی را دارد و به عنوان مدلی مناسب برای فاز بلاست لوسمی مزمن مغز استخوان و مقاوم به دارو محسوب می‌شود [۱۶]. بنابراین در این مطالعه از عصاره طبیعی برگ گیاه آلوئه‌ورا استفاده و اثر آن روی سلول‌های اریترولوکمی ارزیابی شد.

بر اساس اطلاعات به‌دست‌آمده از این مطالعه، AVL به صورت وابسته به غلظت، روی سلول‌های اریترولوکمی اثر سمیت سلولی دارد؛ به طوری که درصد زنده‌مانی سلول‌های اریترولوکمی و سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی تیمارشده در غلظت ۳۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به طور معناداری کمترین میزان را داشت. در این مطالعه، AVL وابسته به زمان نبود و به عبارتی درصد زنده‌مانی با گذشت زمان، اختلاف معناداری نشان نداد.



افق دانش

تصویر ۲. ارزیابی اثر مهاری روی سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی تیمارشده با غلظت‌های مختلف (میکروگرم / میلی‌لیتر) AVL بعد از۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت (* نشانه اختلاف معنی‌دار در سطح P<۰/۰۵ نسبت به غلظت قبلی است)

	24 h	48 h	72 h
	IC50 (µg/ml) ±S.E	IC50 (µg/ml) ±S.E	IC50 (µg/ml) ±S.E
AVL			
K562 ▲ ●	75.32 ± 1.4	59.61 ± 2.37	50.56 ± 1.18
PBMC ◆ ●	34 ± 1.73	22.99 ± 2.04	20.56 ± 1.12
Dox			
K562 ▲ *	0.187 $\pm 4\times10^{-4}$	0.176 $\pm 8.6\times10^{-4}$	0.138 $\pm 8.5\times10^{-5}$
PBMC ◆ *	0.645 $\pm 7.9\times10^{-4}$	0.521 $\pm 3.1\times10^{-4}$	0.506 $\pm 7.3\times10^{-5}$

تصویر ۳. مقادیر IC50 گروه‌های تیمار با کنترل در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت

افق دانش

': نشانگر اختلاف معنی‌داری IC50 در ارتباط با AVL در زمان ۴۸ ساعت نسبت به ۲۴ ساعت است (P<۰/۰۵).

'': نشانگر اختلاف معنی‌داری IC50 در ارتباط با AVL در زمان ۷۲ ساعت نسبت به ۲۴ ساعت است (P<۰/۰۵).

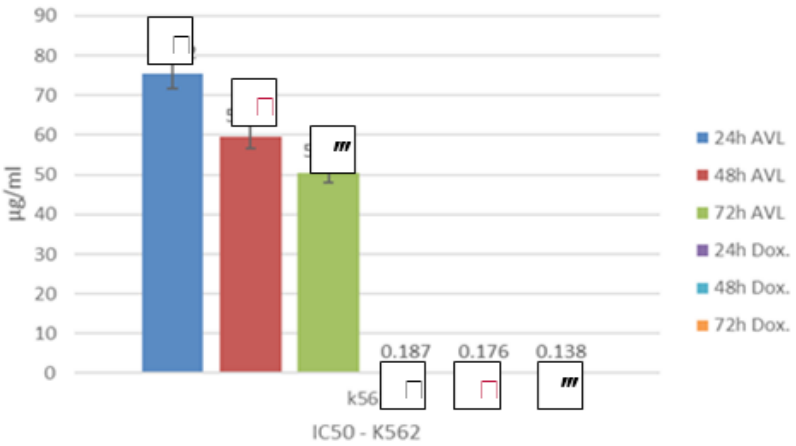
''': نشانگر اختلاف معنی‌داری IC50 در ارتباط با AVL در زمان ۷۲ ساعت نسبت به ۴۸ ساعت است (P<۰/۰۵).

▲: نشانگر اختلاف معنی‌داری IC50 در ارتباط با AVL نسبت به Dox روی سلول های اریترولوکمی (در زمان های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت) است (P<۰/۰۵).

◆: نشانگر اختلاف معنی‌داری IC50 در ارتباط با AVL نسبت به Dox روی سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی (در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت) است (P<۰/۰۵).

●: نشانگر اختلاف معنی‌داری IC50 در ارتباط با AVL روی سلول های اریترولوکمی نسبت به سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی است (P<۰/۰۵).

*: نشانگر اختلاف معنی‌داری IC50 در ارتباط با Dox روی سلول‌های اریترولوکمی نسبت به سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی است (P<۰/۰۵).



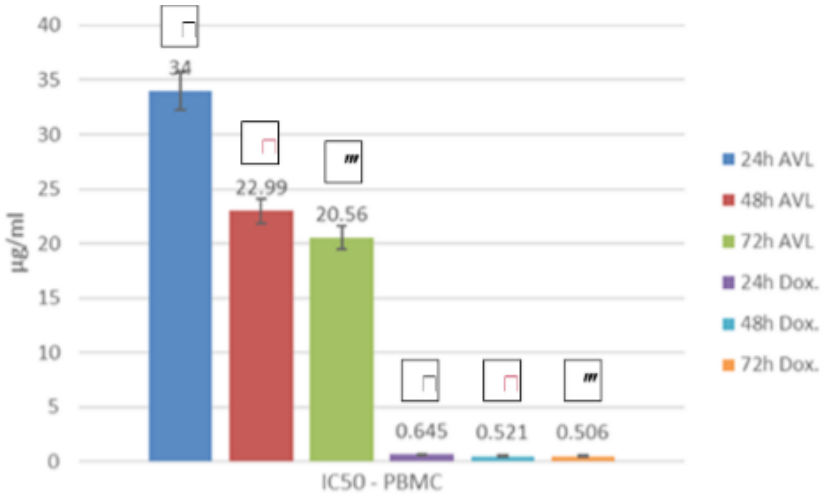
تصویر ۴. مقایسه IC50 گروه‌های تیمار با کنترل بر سلول‌های اریترولوکمی در زمان‌های ۲۴ ، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از مواجهه

افق دانش

': نشانگر اختلاف معنی‌داری IC50 در ارتباط با عصاره طبیعی برگ‌های گیاه آلوئه‌ورا نسبت به Dox روی سلول‌های اریترولوکمی در زمان ۲۴ ساعت است (P<۰/۰۵).

'': نشانگر اختلاف معنی‌داری IC50 در ارتباط با عصاره طبیعی برگ‌های گیاه آلوئه‌ورا نسبت به Dox روی سلول‌های اریترولوکمی در زمان ۴۸ ساعت است (P<۰/۰۵).

''': نشانگر اختلاف معنی داری IC50 در ارتباط با عصاره طبیعی برگ‌های گیاه آلوئه‌ورا نسبت به Dox روی سلول‌های اریترولوکمی در زمان ۷۲ ساعت است (P<۰/۰۵).



تصویر ۵. مقایسه IC۵۰ گروه های تیمار با کنترل بر سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی در زمان‌های ۲۴ ، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از مواجهه

': نشانگر اختلاف معنی‌داری IC۵۰ در ارتباط با AVL نسبت به Dox روی سلول های اریترولوکمی در زمان ۲۴ ساعت است (P<۰/۰۵).

'': نشانگر اختلاف معنی‌داری IC۵۰ در ارتباط با AVL نسبت به Dox روی سلول های اریترولوکمی در زمان ۴۸ ساعت است (P<۰/۰۵).

''': نشانگر اختلاف معنی‌داری IC۵۰ در ارتباط با AVL نسبت به Dox روی سلول های اریترولوکمی در زمان ۷۲ ساعت است (P<۰/۰۵).

چین پی-نی[8] و همکاران در سال ۲۰۰۵ اقدام به بررسی اثر مهاری سیانیدین[9] (یکی از اجزای اصلی تشکیل دهنده پوسته آلوئه‌ورا) بر رشد سلول‌های سرطانی و القای آپوپتوز کردند که با نتایج مطالعه حاضر در زمینه کُشندگی سلول‌های سرطانی مطابقت داشت و می‌طلبد در مطالعات پیش‌رو، اثر این ماده به صورت خالص‌شده روی سلول‌های اریترولوکمی بررسی شود [۱۷].

در مطالعه دیگری که چی-تای یای[10] و همکاران در سال ۲۰۰۹ روی اثر سایتوتوکسیک تری‌ترپن[11] (استخراج‌شده از یک نوع قارچ موسوم به Antrodia camphorate) که در پوسته آلوئه‌ورا نیز موجود است بر چندین رده سلول سرطانی کولون از جمله HT-29, HCT-116 و SW-480 انجام دادند، اثر سایتوتوکسیک و آپوپتوتیک این ترکیب را اثبات کردند که با مطالعه حاضر در کُشندگی سلول‌های سرطانی مطابقت دارد و نشان می‌دهد ترکیبات triterpenes که از اجزای تشکیل‌دهنده پوسته آلوئه‌وراست اثر کشندگی روی سلول‌های سرطانی دارد و این در حالی است که در مطالعه مذکور مشخص شد که tri-terpenes روی رده سلول‌های اپیتلیال پستان (MCF10A) و HS68 اثر سمی نداشته است [۱۸].

لیو [12]و همکاران در سال ۲۰۰۰، مطالعه‌ای با عنوان «اثر ضدرویشی ساپونین ها[13] گیاه جینسنگ[14] روی رده سلولی سرطان پروستات» انجام دادند که به اثر ممانعت‌کنندگی رشد و خواص آپوپتوتیک این ماده اشاره دارد و از آنجایی که Saponins یکی از اجزای پوسته گیاه آلوئه‌وراست، با نتایج مطالعه حاضر همخوانی دارد [۱۹].

در سال ۱۹۸۰، وینترز و همکارانش درباره اثر ضدتوموری عصاره طبیعی برگ‌های گیاه آلوئه‌ورا مطالعه و اشاره کردند این ماده در عین داشتن اثرات ضد توموری، اثر محافظتی نیز بر سلول‌های سالم ریوی جنینی انسانی دارد و این در حالی است که عصاره تجاری این گیاه، فاقد اثرات دوگانه مذکور است. بنابراین در این مطالعه از برگ‌های تازه آلوئه‌ورا برای تهیه عصاره استفاده شده است. همچنین نتایج حاصل از مطالعه مذکور، مؤید اثرات سمیت سلولی AVL روی سلول‌های سرطانی، از جمله سلول‌های اریترولوکمی است که با نتایج مطالعه حاضر همخوانی دارد [۱۰].

پیکر ترزا [15]و همکاران در سال ۲۰۰۰، پس از کشت‌دادن انواع سلول‌های رده نورواکتودرمال تومور، آلو امودین موجود در قسمت ژلی داخل گیاه آلوئه‌ورا را به عنوان یک ماده جدید ضدسرطان با فعالیت انتخابی علیه تومور نورواکتودرمال، اعلام کردند. آلو امودین (هیدروکسی آنتراکوئینون) موجود در برگ آلوئه‌ورا به عنوان یک ماده ضدتوموری مشخص با فعالیت انتخابی علیه سلول‌های سرطانی نورواکتودرمال در شرایط In vitro و In vivo اعلام شد که بدون تأثیر توکسیک قابل ملاحظه، در موش‌های

8. ChenPei-Ni
9. Cyanidin
10. Chi-Tai Yeh
11. Triterpenes
12. Liu
13. Saponins
14. Ginseng
15. Pecere Teresa

مبتلا به نقص ایمنی مرکب حاد موجب کاهش رشد سلول‌های نوروآکتودرمال تومور شد که در راستای نتایج تحقیق حاضر است، با این تفاوت که تحقیق حاضر روی برگ‌های گیاه انجام گرفته شده است [۲۰].

در مطالعات جانگ[16] و همکاران در سال ۲۰۰۳ و همچنین لین[17] و همکاران در سال ۲۰۰۵، به تأثیرات مهاری ماده آلو امودین گیاه بر ان استیل ترانسفراز اشاره شده است که این ماده یکی از عوامل مهم در ایجاد آپوپتوزیس است [۲۱-۲۳].

IC50 برای AVL نسبت به داروی استاندارد دوکسوروبیسین به طور معنادار بیشتر بود. کمتربودن IC50 داروی دوکسوروبیسین، حاکی از بازدهی بیشتر این دارو و میزان کشندگی بالاتر سلول‌های اریترولوکمی است. در عین حال درجه سمیت AVL برای سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی (سلول میزبان) نسبت به سلول سرطانی اریترولوکمی به طور معنادار بیشتر بود و IC50 داروی دوکسوروبیسین برخلاف AVL، برای سلول‌های اریترولوکمی به طور معناداری نسبت به سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی کمتر بود.

نکته بااهمیت این است که داروی دوکسوروبیسین به حالت انتخابی عمل کرده و سلول‌های سرطانی را بیشتر هدف قرار داده است که نشان از تأثیر چندبرابری این دارو بر سلول‌های سرطانی و با میزان کشندگی کمتر برای سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی است. با توجه به اینکه سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی یکی از بازوهای مهم سیستم ایمنی در مقابله با انواع بیماری‌ها مانند سرطان هستند و به عنوان یکی از شاخص‌های مهم برای ارزیابی عوارض جانبی گیاه موردآزمایش در مقایسه با داروی استاندارد به شمار می‌آیند، این نکته خیلی حائز اهمیت است که تیمار با AVL به حالت انتخابی عمل نکرد و سلول‌های سرطانی هدف قرار نگرفتند و برای سلول‌های میزبان آسیب بیشتری همراه داشت.

به رغم اینکه در تحقیق حاضر AVL قادر به کشندگی مطلوب سلول‌های سرطانی اریترولوکمی بود، به سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی (سلول میزبان) نیز آسیب‌های جدی رساند که در نتایج دیگر تحقیقات کمتر به این موضوع اشاره شده است. به نظر می رسد دیگر تحقیقات به صورت in vivo یا مستقل از ارزیابی تأثیر روی سلول‌های بدن میزبان انجام گرفته و در شرایط in vivoاحتمالاً به زمان بیشتری برای مشاهده آسیب‌های وارده به سلول‌های میزبان نیاز است.

ضمن اینکه تأثیر مطلوب AVL روی سلول‌های سرطانی در مدت‌زمان کوتاه‌تر و سریع‌تر مشاهده شده است. از جنبه نحوه انجام کار، استفاده از پوسته گیاه، ژل داخل گیاه یا کل پیکره گیاه، بین مطالعات مختلف تفاوت وجود دارد که این امر به عنوان یک متغیر تأثیرگذار باید مدنظر قرار گیرد.

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج تحقیق حاضر، AVL اثر کُشندگی روی هر دو رده سلولی اریترولوکمی و سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی دارد، اما به طور انتخابی عمل نمی‌کند و درجه سمیت آن برای سلول میزبان بیشتر بود. اما داروی استاندارد دوکسوروبیسین اختلاف معنی‌دار بین IC50 سلول‌های اریترولوکمی با سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی داشت و انتخابی عمل کرده است؛ به طوری که حدود چهار برابر بیشتر بر سلول‌های اریترولوکمی تأثیر داشت.

ملاحظات اخلاقی

پیروی از اصول اخلاق پژوهش

پژوهشگران تمامی موارد اخلاقی در تمامی مراحل پژوهش را رعایت کردند و مجوزهای لازم را از مراجع مربوطه گرفتند.

حامی مالی

منابع مالی این پروژه را دانشگاه علوم پزشکی ارتش تأمین کرده است.

مشارکت نویسندگان

استاد راهنما و نویسنده اول: مینو شاددل (۳۵ درصد)، پژوهشگر اصلی و نویسنده مسئول: حمید شمسی (۳۵ درصد)، پژوهشگر کمکی و نویسنده دوم: پیمان توکلی (۱۰ درصد)، استاد راهنمای دوم و نویسنده سوم: میثم ابطحی فروشانی (۱۰درصد)، پژوهشگر کمکی و نویسنده چهارم: رؤیا شمسی (۱۰ درصد).

تعارض منافع

نویسندگان این مقاله اعلام می‌دارند هیچ‌گونه تعارض منافعی در رابطه با این پژوهش وجود ندارد.

16. Chung
17. Lin

References

[1] Siegel R, Ward E, Brawley O, Jemal A. The impact of eliminating socioeconomic and racial disparities on premature cancer deaths. Ca-a Cancer Journal for Clinicians. 2011; 61(4):212-36. [DOI:10.3322/caac.20121] [PMID]

[2] Beger RD. A review of applications of metabolomics in cancer. Metabolites. 2013; 3(3):552-74. [DOI:10.3390/metabo3030552] [PMID] [PMCID]

[3] Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. Nature. 2000; 407(6805):770-6. [DOI:10.1038/35037710] [PMID]

[4] Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. IgE-dependent immune responses and allergic disease. Philadelphia: Elsevier-Saunders; 2012.

[5] DeVita Jr VT, Rosenberg SA. Two hundred years of cancer research. New England Journal of Medicine. 2012; 366(23):2207-14. [DOI:10.1056/NEJMra1204479] [PMID] [PMCID]

[6] Fani M, Kohanteb J. Inhibitory activity of Aloe vera gel on some clinically isolated cariogenic and periodontopathic bacteria. Journal of Oral Science. 2012; 54(1):15-21. [DOI:10.2334/josnusd.54.15] [PMID]

[7] Choi SW, Son BW, Son YS, Park YI, Lee SK, Chung MH. The wound-healing effect of a glycoprotein fraction isolated from aloe vera. British Journal of Dermatology. 2001; 145(4):535-45. [DOI:10.1046/j.1365-2133.2001.04410.x] [PMID]

[8] Harris CC. Chemical and physical carcinogenesis: Advances and perspectives for the 1990s. Cancer Research. 1991; 51(Suppl. 18):5023s-44s. [PMID]

[9] Dutta A, Sarkar D, Gurib-Fakim A, Mandal C, Chatterjee M. In vitro and in vivo activity of Aloe vera leaf exudate in experimental visceral leishmaniasis. Parasitology Research. 2008; 102(6):1235-42. [DOI:10.1007/s00436-008-0899-2] [PMID]

[10] Winters WD, Benavides R, Clouse WJ. Effects of aloe extracts on human normal and tumor cells in vitro. Economic Botany. 1981; 35(1):89-95. [DOI:10.1007/BF02859219]

[11] Lozzio BB, Lozzio CB. Properties and usefulness of the original K-562 human myelogenous leukemia cell line. Leukemia Research. 1979; 3(6):363-70. [DOI:10.1016/0145-2126(79)90033-X]

[12] Dutta A, Mandal G, Mandal C, Chatterjee M. In vitro antileishmanial activity of Aloe vera leaf exudate: A potential herbal therapy in leishmaniasis. Glycoconjugate Journal. 2007; 24(1):81-6. [DOI:10.1007/s10719-006-9014-z] [PMID]

[13] Dutta A, Bandyopadhyay S, Mandal C, Chatterjee M. Aloe vera leaf exudate induces a caspase-independent cell death in Leishmania donovani promastigotes. Journal of Medical Microbiology. 2007; 56(5):629-36. [DOI:10.1099/jmm.0.47039-0] [PMID]

[14] Kabiri F, Nejati V, Tukmechi A, Delirezh N, Nikbakhsh P. [Inhibitiory properties of cytoplasmic extract of Lactobacilli isolated from common carp intestine on human chronic myelocytic leukemia K562 cell line: An in vitro study (Persian)]. Tehran University Medical Journal. 2011; 68(12):691-8.

[15] Coligan JE, Bierer BE, Margulies DH, Shevach EM, Strober W. Preface- current protocols in immunology. Wiley. 2010; 89(1):iii-vi. [DOI:10.1002/0471142735.imprefs89] [PMID] [PMCID]

[16] Andersson LC, Nilsson K, Gahmberg CG. K562-a human erythroleukemic cell line. International Journal of Cancer. 1979; 23(2):143-7. [DOI:10.1002/ijc.2910230202] [PMID]

[17] Chen PN, Chu SC, Chiou HL, Chiang CL, Yang SF, Hsieh YS. Cyanidin 3-glucoside and peonidin 3-glucoside inhibit tumor cell growth and induce apoptosis in vitro and suppress tumor growth in vivo. Nutrition and Cancer. 2005; 53(2):232-43. [DOI:10.1207/s15327914nc5302_12] [PMID]

[18] Yeh CT, Rao YK, Yao CJ, Yeh CF, Li CH, Chuang SE, et al. Cytotoxic triterpenes from Antrodia camphorata and their mode of action in HT-29 human colon cancer cells. Cancer Letters. 2009; 285(1):73-9. [DOI:10.1016/j.canlet.2009.05.002] [PMID]

[19] Liu WK, Xu SX, Che CT. Anti-proliferative effect of ginseng saponins on human prostate cancer cell line. Life Sciences. 2000; 67(11):1297-306. [DOI:10.1016/S0024-3205(00)00720-7]

[20] Pecere T, Gazzola MV, Mucignat C, Parolin C, Dalla Vecchia F, Cavaggioni A, et al. Aloe-emodin is a new type of anticancer agent with selective activity against neuroectodermal tumors. Cancer Research. 2000; 60(11):2800-4. [PMID]

[21] Chung JG, Li YC, Lee YM, Lin JP, Cheng KC, Chang WC. Aloe-emodin inhibited N-acetylation and DNA adduct of 2-aminofluorene and Arylamine N-acetyltransferase gene expression in mouse leukemia L 1210 cells. Leukemia Research. 2003; 27(9):831-40. [DOI:10.1016/S0145-2126(03)00017-1]

[22] Lin SY, Yang JH, Hsia TC, Lee JH, Chiu TH, Wei YH, et al. Effect of inhibition of aloe-emodin on N-acetyltransferase activity and gene expression in human malignant melanoma cells (A375. S2). Melanoma Research. 2005; 15(6):489-94. [DOI:10.1097/00008390-200512000-00002] [PMID]

[23] Liu K, Liu Y, Yu Y, Feng T, Zhang S. Identification of acetylcholine-related enzymes and the role of acetylcholine and nicotine in human cervical cancer. International Journal of Clinical and Experimental Pathology. 2016; 9(4):4854-61.

This Page Intentionally Left Blank