مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی
دوره ۱۹، شماره ۲، تابستان ۸۸، صفحات ۸۷ تا ۹۲

Original Article

بررسی اثرات آپوپتوزیس القاء شده آپی‌جنین بر ۳ رده سلول سرطانی لنفوسیتی B انسان در in vitro

مهرداد هاشمی[۱]، مهدی نوری لنگ[۲]، ملیحه انتظاری[۳]، شهره نفیسی[۴،۵]، حسین نوروزی[۵،۶]

[۱] استادیار، گروه ژنتیک مولکولی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد پزشکی تهران
[۲] دانشجوی پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد پزشکی تهران
[۳] دکترای سلولی تکوینی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد پزشکی تهران
[۴] دانشیار، گروه شیمی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران مرکز
[۵] موسسه مطالعات تاریخ پزشکی طب اسلامی و مکمل، دانشگاه علوم پزشکی ایران
[۶] استادیار، گروه قارچ شناسی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران

چکیده

سابقه و هدف: *آپوپتوزیس و یا مرگ سازمان‌یافته، اصلی‌ترین مکانیسم در تکامل و هوموستاز بافت‌های بالغ در جهت حذف سلول‌های غیر ضروری است که القای آن روشی موثر در درمان سرطان می‌باشد. هدف این مطالعه بررسی القای آپوپتوزیس آپی‌جنین (Apigenin) بر سلول‌های سرطانی لنفوسیتی B انسان می‌باشد.*

روش بررسی: *در این تحقیق تجربی ،۳ رده سلول سرطانی لنفوسیت B انسانی در محیط RPMI1610 بعلاوه ۱۰ درصد سرم جنین گاوی FBS ، L –گلوتامین، پنی‌سیلین و استروپتومایسین در دمای ۳۷ درجه به مدت ۲ روز کشت شدند و سپس با آپی جنین تیمار شدند و توان زیستی سلول‌ها با روش MTT ارزیابی شد. سپس اثر آپی جنین بر سلول‌های سرطانی لنفوسیتی B انسان با روش فلوسایتومتری مورد سنجش قرار گرفت.*

یافته‌ها: *در روش MTT، سلول‌های سرطانی لنفوسیتی B انسان در غلظت‌های ۱۰ و ۱۵ و ۲۰ میکروگرم بر میلی لیتر مرگ سلولی معنی‌داری را نسبت به گروه‌های شاهد نشان دادند ($p<0/01$). ارزیابی فلوسایتومتری اختلاف معنی‌داری را بین سلول‌های آپوپتوتیک سه رده نشان داد و ۴۸ ساعت زمان مناسبی برای القای آپوپتوز بود.*

نتیجه‌گیری: *در این مطاالعه، برای اولین بار خواص ضدسرطانی آپی جنین و القای آپوپتوز آن بر سلول‌های سرطانی لنفوسیت B در in vitro مشخص گردید.*

واژگان کلیدی: *آپی جنین، آپوپتوزیس، سلول‌های سرطانی لنفوسیتی B انسان.*

مقدمه

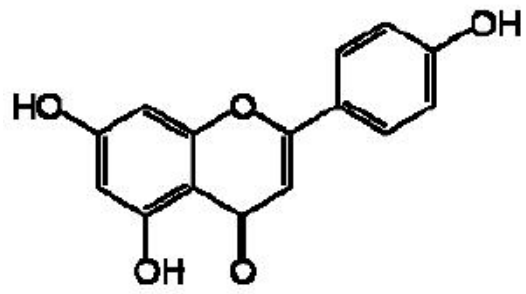
در حال حاضر سرطان یکی از علل عمده مرگ‌ومیر در جهان است که در اثر عوامل مختلفی از جمله مواد جهش‌زا و مواد شیمیایی سرطان‌زا در محیط بوجود می‌آید. برآورد شده که ممکن است بیش از ۷۵ درصد سرطان‌ها دارای منشاء محیطی باشند (۱،۲). آسیب‌ها و تغییرات ژنتیکی ایجاد شده در توالی DNA و بروز جهش در ژن‌ها و دیگر تغییرات در ساختار کروموزومی در سرطان‌زایی نقش بسزایی دارند (۳). بسیاری از مواد جهش‌زا و سرطان‌زا از طریق رادیکال‌های آزاد از جمله گونه‌های اکسیژن واکنش‌گر (Reactive Oxygen =ROS

آدرس نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد پزشکی، دکتر مهرداد هاشمی
(**email**: hashemi@iautmu.ac.ir)
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۷/۱۰/۲٤
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۸۸/۲/۱۵

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2025-07-12]

species) اثر تخریبی خود را نشان می‌دهند. موادی که به عنوان آنتی‌اکسیدان عمل می‌کنند، می‌توانند آثار زیان بار ROS را کاهش دهند. ROS در اتیولوژی بیماری‌هایی مانند سرطان، بیماری‌های قلبی-عروقی، مشکلات عصبی و پیری نقش دارد. لذا مصرف روزانه آنتی‌اکسیدان‌ها دفاع و ایمنی بدن را در مقابل تولید رادیکال‌های آزاد افزایش داده و به عنوان ضدسرطان عمل می‌کند (۶-۴). برخی میوه‌ها و سبزیجات به علت داشتن مقدار زیادی آنتی‌اکسیدان‌ها مانند پلی‌فنل‌ها، ویتامین C، ویتامین E، بتاکاروتن و لیپوتن از مواد غذایی اصلی ضد سرطان محسوب می‌گردند (۷). فلاوونوئیدها بیش از ۴۰۰۰ ترکیبات پلی‌فنولیک هستند که به طور گسترده و طبیعی تقریبا در اکثر خانوادهای گیاهی و غذایی یافت می‌شوند. این ترکیبات از یک ساختار عمومی فنیل بنزوپیران (C6-C3-C6) پیروی می‌کنند و بر اساس درجه اشباعی و نوع باز شدن حلقه پیران مرکزی اساسا به فلاوون‌ها و فلاوانول‌ها و ایزوفلاون‌ها و فلاوونول‌ها و فلاوانون‌ها و فلاوانونول‌ها تقسیم می‌شوند (۸،۹). مکانیسم عمل فلاوونوییدها شامل خواص آنتی‌اکسیدانتی و تاثیرات آنزیمی و ضدالتهابی وضد آلرژی می‌باشد (۱۰،۱۱).

آپی‌جنین (Apigenin) با نام عمومی (4,5,7–trihydroxy flavone) از فلاوونوییدهای موثره گیاه بابونه و از دسته متوکسی‌فلاون‌ها و متوکسی‌فلاونول‌ها می‌باشد (شکل ۱). این فلاوونویید به عنوان یک ترکیب غیر سمی در اکثر میوه‌ها و سبزیجات نظیر گیاه جعفری، پیاز، پرتغال، لیمو، جوانه گندم و چای به وفور یافت می‌شود (۱۲). هدف پژوهش حاضر بررسی اثر ضد سرطانی آپی‌جنین از طریق تاثیر بر سلول‌های سرطانی می‌باشد.



شکل ۱- ساختار شیمیایی ترکیب Apigenin

مواد و روشها

در این تحقیق تجربی، برای بررسی اثر سایتوتوکسیسیته آپی‌جنین بر رده سلول سرطانی از روش آزمون توان حیاتی (MTT) استفاده و نتایج بر حسب اندکس تحریک محاسبه و با آزمون t مورد ارزیابی قرار گرفت.

برای ارزیابی اثر آپوپتوزیس آپی‌جنین، از روش فلوسایتومتری استفاده گردید و نتایج با آزمون آماری ANOVA ارزیابی شدند.

برای کشت سلول، ۳ رده سلول سرطانی لنفوسیت B انسان شامل Nalm6 (Pre B cell ،Raji (Burkitt's Lymphoma Leukemia) و EHEB (Human chronic Lymphocytic Leukemia) از انستیتو پاستور ایران تهیه شد. سلول‌ها در محیط RPMI1610(Sigma) به علاوه ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (Fetal Bovine Serum) FBS، ۲ میلی مولار L–گلوتامین، ۲۵ میلی‌مولار HEPES، ۲/۲۴۰ گرم در لیتر بی‌کربنات سدیم، ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر پنی‌سیلین و ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر استروپتومایسین در دمای ۳۷ درجه، رطوبت ۹۰ درصدو Co_2 ۵ درصد رشد کردند. در شروع کشت در هر فلاسک ۲۵ سانتی‌متر مربعی، 5×10^5 سلول ریخته شد و زمانی‌که رشد سلول‌ها به مرحله لگاریتمی رسید، پس از ارزیابی سیتوتوکسیسیتی و سنجش توان حیاتی، سلول‌ها با غلظت ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر آپی‌جنین (Sigma-Aldrich) تیمار شدند.

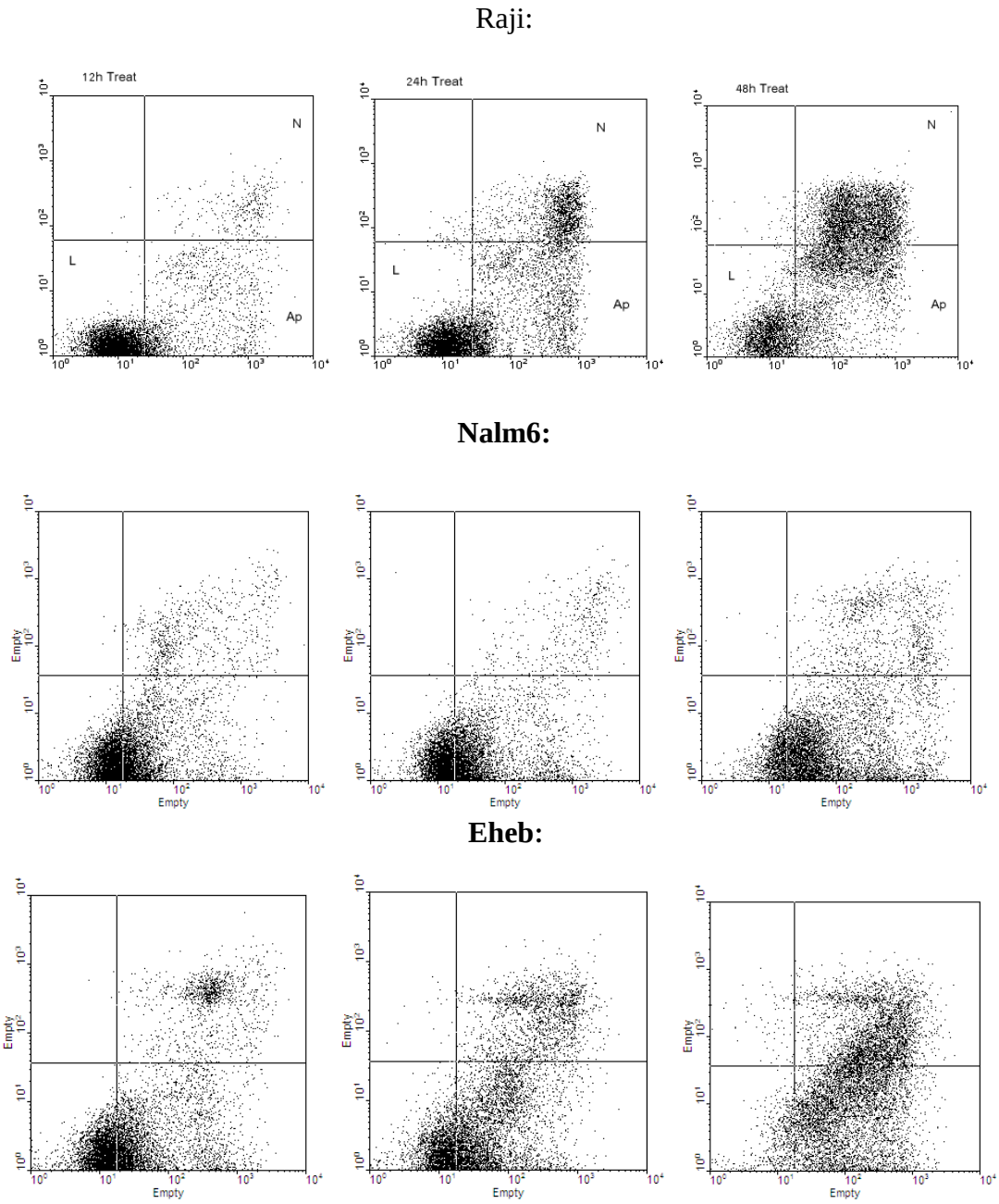
MTT (آزمون توان حیاتی) یک روش سنجش کالریمتریک جهت اندازه‌گیری توان حیاتی سلول و اثرات سایتوتوکسیک آن است. سلول‌های سرطانی Eheb به میزان ۵۰۰۰ سلول در هر فلاسک کشت داده شدند. پس از گذشت ۱ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه با غلظت‌های مندرج در نمودار ۱ از آپی‌جنین تیمار و برای هر غلظت، کنترل در نظر گرفته شد. پس از انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه به مدت ۴۸ ساعت، توان حیاتی سلول‌ها با استفاده از MTT ارزیابی و میزان توکسیسیتی ایجاد شده با استفاده از فرمول ذیل محاسبه شد.

$$\%\text{Cytotoxicity} = \frac{1 - \text{mean absorbance of toxicant}}{\text{mean absorbance of negative control}} \times 100$$

$$\%\ \text{Viability} = 100 - \%\ \text{Cytotoxicity}$$

برای کم کردن میزان خطای آزمایش در چند چاهک بدون سلول نیز رنگ MTT اضافه وسپس شستشو داده شد و همراه دیگر چاهک‌ها میزان جذب آن خوانده شد ودر نهایت ازکل جذب‌ها کم گردید.

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2025-07-12]



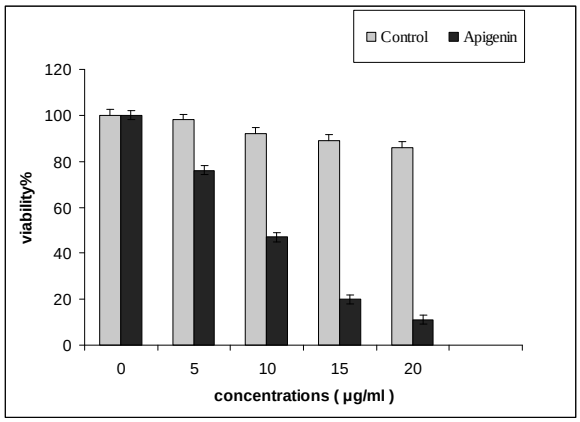
شکل ۲- افزایش تعداد سلول های آپوپتوز در زمانهای ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت. (سلولهای زنده=L ، سلولهای آپوپتوز= AP ، سلولهای نکروز=N)

در آنالیز فلوسایتومتری، ۱×۱۰^{۶} سلول از ۳ رده مختلف سلول‌های سرطانی کشت شده در فلاسک‌های ۲۵ سانتی‌متر مربعی تحت تیمار با آپی‌جنین، با غلظت ۱ میکرومول به همراه کنترل پس از انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه در مدت زمان‌های ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت، با عمل سانتریفوژ (سرعت ۲۰۰g بمدت ۵ دقیقه در ۴ درجه سانتی‌گراد) جمع‌آوری شده و یک بار با محلول PBS شستشو و عمل سانتریفوژ تکرار گردید. از کیت Annexin-V-fluos stainig (Roche) جهت آنالیز فلوسایتومتری استفاده گردید. پس از سانتریفوژ، با اضافه کردن ۱۰۰ میکرولیتر محلول Annexin-V-fluos Labeling شامل Annexin-V-fluorecein و Propidium iodide به سلول‌ها انکوباسیون در دمای ۱۵ الی ۲۵ درجه بمدت ۱۰ الی ۱۵ دقیقه انجام و بلافاصله با دستگاه فلوسایتومتر آنالیز شدند.

یافته‌ها

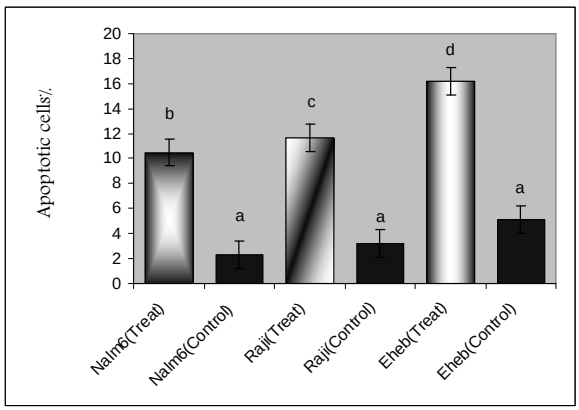
میزان جذب نوری در سنجش MTT در غلظت‌های ۱۰، ۱۵ و ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر آپی‌جنین نشان داد که توان حیاتی سلول‌های تحت تیمار نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری دارد ($p<۰/۰۱$) (نمودار ۱).

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2025-07-12]



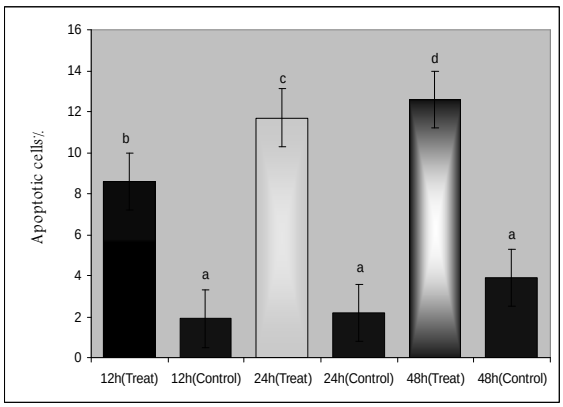
نمودار ۱- نتایج بدست آمده از سنجش MTT در غلظتهای مختلف Apigenin

جهت بررسی و مقایسه اثرات آپی‌جنین بر سلول‌های سرطانی لنفوسیت B، ۱×۱۰^{۶} سلول از هر ۳ رده مختلف سلول‌های سرطانی کشت شده در فلاسک‌های ۲۵ سانتی‌متر مربعی تحت تیمار با آپی‌جنین (پس از محاسبه غلظت IC50 که برابر با غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر می‌باشد) قرار گرفتند و با دستگاه فلوسایتومتر آنالیز شدند. داده ها پس از تبدیل زاویه‌ای به روش تجزیه واریانس سه عاملی بررسی و میانگین آنها با آزمون دانکن مقایسه گردیدند (شکل ۲).



نمودار ۲- مقایسه میانگین سلولهای آپوپتوز القا شده در رده های مختلف سلول سرطانی لنفوسیت B. اختلاف معنی داری بین گروههای مختلف مشاهده می شود.

آپوپتوز القای شده بین سه رده مختلف سلول سرطانی اختلاف معنی‌داری داشت و رده سلولیEheb که از خانواده BCLL (Human chronic Lymphocytic Leukemia) می‌باشد، نسبت به سایر ردهای سلولی تفاوت معنی‌داری را نشان داد ($p<۰/۰۱$) (نمودار ۲). هم‌چنین در زمان ۴۸ ساعت پس از تیمار، القای مناسب آپوپتوز دیده شد (نمودار ۳).



نمودار ۳- میانگین سلولهای آپوپتوز در زمانهای مختلف. تفاوت معنی داری در زمانهای مختلف انکوباسیون پس از تیمار مشاهده می شود.

بحث

از آنجایی که روش‌های معمول درمان سرطان (جراحی، شیمی‌درمانی، رادیوتراپی) علاوه بر سلول‌های توموری بر سلول‌های طبیعی در حال تقسیم نیز اثرات کشنده دارند یا تقسیم سلولی را مهار می‌کنند (۱۵)، در سال‌های اخیر استفاده از داروهای طبیعی گیاهی برای پیشگیری و درمان سرطان مطرح شده است. در این روش نه تنها سلول‌های توموری کنترل می‌شوند، بلکه به سلول‌های سالم آسیبی نمی‌رسد (۱۶). اثر انواع آنتی‌اکسیدان‌های خوراکی بر سرطان و بیماری‌های قلبی عروقی به اثبات رسیده و مشخص شده که این مواد موجب افزایش بیش از شصت درصد طول عمر می‌گردد (۱۷). طی بررسی‌های آزمایشگاهی بر روی فلاونوئیدهای پلی متوکسیله مشخص شده که این مواد اثرات آنتی‌اکسیدانی و ضد سرطانی سلول‌های سرطانی را دارند (۲۱-۱۸). در سال ۲۰۰۸ با انجام آزمایشهایی برروی آپی‌جنین اثر ضدسرطانی آن بر روی سلول‌های سرطانی تخمدان موش A2780 مشخص گردید (۲۲). این ماده با بکارگیری گیرنده‌های بتای استروژن سبب توقف تقسیم سلولی می‌شود. تغییر در مسیر سیگنالینگ گیرنده‌های آلفا و بتای استروژن یکی از مهم‌ترین موارد در متاستاز سلول‌های سرطانی از جمله سرطان پروستات می‌باشد (۲۳). در سال ۲۰۰۰، القای مرگ سلولی یا آپوپتوزیس در سلول‌های سرطانی HL-60 توسط فلاونوئید موجود در لیمو گزارش گردید (۲۴). در سال ۲۰۰۴ متوقف شدن تقسیم سلولی در مرحله G2 در سلول‌های سرطانی کارسینومای انسان توسط آپی‌جنین گزارش گردید (۲۵). مسیرهای انتقال سیگنال‌ها که باعث شروع فعالیت آبشاری آنزیم‌هایی بنام کاسپاز می‌گردد؛ آسیب‌های سلولی که بر اثر افزایش نفوذپذیری غشاء

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2025-07-12]

میتوکندری‌ها و فعال شدن آنزیم‌های کاسپازی اتفاق می‌افتد؛ آسیب DNA که منجر به تجمع پروتئین P53 می‌گردد زیرا تسهیل ترمیم DNA توسط پروتئین فوق صورت می‌گیرد و مسیر آسیب‌های غشای سلولی که باعث فعال شدن آنزیم اسفنگومیلیناز و در نهایت تولید عامل سرامیدی از ترکیبات لیپیدی غشای سلول می‌شود، چهار سیستم اصلی در راه‌اندازی آپوپتوزیس می‌باشند (۳۰-۲۶).

این مطالعه نشان داد آپی‌جنین قادر است در in vitro در سلول‌های سرطانی لنفوسیت B، آپوپتوز را القا نماید. برای افزایش دقت در تشخیص آپوپتوزیس روش دقیق فلوسایتومتری با استفاده از Annexin-V-fluos stainig به کار رفت. در طول مراحل اولیه آپوپتوز، فسفاتیدیل سرین (PS) بر روی سطح سلول ظاهر می‌شود. اساس این روش ترکیب پروتئین اتصالی وابسته به کلسیم Annexin V به فسفولیپیدهای غشایی است (۳۱). آپوپتوز القا شده در رده‌های مختلف سلول سرطانی نشان داد که این ماده در رده سلولی Eheb که از خانواده BCLL می‌باشد، نسبت به سایر ردهای سلولی با اختلاف آماری معنی‌داری بیشترین تاثیر را دارد. میزان تاثیر بیشتر بر سلولهای سرطانی Eheb را می‌توان با نتایج Hanada و همکارانش در سال ۱۹۹۳ توجیه کرد که اشاره داشتند در سلول‌های سرطانی از خانواده BCLL متیلاسیون کم و بیان بسیار زیاد ژن Bcl2 وجود دارد و پروتئین این ژن در القای آپوپتوزیس نقش بسیار مهمی دارد (۳۲). در ضمن در زمان ۴۸ ساعت پس از تیمار نیز القای مناسب آپوپتوز دیده شد.

امید است با افزایش هر چه بیشتر مطالعات در این زمینه اطلاعات هر چه مفیدتری در خصوص درک چهره واقعی اثر این مواد حاصل گردد تا در آینده بتوان از آنها در درمان بیماری‌ها استفاده کرد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از موسسه مطالعات تاریخ پزشکی طب اسلامی و مکمل دانشگاه علوم پزشکی ایران جهت حمایت‌های مالی در اجرای این طرح تشکر به عمل می‌آید.

REFERENCES

1. Møller P, Wallin H, Knudsen LE. Oxidative stress associated psychological stress and life-style factor. Chem Biol Interact 1996;102:17-36
2. Namiki M. Antioxidants/antimutagenes in foods. Crit Rev Food Sci Nutr 1990;29:273-300.
3. McCord JM. Free radicals and pro-oxidants in health and nutrition. Food Technol 1994;48:106-10.
4. Clarkson PM, Thompson HS. Antioxidant: what role do they play in physical activity and health? Am J Clin Nutr 2000;72:637S-46S
5. Hirota F, Suganuma M, Imai K, Nakachi K. Green tea: cancer preventive beverage and/or drug. Cancer Lett 2002;188:9-13.
6. Ching CS, Chang K. Mutagenicity and antimutagenicity studies of Tannic acid and related compounds. Food Chem Toxicol 2000;38:1-5.
7. Ghasemian A, Mehrabian S, Majd A. Peel extracts of two Iranian cultivars of Pomegranate(punica granatum) have antioxidant and antimutagenic activities. Pak J Biol Sci 2006;7:1402-405.
8. Middleton EJr, Kandaswami C. The impact of plant flavonoids on mammalian biology: Implications for immunity, inflammation and cancer. In: Harborne JB, editor. The flavonoids advances in research since 1986. 1st edition. London: Chapman and Hall; 1994. p.619–52.
9. Harborne JB, Williams CA. Advances in flavonoid research since 1992. Phytochemistry 2000;55:481-504.
10. Husain SR, Cillard J, Cillard P. Hydroxyl radical scavenging activity of flavonoids. Phytochemistry 1987;26:2489-91.
11. Craig WJ. Health-promoting properties of common herbs. Am J Clin Nutr 1999;70:S491–99.
12. Havsteen BH. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. Pharmacol Ther 2002;96:67–202.
13. Ames BN. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella mammalian microsome mutagenicity test. Mutat Res 1976;31:347-49.
14. Ames BN, Durston WE, Yamasaki E, Lee FD. Carcinogenes are mutagens: a simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. Proc Natl Acad Sci 1973;70:2281-85.
15. Chabner BA, Friedman MA. Progress against rare and not so-rare cancer. New Engl J Med 1992;236:564-68.

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2025-07-12]

16. Franks LM, Teich NM. Introduction to the cellular and molecular biology of cancer. New York: Oxford University Press;1997.

17. Sunj J, Chu YF, Wu X. Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits. J Agric Food Chem 2002;25:7449-54.

18. Bennett JP, Gompert S, Wollenweber E. Inhibitory effects of natural inflavonoids on secretion from mast cells and neutrophils. Arzneimittelforschung 1981;31:433-37.

19. Rivett AJ. The multicatalytic proteinase. Multiple proteolytic activities. J Biol Chem 1989;21:12215–19.

20. Chen P, Hochstrasser M. Autocatalytic subunit processing couples active site formation in the 20S proteasome to completion of assembly. Cell 1996;6:961-72.

21. Lee DH, Goldberg AL. Proteasome inhibitors: valuable new tools for cell biologists. Trends Cell Biol 1998;10:397-403.

22. Hu XW, Meng D, Fang J. Apigenin inhibited migration and invasion of human ovarian cancer A2180 cells through focal adhesion kinase. Carcinogenesis 2008;28:625-31.

23. Paul M, Yuet K, Wan-yee T. Apigenin suppresses cancer cell growth ERB. Neoplasia 2006;11:896-904.

24. Ogata S, Miyake Y, Yamamoto K, Okumura K, Taguchi H. Apoptosis induced by the flavonoid from lemon fruit (Citrus limon BURM. f.) and its metabolites in HL-60 cells. Biosci Biotechnol Biochem 2000;64:1075-78.

25. Weiqun W, Petes CV, Kimberly A. Individual and Interactive effects of apigenin analogs on G2/M cell-cycle arrest in human colon carcinoma cell lines. Nutr Cancer 2004;48:106-14.

26. Lynch DH, Ramsdell F, Alderson MR. fas and fasl in the homeostatic regulation of immune responses. Immunol Today 1995;16:569-74.

27. Nozawa K. Soluble fas (apo- 1, CD95) and soluble fas lig and in rheumatic disease. Arthr Rheum 1997;40:1126-29.

28. Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nucleow DNA.Pragmentation. J Cell Biol 1992;119:493-501.

29. Kerr JFR, Searle J, Harmon BV, Bishop CJ. Apoptosis. In: Potten CS, editor. Perspectives on mamalian cell death. Oxford: Oxford University Press; 1987. p.93.

30. Sillani J. Anticancer and health protective properties of fruit components. Asia Pac J Clin Nutr 2002;11:79-84.

31. Dustar Y, Hashemi M, editors. Apoptosis. 1st edition. Tehran: Islamic Azad University, Tehran Medical Branch; 2008.

32. Hanada M, Delia D, Aiello A, Stadtmauer E, Reed JC. Bcl-2 gene hypomethylation and high-level expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. Blood 1993;82:1820-28.

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2025-07-12]