

بررسی اثرات آپوتوزیس القاء شده آپی جنین بر ۳ رده سلول سرطانی لنفوسیتی B انسان در *in vitro*

مهرداد هاشمی^۱، مهدی نوری لنگ^۲، ملیحه انتظاری^۳، شهره نفیسی^۴، 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 فارچ شناسی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران

چکیده

سابقه و هدف: آپوتوزیس و یا مرگ سازمان یافته، اصلی ترین مکانیسم در تکامل و هموستاز بافت های بالغ در جهت حذف سلول های غیر ضروری است که القای آن روشی موثر در درمان سرطان می باشد. هدف این مطالعه بررسی القای آپوتوزیس آپی جنین (*Apigenin*) بر سلول های سرطانی لنفوسیتی B انسان می باشد.

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، پنی سیلین و استروپتومایسین در دمای ۳۷ درجه به مدت ۲ روز کشت شدند و سپس با آپی جنین تیمار شدند و توان زیستی سلول ها با روش *MTT* ارزیابی شد. سپس اثر آپی جنین بر سلول های سرطانی لنفوسیتی B انسان با روش فلوسایتومتری مورد سنجش قرار گرفت.

یافته ها: در روش *MTT*، سلول های سرطانی لنفوسیتی B انسان در غلظت های ۱۰ و ۱۵ و ۲۰ میکروگرم بر میلی لیتر مرگ سلولی معنی داری را نسبت به گروه های شاهد نشان دادند ($p < 0/01$). ارزیابی فلوسایتومتری اختلاف معنی داری را بین سلول های آپوتوتیک سه رده نشان داد و ۴۸ ساعت زمان مناسبی برای القای آپوتوز بود.

نتیجه گیری: در این مطالعه، برای اولین بار خواص ضدسرطانی آپی جنین و القای آپوتوز آن بر سلول های سرطانی لنفوسیت B در *in vitro* مشخص گردید.

واژگان کلیدی: آپی جنین، آپوتوزیس، سلول های سرطانی لنفوسیتی B انسان.

مقدمه

در حال حاضر سرطان یکی از علل عمده مرگ و میر در جهان است که در اثر عوامل مختلفی از جمله مواد جهش زا و مواد

شیمیایی سرطان زا در محیط بوجود می آید. برآورد شده که ممکن است بیش از ۷۵ درصد سرطان ها دارای منشاء محیطی باشند (۱،۲). آسیب ها و تغییرات ژنتیکی ایجاد شده در توالی DNA و بروز جهش در ژن ها و دیگر تغییرات در ساختار کروموزومی در سرطان زایی نقش بسزایی دارند (۳). بسیاری از مواد جهش زا و سرطان زا از طریق رادیکال های آزاد از جمله گونه های اکسیژن واکنش گر (Reactive Oxygen = ROS)

آدرس نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد پزشکی، دکتر مهرداد هاشمی

(email: hashemi@iautmu.ac.ir)

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۷/۱۰/۲۴

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۸۸/۲/۱۵

(MTT) استفاده و نتایج بر حسب اندکس تحریک محاسبه و با آزمون t مورد ارزیابی قرار گرفت. برای ارزیابی اثر آپوپتوزیس آپی جنین، 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) و EHEB (Human chronic Lymphocytic Leukemia) و Leukemia) از انسیتیتو پاستور ایران تهیه شد. سلول‌ها در محیط RPMI1610 (Sigma) به علاوه ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (FBS) (Fetal Bovine Serum)، ۲ میلی مولار L-گلوتامین، ۲۵ میلی مولار HEPES، ۲/۲۴۰ گرم در لیتر بی کربنات سدیم، ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر پنی سیلین و ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر استروپتوماسیسین در دمای ۳۷ درجه، رطوبت ۹۰ درصد و CO₂ ۵ درصد رشد کردند. در شروع کشت در هر فلاسک ۲۵ سانتی متر مربعی، ۵ × ۱۰^۵ سلول ریخته شد و زمانی که رشد سلول‌ها به مرحله لگاریتمی رسید، پس از ارزیابی سیتوتوکسیسیته و سنجش توان حیاتی، سلول‌ها با غلظت ۱۰ میکروگرم در میلی لیتر آپی جنین (Sigma-Aldrich) تیمار شدند.

MTT (آزمون توان حیاتی) یک روش سنجش کالریمتریک جهت اندازه‌گیری توان حیاتی سلول و اثرات سیتوتوکسیک 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 آپی جنین 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 توکسیسیته ایجاد شده با استفاده از فرمول ذیل محاسبه شد.

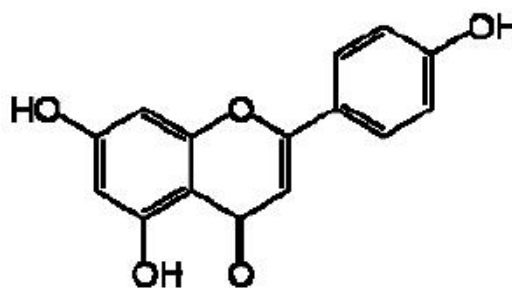
$$\% \text{Cytotoxicity} = \frac{1 - \text{mean absorbance of toxicant}}{\text{mean absorbance of negative control}} \times 100$$

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

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

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 (۴-۶). 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). فلاونوئیدها بیش از ۴۰۰۰ ترکیبات پلی‌فنولیک هستند که به طور گسترده و طبیعی تقریباً در اکثر خانواده‌های 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 اساساً به فلاون‌ها و فلاونول‌ها و ایزوفلاون‌ها و فلاونونول‌ها و فلاونونول‌ها و فلاونونول‌ها تقسیم می‌شوند (۸،۹). مکانیسم عمل فلاونوئیدها شامل خواص آنتی‌اکسیدانتی و تاثیرات آنزیمی و ضدالتهابی و ضد آلرژی می‌باشد (۱۰،۱۱).

آپی جنین (Apigenin) با نام عمومی (4,5,7-trihydroxy flavone) از فلاونوئیدهای موثره گیاه بابونه و از دسته متوکسی فلاون‌ها و متوکسی فلاونول‌ها می‌باشد (شکل ۱). این فلاونوئید 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 آپی جنین از طریق تاثیر بر سلول‌های سرطانی می‌باشد.

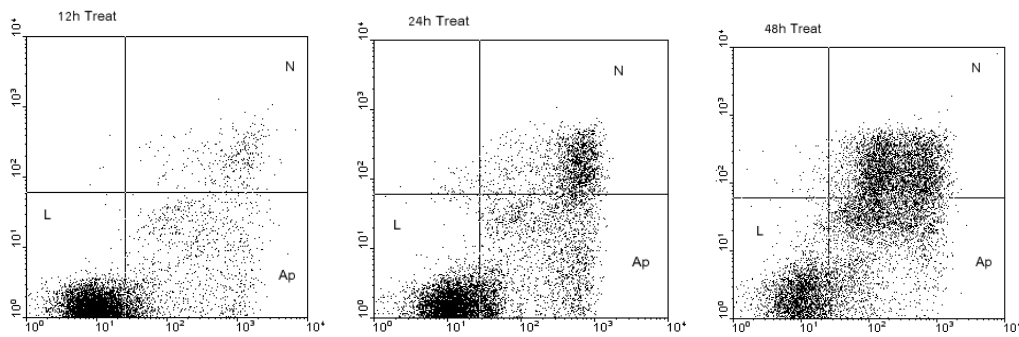


شکل ۱- ساختار شیمیایی ترکیب Apigenin

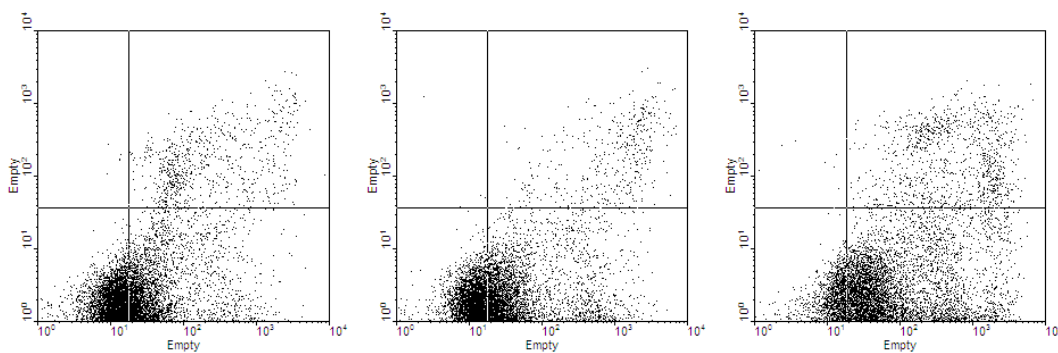
مواد و روشها

در این تحقیق تجربی، برای بررسی اثر سیتوتوکسیسیته آپی جنین بر رده سلول سرطانی از روش آزمون توان حیاتی

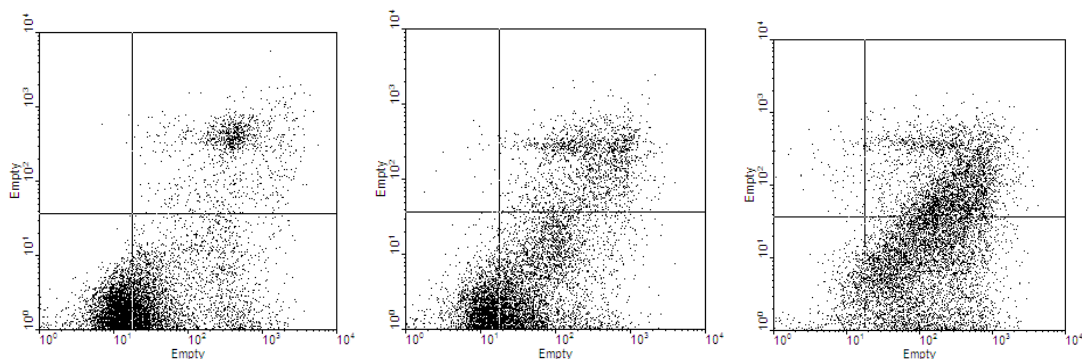
Raji:



Nalm6:



Eheb:



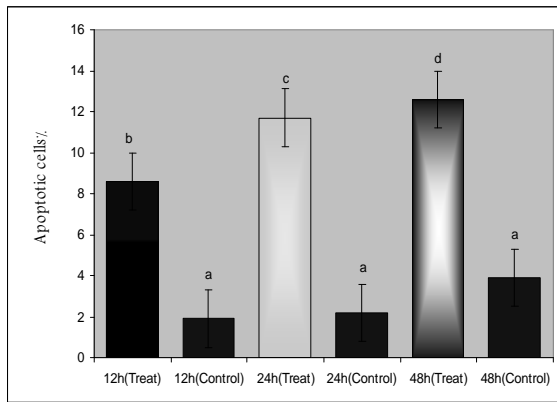
شکل ۲- افزایش تعداد سلول های آپوپتوز در زمانهای ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت. (N= سلولهای نکرز، AP، سلولهای آپوپتوز، L= سلولهای زنده)

شامل Propidium iodide و Annexin-V-fluorecein به سلولها انکوباسیون در دمای ۱۵ الی ۲۵ درجه بمدت ۱۰ الی ۱۵ دقیقه انجام و بلافاصله با دستگاه فلوسایتومتر آنالیز شدند.

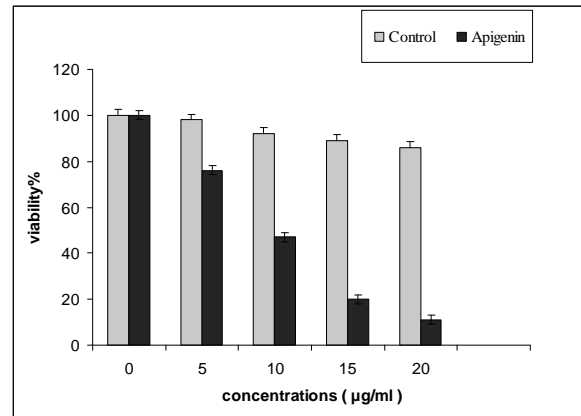
یافته‌ها

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 ($p < 0.01$) (نمودار ۱).

در آنالیز فلوسایتومتری، 1×10^6 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 $200g$ 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 staining (Roche) جهت آنالیز فلوسایتومتری استفاده گردید. پس از سانتریفوژ، با اضافه کردن ۱۰۰ میکرولیتر محلول Annexin-V-fluos Labeling



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

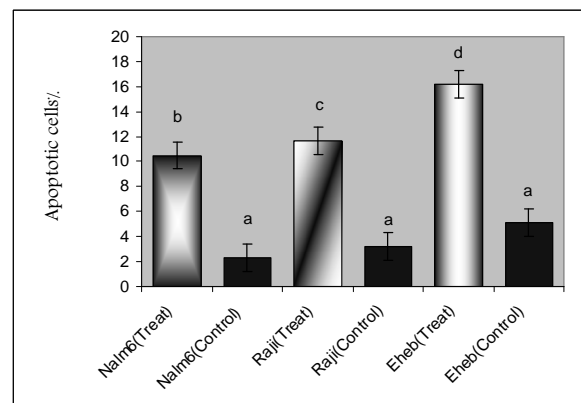


نمودار ۱- نتایج بدست آمده از سنجش MTT در غلظتهای مختلف Apigenin

بحث

از آنجایی که روشهای معمول درمان سرطان (جراحی، شیمی درمانی، رادیوتراپی) علاوه بر سلولهای توموری بر سلولهای طبیعی در حال تقسیم نیز اثرات کشنده دارند یا تقسیم سلولی را مهار می کنند (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 می شوند، بلکه به سلولهای سالم آسیبی نمی رسد (۱۶). اثر انواع آنتی اکسیدانهای خوراکی بر سرطان و بیماریهای قلبی عروقی به اثبات رسیده و مشخص شده که این مواد موجب افزایش بیش از شصت درصد طول عمر می گردد (۱۷). طی بررسیهای آزمایشگاهی بر روی فلاونوئیدهای پلی متوکسیله مشخص شده که این مواد اثرات آنتی اکسیدانی و ضد سرطانی سلولهای سرطانی را دارند (۲۱-۱۸). در سال ۲۰۰۸ با انجام آزمایشهایی بر روی آپی جنین اثر ضد سرطانی آن بر روی سلولهای سرطانی تخمدان موش A2780 مشخص گردید (۲۲). این ماده با بکارگیری گیرندههای بتای استروژن سبب توقف تقسیم سلولی می شود. تغییر در مسیر سیگنالینگ گیرندههای آلفا و بتای استروژن یکی از مهم ترین موارد در متاستاز سلولهای سرطانی از جمله سرطان پروستات می باشد (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 آپی جنین گزارش گردید (۲۵). مسیرهای انتقال سیگنالها که باعث شروع فعالیت آبخاری آنزیمهایی بنام کاسپاز می گردد؛ آسیبهای سلولی که بر اثر افزایش نفوذپذیری غشاء

جهت بررسی و مقایسه اثرات آپی جنین بر سلولهای سرطانی لنفوسیت B، 1×10^6 سلول از هر ۳ رده مختلف سلولهای سرطانی کشت شده در فلاسکهای ۲۵ سانتی متر مربعی تحت تیمار با آپی جنین (پس از محاسبه غلظت IC50 که برابر با غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی لیتر می باشد) قرار گرفتند و با دستگاه فلوسایتومتر آنالیز شدند. داده ها پس از تبدیل زاویه ای 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 معنی داری داشت و رده سلولی Eheb که از خانواده BCLL (Human chronic Lymphocytic Leukemia) می باشد، نسبت به سایر ردهای سلولی تفاوت معنی داری را نشان داد ($p < 0.01$) (نمودار ۲). هم چنین در زمان ۴۸ ساعت پس از تیمار، القای مناسب آپوپتوز دیده شد (نمودار ۳).

دارد. میزان تاثیر بیشتر بر سلولهای سرطانی Eheb را می توان 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 آپوپتوز 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 حمایت های مالی در اجرای این طرح تشکر به عمل می آید.

میتوکندریها و فعال شدن آنزیمهای کاسپازی اتفاق می افتد؛ آسیب DNA که منجر به تجمع پروتئین P53 می گردد زیرا تسهیل ترمیم DNA توسط پروتئین فوق صورت می گیرد و مسیر آسیبهای غشای سلولی که باعث فعال شدن آنزیم اسفنگومیلیناز و در نهایت تولید عامل سرامیدی از ترکیبات لیپیدی غشای سلول می شود، چهار سیستم اصلی در راه اندازی آپوپتوز می باشند (۳۰-۲۶).

این مطالعه نشان داد آپی جنین قادر است در *in vitro* در سلولهای سرطانی لنفوسیت B، آپوپتوز را القا نماید. برای افزایش دقت در تشخیص آپوپتوز روش دقیق فلوسایتومتری با استفاده از Annexin-V-fluorescein staining به کار رفت. در طول مراحل اولیه آپوپتوز، فسفاتیدیل سرین (PS) بر روی سطح سلول ظاهر می شود. اساس این روش ترکیب پروتئین اتصال یافته به کلسیم Annexin V به فسفولیپیدهای غشایی است (۳۱). آپوپتوز القا شده در رده های مختلف سلول سرطانی نشان داد که این ماده در رده سلولی Eheb که از خانواده BCLL می باشد، نسبت به سایر رده های سلولی با اختلاف آماری معنی داری بیشتری تاثیر را

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;336:564-68.

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 flavonoids 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-yeet 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. Dostar 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.