

بررسی اثرات آنتی اکسیدانی و ضد سرطانی عصاره متانولی کالوس

Lithospermum officinale بر رده سلولی NB4 پرومیلوسیت حاد لوسمی انسانی

پروانه یآوری^۱، سید محمد امین موسوی^۲، طاهره ناجی^۳

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد سلولی و مولکولی، گروه آموزشی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم و فناوری های نوین، واحد علوم دارویی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران. ایران.

۲- استادیار، دکترای تخصصی بیوشیمی، گروه زیست فناوری پزشکی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران. ایران. moosavi@nigeb.ac.ir

۳- استادیار، دکترای تخصصی بیولوژی آبزیان، گروه آموزشی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم و فناوری های نوین، واحد علوم دارویی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران. ایران.

تاریخ دریافت: ۹۴/۵/۲۳ تاریخ پذیرش: ۹۵/۸/۱۵

چکیده

زمینه و هدف: اگرچه شیمی درمانی متداول ترین راه کار درمان لوسمی می باشد، اما اغلب با مقاومت دارویی و عوارض جانبی همراه بوده است. آنتی اکسیدانت تراپی به عنوان یک روش موثر با کاهش میزان ROS گونه های واکنش گر اکسیژن) منجر به مهار تکثیر سلول های سرطانی می شود. یکی از منابع سرشار آنتی اکسیدان های طبیعی موجود در ایران، گیاه *Lithospermum officinale* می باشد. در این مطالعه، اثرات آنتی اکسیدانی و آنتی لوکمیک عصاره متانولی این گیاه در رده سلولی NB4 مورد بررسی قرار گرفت.

روش کار: در این آزمایش، رده سلولی NB4 با غلظت های متفاوت عصاره متانولی گیاه LO (۱۰۰-۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر) در فواصل زمانی ۲۴ و ۴۸ ساعت تیمار شدند. به منظور ارزیابی رشد و زیستایی از آزمون تریپان بلو و برای بررسی آپوپتوز از میکروسکوپ فلورسنت و آزمون قطعه قطعه شدن DNA استفاده گردید.

یافته ها: نتایج نشان داد که عصاره متانولی گیاه LO موجب مهار رشد سلول های NB4 به صورت تابعی از زمان و غلظت می شود در حالی که در این سلول ها آپوپتوزی مشاهده نگردید. هم چنین می تواند استرس اکسیداتیو القا شده توسط پراکسید هیدروژن را در سلول های NB4 مهار کند.

نتیجه گیری: با توجه به خواص آنتی اکسیدانی LO، پیشنهاد می شود که اثرات آنتی لوکمیک گیاه LO احتمالاً از طریق مهار تولید ROS صورت می گیرد. بنابراین این گیاه می تواند به عنوان کاندیدی پیشگیرانه در روش های درمانی سرطان مورد ارزیابی بیشتر قرار گیرد.

واژه های کلیدی: لوسمی، آنتی اکسیدانت تراپی، لیتوسپرم آفیسینال، سلول NB4.

مقدمه

کروموزومی (t(15;17)(q22;q21) است که موجب الحاق ژن لوسمی پرومیلوسیت واقع بر روی کروموزوم ۱۵ به ژن کد کننده گیرنده رتینوئیک اسید واقع بر روی کروموزوم ۱۷ می شود. این اختلال موجب ایجاد دو ژن تلفیقی PML-RAR α و RAR α -PML می شود (۵). PML-RAR α انکوژن اصلی APL است که عملکرد رونویسی RAR α را سرکوب می کند که در نتیجه تمایز در مرحله پرومیلوسیتیک مسدود می شود (۲۱). این نوع

Acute Promyelocytic Leukemia (APL) با توقف تمایز در رده سلولی پرومیلوسیتی و تجمع پرومیلوسیت های نابالغ در خون و مغز استخوان شناخته می شود (۲۴). APL یکی از انواع اختصاصی لوسمی میلوئیدی حاد (AML-M3) بوده که حدود ۵ تا ۱۵ درصد از انواع AML (Acute Myeloid Leukemia) را شامل می شود و معمولاً در سنین ۵۰-۴۰ سالگی رخ می دهد (۱۷، ۷). مشخصه بارز APL جا به جایی

لوسمی با شروع سریع علائم، پاسخ ضعیف به شیمی درمانی، انعقاد داخل عروقی منتشر و میزان مرگ و میر بالا شناخته می شود (۱). در دهه های گذشته اکثر روش های درمان سرطان خون شامل شیمی درمانی و پرتو درمانی بوده است (۱۲). با این حال شیمی درمانی با مشکلاتی همراه است که از آن جمله می توان به اثرات جانبی ترکیبات شیمیایی و مقاومت دارویی اشاره کرد. این موارد موجب شده است که روش درمانی موثری که منجر به افزایش معنی دار طول عمر این بیماران شود، حاصل نگردد (۱۶). شواهد اخیر نشان می دهد که برخی از سلول های لوکمیک که به روش های رایج درمانی مقاوم هستند، نسبت به همتای طبیعی خود دارای سطح بالاتری از گونه های واکنش گر اکسیژن یا ROS هستند، به طوری که روش درمانی موثر به نام آنتی اکسیدانت تراپی، با هدف کاهش میزان ROS سلولی و استرس اکسیداتیو پایه گذاری شده است (۲۲، ۱۰، ۶). استرس اکسیداتیو زمانی روی می دهد که تولید مولکول های مضر به نام رادیکال های آزاد بیش از ظرفیت حفاظت بخش دفاع های آنتی اکسیدانی باشد (۱۴، ۱۰). در این میان محصولات طبیعی مشتق شده از گیاهان به عنوان یکی از منابع اصلی مواد فعال بیولوژیکی در نظر گرفته می شود که در مقایسه با سنتز های شیمیایی، در دسترس و کم هزینه می باشند. گیاهان دارویی ایمنی بیشتری نسبت به سایر درمان ها (شیمی درمانی و پرتو درمانی) داشته و هم چنین دارای عوارض جانبی کمتری می باشند. درمان های گیاهی در کشور های در حال توسعه، به عنوان روش درمانی مقابله با انواع سرطان به ویژه سرطان خون، از نقش برجسته ای برخوردار شده است (۲۰). لذا یک عزم جهانی در کشف و معرفی آنتی اکسیدان های قوی با گرایش عمومی به آنتی اکسیدان های مشتق شده از گیاهان در حال شکل گیری است. گیاه LO یکی از گونه های دارویی خانواده گاوزبانیان است که به وفور

در ایران یافت می شود (۳). بسیاری از گزارش ها اثرات آنتی ویروسی، ضد التهابی، آنتی گنادوتروپی، آنتی تیروتروپی، آنتی اورمی و آنتی اکسیدانی LO را نشان می دهند (۱۳، ۱۱). یکی از بهترین منابع از آنتی اکسیدان های طبیعی، ترکیبات فنولی هستند. LO یک منبع غنی از این ترکیبات مانند رزمارینیک اسید، کافنیک اسید، کلروژنیک اسید و لیتوسپرمیک اسید است (۹). علی رغم این که یکی از منابع سرشار آنتی اکسیدان های طبیعی، گیاه LO است با این حال مطالعات وسیعی برای شناخت بهتر مکانیسم عمل آن نیاز می باشد. مطالعه حاضر به منظور بررسی اثرات ضد سرطانی (ضد لوکمی) گیاه LO در رده سلولی لوسمی پرومیلوسیت حاد، به عنوان مدل آزمایشگاهی برای APL صورت پذیرفت.

مواد و روش ها

آماده سازی عصاره LO

به منظور آماده سازی عصاره LO، کالوس ۲۱ روزه ی این گیاه از آزمایشگاه گیاهی پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری تهیه شد. کالوس های گیاهی به دلیل سهولت تکثیر و نگهداری در شرایط آزمایشگاهی، جایگزین مناسبی برای گیاه طبیعی در زمینه تولید مواد فنلی و آنتی اکسیدان ها هستند از اینرو برای تهیه عصاره از کالوس این گیاه استفاده شد (۹). ۵ گرم از این کالوس وزن شده و در ۵ میلی لیتر حلال متانول در هاون کوبیده شد تا کاملاً حل شود. محلول حاصل با شرایط ۲۰ دقیقه، ۴۰۰۰ rpm و دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ و محلول رویی، به داخل شیشه ای منتقل شده و دور آن فویل پیچیده شد، به طوری که از تابش نور به آن جلوگیری شود تا خاصیت آنتی اکسیدانی آن حفظ گردد (۹). به این ترتیب عصاره گیاهی با غلظت ۱ گرم بر میلی لیتر برای مراحل بعدی کار تهیه شد. این عصاره تا

آمده از آزمون دفع رنگ تریپان بلو، بازه غلظتی ۲۵،۵۰، ۷۵،۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر انتخاب و بعد از انکوباسیون سلول های NB4 با غلظت های مختلف عصاره (۲۵، ۵۰، ۷۵، ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) در بازه زمانی ۲۴ و ۴۸ ساعت، ۱۰ میکرولیتر از محلول MTT به آن ها اضافه شده و مجدداً به مدت ۴ ساعت پلیت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد و ۵ درصد CO₂ قرار داده شد. پس از ۴ ساعت که واکنش تبدیل MTT به فورمازان انجام گرفت به منظور حل کردن کریستال های فورمازانی که در آب غیر محلول هستند از ۱۰۰ میکرولیتر دی متیل سولفو کساید (DMSO) استفاده و پس از گذشت یک شبانه روز، جذب نوری در ۵۸۰ نانومتر ثبت شد (۲۵).

بررسی اثرات عصاره LO بر ریخت شناسی سلول های NB4

به منظور بررسی اثرات عصاره LO بر خصوصیات ریخت شناسی (مورفولوژیک) سلول های NB4، تعداد Cell/ml 5×10^5 سلول در پلیت ۲۴ چاهکی، کشت داده شد و سلول ها با غلظت های متفاوت از عصاره LO در فواصل زمانی ۲۴ و ۴۸ ساعت تیمار شدند. تغییرات ریخت شناسی سلول های تیمار شده با عصاره LO، در قیاس با نمونه های کنترل با استفاده از میکروسکوپ نوری معکوس مورد ارزیابی قرار گرفت. برای انجام این آزمایش، ۲۵ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی (Cell/ml 5×10^5) با ۱۰ میکرولیتر از محلول آکریدین اورنج (AO) و اتیدیوم بروماید (EtBr) (شرکت Sigma، آمریکا) با نسبت حجمی ۱:۱ مخلوط و ۱۰ میکرولیتر از آن بر روی لام میکروسکوپی قرار داده شد. پس از تهیه گستره، تغییرات مورفولوژیکی سلول ها با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت مشاهده شد (۱۵).

بررسی مرگ سلولی آپوپتوزی با استفاده از آزمون قطعه قطعه شدن DNA

زمان استفاده در فریزر ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد.

کشت سلول

رده سلولی NB4 از انیستیتوپاستور ایران تهیه شده و در محیط کشت RPMI1640 (Bio Seara، انگلستان) که غنی شده با ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (Fetal bovine serum) (Bio Sera، انگلستان) و آنتی بیوتیک-های استریتومایسین (۱۰۰ میلی گرم در میلی لیتر) و پنی سیلین (۱۰۰ واحد در میلی لیتر) (سیناژن، تهران) بودند، در انکوباتور کشت سلول در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، ۵ درصد CO₂ و رطوبت ۹۵ درصد کشت و نگه داری شد. سلول ها هر ۴۸ ساعت یک بار با محیط کشت جدید تیمار شدند (۱۵).

بررسی اثر عصاره LO بر رشد و زیستایی سلول های NB4

به منظور بررسی اثر عصاره LO بر رشد و زیستایی سلول های NB4، از آزمون دفع رنگ تریپان بلو و شمارش سلولی استفاده شد. برای این منظور تعداد 2×10^4 سلول در هر چاهک پلیت ۹۶ تایی قرار داده شده و سپس بازه غلظتی ۱۰، ۵۰، ۱۰۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر به صورت تصادفی انتخاب و به هر چاهک در زمان های ۲۴ و ۴۸ ساعت اضافه گردید. در هر بازه زمانی تعداد سلول های هر چاهک با استفاده از لام هموسایتومتر و رنگ تریپان بلو (Sigma، آمریکا) در مقایسه با کنترل متانولی مورد سنجش قرار گرفتند. هر آزمایش حداقل سه مرتبه به طور مستقل انجام شد (۱۵).

بررسی اثر عصاره LO بر میزان سمیت و مرگ سلولی

جهت بررسی اثر عصاره LO بر میزان سمیت و مرگ سلولی، آزمون نمک تترازولیم به کار گرفته شد، که بر پایه احیا و شکسته شدن کریستال های زرد رنگ تترازولیم (به وسیله آنزیم سوکسینات دهیدروژناز) و تشکیل کریستال های آبی رنگ نامحلول انجام می شود. به این منظور 10^4 سلول توسط لام نئوبار شمارش و به پلیت ۹۶ خانه ای انتقال یافت و با توجه به نتایج به دست

Microsoft و آزمون آماری t-test مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و داده ها با ارزش $P < 0.05$ از نظر آماری معنی دار تلقی شدند.

نتایج

کاهش رشد و زیستایی سلول های NB4 بر اثر تیمار با عصاره LO

نتایج حاصل از آزمون دفع رنگ تریپان بلو نشان داد که عصاره LO به صورت تابعی از غلظت و زمان موجب مهار رشد سلولی در سلول های NB4 می شود. همان طور که در نمودار ۱-الف مشاهده می شود عصاره LO، پس از ۲۴ ساعت، تغییر معناداری در مهار رشد سلولی ایجاد نکرده است، به طوری که میانگین مهار رشد در غلظت های ۱۰، ۵۰، ۱۰۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر به ترتیب ۹۲، ۸۵، ۸۱، ۶۲، ۶۸ درصد بوده است و پس از تیمار سلول ها در طول ۴۸ ساعت، رشد سلولی به صورت چشمگیری کاهش یافت به نحوی که میانگین مهار رشد در غلظت های ۱۰، ۵۰، ۱۰۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر به ترتیب ۷۳، ۶۰، ۶۷، ۵۴، ۷۹ درصد بود. بر اساس نتایج به دست آمده بیشترین میزان مهار رشد سلول ها در غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر در طول ۴۸ ساعت برای سلول های NB4 رخ داد. داده ها به صورت درصد رشد نسبت به کنترل متانولی و میزان ارزش p هر داده در جدول ۱ ذکر شده است. میزان زیستایی این سلول ها نیز با استفاده از آزمون دفع رنگ تریپان بلو مورد ارزیابی قرار گرفت. درصد بقای سلول ها در همه غلظت ها در مقایسه با درصد زنده بودن سلول-های گروه کنترل هیچ تفاوت معنی داری نداشت به عبارت دیگر عصاره LO سبب القای مرگ در سلول های NB4 نمی شود (نمودار ۱-ب).

برای بررسی مرگ برنامه ریزی سلولی از آزمون قطعه قطعه شدن DNA با کمک الکتروفورز ژل آگارز استفاده گردید. بدین منظور تعداد 5×10^5 سلول با غلظت ۷۵ میکروگرم بر میلی لیتر عصاره LO در زمان ۴۸ ساعت تیمار شد. پس از سانتریفیوژ، سلول ها با ۲۰ میکرولیتر بافر لیز کننده شامل اتیلن دی آمین تتراستیک اسید (EDTA) ۱۰۰ میلی مولار، سدیم دو دسیل سولفات SDS ۰/۸ درصد وزنی- حجمی و بافر تریس- اسید کلریدریک ۲۰ میلی مولار با $pH=8$ (شرکت Merck، آلمان) لیز و سپس ۱۰ میکرولیتر پروتیناز K (شرکت Fermentase، آلمان) به آن افزوده و در ۵۰ درجه سانتی گراد برای حداقل ۹۰ دقیقه قرار گرفت. پس از افزودن ۵ میکرولیتر بافر لودینگ $6 \times$ ۳۰ درصد گلیسرول و ۲۵ درصد بروموفنول بلو، هر یک از نمونه ها در چاهک-های ژل آگارز ۱/۵ درصدی بارگذاری شد. با انجام الکتروفورز قطعات DNA مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند (۲).

بررسی اثر عصاره LO در قدرت آنتی اکسیدانی پراکسید هیدروژن

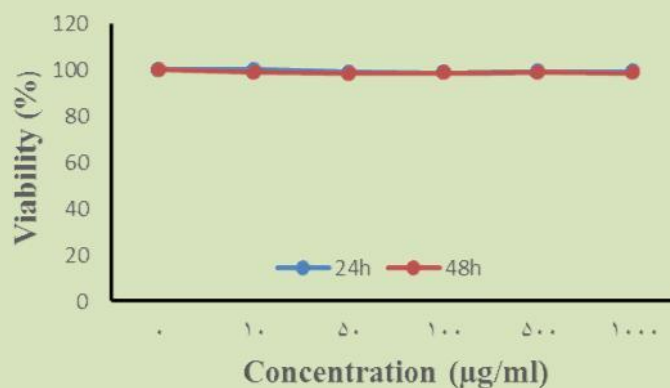
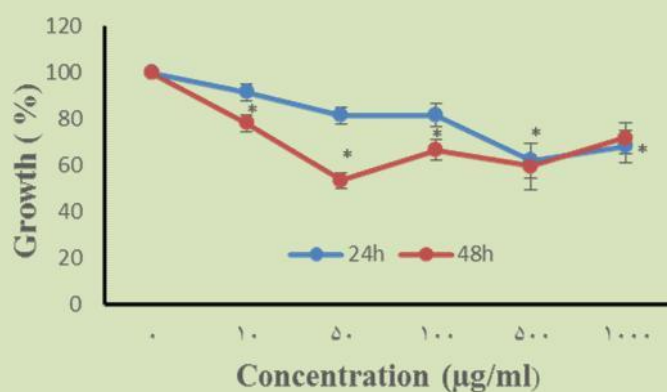
جهت بررسی اثر آنتی اکسیدانی عصاره LO، پراکسید هیدروژن که اکسیدانی قوی است با غلظت ۵۰ میکرومولار انتخاب شد. غلظت عصاره نیز برابر با IC_{50} غلظت مهارکنندگی به میزان ۵۰٪ آن تعیین گردید. سپس تعداد 5×10^5 سلول درون چاهک های پلیت ۲۴ تایی قرار داده شده و یک ساعت پس از تیمار سلول ها با عصاره LO، پراکسید هیدروژن به آن ها افزوده و قیاسی نسبت به سلول هایی که فقط با پراکسید هیدروژن تیمار شدند، صورت پذیرفت.

تحلیل آماری

تمامی داده های به دست آمده از این مطالعه حاصل سه بار تکرار از سه آزمایش مستقل بوده است. داده ها با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۲ و ۲۰۱۳ Excel

جدول ۱- مقایسه درصد رشد سلول های NB4 در حضور غلظت های مختلف عصاره LO

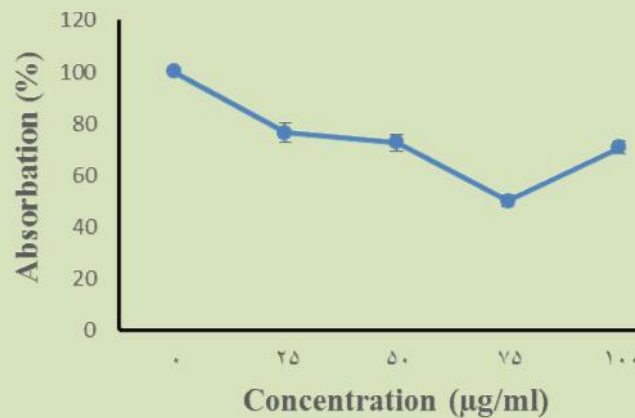
درصد رشد نسبت به کنترل متانولی		غلظت (میکروگرم بر میلی لیتر)
۴۸ ساعت	۲۴ ساعت	
۱۰۰	۱۰۰	۰ (کنترل)
۷۹	۹۲	۱۰
$P < 0.05$	$P = 0.001$	
۵۴	۸۵	۵۰
$P < 0.01$	$P = 0.05$	
۶۷	۸۱	۱۰۰
$P = 0.01$		
۶۰	۶۲	۵۰۰
$P = 0.01$	$P < 0.05$	
۷۳	۶۸	۱۰۰۰
$P = 0.01$	$P < 0.05$	



نمودار ۱- الف) اثرات عصاره LO بر رشد سلول های NB4. LO به صورت وابسته به غلظت و زمان سبب کاهش میزان رشد و تکثیر سلولی می شود و ب) اثرات عصاره LO بر زیستایی سلول های NB4. میزان زیستایی در سلول های تیمار شده با LO نسبت به سلول- های کنترل تفاوت معنی داری نشان نداد. نتایج میانگین سه آزمایش مستقل است که هر یک سه بار تکرار شده و به صورت میانگین سه تکرار مستقل \pm انحراف استاندارد (SD) می باشد.

اثر سایتوتوکسیتی عصاره ی LO، بر رده سلولی NB4

نتایج حاصل از بررسی اثر سایتوتوکسیتی عصاره ی LO، بر رده سلولی NB4، نشان داد که این عصاره دارای اثرات سمی بر روی این سلول ها بوده و موجب مهار رشد آن ها می شود. با توجه به نمودار ۲، عصاره ی LO به صورت تابعی از غلظت و زمان دارای اثرات سمی بر سلول های NB4 می باشد و میزان OD در طول ۴۸



نمودار ۲- میزان اثر سایتوتوکسیک عصاره ی LO روی سلول های سرطانی NB4 پس از ۴۸ ساعت. پس از تیمار سلول های NB4 با غلظت های مختلف عصاره در زمان ۴۸ ساعت میزان سمیت عصاره با استفاده از آزمون MTT مورد ارزیابی قرار گرفت. LO دارای اثرات سمی به صورت وابسته به غلظت و زمان بر سلول های NB4 می باشد. مقادیر ارائه شده در نمودار به صورت میانگین سه تکرار مستقل \pm انحراف استاندارد (SD) می باشد.

شود. به منظور اثبات عدم مرگ سلولی آپوپتوزی از آزمون قطعه قطعه شدن DNA توسط الکتروفورز ژل آگارز استفاده و این آزمون در کنار داده های به دست آمده از میکروسکوپ فلورسنت نشان دهنده آن است که عصاره LO باعث مرگ سلولی آپوپتوزی نمی شود و فقط باعث مهار رشد سلولی می گردد (شکل ۲).

اثرات عصاره LO بر کاهش فعالیت اکسیدانی و آپوپتوزی پراکسید هیدروژن

همان طور که اشاره شد نتایج به دست آمده بیان گر آن بود که عصاره LO موجب مرگ سلولی آپوپتوزی سلول های NB4 نمی شود از این رو نتیجه حاصله این بود که این عصاره یک ترکیب آپوپتوتیک نیست. بنابراین در پی بررسی اثرات آنتی اکسیدان آن مشاهده گردید که پراکسید هیدروژن یک اکسیدان قوی بوده و

تغییرات ریخت شناسی سلول های NB4 تیمار شده با

عصاره LO

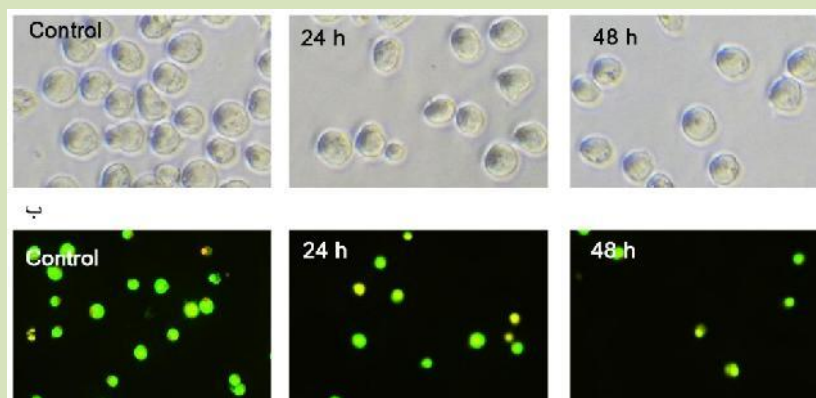
بررسی های انجام شده با میکروسکوپ نوری نشان دهنده عدم تغییرات ظاهری در سلول های NB4 تیمار شده با عصاره LO است. سلول های NB4 کروی بوده که پس از تیمار با عصاره ی LO در بازه های زمانی ۲۴ و ۴۸ ساعت تغییرات ریخت شناسی معنی داری نسبت به کنترل در آن ها ایجاد نمی شود اما کاهش رشد قابل ملاحظه ای در این سلول ها دیده شد (شکل ۱-الف).

اثرات آپوپتوزی عصاره LO

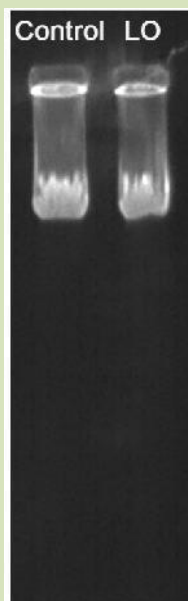
برای مطالعه آپوپتوز در ابتدا از میکروسکوپ فلورسنت استفاده گردید، همان طور که در شکل ۱-ب مشاهده می شود، مشخص گردید که مقایسه میان سلول-های تیمار شده با عصاره LO و سلول های کنترل، تفاوت معنی داری مبتنی بر وقوع آپوپتوز مشاهده نمی-

LO بر فعالیت اکسیدانی پراکسید هیدروژن را تأیید کرد و بیان گر کاهش آپوپتوز در این راستا بود (شکل ۳-الف) به منظور مطالعه دقیق تر و تعیین نوع مرگ سلولی که آیا عصاره LO موجب مهار مرگ سلولی القا شده توسط پراکسید هیدروژن می شود یا خیر، از روش رنگ آمیزی با میکروسکوپ فلورسنس استفاده شد (شکل ۳-ب). در مشاهدات حاصل از میکروسکوپ فلورسنس و رنگ آمیزی با Ao/EtBr مقایسه ای میان سلول های تیمار شده با پراکسید هیدروژن پس از ۲۴ ساعت با سلول های کنترل انجام گرفت. در سلول های تیمار شده، رنگ قرمز که حاکی از القا مرگ سلولی از نوع آپوپتوز در این سلول هاست، نمایان شده در حالی که در سلول هایی که با ترکیب عصاره LO و پراکسید هیدروژن تیمار شدند، عصاره توانست موجب اثر مهاری در القای آپوپتوز توسط پراکسید هیدروژن شود

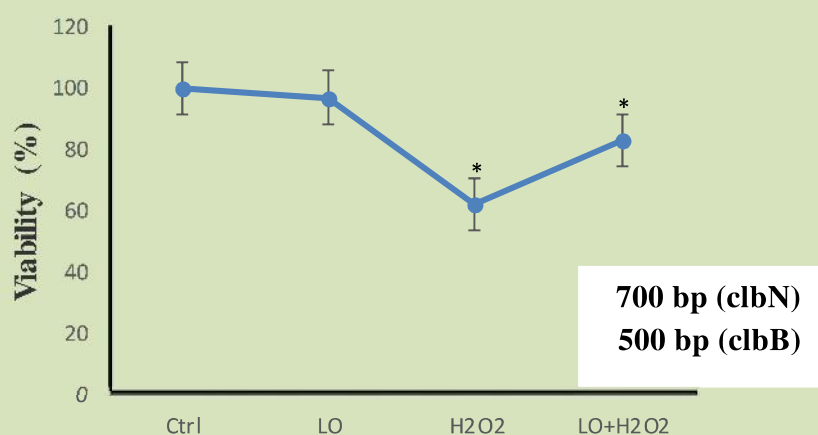
اثرات این عصاره در مهار اثر اکسیدانی پراکسید هیدروژن در غلظت ۵۰ میکرو مولار در طی ۲۴ ساعت موجب مرگ ۴۰ درصد از سلول های NB4 در مقایسه با سلول های کنترل می گردد. این در حالی بود که ترکیب عصاره LO در غلظت ۷۵ میکروگرم بر میلی لیتر و پراکسید هیدروژن در غلظت ۵۰ میکرو مولار و در طول ۲۴ ساعت موجب مرگ ۱۹ درصدی سلول های NB4 شده و این نتیجه گویای این بود که عصاره LO خاصیت مهارکنندگی ۲۱ درصدی بر روی فعالیت اکسیدانی پراکسید هیدروژن داشته است بنابراین می توان نتیجه گرفت عصاره LO یک ترکیب آنتی اکسیدان در غلظت ۷۵ میکروگرم بر میلی لیتر می باشد (نمودار ۳). مقایسه تغییرات ظاهری سلول های NB4 تیمار شده با پراکسید هیدروژن و سلول هایی که با ترکیب عصاره LO و پراکسید هیدروژن تیمار شدند اثر مهارکنندگی عصاره



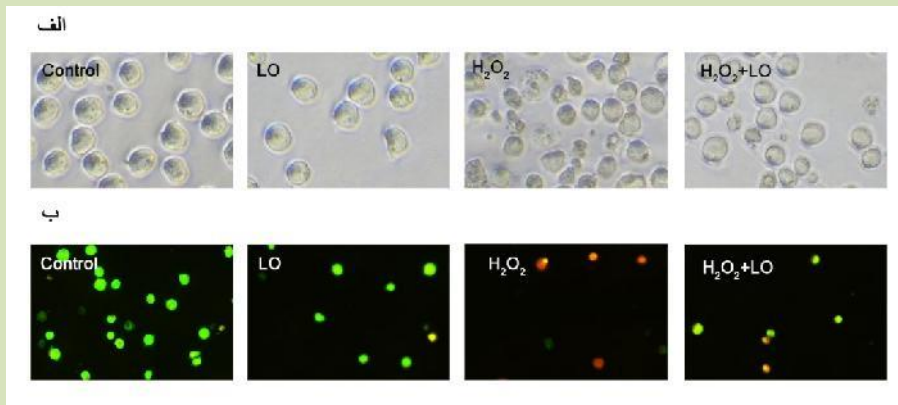
شکل ۱- الف) بررسی تغییرات ریخت شناسی سلول های NB4 تیمار شده با عصاره ی LO. سلول های NB4 با غلظت های متفاوت از عصاره ی LO تیمار شدند و سپس خصوصیات ظاهری سلول ها با استفاده از میکروسکوپ نوری (بزرگنمایی ۴۰X) مورد بررسی قرار گرفت که نتایج نشان دهنده ی عدم تغییرات ظاهری معنی داری نسبت به کنترل در آن ها شد. ب) تصویر میکروسکوپ فلورسنس پس از تیمار سلول های NB4 با عصاره LO در غلظت ۷۵ میکروگرم بر میلی لیتر در زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت. در مقایسه میان سلول های تیمار شده با عصاره LO با سلول های کنترل تفاوت معنی داری مبتنی بر وقوع آپوپتوز مشاهده نمی شود.



شکل ۲- بررسی اثرات عصاره LO بر قطعه قطعه شدن DNA. پس از تیمار سلول های NB4 با عصاره LO، با غلظت ۷۵ میکروگرم بر میلی لیتر، در زمان ۸ ساعت، با استفاده از الکتروفورز DNA به کمک ژل آگارز، اثرات آپوآپتوزی عصاره LO بررسی شد که حاکی از عدم وقوع آپوآپتوز توسط این عصاره بود.



نمودار ۳- بررسی خاصیت مهارکنندگی عصاره LO بر فعالیت اکسیدانی پراکسید هیدروژن. خاصیت مهارکنندگی عصاره LO بر روی فعالیت اکسیدانی پراکسید هیدروژن بررسی شد. نتایج نشان داد که پراکسید هیدروژن در غلظت ۵۰ میکرو مولار در زمان ۲۴ ساعت باعث مرگ ۴۰ درصد از سلول های NB4 شد در حالی که در ترکیب عصاره LO و پراکسید هیدروژن، عصاره LO، ۲۱ درصد میزان مرگ را کاهش داده است.



شکل ۳-الف) مقایسه تغییرات ریخت شناسی سلول های NB4 تیمار شده با پراکسید هیدروژن و سلول های تیمار شده با ترکیب عصاره LO و پراکسید هیدروژن. خصوصیات ظاهری سلول ها با استفاده از میکروسکوپ نوری (بزرگنمایی $40\times$) مورد بررسی قرار گرفت که نتایج نشان دهنده ی اثر مهاری عصاره LO بر روی خاصیت اکسیدانی پراکسید هیدروژن می باشد. ب) اثرات مهاری عصاره LO بر تغییرات ریخت شناسی آپوپتوز القا شده توسط پراکسید هیدروژن بر سلول های NB4. پس از تیمار سلول های NB4 با پراکسید هیدروژن با غلظت ۵۰ میکرومولار و ترکیب عصاره LO با غلظت ۷۵ میکروگرم بر میلی لیتر و پراکسید هیدروژن با غلظت ۵۰ میکرومولار، به مدت ۲۴ ساعت خصوصیات ظاهری آپوپتوز در سلول های تیمار شده و سلول های کنترل با استفاده از میکروسکوپ فلورسنس و رنگ آمیزی با Ao/EtBr مورد بررسی قرار گرفت.

بحث و نتیجه گیری

می برند که به طور مستقیم باعث القای آسیب به DNA و مولکول های زیستی می شوند. رادیکال های آزاد تولید شده توسط روش های درمانی سرطان، از عوارض جانبی مهم آن ها هستند. گزارشات نشان می دهند که آنتی اکسیدان ها می توانند باعث کاهش عوارض جانبی شوند به طوری که بیماران قادر به تکمیل رژیم های شیمی درمانی تجویز شده می شوند و در نتیجه به سهم خود، به طور به القوه باعث بهبود موفقیت در پاسخ به تومور می-شوند. مطالعات متعدد نشان داده است که ترکیب شیمی درمانی / پرتودرمانی و آنتی اکسیدان ها باعث کاهش اندازه تومور و افزایش طول عمر بیماران می شود(۸). البته بحث های بسیاری پیرامون این موضوع مطرح است که ممکن است آنتی اکسیدان ها با کاهش رادیکال های آزاد اکسید کننده موجب کاهش اثربخشی شیمی درمانی و پرتو درمانی شوند. مطالعات انسانی و حیوانی نشان می-دهند که آنتی اکسیدان ها بدون کاهش اثر بخشی شیمی درمانی یا پرتودرمانی باعث کاهش عوارض جانبی، کاهش اندازه تومور و افزایش طول عمر بیماران می شوند که این داده ها توسط Weijl و همکاران جمع بندی شده است(۲۳). با این وجود هنوز فعل و انفعالات بین آنتی

مطالعه حاضر به منظور بررسی اثرات ضد سرطانی (ضد لوکمی) گیاه LO در رده سلولی لوسمیک انسانی NB4 صورت پذیرفت. شایان ذکر است که تاکنون مطالعه جامعی در این رابطه نسبت به اثرات آنتی لوکمیک این گیاه انجام نگرفته است و در مطالعه حاضر برای اولین بار اثرات آنتی لوکمیک LO بر رده سلولی لوکمیک انسانی NB4 مورد بررسی قرار گرفته است. داده های حاصل از این مطالعه بیان گر این بود که عصاره LO می تواند به عنوان یک مهار کننده رشد در سلول های NB4 مطرح شود و از این نظر می تواند به عنوان یک داروی موثر در کنار داروهای شیمی درمانی مورد توجه قرار گیرد. هم چنین نتایج گویای این بود که عصاره LO، دارای خاصیت مهارکنندگی بر روی فعالیت اکسیدانی پراکسید هیدروژن است، بنابراین می توان نتیجه گرفت عصاره LO یک ترکیب آنتی اکسیدانی است. از طرفی مکانیسم اولیه بسیاری از داروهای شیمی درمانی بر روی سلول های سرطانی بر پایه تشکیل رادیکال آزاد یا ROS است و مبنای پرتودرمانی نیز بر این است که پرتوهای یونیزان سلول های توموری را از بین

است که از عوامل ایجاد خواص مفید در گیاهان دارویی است. این ترکیب دارای فعالیت های بیولوژیکی مهمی از جمله اثرات ضد ویروسی، ضد باکتری، ضد التهابی، ضد سرطانی و هم چنین دارای فعالیت آنتی اکسیدانی بوده (۱۳، ۱۱) و دارای خاصیت پاکسازی (Scavenger) رادیکال های اکسیژن می باشد که مانع رشد بیش از حد سلول ها می شود (۱۹). بنابراین می توان اثرات گیاه LO به وجود ترکیبات فنولی در این گیاه نسبت داد. با توجه به اثرات مهارکنندگی رشد و خاصیت آنتی اکسیدانی گیاه LO انتظار می رود این ترکیب بتواند تحولی در نظام درمانی بیماران سرطان ایجاد کند و زمینه مطالعات بیشتر برای درمان APL را فراهم آورد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری که حمایت مالی این طرح را بر عهده داشته اند، کمال تشکر و امتنان را دارند. هم چنین از جناب آقای دکتر مهدوی به جهت همکاری در تامین بخشی از مواد پژوهش و سرکار خانم دکتر رحمتی به خاطر مساعدت و همکاری صمیمانه شان در تفسیر و ویرایش مقاله صمیمانه سپاسگزاری می گردد.

اکسیدان ها و عوامل شیمی درمانی مشخص نشده است. مطالعات نشان داده اند بیماران تحت درمان با آنتی اکسیدان ها به همراه شیمی درمانی/پرتودرمانی از بسیاری از ویژگی های مثبت درمانی از جمله تحمل بهتر بیماری، از دست دادن وزن کمتر، کیفیت بهتر زندگی و از همه مهم تر طول عمر بیشتر نسبت به بیمارانی که مکمل های آنتی اکسیدانی را دریافت نکرده اند، برخوردار هستند (۱۸). بنابراین گیاه LO علاوه بر این که می تواند به عنوان مهارکننده رشد در کنار داروهای شیمی درمانی استفاده شوند، به عنوان آنتی اکسیدان هم می تواند در کنار سایر درمان ها، مفید واقع شود. در بسیاری از گیاهان دارویی آنتی اکسیدان های طبیعی یافت می شود که به لحاظ حفاظت بدن در مقابل تخریب ناشی از استرس های اکسیداتیو حاصل از رادیکال های آزاد از اهمیت خاصی برخوردار هستند (۴). به نظر می رسد کلیه خواص گیاه LO به نحوی با قدرت آن در پاک سازی رادیکال های اکسیژنی در آن مرتبط باشد گیاه LO سرشار از ترکیبات پلی فنلیک اسیدی است از جمله این ترکیبات می توان رزمارینیک اسید، لیتوسپرمیک اسید و کافئیک اسید را نام برد. رزمارینیک اسید یک ترکیب پلی فنلی طبیعی

منابع

1. Assadollahi, V., Parivar, K., Roudbari, N. H., Khalatbary, A. R., Motamedi, M., Ezatpour, B. (2013). The effect of aqueous cinnamon extract on the apoptotic process in acute myeloid leukemia HL-60 cells. *Advanced biomedical research*, 2.
2. Asvadi Kermani, I. (2011). Growth inhibitory and apoptotic effects of carbenoxolone on human leukemia NB4 cell Line. *Arak Medical University Journal*, 14(5); 92-100.
3. Baczyńska, B., Lityńska-Zajac, M. (2005). Application of *Lithospermum officinale* L. in early Bronze Age medicine. *Vegetation History And Archaeobotany*, 14(1); 77-80.
4. Baharum, Z., Akim, A. M., Taufiq-Yap, Y. H., Hamid, R. A., Kasran, R. (2014). In vitro antioxidant and antiproliferative activities of methanolic plant part extracts of *Theobroma cacao*. *Molecules*, 19(11); 18317-18331.
5. Baljevic, M., Park, J. H., Stein, E., Douer, D., Altman, J. K., & Tallman, M. S. (2011). Curing all patients with acute promyelocytic leukemia: are we there yet? *Hematology/Oncology Clinics of North America*, 25(6); 1215-1233.
6. Cui, X. (2012). Reactive oxygen species: the achilles' heel of cancer cells? *Antioxidants & redox signaling*, 16(11); 1212-1214.
7. De-Medeiros, B., Strapasson, E., Pasquini, R., & De-Medeiros, C. (1998). Effect of all-trans retinoic acid on newly diagnosed acute promyelocytic leukemia patients: results of a Brazilian center. *Brazilian journal of medical and biological research*, 31(12); 1537-1543.
8. Fuchs-Tarlovsky, V. (2013). Role of antioxidants in cancer therapy. *Nutrition*, 29(1); 15-21
9. Haghbeen, K., Mozaffarian, V., Ghaffari, F., Pourazeezi, E., Saraji, M., Joupari, M. D.

- (2006). *Lithospermum officinale* callus produces shikalkin. *Biologia*, 61(4); 463-467..
- 10.**Hole, P. S., Darley, R. L., Tonks, A. (2011). Do reactive oxygen species play a role in myeloid leukemias? *Blood*, 117(22); 5816-5826.
- 11.**Hossan, M. S., Rahman, S., Bashar, A. A., Jahan, R., Al-Nahain, A., Rahmatullah, M. (2014). Rosmarinic acid: a review of its anticancer action.
- 12.**Jackson, N., Menon, B., Zarina, W., Zawawi, N., & Naing, N. (1999). Why is acute leukemia more common in males? A possible sex-determined risk linked to the ABO blood group genes. *Annals of hematology*, 78(5); 233-236.
- 13.**Krajčovičová, Z., Meluš, V. Bioactivity and potential health benefits of rosmarinic acid.
- 14.**Maiese, K., Chong, Z. Z., Hou, J., Shang, Y. C. (2010). Oxidative stress: Biomarkers and novel therapeutic pathways. *Experimental gerontology*, 45(3); 217-234.
- 15.**Moosavi, M. (2010). The inductive effect of boric acid on growth inhibition and differentiating changes of human chronic myeloid leukemia K562 cell line.
- 16.**Mrózek, K., Marcucci, G., Paschka, P., Whitman, S. P., Bloomfield, C. D. (2007). Clinical relevance of mutations and gene-expression changes in adult acute myeloid leukemia with normal cytogenetics: are we ready for a prognostically prioritized molecular classification? *Blood*, 109(2); 431-448.
- 17.**Nagendra, S., Meyerson, H., Skallerud, G., Rosenthal, N. (2002). Leukemias resembling acute promyelocytic leukemia, microgranular variant. *American journal of clinical pathology*, 117(4); 651-657.
- 18.**Nepomuceno, J. C. (2011). Antioxidants in cancer treatment: INTECH Open Access Publisher.
- 19.**Petersen, M., Simmonds, M. S. (2003). Rosmarinic acid. *Phytochemistry*, 62(2); 121-125.
- 20.**Saedi, T. A., Md Noor, S., Ismail, P., Othman, F. (2014). The effects of herbs and fruits on leukaemia. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*,
- 21.**Salomoni, P., Dvorkina, M., Michod, D. (2012). Role of the promyelocytic leukaemia protein in cell death regulation. *Cell death & disease*, 3(1); e247.
- 22.**Trachootham, D., Alexandre, J., Huang, P. (2009). Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? *Nature reviews Drug discovery*, 8(7); 579-591.
- 23.**Weijl, N., Cleton, F., Osanto, S. (1997). Free radicals and antioxidants in chemotherapy-induced toxicity. *Cancer treatment reviews*, 23(4); 209-240.
- 24.**Yaghmaie, M., Alimoghaddam, K., Mozdarani, H., Ghavamzadeh, A., Hajhashemi, M., Aznab, M. (2012). Cytogenetic and fms-like tyrosine kinase 3 mutation analyses in acute promyelocytic *Leukemia patients*. *Iranian biomedical journal*, 16(1); 10.
- 25.**Yazdanparast, R., Moosavi, M. A., Mahdavi, M., Sanati, M. H. (2005). 3-Hydrogenkwadaphnin from *dendrostellera lessertii* induces differentiation and apoptosis in HL-60 cells. *Planta medica*, 71(12); 1112-1117.



Anti-Oxidative and Anti-Leukemic Effects of Methanolic Extracts of *Lithospermum officinale*'s Callus on Human Acute Promyelocytic Leukemia NB4 Cell Line

P. Yavari¹, **M. A. Moosavi**², T. Naji³

1. Cell & Molecular Biology Department, Pharmaceutical Sciences Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

2. Assistant Professor Division of Medical Biotechnology, National Institute for Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran. a-moosavi@nigeb.ac.ir

3. Assistant Professor Cell & Molecular Biology Department, Pharmaceutical Sciences Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

Received: 2016.13.8

Accepted: 2016.5. 11

Abstract

Introduction & Objective: Although chemotherapy is a current treatment strategy for leukemia, it is usually accompanied with development of drug resistance and severe side effects. One of the possible therapeutic approaches is reducing ROS (Reactive Oxygen Species) in malignant cells (as anti-oxidant therapy) to inhibit proliferation of cancer cells. LO (*Lithospermum officinale*), as an Iranian medicinal plant, has been reported as a rich source of anti-oxidants. Here, we studied anti-oxidative and anti-leukemic effects of methanol extract of this plant NB4 cell line.

Material and Method: NB4 cell line was cultured and treated with different concentrations of LO extract with methanol (25-100µg/ml) in various time intervals (12-48 hours). Trypan blue exclusion test was used to evaluate growth inhibitory and viability effects of the extract on NB4 cells. Fluorescent microscopy and DNA fragmentation assay were used to study apoptosis.

Results: The results showed that LO caused growth inhibition but not apoptosis in a time- and dose-dependent manner in NB4 cells. The methanol extract of the plant could inhibit oxidative stress induced by hydrogen peroxide in NB4 cells

Conclusions: Attain to anti-oxidant properties of LO, suggesting that anti-leukemic effects of the plant may mediate inhibiting ROS generation so this plant may be proposed as chemo-preventive candidate for further evaluation in cancer therapeutic approaches.

Keywords: Leukemia, Anti-Oxidant Therapy, *Lithospermum officinale*, NB4 Cells.