بررسی اثر سمیت سلولی عصاره هیدرومتانولی دانه انگور سیاه بر سلول‌های سرطانی KB (مدل سلولی اسکواموس سل کارسینوما)

دکتر امیرعلا آغبالی[1]، دکتر سپیده وثوق حسینی*[1]، دکتر بهزاد برادران[2]، دکتر نادر کلباسی غروی[3]، دکتر علی بنده حق[4]، اکبر جلیلی[5]

چکیده

مقدمه: دانه انگور سیاه حاوی ترکیبات فعالی مانند آنتی‌سیانین، پروآنتوسیانیدین و پروسیانیدین می‌باشد. مطالعه‌ی حاضر با هدف ارزیابی اثر سمیت سلولی عصاره هیدرومتانولی دانه انگور سیاه بر روی سلول‌های سرطانی KB و القای آپوپتوز بر روی آن‌ها انجام گردید.

مواد و روش‌ها: در مطالعه‌ی تجربی حاضر از دانه انگور به کمک حلال هیدرومتانولی ۹۰ درصد، عصاره‌گیری شد. سلول‌های سرطانی KB در محیط کشت با غلظت‌های مختلف عصاره تیمار شدند و در زمان ۲۴ ساعت اثر سمیت سلولی آن‌ها با استفاده از روش Micro-culture tetrazolium test (MTT) بررسی شد. جهت بررسی القای آپوپتوز، تست الایزا در طی ۲۴ ساعت انجام پذیرفت. داده‌ها در نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۲۰، با آزمون یک‌طرفه ANOVA مورد آنالیز قرار گرفت ($\alpha = ۰/۰۵$).

یافته‌ها: نتایج حاصل از بررسی اثر سمیت سلولی عصاره هیدرومتانولی دانه انگور سیاه بر روی قابلیت زیست‌سازگاری سلول‌های سرطانی KB در طی ۲۴ ساعت نشان داد که عصاره هیدرومتانولی در همه غلظت‌های بررسی شده توسط تستMTT، اختلاف معنی‌دار ($p\ value = ۰/۰۴۶$) با گروه کنترل داشته و توانایی مهار رشد و خاصیت سمیت سلولی بر سلول‌های سرطانی KB را دارد و پس از ۲۴ ساعت موجب مهار رشد سلول‌های سرطانی KB با IC50 (Inhibition cencentration 50) ۴۱۷/۳۷۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر شد. تست الایزا در طی ۲۴ ساعت نشان داد که عصاره هیدرومتانولی، ۶۸ درصد مرگ سلولی آپوپتوز را القا می‌کند. با بررسی مورفولوژی سلول‌ها تغییرات عمده آپوپتوزی مشاهده شد و مرگ سلولی گروه تحت تأثیر عصاره، معنی‌دار ($p\ value = ۰/۰۰۲$) بود.

نتیجه‌گیری: با توجه به محدودیت‌های این مطالعه، عصاره هیدرومتانولی دانه انگور سیاه، توانایی مهار رشد و خاصیت سمیت سلولی بر سلول‌های سرطانی KB را دارد و سبب القای آپوپتوز در این رده سلولی KB می‌گردد. به‌نظر می‌رسد عصاره هیدرومتانولی دانه انگور کاندید مناسبی جهت استخراج و خالص سازی ترکیبات فعال باشد.

کلید واژه‌ها: دانه انگور سیاه، سمیت سلولی، آپوپتوز، اسکواموس سل کارسینوما

* استاد، گروه آسیب‌شناسی دهان، فک و صورت، دانشکده دندان‌پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران (مؤلف مسؤول)
svosough.rare@yahoo.com

۱: دانشیار، گروه آسیب‌شناسی دهان، فک و صورت، دانشکده دندان‌پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

۲: استادیار، گروه ایمنولوژی پزشکی، مرکز تحقیقات ایمنولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

۳: دستیار تخصصی، گروه آسیب‌شناسی دهان، فک و صورت، دانشکده دندان‌پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

۴: استادیار، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

۵: کارشناس آزمایشگاه، مرکز تحقیقات ایمنولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

این مقاله در تاریخ ۹۱/۱۲/۱۹ به دفتر مجله رسیده، در تاریخ ۹۲/۴/۲۵ اصلاح شده و در تاریخ ۹۲/۶/۱۹ تأیید گردیده است.

مجله دانشکده دندان‌پزشکی اصفهان
۱۳۹۲؛ ۹(۶)؛ ۴۸۹ تا ۴۹۷.

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

انگور سیاه (Vitis vinifera) از خانواده Vitaceae بومی مناطق مدیترانه‌ای، اروپای مرکزی و جنوب غربی آسیا است. دانه و پوست انگور در طب سنتی و میوه آن به‌عنوان مکمل غذایی استفاده می‌شود. انگور سیاه حاوی ترکیبات فعالی چون فلاونوئیدها، پلی‌فنول‌ها، آنتی‌سیانین، پروآنتوسیانیدین و پروسیانیدین‌ها می‌باشد[۱]. این ترکیبات فعال از نظر زیستی با دخالت در مسیرهای بیولوژیکی مختلف، اثرات سمیت سلولی، ضدسرطانی و ضدمیکروبی دارند. عصاره دانه انگور دارای طیف وسیعی از اثرات دارویی و درمانی مانند فعالیت‌های آنتی اکسیداتیو، ضدالتهابی و ضدمیکروبی می‌باشد[۲].

سرطان پس از بیماری‌های قلبی عروقی، شایع‌ترین دلیل اصلی مرگ و میر در بیشتر جوامع می‌باشد. بروز سرطان به عواملی چون سن، جنس و زمینه ژنتیکی بستگی دارد[۳]. سرطان دهان کم‌تر از ۳ درصد کل سرطان‌ها را تشکیل می‌دهد اما یازدهمین سرطان شایع در سراسر دنیا است. تقریباً ۹۴ درصد بدخیمی‌های دهان را کارسینوم سلول سنگ‌فرشی (Squamous cell carcinoma) تشکیل می‌دهد[۴].

درمان کارسینوم سلول سنگ‌فرشی داخل دهانی بر اساس مرحله‌بندی بالینی بیماری تعیین می‌گردد و شامل جراحی وسیع (رادیکال)، اشعه درمانی یا ترکیبی از این دو است. درمان‌های رایج مانند شیمی درمانی دارای عوارض بسیار بالایی بوده و در بهترین حالت تنها باعث افزایش طول عمر به مدت چند سال می‌شوند[۴] .با وجود پیشرفت‌های به‌دست آمده در درمان و فهم پاتوژنز مولکولی سرطان دهان میزان بقا در طی چند دهه‌ی اخیر بهبود قابل توجهی نداشته و در حد ۵۰ درصد تا ۵۹ درصد باقیمانده است[۴]. در سال‌های اخیر استفاده از ترکیبات طبیعی برای مقابله با سرطان با توجه به عوارض جانبی کم، هزینه‌های ناچیز و هم‌چنین تأثیرات امید بخش مورد توجه واقع شده است[۵]. امروزه ترکیبات گیاهی فراوانی با اثرات بیولوژیک مختلف جداسازی شده و در علم داروسازی نوین وارد شده‌اند که در درمان سرطان‌های مختلف مؤثرند[۶].

برای درمان هر بیماری ابتدا شناخت کامل بیماری و عوامل مؤثر بر آن مورد نیاز می‌باشد. سرطان دهان مانند سایر سرطان‌ها به دلیل جهش، فعال‌سازی یا تقویت پروتوانکوژن‌ها و ژن‌های سرکوب‌گر تومور و هم‌چنین به‌دلیل از دست رفتن کنترل چرخه‌ی سلولی (تکثیر بیش از مهار) و بقای سلولی (آپوپتوز کمتر از حد نرمال) ایجاد می‌شود[۷] .با توجه به نکات فوق یکی از راه‌کارهای جدید درمانی استفاده از داروهایی گیاهی است که بتوانند سبب القای آپوپتوز در سلول‌های بدخیم شوند. یکی از عملکردهای داروهای ضد سرطانی القای آپوپتوز می‌باشد، آپوپتوز یا مرگ برنامه‌ریزی شده سلول یک فرایند تنظیم شده دقیق می‌باشد که در طی آن یک یا گروهی از سلول‌ها دچار مرگ سلولی می‌شوند[۹، ۸].

مطالعات گذشته نشان داده است که عصاره دانه انگور دارای خصوصیات پیشگیرانه و مهاری بر علیه سرطان‌های سینه، ریه، پوست، پروستات، معده و روده می‌باشد. از طرفی عصاره دانه انگور رشد و بقای سلول‌های ماکروفاژ، قلب و پوست را افزایش می‌دهد، هم‌چنین پروآنتوسیانیدین موجود در عصاره دانه انگور مسؤول فعالیت‌های آنتی اکسیدانی، ضد التهابی، ضد قارچی، ضد باکتریایی و ضد آلرژیک آن است[۱۱-۱۰].

با توجه به این‌که به‌نظر می‌رسد تاکنون مطالعه‌ای به منظور ارزیابی تأثیر عصاره هیدرومتانولی دانه انگور سیاه و ترکیبات موجود در آن روی ویژگی‌های آپوپتوتیک و زیست‌سازگاری کارسینوم سلول سنگ‌فرشی دهان صورت نگرفته است، این مطالعه با هدف بررسی اثر عصاره هیدرومتانولی دانه انگور سیاه بر روی رده سلولی (KB) سرطان سلول سنگ‌فرشی دهان انجام پذیرفت، که برای این منظور میزان زیست‌سازگاری و آپوپتوز سلول‌های توموری به کمک آزمون‌های MTT (Micro-culture tetrazolium test)، Cell Death Detection ELISA و تغییرات مورفولوژیک مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

گیاه و تهیه عصاره

در این مطالعه‌ی تجربی، ابتدا دانه انگور سیاه توسط آسیاب مکانیکی به پودر کاملاً ریزی تبدیل شده و سپس اقدام به چربی‌زدایی توسط حلال N- هگزان گردید. پس از آن پودر حاصل کاملاً خشک و عاری از حلال گشته و سپس استخراج توسط حلال متانول ۹۰ درصد صورت پذیرفت و عصاره‌گیری سه بار تکرار شد. پودر دانه‌های انگور زیر هود قرار گرفته تا از

Archive of SID
www.SID.ir

حالت خیس به صورت خشک درآید، سپس حلال متانول به پودر اضافه شده و پس از حدود ۴ ساعت محلول رویی صاف و با دستگاه Rotary evaporator (Heildolph, Germany) در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد خشک گردید. ماده حاصل عصاره متانولی دانه انگور بوده که در نهایت ۲۵ گرم ماده خشک پودر عصاره به‌دست آمد[۱۲].

عصاره خشک تا زمان به‌کارگیری در فریزر (دمای زیر صفر درجه) نگهداری شد. برای تهیه غلظت‌های مورد نیاز، محلول ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از آن با محیط کشت RPMI-164 medium (Roswell Park Memorial Institute (Sigma, USA) رقیق شد و با استفاده از فیلتر میلی‌پور ۰/۰۲ میکرومتری استریل شد و تا زمان مصرف در یخچال نگهداری گردید.

کشت سلول

در مطالعه‌ی تجربی حاصل رده سلولی KB (مدل سلولی اسکواموس سل کارسینوما) و سلول‌های سرطانی HUVEC (Human umbilical vein endothelial cells)، مدل سلولی سلول‌های اندوتلیال سیاهرگی بند ناف نرمال انسان) از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران خریداری و در محیط کشت RPMI-164 حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (Fetal bovine serum) FBS و آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین ۱۰۰ IU بر میلی‌لیتر و استرپتومایسین ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر (Invitrogen Gibco, Germany) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در محیط مرطوب حاوی ۵ درصد T CO2 کشت داده شد[۱۳].

بررسی اثر سمیت سلولی با روش MTT

اثر سمیت سلولی عصاره هیدرومتانولی دانه انگور سیاه بر روی سلول‌های سرطانی KB و سلول‌های گروه کنترل HUVEC با روش رنگ‌سنجی، با استفاده از Micro-culture (MTT) tetrazolium test و در مقایسه با کنترل بررسی شد. این آنزیم بر فعالیت سوکسینات دهیدروژناز در میتوکندری سلول‌های زنده استوار است که محلول زرد رنگ MTT را به کریستال‌های نامحلول فورمازان بنفش رنگ تبدیل می‌کند، که می‌توان پس از حل کردن در DMSO (Dimethyl sulfoxide) با دستگاه الایزا پلیت ریدر (Bio Teck, Germany) (ELISA plate reader) آن را سنجش نمود. به‌طور خلاصه ۲۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون سلولی (5×10^4 سلول در هر میلی‌لیتر محیط کشت) در میکروپلیت‌های ۹۶ خانه (Nunc, Denmark) کشت داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه انکوبه گردید، سپس غلظت‌های ۶۰۰، ۵۰۰، ۴۰۰، ۳۰۰، ۲۰۰، ۱۰۰، ۵۰ و صفر عصاره اضافه شد که مبنای انتخاب غلظت‌های مذکور به صورت پایلوت انتخاب گردید، لذا دامنه‌ی گسترده‌ای از غلظت‌ها در نظر گرفته شد. هم‌چنین به عنوان کنترل منفی، محیط کشت حاوی ۰/۵ درصد DMSO (Dimethyl sulfoxide) فاقد عصاره به کار رفت. میکروپلیت‌های حاوی سلول و عصاره به مدت ۲۴ ساعت در شرایط یکسان انکوبه شدند، علاوه بر این جهت بررسی اثر زمان بر سمیت سلولی عصاره هیدرومتانولی، سلول‌های تیمار شده با این عصاره به مدت ۲۴ ساعت انکوبه گردیدند.

۲۰۰ میکرولیتر DMSO جایگزین محیط انکوبه شده با MTT شد و برای حل کردن کریستال‌های فورمازان به آرامی پیپت گردید. جذب نور در طول موج ۵۷۰ نانومتر با دستگاه الایزا ریدر (Bio Teck, Germany) سنجیده شد. اثر هر غلظت عصاره در ۳ چاهک و در ۳ زمان مختلف ارزیابی شد. درصد سمیت سلولی در گروه کنترل منفی، ۱۰۰ منظور شد. درصد سمیت سلولی سلول‌هایی که تحت تأثیر غلظتی خاص از دارو قرار گرفته‌اند با تقسیم جذب چاهک‌های تیمار شده به جذب کنترل منفی ضرب در ۱۰۰ محاسبه گردید. غلظتی از ترکیبات مورد آزمایش که درصد حیات سلولی را به نصف تقلیل می‌دهد، به‌عنوان IC50 (Inhibition cencentration 50) درنظر گرفته شد، این مقدار از روی نمودار با استفاده از نرم‌افزار اکسل مایکروسافت تعیین گردید[۱۴].

تست الایزا

از این تست تک مرحله‌ای با رنگ‌سنجی ساندویچ جهت سنجش میزان کمی منونوکلئوزوم و الیگونوکلئوزوم (قطعات سیتوپلاسمی هیستون و DNA) ایجاد شده توسط القای آپوپتوز عصاره هیدرومتانولی بر روی سلول‌های سرطانی بر پایه‌ی sandwich-enzyme-immunoassay quantitative استفاده شد. ابتدا سلول‌ها به تعداد ۱۰۰۰۰ عدد به صورت تریپلیکیت در

Archive of SID
www.SID.ir

پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای کشت داده شدند و در مدت زمان ۲۴ ساعت در مجاورت با عصاره در غلظت ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و کنترل مثبت قرار گرفتند. سلول‌های تیمار شده با محلول تجزیه کننده سلولی به مدت نیم ساعت انکوبه شده و سانتریفیوژ گردید. سپس طبق دستور العمل کیت Cell Death DetectionELISA (Roche Applied Science, Germany) لایزیت (lysate) سلول‌ها که محلول حاصل از فرایند لیز سلول‌ها می‌باشد، برای مشخص شدن القای آپوپتوز جمع‌آوری گردید و به میکروپلیت‌های آماده که حاوی دو نوع مونوکلونال آنتی‌بادی برعلیه Histon هسته‌ای و DNA هستند، افزوده شدند. بعد از انکوباسیون، ۳ بار عمل شستشو انجام شد و سپس به سوبسترا پراکسیداز اضافه نموده و بعد از ۱۵ دقیقه مقدار جذب نوری در ۴۰۵ نانومتر خوانده شد[۱۵].

بررسی تغییرات مورفولوژیک

یک فلاسک حاوی ۱×۱۰^{۶} سلول‌های سرطانی در ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت در نظر گرفته شد. پس از ۲۴ ساعت که از اتصال سلول‌ها اطمینان حاصل شد عصاره هیدرومتانولی با غلظت IC50 نزدیک به ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر اضافه گردید. پس از ۲۴ ساعت تغییرات ایجاد شده با استفاده از میکروسکوپ فاز کنتراست (Nikon, Japan) در بزرگ‌نمایی ۲۰ مشاهده و سپس عکس‌برداری شد.

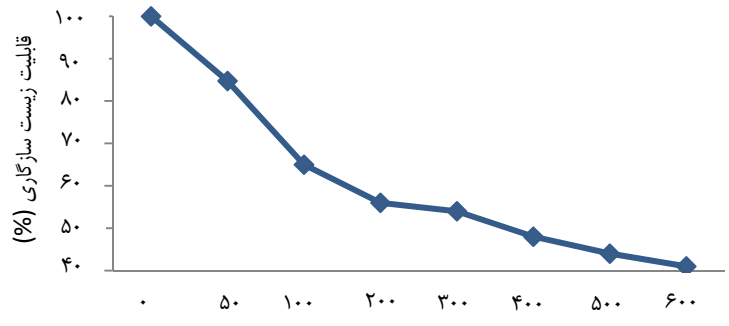
آنالیز آماری

برای انجام آنالیز آماری از نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۲۰ (version 20, SPSS Inc., Chicago, IL) استفاده گردید. داده‌ها با استفاده از آزمون واریانس یک طرفه مورد تحلیل قرار گرفت. آزمون چند دامنه‌ای دانکن (Duncan's test) به‌عنوان آزمون Post hoc برای مقایسه میانگین گروه‌ها مورد استفاده قرار گرفت (α = ۰/۰۵).

یافته‌ها

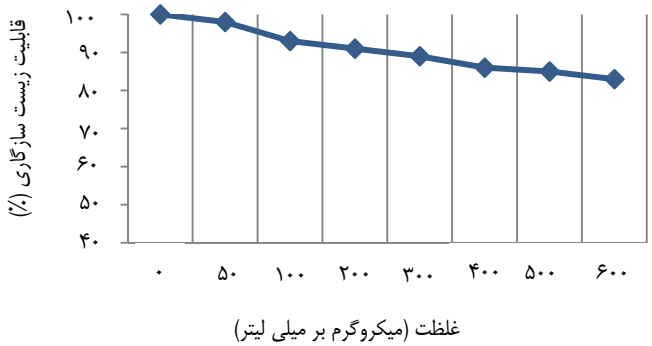
اثر سمیت سلولی عصاره هیدرومتانولی بر روی قابلیت زیست سازگاری سلول های سرطانیKB

نتایج حاصل از بررسی اثر سمیت سلولی عصاره هیدرومتانولی دانه انگور سیاه بر روی قابلیت زیست‌سازگاری سلول‌های سرطانی KB (مدل سلولی اسکواموس سل کارسینوما) در طی ۲۴ ساعت نشان داد که عصاره هیدرومتانولی در همه غلظت‌های بررسی شده توسط تست MTT، اختلاف معنی‌دار (p value = ۰/۰۴۶) با گروه کنترل داشته و توانایی مهار رشد و خاصیت سمیت سلولی بر سلول‌های سرطانی KB (مدل سلولی اسکواموس سل کارسینوما) را دارد (نمودار ۱). نتایج حاصل از بررسی اثر عصاره در طی ۲۴ ساعت نشان داد که عصاره هیدرومتانولی دانه انگور سیاه در همه غلظت‌ها توانایی مهار رشد و خاصیت سمیت سلولی در رده سلولیKB (مدل سلولی اسکواموس سل) با غلظت IC50 (۴۱۷/۳۷۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) عصاره هیدرومتانولی را دارا می‌باشد، اما بر روی سلول‌های نرمال HUVEC فاقد اثر (p value = ۰/۲۴۵) سمیت سلولی مؤثر بود (نمودار ۲).



نمودار ۱. اثر غلظت‌های مختلف عصاره هیدرومتانولی دانه انگور سیاه بر روی قابلیت زیست‌سازگاری سلول‌های سرطانیKB (مدل سلولی اسکواموس سل کارسینوما) پس از تیمار توسط تست MTT (p value = ۰/۰۴۶).

Archive of SID
www.SID.ir



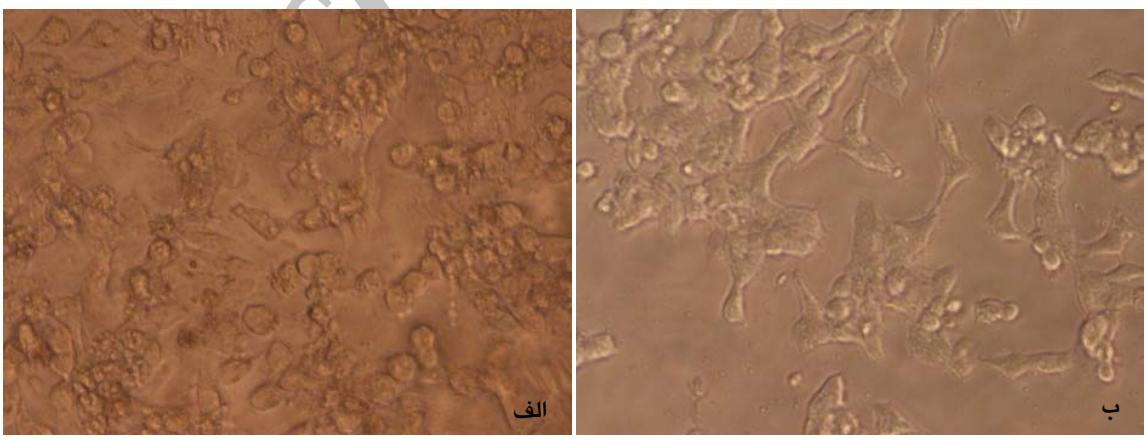
نمودار ۲. اثر غلظت‌های مختلف عصاره هیدرومتانولی دانه انگور سیاه بر روی قابلیت زیست‌سازگاری سلول‌های سرطانی HUVEC (مدل سلولی سلول‌های اندوتلیال سیاهرگی بند ناف نرمال انسان) پس از تیمار توسط تست MTT (p value = ۰/۲۴۵).

بررسی میزان مرگ سلولی القا شده بر روی رده سلولی KB

با توجه به نتایج حاصل از آزمایشات MTT و تحلیل واریانس آن‌ها (p value = ۰/۲۰۰) و مقادیر IC50 (۴۱۷/۳۷۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر)، جهت تعیین نوع مرگ سلولی و بررسی میزان القای آپوپتوز، مقایسه شدت جذب سوپرناتانت (مایع رویی حاصل از سانتریفیوژ) و لایزت (محلول حاصل از لیز) سلول‌ها با کنترل مثبت توسط تست ELISA نشان داد که در عصاره هیدرومتانولی در غلظت IC50 در زمان ۲۴ ساعت بر روی سلول‌های سرطانی، مرگ سلولی(آپوپتوز) برابر ۶۸ درصد می‌باشد.

اثر عصاره هیدرومتانولی بر ساختار مورفولوژیک سلول های سرطانی KB

تغییرات مورفولوژیک به صورت کیفی و زیر میکروسکوپ نوری بررسی گردید، تغییرات مورفولوژیک ایجاد شده پس از ۲۴ ساعت، شامل چروکیدگی سلول و تغییر شکل در غشا سلول‌ها بود، هم‌چنین درصدی از سلول‌ها از بستر خود جدا شده بودند (شکل ۱).



شکل ۱. تغییرات مورفولوژیک سلول های سرطانی پس از تیمار با عصاره هیدرومتانولی دانه انگور سیاه الف) سلول های سرطانی KB بدون تیمار عصاره پس از ۲۴ ساعت. ب) سلولهای سرطانی در غلظت ۴۱۷/۳۷۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصاره هیدرومتانولی پس از۲۴ ساعت.

Archive of SID
www.SID.ir

بحث

سرطان یکی از عوامل اصلی مرگ و میر در سراسر جهان است. در آمار سازمان بهداشت جهانی تخمین زده شده است که سرطان عامل ۸۳/۲ میلیون مرگ در بین سال‌های ۲۰۰۵ تا ۲۰۱۵ خواهد بود. بروز سرطان به عواملی چون سن، جنس و زمینه ژنتیکی بستگی دارد[۳] .سرطان دهان کمتر از ۳ درصد کل سرطان‌ها را تشکیل می‌دهد اما هشتمین سرطان شایع در مردان و پانزدهمین سرطان شایع در زنان می‌باشد، هم‌چنین یازدهمین سرطان شایع در سراسر دنیا است. تقریباً ۹۴ درصد بدخیمی‌های دهان را کارسینوم سلول سنگ‌فرشی (Squamous cell carcinoma) تشکیل می‌دهد[۴]. بیماری سرطان، بدخیمی است که مشخصه‌ی بارز آن میزان پایین آپوپتوز است. آپوپتوز یا مرگ برنامه‌ریزی شده، یک مکانیسم فیزیولوژیک مرگ سلولی است. در طی آپوپتوز، حجم سلولی به سرعت کاهش یافته و به دنبال آن کروماتین هسته‌ای متراکم شده و DNA آن قطعه قطعه می‌شود. این روند در حالت نرمال سلول‌هایی که دچار اختلال ژنتیکی شده‌اند را پاک‌سازی می‌کند[۱۶]. چگونگی تنظیم آپوپتوز یکی از دغدغه‌های اصلی توسعه داروهای ضدسرطانی و شیمی درمانی سلول‌های بدخیم است. در سال‌های اخیر استفاده از ترکیبات طبیعی برای مقابله با سرطان با توجه به عوارض جانبی کم و هزینه‌های ناچیز و هم‌چنین تأثیرات امید بخش مورد توجه قرار گرفته است، امروزه ترکیبات گیاهی فراوانی با اثرات بیولوژیک مختلف جداسازی شده و در علم داروسازی نوین وارد شده‌اند که در درمان سرطان‌های مختلف مؤثرند[۵].

انگور سیاه (VitisVinifera) از خانواده Vitaceae بومی مناطق مدیترانه‌ای، اروپای مرکزی و جنوب غربی آسیا است. دانه و پوست انگور در طب سنتی و میوه آن به‌عنوان مکمل غذایی استفاده می‌شود. انگور سیاه حاوی ترکیبات فعالی چون فلاونوئیدها، پلی‌فنول‌ها، آنتی‌سیانین‌ها، پروآنتوسیانیدین و پروسیانیدین‌ها می‌باشد[۱]. این ترکیبات فعال از نظر زیستی با دخالت در مسیرهای بیولوژیکی مختلف، اثرات سمیت سلولی، ضدسرطانی و ضدمیکروبی دارند. مطالعه‌ی Agarwal و همکاران[۲] نشان داده است که عصاره دانه انگور دارای طیف وسیعی از اثرات دارویی و درمانی به مانند فعالیت‌های آنتی اکسیداتیو، ضدالتهابی و ضدمیکروبی می‌باشد.

در تحقیقی که توسط باغچی و همکاران[۱۰] صورت گرفته است، نشان داده شده که ترکیبات موجود در دانه انگور، دارای اثر سمیت سلولی و آپوپتوتیک بر روی سلول‌های سرطانی سینه، ریه، پوست، پروستات، معده، روده، پانکراس و کولون می‌باشند. در مطالعه‌ای که توسط Tong و همکاران[۱۷] در سال ۲۰۱۱ به منظور بررسی نقش فعالیت ضد توموری و تنظیم کنندگی ایمنی پروانتوسیانیدین‌های دانه انگور با استفاده از تانل و الایزا صورت گرفت، ترکیبات موجود در دانه انگور توانایی بهبود فعال‌سازی عملکرد سیستم ایمنی و تأثیرات ضد توموری را به‌وسیله تحریک سیستم ایمنی داشتند.

در مطالعه‌ای که توسط Chung و همکاران[۱۸] در سال ۲۰۱۲ جهت ارزیابی ویژگی مهارکنندگی تکثیر و تهاجم سلولی پروانتوسیانیدین‌های دانه انگور بر روی کارسینوم پانکراس در in vitro با استفاده از تست الایزا و سنجش فلوسیتومتری صورت پذیرفت، پروانتوسیانیدین‌ها توانایی مهارکردن تکثیر و تهاجم سلولی را توسط مهار چرخه سلولی و هم‌چنین القای آپوپتوز داشتند.

در مطالعه‌ای که توسط Dinicola و همکاران[۱۹] در سال ۲۰۱۳ به‌منظور بررسی اثرات عصاره دانه انگور بر روی رده سلولی Caco-2 سرطان کولون با استفاده از تست شمارش سلولی و سنجش فلوسیتومتری صورت پذیرفت، عصاره دانه انگور به طور مؤثر و معنی‌داری توانایی القای آپوپتوز بر روی سلول‌های سرطانی را از مسیر داخلی آپوپتوز به‌وسیله افزایش غلظت داخل سلولی یون کلسیم و تولید فرآورده‌های (ROS) Reactive oxygen species داشت.

نتایج حاصل از مطالعه‌ی حاضر مطابق با نتایج مطالعات فوق می‌باشد و علاوه بر این نشان می‌دهد که عصاره هیدرومتانولی دارای اثر سمیت سلولی و مهار کننده رشد بر روی رده سرطانی KB اسکواموس سل کارسینوما بدون اثر قابل توجه بر روی سلول‌های نرمال نیز می‌باشد.

اثر عصاره هیدرومتانولی در زمان‌های مختلف بر روی سلول‌های سرطانی با کاهش رشد سلول‌های سرطانی اسکواموس سل کارسینوما در مقایسه با نمونه کنترل منفی

Archive of SID
www.SID.ir

(بدون تیمار) همراه می‌باشد. مهار رشد و تکثیر سلول‌های سرطانی همراه با القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی تیمار شده با عصاره با استفاده از تست الایزا و بررسی مورفولوژیک تأیید شد. عصاره هیدرومتانولی در غلظت IC50 و در زمان ۲۴ ساعت بر روی سلول‌های سرطانی، مرگ سلولی آپوپتوزی برابر ۶۸ درصدی را در مقایسه با کنترل مثبت کیت القا کرد. مورفولوژی سلول‌های در حال آپوپتوز خصوصیاتی اختصاصی نظیر چروکیدگی سلول و آماس غشا را نشان می‌دهند که چروکیده شدن سلول‌های سرطانی تیمار شده با غلظت ۴۱۷/۳۷۰ میکروگرم در میلی‌لیتر عصاره هیدرومتانولی در مقایسه با سلول‌های بدون تیمار با عصاره، القای آپوپتوز را در طی مهار رشد تأیید می‌کند. رده‌ی سلولی KB تیمار شده با عصاره هیدرومتانولی در غلظت‌های نزدیک به IC50 (۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر)، پس از ۲۴ ساعت نشان داد که عصاره هیدرومتانولی موجب گرد شدن سلول‌های سرطانی و جدا شدن از بستر خود می‌شود، در حالی‌که سلول‌های فاقد تیمار با عصاره، چسبندگی، مورفولوژی طبیعی و اپی‌تلیال مانند خود را حفظ کرده‌اند[۱۳].

بر اساس نتایج به‌دست آمده از مطالعه‌ی حاضر و تأیید اثرات سمیت سلولی و هم‌چنین اثرات القا کنندگی مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی(آپوپتوتیک) عصاره دانه انگور، پیشنهاد می‌شود که در مطالعات بعدی اثر عصاره دانه انگور بر روی سایر رده‌های سلولی سرطانی بررسی شود. هم‌چنین مکانیزم‌های مولکولی درگیر در القای آپوپتوز و میزان سمیت دارویی آن با استفاده از مدل‌های سلولی در آزمایشگاه و حیوانی مشخص گردد. لازم است با استفاده از آنالیزهای کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (High Performance liquid chromatography) HPLC ترکیبات فعال موجود در عصاره دانه انگور جداسازی و خالص گردد.

نتیجه‌گیری

افزایش غلظت عصاره هیدرومتانولی و زمان سبب کاهش قابلیت زیست‌سازگاری سلول‌ها و القای آپوپتوز در این رده می‌شود. با توجه به نتایج حاصل از اثر عصاره هیدرومتانولی دانه انگور سیاه بر روی سلول‌های سرطانیKB (مدل سلولی اسکواموس سل کارسینوما)، به‌نظر می‌رسد این ماده کاندید مناسبی جهت شناسایی و خالص‌سازی ترکیبات فعال باشد.

تشکر و قدردانی

از حمایت‌های مالی مرکز تحقیقات کاربردی دارویی دانشگاه علوم پزشکی تبریز و تمامی همکاران عزیزی که ما را در جهت اجرای هر چه بهتر این تحقیق یاری نموده‌اند، نهایت تشکر را داریم.

References

1. Agarwal C, Sharma Y, Agarwal R. Anticarcinogenic effect of a polyphenolic fraction isolated from grape seeds in human prostate carcinoma DU145 cells: modulation of mitogenic signaling and cell-cycle regulators and induction of G1 arrest and apoptosis. Mol Carcinog 2000; 28(3): 129-38.
2. Agarwal C, Sharma Y, Zhao J, Agarwal R. A polyphenolic fraction from grape seeds causes irreversible growth inhibition of breast carcinoma MDA-MB468 cells by inhibiting mitogen-activated protein kinases activation and inducing G1 arrest and differentiation. Clin Cancer Res 2000; 6(7): 2921-30.
3. Kamesaki H. Mechanisms involved in chemotherapy-induced apoptosis and their implications in cancer chemotherapy. Int J Hematol 1998; 68(1): 29-43.
4. Neville BW, Damm DD, Allen CM, Bouquot JE. Oral and maxillofacial pathology. 3rd ed. Philadelphia, PA: Saunders/Elsevier; 2009. p. 409- 11.
5. Cragg GM, Newman DJ. Plants as source of anti-cancer agents. J Ethnopharmacol 2005; 100(1-2): 72-9.
6. Chin YW, Balunas MJ, Chai HB, Kinghorn AD. Drug discovery from natural sources. AAPS J 2006; 8(2): E239-53.
7. Urueña C, Cifuentes C, Castañeda D, Arango A, Kaur P, Asea A, et al. Petiveria alliacea extracts uses multiple mechanisms to inhibit growth of human and mouse tumoral cells. BMC Complement Altern Med. 2008; 8: 60.
8. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. Toxicol Pathol 2007; 35(4): 495-516.
9. Mehta RG, Murillo G, Naithani R, Peng X. Cancer chemoprevention by natural products: how far have we come? Pharm Res 2010; 27(6): 950-61.
10. Bagchi D, Garg A, Krohn RL, Bagchi M, Bagchi DJ, Balmoori J, et al. Protective effects of grape seed proanthocyanidins and selected antioxidants against TPA-induced hepatic and brain lipid peroxidation and DNA fragmentation, and peritoneal macrophage activation in mice. Gen Pharmacol 1998; 30(5): 771-6.

Archive of SID
www.SID.ir

11. Maffei Facinó R, Carini M, Aldini G, Berti F, Rossoni G, Bombardelli E, et al. Procyanidines from Vitis vinifera seeds protect rabbit heart from ischemia/reperfusion injury: antioxidant intervention and/or iron and copper sequestering ability. Planta Med 1996; 62(6): 495-502.
12. Tanko Y, Abdelaziz MM, Adelaiye AB, Fatihu MY, Musa KY. Effects of Hydromethanolic leaves extract of Indigofera pulchra on blood glucose levels of normoglycemic and alloxan-induced diabetic Wistar rats. Int J Applied Res Nat Prod 2008; 1(4): 13-18.
13. Phelan MC. Basic techniques for mammalian cell tissue culture. Curr Protoc Cell Biol 1998; 7: 1-10.
14. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods 1983; 65(1-2): 55-63.
15. Frankfurt OS, Krishan A. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the specific detection of apoptotic cells and its application to rapid drug screening. J Immunol Methods 2001; 253(1-2): 133-44.
16. Reed JC, Pellecchia M. Apoptosis-based therapies for hematologic malignancies. Blood 2005; 106(2): 408-18.
17. Tong H, Song X, Sun X, Sun G, Du F. Immunomodulatory and antitumor activities of grape seed proanthocyanidins. J Agric Food Chem 2011; 59(21): 11543-7.
18. Chung YC, Huang CC, Chen CH, Chiang HC, Chen KB, Chen YJ, et al. Grape-seed procyanidins inhibit the in vitro growth and invasion of pancreatic carcinoma cells. Pancreas 2012; 41(3): 447-54.
19. Dinicola S, Mariggiò MA, Morabito C, Guarnieri S, Cucina A, Pasqualato A, et al. Grape seed extract triggers apoptosis in Caco-2 human colon cancer cells through reactive oxygen species and calcium increase: extracellular signal-regulated kinase involvement. Br J Nutr 2013; 110(5): 797-809.

Archive of SID

www.SID.ir

Evaluation of the cytotoxic activitiy of hydromethanolic grape seed extract in oral squamous cell carcinoma (KB cell line)

Amir ala Aghbali, Sepideh Vosough Hosseini*, Behzad Baradaran, Nader Kalbasi Gharavi, Ali Bandehagh, Akbar Jalili

Abstract

Introduction: *The grape seed is rich in anthocyanin, proanthocyanidins, procyanidins. The present investigation was carried out to study cytotoxic effects of hydromethanolic extract of grape seed on oral squamous cell carcinoma KB cell line and induction of apoptosis in these cells.*
Materials and methods: *In the present experimental study grape seeds were extracted with 90% hydromethanolic solvent. Then KB cells were treated with different concentrations of crude extract. The cytotoxicity was measured using the MTT (Micro-culture tetrazolium test) assay in 24 hours. ELISA assay was used to measure induction of apoptosis after 24 hours. Data was analyzed with SPSS 20 and one-way ANOVA (α=0.05).*
Results: *Data from MTT revealed that hydromethanolic crude extract of grape seed had growth inhibitory and cytotoxic activity on KB cell line in (IC_{50} = 417.370 μg/mL) after 24 hours. In ELISA assay apoptosis cell death rate was determined to be about 68% after 24 hours. Cell morphology alteration analysis showed major apoptosis changes and the extract resulted in significant cell death in the treated group (p value = 0.002).*
Conclusion: *Under the limitations of the present study, crude grape seed extract had an inhibitory effect on the growth of neoplastic KB cell line, inducing apoptosis in these cells. Grape seed extract appears to be an appropriate candidate for identification and purification of its active compounds.*

Key words: *Apoptosis, Cytotoxicity, Grape seed extract, Squamous cell carcinoma*

Received: 9 Mar, 2013 **Accepted:** 10 Sep, 2013

Address: Professor, Department of Oral and Maxillofacial Pathology, School of Dentistry, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran
Email: svosough.rare@yahoo.com

Citation: Aghbali A, Vosough Hosseini S, Baradaran B, Kalbasi Gharavi N, Bandehagh A, Jalili A. **Evaluation of the cytotoxic activitiy of hydromethanolic grape seed extract in oral squamous cell carcinoma (KB cell line).** J Isfahan Dent Sch 2014; 9(6): 489-97.

Archive of SID

www.SID.ir