تأثیر شیکونین، داروی گیاهی مورد استفاده در آسیای شرق، بر فعالیت و آپپتوز سلولهای ملتهب میکروگلیا در *in vitro*

مریم علیزاده[1]، فرزانه صابونی*[1]، شاه صنم عباسی[1]، علی مقیمی[2] و کمال الدین حق بین[1]

[1] تهران، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری

[2] مشهد، دانشگاه فردوسی، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی

تاریخ دریافت: 86/4/4 تاریخ پذیرش: 87/3/12

چکیده

شیکونین (β-آلکانین) رنگیزه نفتوکینونی استخراج شده از ریشه *Arnebia euchroma* از خانواده *Boraginaceae* در آسیای شرق در درمان زخمها و عفونتها بسیار کاربرد داشته است. مطالعات نشان داده اند که این ترکیب دارای خواص ضد التهابی و ضد توموری در شرایط *in vitro* و *in vivo* می باشد. در این مطالعه نیز تأثیر شیکونین بر سلولهای میکروگلیای فعال شده در in vitro مورد بررسی قرار گرفته و بررسی تغییرات سطح NO (Nitric Oxide) و همچنین میزان آپپتوز سلولی در حضور و غیاب LPS(*Lipopolysaccharide*) که یکی از فاکتورهای اساسی در القاء التهاب CNS می باشد مورد توجه است. میکروگلیا، سلولهای دارای منشاء مونوسیتی مقیم در سیستم عصبی مرکزی هستند که قادر به آزاد سازی انواعی از سیتوکین ها، کموکین ها، نیتریک اکساید و ... به منظور تنظیم ارتباط بین نورونی و انواع دیگر سلولهای گلیا می باشند. هنگامی که فعالیت میکروگلیا به دلیل به هم خوردن تعادل پاتولوژیکی مشخصی افزایش می یابد می تواند موجب دژنره شدن نورونی و بیماریهای التهابی همچون ایسکمی مغزی، آلزایمر، پریون،MS ، پارکینسون، AIDs ، تروما و انواع دیگر شود. افزایش میزان NO تولید شده توسط این سلولها در CNS نیزمرتبط با پاتوژنی بیماریهای نورودژنراتیو و التهابی در انسان می باشد. عصاره گیاهی *Arnebia euchroma* موجب مهار ویژه ای در تولید NO و آپپتوز سلولهای تیمار شده می شود که این مهار وابسته به دوز مصرفی شیکونین است. نتایج نشان می دهد که شیکونین در غلظتهای 10-30μg/ml موجب القاء آپپتوز در این سلولها شده و همچنین در غلظتهای 0،1-5 μg/ml موجب کاهش مشخصی در تولید NO می شود که این نتایج را می توان به ترتیب، با رنگ آمیزی آکریدین اورنج / اتیدیوم بروماید و با معرف گریس به دست آورد. با توجه به نتایج کسب شده می توان شیکونین را به عنوان ماده ای با منشاء گیاهی دانست که در غلظتهای تعیین شده قادر به کنترل التهاب ایجاد شده در سلولهای میکروگلیا و نیز القاء روند آپپتوز در این سلولها می شود از این رو می تواند به عنوان ترکیبی دارویی در بیماریهای نورودژنراتیو مورد استفاده واقع شود.

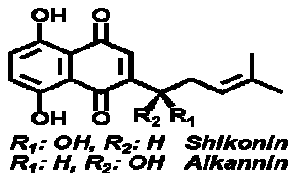
واژه های کلیدی : شیکونین ، *Arnebia euchroma* ، میکروگلیا ، NO ، آپپتوز، LPS ، نورودژنراتیو

* نویسنده مسئول، تلفن تماس: 44580374-021، پست الکترونیک: sabouni@nrcgeb.ac.ir

مقدمه

خانواده *Boraginaceae* با حدود 100 جنس و 2000 گونه معرفی می شوند. ریشه بعضی از جنسهای متعلق به این خانواده در مشتقات نفتوکینونی بسیار غنی بوده که شامل *Lithospermum* ، *Arnebia*، *Alkanna* و *Onosma* می باشد و دارای شیکونین، آلکانین و مشتقات آنها می باشند(6 و 26).

Archive of SID
www.SID.ir



مردم خاور دور (چین ، کره، ژاپن) ازعصاره استخراج شده از این گیاهان در درمان عفونتها، زخمها، جوشها، سرخک، گلو درد، سیاه زخم، تاول و سوختگیها استفاده فراوان می کردند. امروزه تحقیقات وسیعی برای استفاده از این گیاهان در زمینه درمانی و کلینیکی صورت می گیرد. مطالعات نشان داده اند که این ترکیب دارای خواص ضد التهابی و ضد توموری در شرایط *in vitro* و *in vivo* می باشد. در بسیاری کاربرد های فارماکولوژیکی به عنوان ترکیب ضد التهابی، ضد گونادوتروپیکی، ضد فعالیت HIV-1 (5) ، ضد توموری، ضد میکروبی، ضد ترومبیک، ضد باکتریا یی، ضد قارچی، ضد آمیبی نیز از شیکونین استفاده می شود (5). همچنین شیکونین موجب القای آپپتوز در سلولهای سرطانی بی شماری از جمله سلولهای HL60 لوکمیای پریمیلوسیتیک انسانی(37)، سلولهای سرطان پستانی MCF-7 انسانی (16)، سلولهای هپاتوما Sk–Hep-1 انسانی، سلولهای ملا نومای بد خیم S2 -A375انسانی(35)، لاینهای سلولی U266 ، RPMI8226 ، IM9 و Hs-sultan cells میلوما انسانی (19)، سلولها سرطانی کولورکتال انسانی (17)، سلولهای اپیتلیال سرویکال انسانی و... می شود. آپپتوز که مرگ برنامه ریزی شده سلولی می باشد پروسه ای فعال بوده و فرآیندی طبیعی در تکامل و سلامت ارگانیسمهای چند سلولی می باشد. مطالعه آپپتوز قسمت مهمی از تحقیقات بیولوژیکی را به خود اختصاص داده چون هرگونه کاهش و یا افزایش در این فرآیند می تواند دلیلی برای ایجاد سرطانها، بیماریهای خود ایمنی، دیابت، آلزایمر و بیماریهای نورودژنراتیو دیگر باشد (28).

سلولهای میکروگلیا دسته ای از سلولهای گلیا می باشند که علاوه بر نورونها در سیستم عصبی مرکزی (CNS) وجود دارند. اگرچه منشاء این سلولها همچنان مورد بحث است ولی اکثر دانشمندان بر این عقیده اند که این سلولها مشتق شده از مغز استخوان می باشند و سلولهای اجدادی مونوسیت/ماکروفاژ اند که در روند تکامل جنینی وارد مغز شده اند و از طریق یک سری تغییرات مورفولوژیکی بصورت سلولهای رمیفید در حال استراحت متمایز می شوند (8). این سلولها سلولهای تنظیم گر ایمنی مغزی بوده و در مواجهه با شرایط پاتولوژیکی تغییر شکل داده ، فرم آمیبی به خود گرفته و قابلیت فاگوسیتوزی پیدا می کنند. تغییرات در مورفولوژی میکروگلیاها مشخصه اصلی در تقریباً تمامی فرمهای پاتولوژیکی مغز می باشد. فعال شدن میکروگلیا علاوه بر تغییرات مورفولوژیکی همراه با بیان و آزاد شدن فاکتورها و مولکولهای مرتبط با ایمنی و بالقوه سیتو توکسیک چون نیتریک اکساید، سیکلواکسیژناز-2 ، پروستاگلندین-2، تومور نکروزیس فاکتور-α، اینترلوکین-1 β، متابولیت های اسید چرب مانند ایکوسانوئیدها و رادیکالهای آزاد همچون سوپر اکسید می باشد و نقش مرکزی در التهاب حاد و مزمن ایفا می کنند (25 و 24). وجود سلولهای میکروگلیا فعال شده در طیف وسیعی از بیماریهای مغزی شامل جراحت مغزی مستقیم و غیر مستقیم، ایسکمی، بیماریهای عفونی خود ایمنی و مخرب عصبی نشان داده شده اند (1، 29، 30 و 32).

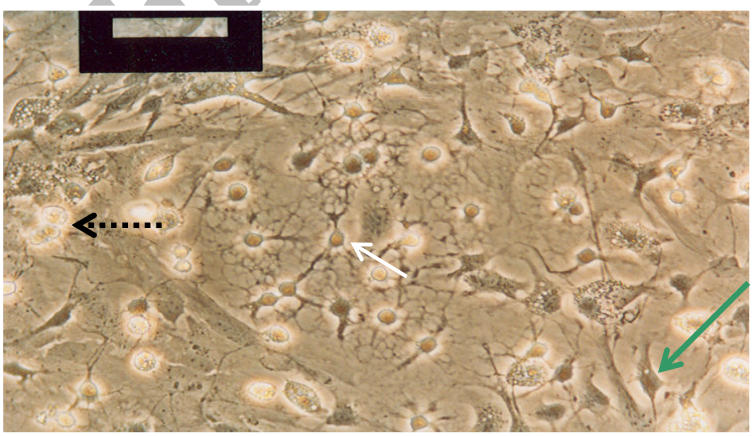
علی رغم وجود بیماریهای نورودژنراتیو متنوع، فرآیند التهاب مکانیسم پایداری است که سبب گسترش و پیشبرد این بیماریها می شود. سلولهای متعددی در نورودژنراسیون ایجاد شده در اثر التهاب نقش دارند ولی سلولهای میکروگلیا به عنوان سلولهای اساسی در این آسیب نورونی شناخته شده اند و در بیماریهایی همچون ایسکمی مغزی، آلزایمر، پریون، MS ، پارکینسون، AIDs و تروما نقش مؤثر دارند. LPS (لیپوپلی ساکارید) گلیکولیپیدی مشتق شده از سطح غشاء باکتری گرم منفی (اندوتوکسین) قادر به ایجاد این التهاب در CNS می باشد (2، 12 و 22). با استفاده از مشاهدات *in vitro* بر روی کشتهای میکروگلیا،

Archive of SID
www.SID.ir

LPS قادر به فعال کردن میکروگلیا و ایجاد تغییرات وسیعی بر عملکرد سلولی آنها و همچنین القاء تولید انواع سیتوکین های التهابی، کموکین ها و پروستاگلندین می باشد. به علاوه LPS قادر به القاء سنتز iNOS (آنزیم مخصوص سنتز NO در CNS) و تولید NO می باشد.(7، 9 و 27) تغییر سطح NO می تواند در رابطه با عواملی چون عفونتها و مسمومیتهای خونی، التهابات مغزی، افزایش فشار خون، هیجان، دیابت نوع 2، هیپوکسی و سرطان باشد (3). تولید و آزادسازی این فاکتور که قسمتی از ایمنی ذاتی بدن را تشکیل می دهد میزبان را قادر به از بین بردن پاتوژنهای هجوم آورنده می کند اما تولید بسیار و تجمع این فاکتورها برای نورونها بسیار زیان آور و توکسیک است (4). با توجه به فعالیت سلولهای ملتهب میکروگلیا در انواع بیماریهای سیستم عصبی مرکزی که سبب کاهش ایمنی مغزی و گسترش بیماریهای نورودژنراتیو شده، کاهش میزان التهاب این سلولها می تواند به کاهش علائم پاتولوژیک بیانجامد، از طرفی با توجه به نقش شیکونین در کاهش التهاب انواع جراحات و سلولهای ملتهب و همچنین القاء فرآیند آپپتوز در انواع سلولهای سرطانی، بررسی تأثیر این ماده در التهاب ایجاد شده در سلولهای میکروگلیا تحت شرایط پاتولوژیک می تواند نتایج مفیدی را در پی داشته باشد.

مواد و روشها

عصاره گیری از ریشه گیاه *Arnebia euchroma*: در این تحقیق از جنس *Arnebia* و گونه *euchroma* با نام فارسی گل عسلی رنگین استفاده گردیده است. رویش این گیاه در ایران، آسیای مرکزی، هند، چین، روسیه، افغانستان و پاکستان گزارش شده است. در ایران این گیاه در غرب، جنوب غربی و مرکزی در ارتفاعات 4000 – 3500 متری می روید (11). مواد گیاهی مورد استفاده در این تحقیق از ارتفاعات دنا واقع در گردنه بیژن در منطقه سی سخت استان کهکیلویه و بویر احمد با اسم محلی هوئه چوئه جمع آوری شده است. نوع گیاه توسط گیاه شناسان تخصصی مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع ایران و هرباریوم دانشگاه تهران تعیین می شود. محلول مورد استفاده برای استخراج عصاره از ریشه این گیاه THF (Tetrahydrofuron) با نقطه جوش 66 درجه سانتی گراد می باشد (15). برای عصاره گیری از سوکسوله و دستگاه تقطیر Rotevapor استفاده گردید.

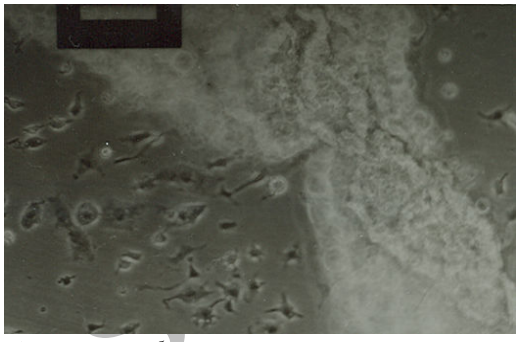


شکل 1- کشت مخلوط سلولهای گلیا بعد از 10 روز، فلش کوچک و سفید رنگ اولیگودندروسیت ، فلش منقطع و سیاهرنگ میکروگلیا و فلش بلند و سبز رنگ آستروسیت می باشد.

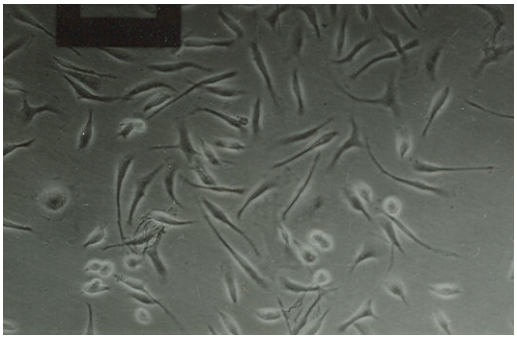
کشت سلولهای میکروگلیا: در کشت سلولهای میکروگلیا از روش Giulian & Baker استفاده شد (13). کشت پرایمری سلولهای میکروگلیا با استفاده از بافت کورتکس رتهای 2-1 روزه نژاد wistar انجام گردید. پس از عاری کردن بافت کورتکس از پرده مننژ و جداسازی مکانیکی سلولها، سوسپانسیون سلولی حاصل داخل محیط کشت

Archive of SID
www.SID.ir

(Dulbecco's modified Eagle's medium) DMEM حاوی FCS 10٪ (fetal bovine serum) قرار گرفت. کشت در پلیت های 6 خانه ای به نسبت یک نیمکره در یک خانه صورت گرفت (7) پلیتها به مدت 14-12 روز در انکوباتور مخصوص کشت سلول که دارای CO_2 5٪ ، رطوبت کافی و دمای 37 درجه سانتی گراد بود، قرارگرفتند. در پایان روز دهم کشت، سلولها تقریباً 80 درصد سطح هر خانه را مفروش کرد که در زیر میکروسکوپ مخلوطی از انواع سلولهای گلیا (آستروسیت، میکروگلیا و الیگودندروسیت) را می توان مشاهده کرد (شکل 1).



شکل 2- روش تریپسین زنی ملایم برای بدست آوردن میکروگلیای خالص.



شکل 3- میکروگلیا 24 ساعت پس از ماندن در ACM

خالص سازی سلولهای میکروگلیا: این روش جداسازی براساس تمایل سلولها در قدرت چسبندگی شان به سطح بستر است. در این روش می توان سلولهای میکروگلیا را با خلوص بالا و بدون آلودگی با سلولهای دیگر از قبیل آستروسیتها و الیگودندروسیتها به دست آورد. سلولهای میکروگلیا نسبت به سایر سلولهای گلیا در مواجهه با تریپسین مقاومت بیشتری نسبت به جدا شدن از سطح بستر نشان می دهند. بنابراین سلولهای کشت داده شده به مدت 30 دقیقه با تریپسین 0/05 درصد انکوبه شدند. پس از این مدت لایه سلولی جدا شده حاوی آستروسیت ها و به میزان اندک نورون و الیگودندروسیت می باشد (شکل 2) و سلولهای چسبیده به سطح شامل میکروگلیا هستند. سلولها به مدت 24 ساعت در ACM (Astrocyte Conditioned Medium) قرار گرفته و سپس تیمارهای لازم بر روی آنها انجام شد

تعیین خلوص سلولهای میکروگلیا: رنگ آمیزی اختصاصی سلولهای میکروگلیا به وسیله آنتی بادی اختصاصی *Griffonia Simplicifolia* که نوعی لکتین است انجام شد (شکل 4).

تیمار سلولها با LPS و شیکونین : برای تیمار سلولها محلول LPS با غلظت 1µg / ml در محیط کشت DMEM استفاده شد. برای تهیه غلظتهای معین شیکونین، میزان مشخصی شیکونین در اتانول خالص حل گردید، به طوری که حجم نهایی اتانول در محیط کشت نباید بیشتر از 0/02 درصد باشد. فلاسکهای حاوی سلولهای میکروگلیا در حالی که 24 ساعت در معرض ACM قرار داشته اند و بیش از 70 درصد سطح فلاسک را پوشانده اند آماده تیمار می باشند(شکل 3). میکروگلیا در حالت فعال شده (با استفاده از LPS) با غلظتهای متفاوت شیکونین تیمار می شود. در هنگام تیمار سلولها با LPS و شیکونین و حتی سلولهای کنترل سرم از محیط کشت حذف می شود.

اندازه گیری نیتریک اکساید: پس از تیمار سلولها در مدت زمانهای 24 و 48 ساعت آزمایش تعیین میزان NO توسط معرف Griess بر روی سلولها انجام گردید (14). گریس

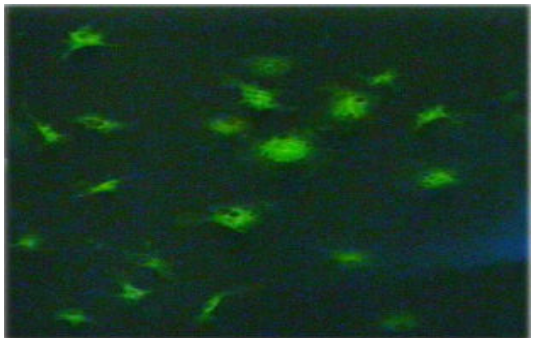
Archive of SID
www.SID.ir

یک آزمایش طیف سنجی بوده و بر پایه یک واکنش دیازوتیزاسیون استوار است. برای برآورد میزان NO تولید شده توسط نمونه های تیمار شده، از منحنی استاندارد استفاده می شود. غلظتهای NO_2^- مورد استفاده در منحنی استاندارد توسط ماده $NaNO_2$ تهیه می گردد.

بررسی آپپتوز سلولی: استفاده از روش ساده و سریع برای برآورد میزان آپپتوز در انجام تحقیقات بیولوژیکی بسیار اهمیت داشته و مفید واقع می شود. در حال حاضر متدهای رایج برای تشخیص آپپتوز در محیط *in vitro* شامل چندین روش رنگ آمیزی مورفولوژیکی چون اتیدیوم بروماید وآکریدین اورنج ، دی آمیدینو فنیل ایدول، Hoechst و روشهای دیگر همچون DNA ladder AnnexinVstaining, ssDNAstaining , Caspase 3/7 activity , TUNEL , می باشد. هر یک از روشهای ذکر شده می تواند دارای محدودیتهایی چون چند مرحله ای بودن روشها، نبود امکان برآورد میزان سلولهای زنده، آپپتوز و نکروز در یک زمان و تشخیص غیر اختصاصی باشد در صورتی که میکروسکوپ فلوئورسانس با قابلیت جذب متفاوت برای رنگهای باند شونده با DNA فلوئورسانت مانند رنگ آمیزی با EB/AO یک متد مناسب برای سهولت، سرعت و صحت تشخیص آپپتوز می باشد (28 و 34).

بررسی تأثیر شیکونین بر سلولهای میکروگلیا بدون حضور LPS : به منظور دستیابی به پاسخ این پرسش که شیکونین به تنهایی و بدون حضور LPS به عنوان یک فاکتور فعال کننده سلولی چه تاثیری بر سلولهای میکروگلیا دارد آزمایش دیگری ترتیب داده شد که تنها تفاوت آن با آزمایش اول در بکار بردن LPS بود و از همان غلظتهای شیکونین در این آزمایش نیز استفاده شد. میزان NO آزاد شده از این سلولها نیز به همان ترتیب گفته شده اندازه گیری گردید.

آنالیز آماری: بررسی اختلاف معنی دار بین نمونه LPS دار و نمونه های تیمار شده با غلظتهای مختلف شیکونین در حضور LPS با استفاده از روش ANOVA و $p<0.05$ انجام شد.



شکل 4- رنگ آمیزی اختصاصی سلولهای میکروگلیا با لکتین اختصاصی (گریفونیا سیمپلیسیفولیا نشاندار شده با فلوروسنت).

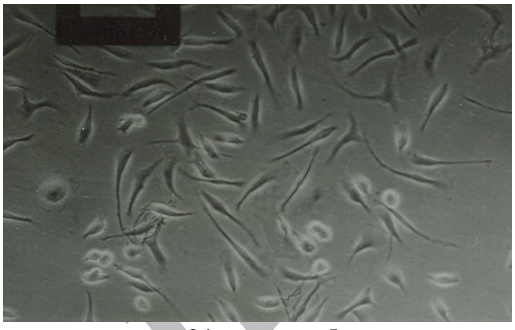
نتایج

نتایج میکروسکوپی بدست آمده از تأثیر تیمارهای LPS و شیکونین بر کشت سلولهای میکروگلیا ناحیه کورتکس مغز رت توسط میکروسکوپ اینورت: مطالعه میکروسکوپی انجام شده توسط میکروسکوپ اینورت نتایج جالبی را نشان می دهد. این نتایج در مدت زمانهای 24 ساعت و 48 ساعت پس از تیمار مورد بررسی قرار گرفت: در نمونه های کنترل بعد از 24 ساعت و 48 ساعت سلولها نسبتاً در موقعیت مناسبی قرار داشته و به صورت میله ای و کشیده و گاهی سلولهای فعال نیز دیده می شوند که این سلولها به صورت سلولهای آمیبی شکل کوچک اند (شکل 5). در نمونه هایی که LPS با غلظت 1µg/ml دریافت کرده اند به سرعت روند فعالیت سلولی شروع شده و سلولها به صورت آمیبی شکل دیده می شوند به طوری که بعد از 1ساعت این فرم سلولی قابل مشاهده است و بعد از 24 ساعت سلولهای آمیبی شکل کاملاً پهن و گسترده شده و حالت نیمرو مانند به خود می گیرند (شکل 6). در نمونه هایی که به صورت همزمان LPS 1µg/ml و شیکونین را دریافت کرده اند نسبت به غلظت شیکونین به کار رفته مورفولوژی سلولها متفاوت می باشد. در غلظت 30µg/ml و 20µg/ml روند فعالیت سلولی به سرعت شروع شده به طوری که بعد از گذشت 24 ساعت

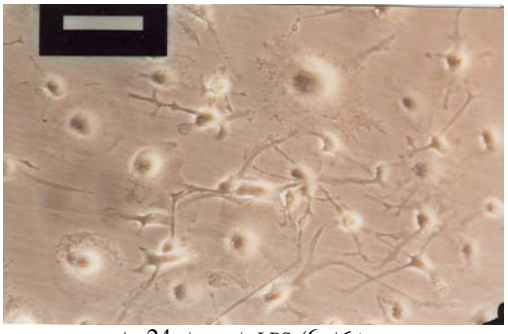
Archive of SID

www.SID.ir

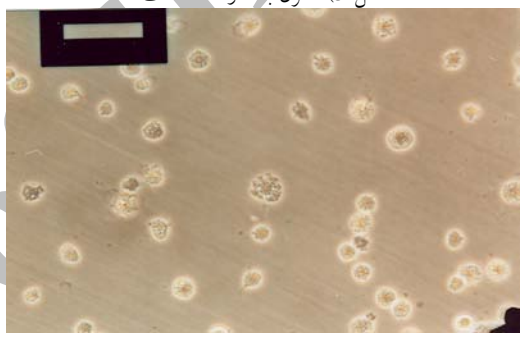
تمامی سلولها دچار فرآیند آپپتوز شده و سلول زنده ای یافت نمی شود (شکل7 و8) و اما در غلظت 10µg/ml این روند مقداری کاهش یافته به طوری که بعد از 24 ساعت به ندرت می توان سلولهایی را یافت که هنوز دچار آپپتوز نشده اند و یا در مراحل ابتدایی آن می باشند ولی بعد از گذشت 48 ساعت هیچ سلول زنده ای را نمی توان در سطح خانه یافت که دچار آپپتوز نشده باشند (شکل9).



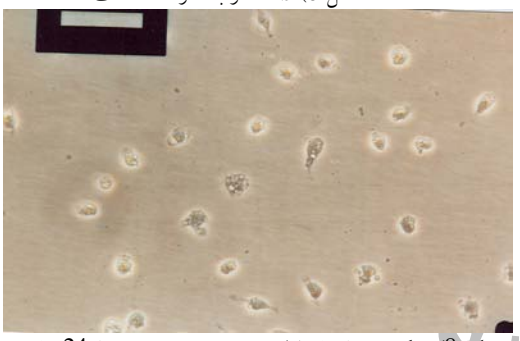
شکل 5) کنترل بعد از 24 ساعت



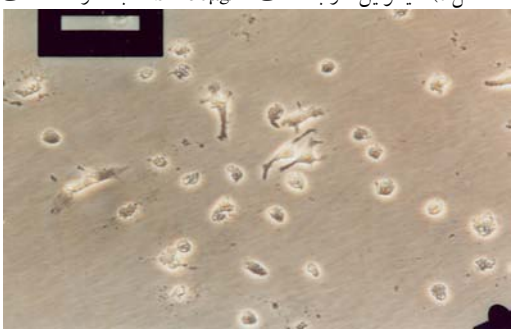
شکل 6) LPS دار بعد از 24 ساعت



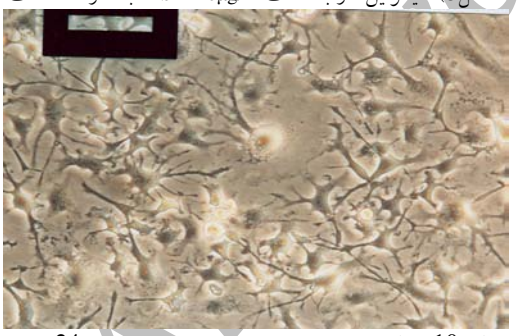
شکل7) شیکونین دار با غلظت30µg/ml + LPS بعد از24 ساعت



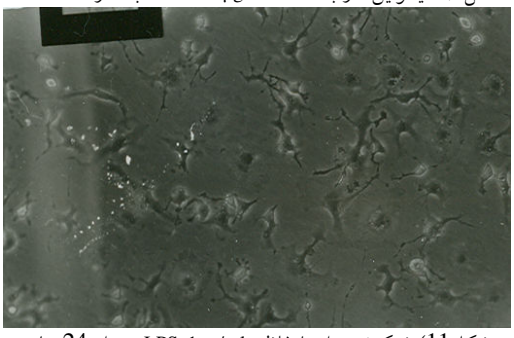
شکل8) شیکونین دار با غلظت20µg/ml + LPS بعد از24 ساعت



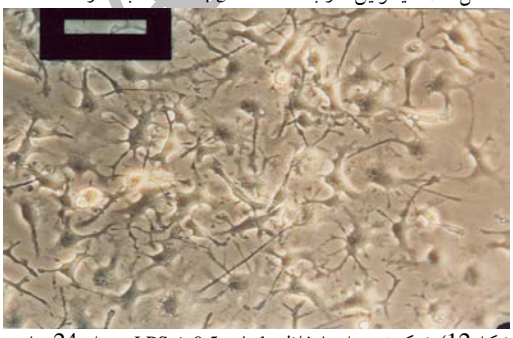
شکل9) شیکونین دار با غلظت10µg/ml + LPS بعد از 24 ساعت



شکل10) شیکونین دار با غلظت5µg/ml + LPS بعد از 24 ساعت



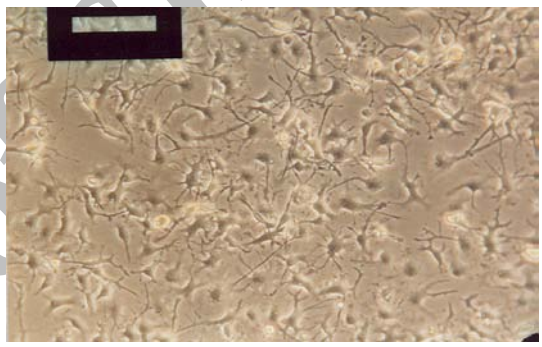
شکل11) شیکونین دار با غلظت1µg/ml+LPS بعد از 24 ساعت



شکل12) شیکونین دار با غلظت0.5µg/ml + LPS بعد از 24 ساعت

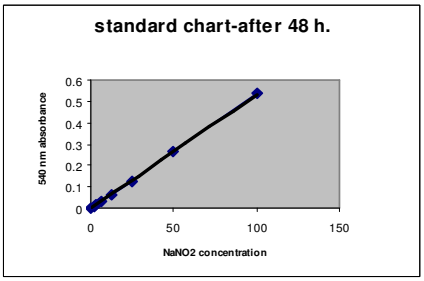
www.SID.ir

در غلظتهای 5µg/ml ، 1µg/ml ، 0.5µg/ml و 0.1µg/ml وضعیت به گونه ای دیگر می باشد. به طوری که هر چه از غلظت 5µg/ml به غلظت 0.1µg/ml نزدیک می گردد از شدت فعالیت سلولها کاسته می شود تا جایی که در غلظت 0.1µg/ml بعد از مدت زمان 24 ساعت وضعیت مورفولوژی سلولها به مورفولوژی نمونه های کنترل شبیه است. همچنین حالت نیمرو مانند و پخش شدگی سلولی در غلظت 0.1µg/ml شیکونین کمتر از این حالت در غلظت 5µg/ml شیکونین می باشد. مورفولوژی گفته شده از غلظت 0.1µg/ml به سمت غلظت 5µg/ml روندی افزایشی دارد (شکل10 تا 13).



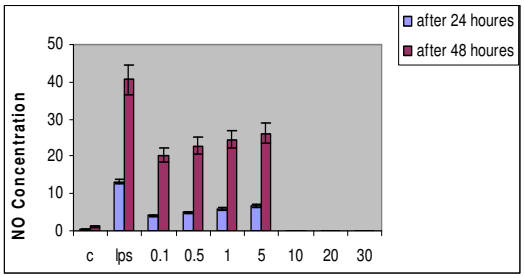
13- شیکونین دار با غلظت LPS+0.1µg/ml بعد از 24 ساعت

نتایج حاصل از اندازه گیری نیتریک اکساید: همانطور که در نمودار مشخص است در نمونه کنترل بعد از گذشت 24 ساعت میزان تولید NO در حد صفر گزارش شده است و نهایت تولید NO در غلظت 1µg/ml LPS می باشد. در غلظت های 30µg/ml ، 20µg/ml و10µg/ml شیکونین، میزان تولید NO صفر، ولی در غلظتهای 5µg/ml ، 1µg/ml ، 0.5µg/ml و0.1µg/ml این روند متفاوت بوده



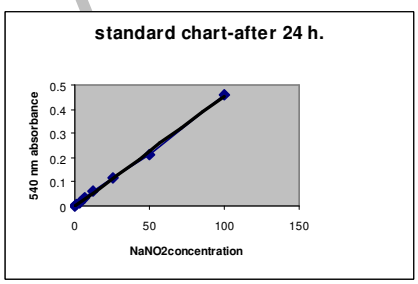
نمودار 2) منحنی استاندارد بعد از 24 ساعت
مربوط به اندازه گیری NO در حضور LPS در سلولهای میکروگلیا

و از غلظت 5µg/ml به سمت 0.1µg/ml شیکونین، سیر نزولی در تولید NO مشاهده می شود به طوری که غلظت 0.1µg/ml شیکونین نزدیکترین گروه به گروه کنترل و در غلظت 5µg/ml شیکونین دورترین گروه به گروه کنترل و نزدیکترین گروه به LPS می باشد. بعد از 48 ساعت از گذشت تیمار روند تولید NO به همان صورت بوده ولی میزان تولید آن با توجه به گذشت زمان در هر غلظتی تشدید شده است که با مقایسه دو منحنی این نتیجه کاملاً مشهود است (نمودار 1).



نمودار 1) نمودارمربوط به اندازه گیری میزان NO در حضور LPS در سلولهای میکروگلیا. آنالیز آماری توسط ANOVA به منظور مقایسه بین نمونه LPS دار و گروههای تیمار شده با شیکونین انجام شده است. $p<0.05$

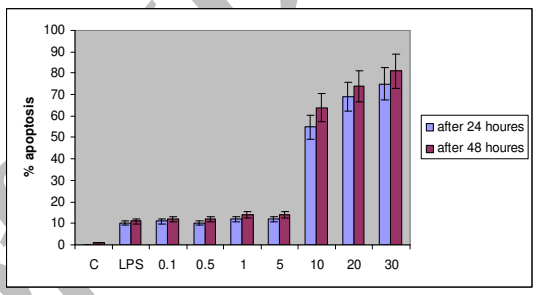
نتایج حاصل از رنگ آمیزی آکریدین اورنج و اتیدیوم برماید و تعیین میزان آپپتوز سلولی: میزان آپپتوز سلولی دربیش از چند فیلد و با دانسیته سلولی بیش از 100 سلول بدست آمده است . در نمونه کنترل میزان میانگین آپپتوز سلولی رویت شده پس از 24 ساعت صفر و بعد از 48 ساعت حدوداً 3 درصد گزارش شده است.



نمودار 3) منحنی استاندارد بعد از 48 ساعت
مربوط به اندازه گیری NO در حضور LPS در سلولهای میکروگلیا

Archive of SID
www.SID.ir

در نمونه هایی که غلظت LPS 1µg/ml را دریافت کرده بودند میزان آپپتوز سلولی پس از 24 ساعت و 48 ساعت به ترتیب 10 درصد و 12 درصد می باشد. بیشترین درصد آپپتوز بعد از 48 ساعت که 100 درصد می باشد در غلظتهای 30µg/ml ، 20µg/ml و10µg/ml شیکونین مشاهده شد. روند آپپتوز سلولی از غلظت 30µg/ml تا غلظت 0.1µg.ml بعد از 24 ساعت و 48 ساعت روندی مشابه و نزولی داشته و کمترین میزان آپپتوز مربوط به غلظت 0.1µg.ml شیکونین می باشد (نمودار 4).



نمودار 4) نمودار تعیین میزان آپپتوز سلولی در سلولهای میکروگلیا. آنالیز آماری توسط ANOVA به منظور مقایسه بین نمونه LPS دار و گروههای تیمار شده با شیکونین انجام شده است.$p<0.05$

نتایج حاصل از تأثیر شیکونین به تنهایی و بدون حضور LPS بر سلولهای میکروگلیا: این آزمایش در مدت زمانهای 24 ساعت، 48 ساعت و 72 ساعت انجام پذیرفت. نتایج گویای این مطلب بودند که شیکونین به تنهایی هیچ تأثیری در آزادسازی NO توسط سلولهای میکروگلیا ندارد. در تمامی غلظتهای شیکونین به کار برده شده – 30µg/ml ، 20µg/ml ، 10µg/ml ، 5µg/ml ، 1µg/ml ، 0.5µg/ml و 0.1µg/ml – هیچ نوع آزاد سازی NO صورت نگرفت و میزان آن همواره مانند نمونه کنترل در حد صفر گزارش شد.

بحث

در این مجموعه آزمایشات شیکونین به عنوان بازدارنده دیگری برای iNOS معرفی شد چرا که بر پایه نتایج به دست آمده بعد از استفاده از شیکونین در غلظتهای µg/ml 5 تا µg/ml 0.1 خاصیت ضد التهابی شیکونین مشخص شده است و میزان تولید NO از حد تحریک شده با LPS بعد از 24 ساعت که حدوداً 13.1µM است به 4.06µM در غلظت µg/ml 0.1 شیکونین می رسد و در غلظت µg/ml 5 شیکونین، این نسبت بعد از 24 ساعت به 6.66µM کاهش پیدا کرده است به طوری که مهار تولید NO بعد از گذشت 24 ساعت از غلظت µg/ml 5 تا غلظت µg/ml 0.1 روندی صعودی داشته و در صد بازدارندگی شیکونین در تولید NO به صورت ٪49.17 :µg/ml 5 ، ٪55.42 :µg/ml 1 ، ٪62.75 :0.5µg/ml و٪69.1 :µg/ml 0.1 می باشد و در غلظت 0.1µg/ml شیکونین، میزان کاهش NO به نهایت خود رسیده و میزان بازدارندگی 69.1 درصد است. مسلماً این تأثیر شیکونین بر کاهش NO از طریق اثر بر میزان بیان آنزیم iNOS می باشد به طوری که در مطالعات گذشته صورت گرفته بر روی سلولهای میکروگلیا این مسئله ثابت شده است (33). نکته دیگر مورد توجه در این آزمایشات میزان اندک شیکونین مورد استفاده می باشد. بر خلاف داروهای سینتتیک دیگر مانند ایبوپروفن که در غلظتهای 100µM و یا 250µM قادر به القاء اثرات آپپتوتیک خود هستند و یا درمورد مینوسایکلین که در غلظتهای بالای 60µM و آن هم بعد از گذشت 48 ساعت قادر به القاء اثرات آپپتوتیک خود می باشد (10) شیکونین در غلظتهای اندک هم قادر به القاء اثرات آپپتوتیک خود و هم قادر به القاء اثرات ضد التهابی خود می باشد. به طوری که درغلظت µg/ml 10 اثرات آپپتوتیک خود را نشان داده و در غلظتهای زیر µg/ml 5 اثرات ضد التهابی خود را نشان می دهد. با توجه به اینکه در غلظتهای بالای شیکونین تمام سلولها دچار آپپتوز شده اند و مقدارNO گزارش شده در حد صفر می باشد و با توجه به اینکه فعالیت iNOS و تولید NO را 6 ساعت پس از شروع تیماربا LPS گزارش کرده اند (21) می توان چنین نتیجه گرفت که در غلظتهای بالای شیکونین القاء روند آپپتوز در سلولهای میکروگلیا آنچنان سریع اتفاق می افتد که به سلول اجازه ای برای

Archive of SID
www.SID.ir

تولید NO داده نمی شود و فرآیندهای القاء آپپتوز در ساعتهای ابتدائی تیمار اتفاق می افتد و عوامل درگیر در القاء آپپتوز در این سلولها در غلظتهای بالای شیکونین چیزی بجز تولید NO و آپپتوز ایجاد شده در نتیجه توکسیک بودن NO می باشد(20 و 31). القاء آپپتوز در سلولهای میکروگلیا در غلظتهای بالای شیکونین می تواند چیزی مشابه با القاء آپپتوز توسط این ماده در سلولهای التهابی و سرطانی ذکر شده باشد. القاء آپپتوز در این سلولها می تواند در نتیجه فعالیت کاسپازها و MAPK مانند ERK ، JNK ، P53 که درگیر در فرآیند القاء آپپتوز در سلولهای A375-S2 ملانومای انسانی از طریق توقف سیکل سلولی اند باشد (35 و 36) و یا در نتیجه افزایش رادیکالهای آزاد و اکسیژنهای فعال و کاهش گلوتاتیون سلولی باشد که در این صورت موجب القاء سریع آپپتوز در کمتر از1ساعت مشابه آنچه در سلولهایSK-Hep-1 پریمیئلوسیتیک انسانی اتفاق می افتد می شود. در صورتی که شیکونین در غلظتهای پایین فقط موجب آپپتوز سلولهایی می شود که به شدت فعال شده اند و چون شدت فعالیت سلولی در نتیجه LPS، وابسته به دوز شیکونین استفاده شده می باشد و در غلظتهای پایین موجب مهار فعالیت سلولها می شود بنابراین روند آپپتوز سلولی از غلظتهای بالای شیکونین به سمت غلظتهای پایین آن روندی کاهشی داشته، پس می توان گفت که شیکونین در این غلظتها هم فعالیت التهابی سلولها را از طریق کاهش میزان NO تولید شده مهار کرده و هم موجب آپپتوز سلولهایی می شود که شدت فعالیت آنها آنچنان زیاد شده است که برای سلولهای دیگر توکسیک هستند.

القاء روند ضدالتهابی شیکونین در این سلولها می تواند در نتیجه کاهش رسپتورهای LPS مانند CD14 و یا کاهش TLR4 که انتقال دهنده سیگنالهای LPS به درون سلول است باشد (18). در هر حال موجب مهار iNOS و کاهش پروتئین iNOS شده و کاهش NO را به همراه دارد. در غلظتهای بالای شیکونین 10 µg/ml و بالاتر از آن شروع فعالیت سلولی به سرعت دیده می شود که این تغییر را می توان در نتیجه وجود LPS و همچنین غلظت بالای شیکونین دانست. شروع زود هنگام فعالیت سلولی در خانه های حاوی LPS باعث گرد شدن حالت سلولها شده که که دلیل این فعالیت وجود LPS1µg/ml می باشد. بر عکس در غلظتهای پائین شیکونین که دارای همان مقدار LPS بوده چنین روند فعالیتی دیده نمی شود که پایین بودن غلظتهای شیکونین روندی ضدالتهابی را در این سلولها القاء می کند.

با تأثیر شیکونین به تنهایی و بدون LPS بر سلولهای میکروگلیا نتیجه جالبی مشاهده شد و آن اینکه شیکونین به تنهایی موجب تولید NO نمی شود و مقدار NO گزارش شده صفر است. بنابراین می توان چنین نتیجه گرفت که شیکونین همانند مینوسایکلین تنها در حضور LPS است که موجب مهار فعالیتهای توکسیک این ماده ملتهب کننده بر سلولها شده و میزان تولید NO را کاهش داده است (33). بر عکس در غلظتهای بالای شیکونین و در غیاب LPS همچنان آپپتوز سلولی مشاهده می شود و این گویای این مطلب است که فعالیت شیکونین در غلظتهای بالا به خودی خود موجب القاء آپپتوز در این سلولها شده و آپپتوز بوجود آمده در این غلظت ها غیر وابسته به آپپتوز ایجاد شده در نتیجه التهاب سلولی بواسطه LPS و اثرات توکسیک وابسته به NO می باشد(31). گزارش شده است که سلولهای میکروگلیا در روزهای ابتدائی کشت نسبت به حذف سرم حساس تر بوده و حذف سرم به دلیل از بین رفتن فاکتورهای رشد می تواند موجب القاء آپپتوز در این سلولها شود ولی در روزهای انتهایی کشت و در هفته سوم کشت تأثیر چندانی در مرگ آپپتوتیک این سلولها ندارد (7).

با توجه به نتایج مشاهده شده می توان شیکونین را به عنوان یک ترکیب مؤثر با منشاء گیاهی در نظر گرفت و از آن در انواع بیماریهای نورولوژیکی که فعال شدن سلولهای

Archive of SID

www.SID.ir

میکروگلیا در آن منجر به آسیب نورونها و در مجموع آسیب CNS می شود استفاده کرد و با توجه به اینکه این ترکیب دارای منشاء گیاهی است مسلماً آثار جانبی استفاده از آن بسیار کمتر از هر نوع داروی سینتتیک و شیمیایی دیگر بوده و با توجه به میزان اندک مورد نیاز برای تأثیرگذاری این ماده چه در آپپتوز و چه در خصوصیات ضد التهابی می توان استفاده از آن را بسیار توسعه داد.

منابع

1- Aloisi F. 2001. Immune function of microglia. Glia.36:165-179.

2- Block M.L., Hong J.Sh. 2005. Microglia and inflammation–mediated neurodegeneration: multiple triggers with a common mechanism. Progress in Neurobiology.76:77-98.

3- Bredt D.S., Synder S.H. 1994. Nitric oxide: a physiologic messenger molecule. Ann Rev Biochem.63:95-175.

4- Chao C.C., Hu S., Molitor Th.W., Shaskan E.G., Peterson Ph.K. 1992.Activation microglia mediate neuronal cell injury via a nitric oxide mechanism. The Journal of Immunology.149:2736-2741.

5) Boggs W. 2003.Chinese herb blocks chemokine receptor, may have anti-HIV effect. Reuters Health.13,50:24-30.

6- Chen X.,Yang L., Oppenheim J.J., Zack howard O.M. 2002. Cellular pharmacology studies of shikonin derivatives. Phytotherapy Research.16,3:199-209.

7- Chock V.Y., Giffard R.G. 2005. Development of neonatal murine microglia in vitro: changes in response to lipopolysaccharide and ischemia-like injury. Podiatric Research.57,4:475-480.

8- Cuadros M.A., Navascues J. 1998. The origin and differentiation of microglia cells during development.Progress in Neurobiology.56:173-189.

9- Dawson T.M., Dawson V.L. 1995. Nitric oxide: actions and pathological roles.The Neuroscientist.1:7-18.

10- Elsisi N.S., Darling-Reed S., Lee E.Y., Oriaku E.T., Soliman K.F. 2005. Ibuprofen and apigenin induce apoptosis and cell cycle arrest in activated microglia. Neuroscience Letters.375:91-96.

11- Flora of china.1998.19:346

12- Garden G., Moller Th. 2006. Microglia biology in health and disease. J Neuroimmune Phaemacol.1:127-137.

13- Giulian D., Baker T.J. 1986. Characterization of ameboid microglia isolated from developing mammalian brain.Journal of Neuroscience.6:2163-2178.

14- Griess P. 1879. Bemerkungen zu der abhandlung der H.H Weselsky und Benedict:Ueber eining azoverbindungen.Chem Ber.12:426-428.

15- Haghbeen K., Mozaffarian V., Ghaffari F., Pourazeezi E., Saraji M., Daliri Joupari M. 2006. Lithospermum officinale callus produces shikalkin. Biologia Bratislava. 61,3: 1-5.

16- Hou Y., Guo T., Wu C., He X., Zhao M. 2006. Effect of shikonin on breast cells proliferation and apoptosis in vitro. The Pharmaceutical Society of Japan.126,12:1383-1386.

17- Hsu P.C., Huang Y.T., Tasi M.L., Wang Y,G., Lin J.K., Pan M.H. 2004. Induction of apoptosis by shikonin through coordinative modulation of Bcl-2 family, p27 and p53 , release of cytochrome c , and sequential activation of caspase in human colorectal carcinoma cells. J Agric Food Chem.52,20:6330-6337.

18- Jung D.Y., Lee H., Jung B.Y., Ock J., Lee M.S., Lee WH., Suk K. 2005. TLR4 but not TLR2, signals autoregulatory apoptosis of cultured microglia: a critical role of IFN-β as a decision maker. The Journal of Immunology. 174:6467-6476.

19- Kimura T., Nakazato T., Ikeda Y., Kizaki M. 2005. Rapid induction of apoptosis by a Chinese herb compound, shikonin, via modulation of IL-6/STAT3- and IGF-1/IGF-1R- mediated dual survival pathway in human myeloma cells.Planta Med.29,2.205-210.

20- Lee P., Lee J., Kim S., Lee M.S., Yagita H., Kim S.Y., Kim H., Suk K. 2001. NO as an autocrine mediator in the apoptosis of avtivated microglial cells: correlation between activation and apoptosis of microglial cells. Brain Research.892:380-385.

21- Liu B., Gao H.M., Wang J.Y., Jeohn G.H., Cooper C.L., Hong J.SH. 2002. Role of nitric oxide in inflammation-mediated neurodegeneration. The Annals of Newyork Academy of Scienceses.962:1-15.

Arrive of SID
www.SID.ir

22- Liu B., Hong J.SH. 2003. Role of microglia in inflammation-mediated neurodegenerative diseases: mechanisms and strategies for therapeutic intervention.The Journal of Pharmacology & Experimental Therapeutics.304,1:1-7.

23- Liu B., Wang K., Gao H.M., Mandavilli B., Wang J.Y., Hong J.SH. 2001. Molecular consequences of activated microglia in the brain: overactivation induces apoptosis.Journal of Neurochemistry.77:182-189.

24- Nakajima K., Kohsaka SH. 2001. Microglia:activation and their significance in the central nervous system.The Jounal of Biochemistry.130:169-175.

25- Nakamura Y. 2002. Regulating factors for microglial activation. Biol Pharm.25,8:945-953.

26- Papageorgiou V.P., Assimopoulou A.N., Couladouros E.A., Hepworth D., Nicolaou K.C. 1999. The chemistry and biology of alkannin, shikonin and related naphthazarin natural products. Angew Chem.38:270-300.

27- Ramendra N.S., Kalipada P. 2006. Regulation of nitric oxide synthase gene in glial cells.Antioxidants & Redox Signaling.5,6:929-947.

28- Ribble D., Goldstein N.B., Norris D.A., Shellman Y.G. 2005. A simple technique for quantifying apoptosis in 96-well plates. Bio Med Central Biotechnology.5,12:1-7.

29- Rock R.B., Gekker G., Hu SH., Sheng W.S., Cheeran M., Lokensgard J.R., Peterson PH.K. 2004. Role of microglia in central nervous system infections.Clinical Microbiology Reviews.17,4:942-964.

30- Streit W.J., Mark R.E., Griffin W.S.T. 2004. Microglia and neuroinflammation: a pathological perspective.Journal of Neuroinflammation.1,1.14-20.

31- Suk K. 2005. Role of caspases in activation-induced cell death of neuroglia.Current Enzyme Inhibition.1:43-50.

32- Suzumura A. 2002. Microglia : immunoregulatory cells in the central nervous system.Journal of Medical Science.65,2:8-20.

33- Wang A.L., Yu A.C.H., Lau L.T., Lee C., Wu L.M., Zhu X.A., Tso M.O.M. 2005. Minocycline inhibits LPS-induced retinal microglia activation. Neurochemistry International.47:152-158.

34- Willingham M.C. 1999. Cytochemical methods for the detection of apoptosis.The Journal of Histochemistry & Cytochemistry.47,9:1101-1109.

35- Wu Z., Wu L., Li L., Tashiro SH.I., Onodera S., Ikejima T. 2004. P53-mediated cell cycle arrest and apoptosis induced by shikonin via a caspase -9-dependent mechanism in human malignant melanoma A375-S2 cells. Journal of Pharmacological Sciences.94:166-176.

36- Wu Z.,Wu L.J., Tashiro S., Onodera S., Ikejima T. 2005. Phosphorylated extracellular signal–regulated kinase up-regulated p53 expression in shikonin–induced Hela cell apoptosis.Chin Med J.118,8:671-677.

37- Yoon Y., Kim Y.O., Lim N.Y., Jeon W.K., Sung H.J. 1999. Shikonin, an ingredient of lithospermum erythrorhizon induced apoptosis in HL60 humam premyelocytic leukemia cell line. Plant Medica.65:532-535.

Archive of SID

www.SID.ir

Effects of shikonin, a component of chinese herbal medicine, on activation and apoptosis of inflammated microglial cells in vitro

Alizadeh M.[1], Sabouni F. [1], Abbasi SH.[1], Moghimi A.[2], and Haghbeen K. [1]

[1] National Institute for Genetic Engineering & Biotechnology (NIGEB), Tehran, I.R. of IRAN

[2] Biology Dep., Faculty of Science, Ferdowsi Univ., Mashhad, I.R. of IRAN

Abstract

Shikonin (*β-alkannin*) a red naphtoquinone pigment extracted from the groun rhizome of *Arnebia euchroma* (*Boraginaceae*) which has been used in East Asia for treating burns, has anti-inflammatory and antitumor effects both in vitro and in vivo. In this study we evaluated the effects of shikonin on activated microglia in vitro and analysis the changes of NO (Nitric oxide) level and percentage of apoptosis in the presence or absence of LPS(*Lipopolysaccharide*). Microglia, residential monocyte-lineaged cells in the central nervous system, can release a variety of factors including cytokines, chemokines, nitric oxide, *etc.* to regulate the communication among neuronal and other types of glial cells. when microglia are hyperactiveted due to a certain pathological imbalance, they may cause neuronal degeneration and inflammatory disease such as cerebral ischemia, Alzheimer' disease, prion disease, multiple sclerosis, parkinson' disease, AIDs dementia, trauma and others. Elevated level of NO produced with this cells in the CNS also are associated with the pathogenesis of neuroinflammatory and neurodegenerative human disease. The crude plant extract of *Arnebia euchroma* showed significant dose-dependent inhibition of NO production and apoptosis of treatrd cells. The results showed that shikonin at concentrations >&=10μg/ml induce apoptosis and at concentrations beetwen 0.1-5μg/ml induce significant reduction in NO level as measured by Acridine orange/Ethidium bromide staning and Griess reagent, respectively. Thus, shikonin may have clinical potential as anti-inflammatory therapeutics in neurodegenerative disease.

Keywords: shikonin , *Arnebia euchroma* , microglia , NO , apoptosis , LPS , Neurodegenerative

Archive of SID

www.SID.ir