مقایسه اثر توکسیک شیکونین استاندارد و شیکونین استخراج شده از *Arnebia euchroma* بر آستروسیت ها

مولود میررضوی[۱]، فرزانه صابونی[۲،*]، شاه صنم عباسی[۲]، کمال الدین حق بین[۲]، رضا حاج حسینی[۱]، حبیب الله ناظم[۱]

[۱] تهران، دانشگاه پیام نور مرکز

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

تاریخ دریافت: ۸۹/۱/۲۳ تاریخ پذیرش: ۸۹/۹/۲۷

چکیده

آستروسیت ها فراوان ترین سلولها در سیستم عصبی مرکزی هستند و عملکرد آنها نگهداری حالت طبیعی فیزیولوژی مغز می باشد. همچنین این سلولها در آسیبهای مغزی واکنش نشان داده و نقش تنظیمی مهمی را در هنگام التهاب مغزی ایفاء می کنند. شیکونین از عصاره استخراج شده از ریشه گیاه *Lithospermum erythrorhizon* و *Arnebia euchroma* به دست می آید که به عنوان ترکیب ضد التهاب ، ضد فعالیت HIV-1 ، ضد تومور ، ضد میکروب ، ضد ترومبیک ، استفاده می شود. در این مطالعه اثر توکسیک غلظتهای مختلف شیکونین (μM ۲۰-۵) بر آستروسیت جدا شده به روش مکانیکی از مغز نوزاد موش صحرایی نژاد Wister و آستروسیت های رده سلولی 1321N1 بررسی شده است. از واکنش MTT برای بررسی قابلیت حیات سلولها و از رنگ آمیزی DAPI برای بررسی مرگ سلولی استفاده شد. از نتایج چنین بر می آید که داروی شیکونین یک اثر وابسته به دُز را نشان می دهد. به طوری که در غلظتهای بالا اثر توکسیک بر سلولها داشته و با کاهش غلظت این توکسیسیتی کمتر می شود.

واژه های کلیدی: آستروست، شیکونین، توکسیسیتی

* نویسنده مسئول، تلفن: ۴۴۵۸۰۳۷۴-۰۲۱ ، پست الکترونیکی: sabouni@nigeb.ac.ir

مقدمه

سیستم عصبی از دو نوع سلول اصلی تشکیل شده است: نرونها و سلولهای گلیا. تمام جنبه های تکوینی و عملکردی مغز درگیر شرکت نرون _ گلیالی می باشد(۵). سه نوع سلول گلیال در سیستم عصبی مرکزی وجود دارد که به ترتیب فراوانی عبارتند از: آستروسیت، الیگودندروسیت و میکروگلیا (۱۷و۶). آستروسیت ها که به *آستروگلیا نیز* معروف هستند(۱۳). فراوان ترین سلولهای گلیا در سیستم عصبی مرکزی می باشند(۴و۱۰). از جمله عملکرد آستروسیت ها می توان به شکل دهی و حفاظت از سد مغزی_ خونی، هومئوستازی یونی خارج سلولی، مهاجرت نرونها در طی تکامل آنها اشاره کرد (۴، ۸، و۲۱). آستروسیت ها به طور مستقیم و یا غیر مستقیم در پاتوفیزیولوژی انواع آسیب و پیشرفت بیماریهای تحلیل رونده عصبی وتولید *بافت عصبی* مؤثر هستند (۲۹). این سلولها نقش کلیدی در التهاب سیستم عصبی و ترمیم آن به عهده دارند. به طوری که در آسیبهای مغزی، آستروسیت ها واکنش نشان داده و نقشهای تنظیمی مهمی را در هنگام التهاب ایفاء می کنند (۸ و۲۱). آستروسیت ها به طور فعال در انتقال اطلاعات از طریق تبدیل اطلاعات ورودی به گروه رسپتورهای نوروترنسمیتردر غشای آستروسیت ها، دخالت دارند (۳). آستروسیت های فعال شده انواع فاکتورهای پیش التهابی مثل سیتوکین ها، شیموکین ها

Archive of SID
www.SID.ir

ونیتریک اکساید (NO) را تولید می کنند که در پاتولوژی بیماریهای نروایمونولوژیکی ازجمله (Multiple Sclerosis MS)، آلزایمر، آسیبهای مغزی، پارکینسون، Experimental allergic encephalomyelitis (EAE) و trauma نقش دارند (۱۴ و ۱۶). توصیف طیف پاسخهای آستروسیت ها در مراحل مختلف در بیماریهای مغز اهمیت این سلولها در آسیبهای نرودژنراتیو شناخته شده را نشان می دهد(۱۲).

آلکانین و شیکونین از نفتوکینون های انانتیومر طبیعی بوده که ریشه استفاده از آنها به سده های قبل بر می گردد. مشخص شده که مشتقات شیکالکینی (انانتیومرهای شیکونین و آلکانین) به طور طبیعی در ریشه *Lithospermum erythrorhizon* , *Arnabia euchroma* , *Alkanna tinctoria* به فراوانی یافت می شوند (۹، ۱۹ و ۳۰). وزن مولکولی شیکونین ۲۸۸/۲۹۹۴ و فرمول بیوشیمیایی آنها $C_{16}H_{16}O_5$ می باشد (۲۴). عصاره قرمز رنگ به دست آمده از ریشه خشک شده این گیاه در درمان زخمها، جوشها، سرخک، گلو درد، سیاه زخم ، تاول و سوختگیها کاربرد داشته است. همچنین شیکونین موجب القای آپوپتوز در سلولهای سرطانی انسانی مختلف از جمله سلولهای HL-60 لوکمیای پرمینوسیتیک از طریق القای مکانیزم وابسته به کاسپاز ۳ ، سلولهای هپاتوما SK-Hep-1، سلولهای ملانومای بدخیم A375-S2 ، سلولهای کولورکتال، سلولهای اپیتلیال سرویکال ، سلولهای MCF-7 می شود (۱۱، ۲۴، ۲۵، ۲۷، ۲۸ و ۳۱) .

در شرایط پاتولوژیک سلولهای گلیا انواع مختلف سیتوکین ها را که سبب بقای نرونها می شوند، ترشح می کنند (۱۲). آستروسیت ها علاوه بر اینکه به عنوان سلولهایی که اطراف نرونها را احاطه کرده شناخته شده اند ، عمل محافظت ، تغذیه و تنظیم رشد آنها را نیز به عهده دارند (۷). آستروسیت ها خودشان به طور مستقیم در ارتباط با نرونها و الیگودندروسیت ها هستند و از طریق ترشح واسطه هایی مثل شیموکین ها به آسیب ایمونوپاتوبیولوژیکی هدایت می کنند (۲۲).

در این مطالعه اثر توکسیک غلظتهای مختلف شیکونین بر دودمان سلولی آستروسای انسانی 1321N1 و آستروسیت های جداسازی شده از مغز نوزاد موش صحرایی مورد بررسی قرار گرفت . تا با توجه به نقش شیکونین در کاهش التهاب و القای مرگ سلولی در انواع سلولهای سرطانی ، غلظت توکسیسک این دارو بر آستروسیت ها و اثر آن بر سلولهای آسیتروسای انسانی نیز بررسی شود.

مواد و روشها

کشت سلول: کشت اولیه از مغز موش صحرایی ۱-۳ روزه نژاد Wister انجام گردید. پس از جدا کردن بافت کورتکس از پرده مننژ و جداسازی سلولها به صورت مکانیکی سوسپانسیون سلولی داخل محیط کشت Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) حاوی ده درصد fetal bovine serum(FBS) قرار گرفت. بعد از حدود ۱۰ روز به روش تریپسینه کردن ملایم جداسازی سلولهای آستروسیت از دیگر سلولهای مغزی انجام شد. بدین صورت که با استفاده از تریپسین ۲۵/. درصد(Merck) سلولها را از فلاسک جدا و به مدت ۱۰ دقیقه درrpm ۱۵۰۰ سانتریفیوژ کرده و مایع رویی را دور ریخته و رسوب حاصل در محیط کشت سرم دار حل ودر ۳۷ درجه سانت گراد و ۵ درصد، CO_2 انکوبه شد. بعد از پاساژ اول و جداسازی آستروسیت ها از آنها برای مطالعات استفاده گردید (۱۵).

همچنین دودمان سلولی 1321N1 تهیه شده از آستروسیتومای مغز انسان (پاستور) در محیط کشت DMEM و ۱۰ درصد سرم جنین گوساله (Gibco) کشت داده شد.

بعد از اینکه هر دو نوع سلول ۷۰ درصد از سطح فلاسک ۵۰ml (Nunc) را پر کردند سلولها با استفاده از تریپسین ۲۵/. درصد (Merck) از فلاسک جدا و به مدت ۱۰ دقیقه درrpm ۱۵۰۰ سانتریفیوژ شدند و رسوب سلولی در ml ۱ محیط سرم دار حل گردید و بعد از رنگ آمیزی

Archive of SID

www.SID.ir

با تریپان بلو(۱/۱۰) و شمارش سلولی در پلیت ۹۶ چاهکی (Nunc) پاساژ داده شدند. به طوری که برای هر چاهک ۵۰۰۰ سلول در نظر گرفته شد. بعد از ۲۴ ساعت سلولها به مدت ۴ ساعت با غلظتهای مختلف(۵μM– ۲۰ μM) شیکونین استاندارد (GALBIOCHEM) خریداری شده و شیکونین استخراج شده از ریشه گیاه*Arnebia euchroma* در پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری (۲) تیمار شدند و سپس دارو حذف و با محیط سرمدار جایگزین گردید (۲۰).

سنجش MTT : قابلیت حیات و تکثیر سلولها توسط سنجش MTT(sigma) مشخص گردید که بعد از تیمار سلولها با شیکونین در ۲۴ و ۴۸ ساعت این تست انجام شد. که در هر چاهک ۱۰ µl از MTT با غلظت ۵۰ mg/ml ریخته و به مدت ۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد در ۵ درصد، CO_2 انکوبه گردید. سپس محیط سلولها حذف و ۲۰۰ µl ، Dimythylsulfoxid (DMSO) (Merck) به هر چاهک اضافه و با طول موج ۵۸۰nm توسط دستگاه الایزا ریدر (Microplate reader Labsystems Multiscan) بررسی گردید (۲۹).

رنگ آمیزی DAPI : رنگ DAPI هسته سلولی را رنگ می کند و زیر میکروسکوپ می توان تغییرات ایجاد شده در هسته را بررسی کرد. برای بررسی مستقیم اثرات شیکونین بر آستروسیت ها، سلولها بعد از کشت بر روی لامل و تیمار با غلظتهای ۵ µM و ۱۰µM و۱۵µM و ۲۰µM شیکونین با پارا فرم آلدئید ۴ درصد (Merck) به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق فیکس وسپس به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق تحت اثر DAPI(Sigma)ٓ قرار داده شدند و با میکروسکوپ فلورسانس بررسی گردیدند (۲۳ و ۲۶).

رنگ آمیزی اختصاصی ایمونوسیتوشیمی: Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) مارکر سلولی برای تشخیص آستروسیت ها می باشد. سلولهای آستروسیت مغز نوزاد موش صحرایی پس از جداسازی (مطابق روش ذکر شده در کشت سلول) وکشت در پلیت ۹۶ خانه ای ، با پارا فرم آلدئید (Merck) فیکس و توسط محلول نفوذ پذیر کننده۲ درصد Triton X100 نفوذپذیر گردیدند. بعد از اضافه کردن محلول بلوکه کننده ۱۰ در صد به مدت ۴۵ دقیقه ، رقت ۱/۲۰۰ از آنتی بادی اولیه GFAP (Santa cruz biotechnology) به سلولها اضافه گردید و به مدت یک ساعت در دمای اتاق قرار داده شدند.سپس بعد از تیمار با آنتی بادی ثانویه anti-GFAP (Dako Cytomation) به مدت یک ساعت، محلول streptovidine/HRP به مقداری که روی نمونه را بپوشاند جایگزین گردید و به مدت یک ساعت در دمای اتاق قرار شد. بعد ازجایگزینی با محلول (Dakof Cytomation) DAB-chrom به مدت ۱۵ دقیقه توسط میکروسکوپ فلورسانس بررسی گردید.

آنالیز آماری: نتایج به دست آمده در برنامه SPSS (v.16) از طریق تجزیه RB ، General linear model، و آزمونهای Duncan و LSD آنالیز شده اند. سطح معنا داری می باشد.

نتایج

نتایج حاصل از رنگ آمیزی اختصاصی ایمونوسیتوشیمی آستروسیت های نوزاد موش جداسازی شده بیانگر خلوص بالای آستروسیت های جداسازی شده می باشد (شکل۱).

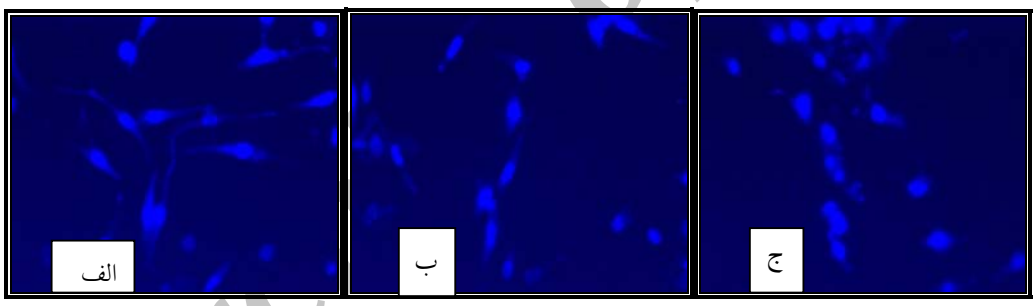
بررسی آماری نتایج حاصل از تست MTT مربوط به آستروسیت های جداسازی شده ازمغز نوزاد موش صحرایی نشان می دهد که با توجه به سطح معنا داری $p<0.01$ =**، بین سه بار تکرار در آزمایش اختلاف معنادار مشاهده نشد(E^{-5} ۲/۷۷ =MS) ولی بین زمان (** ۰/۰۴۴ =MS)، غلظتهای مختلف شیکونین (** ۰/۰۰۶ =MS) و اثر متقابل غلظت در زمان (** ۰/۰۱۰ =MS) اختلاف معنا دار مشاهده گردید در نتیجه زمان ۲۴ ساعت و ۴۸ ساعت به طور جداگانه مورد بررسی قرار گرفت که

Archive of SID
www.SID.ir

بین غلظتهای مختلف شیکونین در هر دو زمان ۲۴ ساعت (** ۰/۰۴۵ =MS) و ۴۸ ساعت (** ۰/۰۳۵ =MS) اختلاف معنا دار مشاهده گردید.

بررسی آماری نتایج حاصل از تست MTT مربوط به آستروسیت های سل لاین 1321N1 نشان می دهد که با توجه به سطح معنا داری $p<0.01$ =**، بین سه بار تکرار در آزمایش اختلاف معنادار وجود نداشته (۰/۰۰۲ =MS) ولی بین زمان (** ۰/۳۶۹ =MS) ، غلظتهای مختلف شیکونین (** ۰/۸۲۹ =MS)و اثر متقابل غلظت در زمان (** ۰/۰۴۷ =MS) اختلاف معنا دار وجود داشته در نتیجه زمان ۲۴ ساعت و ۴۸ ساعت به طور جداگانه مورد بررسی قرار گرفت. که بین غلظتهای مختلف شیکونین در هر دو زمان ۲۴ ساعت (** ۰/۴۳۲ =MS) و ۴۸ ساعت (** ۰/۴۴۳ =MS) اختلاف معنا دار مشاهده گردید.

شکل ۱ – رنگ آمیزی ایمونوسیتوشیمی آستروسیت های موش صحرایی. **از چپ به راست:الف**– نمونه کنترل منفی بدون اضافه کردن آنتی بادی اولیه GFAP. سلولها رنگ نگرفته اند.ب– نمونه کنترل مثبت . سیتوپلاسم سلولها رنگ شده و هسته رنگ نشده.ج– سلولهای کنترل مثبت. تقریباً تمامی سلولها رنگ شده که بیانگر خلوص سلولهای آستروسیت جداسازی شده می باشد.



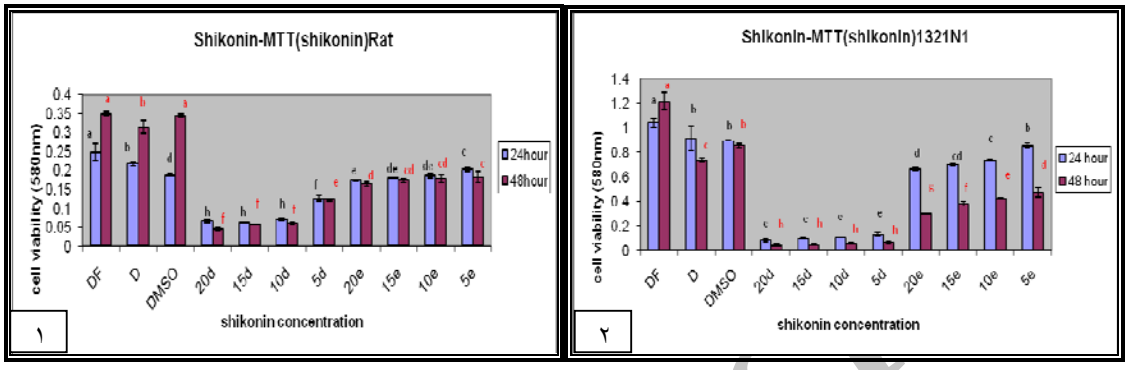
شکل ۲ – رنگ آمیزی سلولهای 1321N1 با DAPI بعد از تمار با شیکونین و بررسی با میکروسکوپ فلورسانس از چپ به راست:. **الف**– نمونه کنترل منفی که با شیکونین تیمار نشده . ب – تیمار با غلظت ۲۰ µM شیکونین استخراجی که تکه تکه شدن هسته سلول مشاهده می شود. ج– تیمار با غلظت ۱۵µM شیکونین استاندارد که به خوبی تکه تکه شدن هسته ها مشاهده می شود.

همان طور که در نمودار ۱و ۲ مشاهده می شود در هر دو زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت نمونه های تیمار شده با غلظتهای مختلف شیکونین به طور معناداری نسبت به نمونه کنترل محیط کشت سرمدار در بقای سلولی نقش داشته و به طور وابسته به دُز میزان سلولها را کم کرده اند که این اثر در ۴۸ ساعت بیش از ۲۴ ساعت بوده که بیانگر اثر شیکونین بعد از حذف آن می باشد. همچنین میزان بقای سلولی در نمونه کنترل DMSO نسبت به نمونه کنترل محیط کشت سرم دار اختلاف معنادار نداشته و یا اختلاف کمی را نشان می دهد که بیانگر آن است که مقدار DMSO به کار رفته برای حل کردن شیکونین به طور معناداری در بقای سلولی نقش نداشته و کاهش میزان سلولها مربوط به اثر توکسیک شیکونین می باشد. به علاوه اثر توکسیک شیکونین استاندارد نسبت به شیکونین استخراجی به طور معناداری بیشتر بوده است. به طوری که غلظتهای شیکونین

www.SID.ir

استخراجی تفاوت معناداری با نمونه کنترل DMSO ندارد و یا اختلاف کم است.

در رنگ آمیزی با DAPI هم این حالت کاملاً مشخص است به طوری که تغییرات مورفولوژیکی هسته رنگ آمیزی شده نشان می دهد در غلظتهای ۲۰ و ۱۵ شیکونین به خصوص شیکونین استاندارد هسته های متراکم و تکه تکه شده مشاهده که می تواند بیانگر مرگ سلولی باشد (شکل۲).



نمودار۱و۲- نتایج تست MTT آستروسیت های جداسازی شده از مغز نوزاد موش صحرایی تیمار شده با غلظتهایμM ۲۰- μM ۵ شیکونین استاندارد و شیکونین استخراجی. نمودار ۲: نتایج تست MTT آستروسیت های سل لاین 1321N1 تیمار شده با غلظتهایμM ۲۰- μM ۵ شیکونین استاندارد و شیکونین استخراجی.(DF: نمونه کنترل محیط کشت DMEM+FBS، D: نمونه کنترل محیط کشت DMEM بدون سرم،DMSO : نمونه کنترل محیط DMEM+DMSO، d: نمونه تیمار شده با غلظتهای ۲۰و۱۵،۱۰و۵ شیکونین استاندارد،e: نمونه تیمار شده با غلظتهای ۲۰،۱۵،۱۰و ۵ شیکونین استخراج شده.)

بحث

آستروسیت ها می توانند به عنوان تنظیم کننده جریان خونی- مغزی ، فاکتور های متنوع غذایی ، متابولیسم گلوتامات ، بافر پتاسیم و سیگنال گلیال- نرونی عمل کنند. آستروسیت ها تنها عملکرد داربست ندارند ، آنها کلید تنظیم هموستازی متابولیت های انرژی و ناقلین عصبی در CNS هستند. اثر متابولیسم بین آستروسیتها، الیگودندروسیت ها و نرونها وجود دارد. وقتی آستروسیت ها خودشان هدف التهاب قرار بگیرند ، برای مثال در عفونت HIV، عملکرد های بیولوژیکی خود را تغییر می دهند که شامل ترشح تغییر یافته سیتوکین و شیموکین ها و اجزای پروتئینی درگیر در هومئوستازی است (۱، ۱۸ و ۲۲) همچنین آستروسیت ها در تکامل بسیاری از تومورهای مغزی دخالت دارند(۱۶).

با توجه به اهمیت آستروسیت ها در این مطالعه اثر توکسیک غلظتهای مختلف شیکونین (μM ۲۰-۵) بر دودمان سلولی آستروماى انسانی 1321N1و آستروسیت های جداسازی شده از مغز نوزاد موش صحرایی مورد بررسی قرار گرفت. همان طور که نتایج حاصل از مطالعه فوق نشان می دهد شیکونین بر آستروسیت ها اثر توکسیک داشته که این روند به صورت وابسته به دُز بوده و با کاهش غلظت دارو بقای سلولی بیشترشده است. این اثر توکسیک در شیکونین استاندارد از شیکونین استخراجی بیشتر بوده که می توان آن را عدم خلوص شیکونین استخراجی دانست. به علاوه اثر توکسیک شیکونین بر سلولها در ۴۸ ساعت بیشتر از ۲۴ ساعت بوده که ماندگاری اثر دارو به طور طولانی مدت بعد از حذف آن را نشان می دهد.

همچنین اثر توکسیک شیکونین بر آستروسیت های سرطانی سل لاین 1321N1 نسبت به آستروسیت های سالم جداسازی شده بیشتربوده است . نتایج رنگ آمیزی DAPI مؤید این مطلب می باشد که شیکونین در غلظتهای بالا باعث متراکم و تکه تکه شدن هسته آستروسیت ها و

Archive of SID
www.SID.ir

در نتیجه مرگ سلولی در آنها می شود. در نتیجه از اثرات توکسیک غلظتهای بالای (۱۵ µM و ۲۰ µM) شیکونین بر آستروسیت ها و مشاهده هسته های متراکم شده این سلولها پس از تیمار با دارو می توان این گونه استنباط کرد که شیکونین در غلظتهای بالاباعث القای مرگ سلولی در آستروسیت ها می شود در نتیجه شاید بتوان از ترشح فاکتورهای خونی از آستروسیت های فعال شده و اثر آنها بر نرونها و درنتیجه اثرات نرو توکسیک جلو گیری کرد. برای مثال با توجه به آلودگی سلولهای آستروسیت در بیماران مبتلا به ایدز در مراحل پیشرفته بیماری و ملتهب شدن آنها و ایجاد عوامل مخرب و توکسیک عصبی از این سلولها، بررسی سیتوتوکسی این دارو بر سلولهای آستروسیت حائز اهمیت می باشد و همچنین با توجه به اینکه اثر توکسیک شیکونین در غلظتهای بالا بر سلولهای آستروسیت سرطانی بیشتر بوده بیانگر این است که شاید بتوان از شیکونین در کنترل رشد سلولهای توموری آستروسیت استفاده کرد.

این نتایج با نتایج مطالعات انجام شده بر شیکونین منطبق می باشد. مطالعات انجام شده نشان می دهد که خصوصیت ضد سرطانی شیکونین همانند اثر ضد التهابی و نقش آن در بهبود زخمها بسیار مورد توجه و بررسی قرار گرفته است (۲۰ و ۲۴).شیکونین از طریق رهاسازی سیتوکروم C ، مراحل فعال کننده کاسپاز ۹ (procaspase 9) ، فعال شدن کاسپاز ۳ ، احیا PARP (Poly (ADP-ribose) Polymerase) ، تکه تکه شدن DNA از طریق فعال شدن DFF-45(DNA fragmentation factor) آپوپتوز را در سلولها القاء می کند(۲۰ و ۳۱). شیکونین در ارتباط با آپوپتوز و تنظیم تقسیم و تکثیر سلولی بوده و عامل ضد سرطانی شیکونین توانایی القای آپوپتوز را به صورت وابسته به دُز دارد(۲۰).

مطالعه انجام شده در بررسی اثر شیکونین در مهار رسپتورهای شیموکین در درمان HIV نشان می دهد که اثر شیکونین با گذشت زمان و شستشوی آن از سوسپانسیون سلولی از بین نمی رود که بیانگر برهمکنش غیربرگشت پذیر شیکونین با ترکیباتی که برای عملکرد رسپتورهای شیکونین ضروری هستند، می باشد (۲۸). آنزیم توپوایزومراز ۲ که پاسخ سلولی به انواع آسیب DNA می باشد، هدف برای دارو های ضد سرطانی است که مشخص شده شیکونین نیز توانایی مهار این آنزیم را دارد (۳۱). ولی با توجه با عملکردهای بیولوژیکی مختلفی که برای این داروی گیاهی شناخته اند عملکرد مکانیزمی که شیکونین آپوپتوز را القاء می کند به طور کامل مشخص نشده است (۲۰).

شیکونین توانایی کاهش التهاب را از طریق اثر بر مسیر MAPK/NF-kB دارد (۳۰). همچنین نشان داده شده که بر خلاف دارو های سینتتیک نظیر ایبو بروفن که در غلظتهای بالا قادر به القای آپوپتوز هستند شیکونین در غلظتهای پایین نیز قادر به القای اثرات آپوپتیک می باشد (۲). این دارو در نتیجه کاهش رسپتور های LPS می تواند بر سلولهای میکروگلیا اثر ضد التهابی داشته باشد و باعث القای آپوپتوز در این سلولها شود (۲).

در نتیجه با توجه به نتایج به دست آمده شیکونین به عنوان یک ترکیب گیاهی دارای اثراتی نظیر القای مرگ سلولی به خصوص در سلولهای آستروسیت سرطانی می باشد. به طوری که القای مرگ سلولی توسط شیکونین ممکن است که بتواند مکانیسم درمانی برای تومور در این سلولها باشد به علاوه از اثر توکسیک این دارو بر این سلولها و آستروسیت های فعال شده، می توان در کاهش اثرات نروتوکسیک استفاده کرد. با توجه با اینکه مطالعات مشابهی مبنی بر اثر شیکونین بر آستروسیت ها منتشر نشده نتایج فوق نیاز به بررسی بیشتر و انجام مطالعات مولکولی در این زمینه دارد.

Archive of SID
www.SID.ir

منابع

۱- صابونی فرزانه ، ۱۳۸۷، میکروگلیا ، دمانس همراه با HIV و تازه های درمان، مجله ژنتیک نوین، دوره سوم، شماره ۲.

۲- علیزاده مریم ،صابونی فرزانه، عباسی شاه صنم ، مقیمی علی، حق بین کما الدین، ۱۳۸۸، تأثیر شیکونین، داروی گیاهی مورد استفاده در آسیای شرق، بر فعالیت و آپوپتوز سلولهای ملتهب میکروگلیا، مجله زیست شناسی ایران، جلد ۲۲ ، شماره ۲

3.A.Chvatal, M.Anderova, H.Neprasova, I.Prajerova, J.Benesova, O.Butenko, A.Verkhartsky, 2008, Pathological Potential of Astroglia, Physiology Research, 57: 101-110.

4. Axel Nimmerjahn, 2009, Astrocytes Going Live: Advances and Challenges, J. Physiology, 1639-1647.

5.Barres B.A., 2003,WHAT is a glial cell?,Glia, 43(1), 4-5

6.Baumann.N, D.Pham-Dinh, 2001,Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian CNS,Physiol Rev, 81(2),871-927

7. Birgitte Thuesen Olesen, Jorgen Clausen, Ole Vang, 2008, Characterization of the Transcriptional Profile in Primary Astrocytes After Oxidative Stress Induced by Paraquat , Neuro Toxicologe, 29: 13-21.

8.E.Hamby.M, F.Uliasz.T,J.Hewett.S,A.Hewett.J, 2006, Characterization of an improved procedure for the removal of miroglia from confluent monolayers of primary astrocytes,J.Neuroscience Method, 150,128-137.

9. Haghbeen K., Mozaffarian V.,Ghaffari F., Pourazeezi E., Seraji M., Daliri Jouapari M., 2006, Lithospermum of Ficinalae Callus Produces Shikonin, Boiloy Bratislave, 61(3): 1-5

10.He.F,Y.E.Sun,2006,Glial cells more than support cells?,Int J Biochem Cell Biol.

11. Hou Y., Guo T,Wu C., He X., Zhao M., 2006, Effect of Shikonin on BREAST Cells PROLIFERATION AND apoptosis invitro, The Pharmaceutical Society of Japan, 126(12): 1383-1386.

12. Inga Markiewicz, Barbara Lukomska, 2006, The Role of Astrocytes in the Physiology and Pathology of the Central Nervous System, Acta Neurobiologiae Experimentalis,66: 343-358.

13.Jessen K.R., 2004, Glial Cells, Int. J. Biochem Cell Biol., 36(10):1861-7.

14. Jihong Xu, Paul D.Drew, 2006, 9-Cis-retinoic Acid Suppresses Inflammatory Responses of Microglia and Astrocyte, Journal of Neuroimmunology,171: 135-144.

15.Ken D.Mccarty and Jean De Vellis, 1980, Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue, J. cell biology, v:85.

16.Micheal V.Sofroniew, Harry V.vinters, 2010, Astrocytes: biology and pathology,Acta Neuropathology,119: 7-35.

17.Nishiyama.A, Yang.Zh, Butt.A, 2005,Astrocytes and NG2-glia:what's in a name?, J.Anat. , 207,687-693

18.Olesen.B.Th, Clausen.J, Vang.O, 2008, Characterization of the transcriptional profile in primery astrocyte after oxidative stress induced by Paraquat,NeuroToxiocology, 29, 13-21

19.Ozge U., 2004, Naphtoquninnes from the roots of Onksma argantatum(boraginaceae), Turk J.Chem, 28: 451-454

20. Ping-Chi Hsu,Yu-Ting Huang, Mel-Ling Tsai,Ying_jan Wang,Jen-Knu Lin, Min-Hsiung Pan,2004,Induction of Apoptosis by Shikonin through Coordinative Modulation of the Bcl-2 Family and p53 ,Release of Cytochrome c ,an Sequential of caspases in human Colorectal Carinoma cells, Journal of agricultural and food chemistry,52,6330-6337

21.Saura.J, 2007,Micriglial cells in astroglial cultures:a cautionary note, J. Neuroinflammation,4:26

22. Thomas Korn, Mahendra Rao, Tim Magnus, 2007, autoimmune Modulation of Astrocyte-Medi, NeuroMolecular Medicine, 9: 1-16.

23.Toshiyuki Kaswasaki,Tatsuya Kitao, Katsuhiro Nakagawa, Hiroko Fujisaki, Yoshimi Takegawa, Ken Koda, Yukio Ago, Akemichi Baba, Toshio Matsuda, 2007, Nitric oxide-induced apoptosis in cultured rat astrocytes: protection by Edaravone,a radical Scavenger, GLIA, 55: 1325-1333.

24. V.P.Papageorgiou, A.N.Assimopoulou, A.C.Ballis, 2008, Alkannins and Shikonins: A New Class of Wound Healing Agents, Current Medicinal Chemistry, 15: 3248-3267.

25. Vanisree Staniforth,Sheng.Yang Wang,Lie-Fen Shyur,Ning.Sun

Archive of SID
www.SID.ir

Yang,2004,Shikonins,Phytocompounds from Lithospermum erythrhizon.Inhibit the Transcriptional Activation of Human Tumor Necrosis Factor α Promoter in vivo,The Journal of Biological Chemistry,279(7):5877-5885

26.www.sigmaaldrich.com/product%20 information %20 sheet/ D9542pis.pdf

27.Xin Chen, Lu Yang, Joost J.Oppenheim, O.M.Zack Howard, 2002, Cellular Pharmacology of Shikonin Derivatives, Phytotherapy Research,16(3), 199-209.

28. Xin Chen,Lu Yang,Ning Zhang,Jim A.Turpin,Robert W.Buckeit,Clay Osterling,Joost J.Oppenheim, O.M.Zack Howard,2003,Shikonin, a Component of Chinese Herbal Medicine , Inhibits Chemokine Receptor Function and Suppresses Human Immunodificiency Virus Type 1 ,Antimicrobial Agents and Chemotherapy,47(9):2810-2816.

29.Yang.H,Liang.Z,Li.J,Cheng.X,Luo.N,Ju.G,2006, Optimized and efficient preparation of astrocyte cultures from rat spinal cord,J Cell culture and Biotechnology

30.Yu Wen Cheng, Ching Yi Chang, Kou Lung Lin, Chien Ming Hu, Cheng Hui Lin,Jaw Jou Kang,2008, Shikonin derivatives inhibited LPS-induced NOS in RAW 264.7 cells via downregulation of MAPK/NFkB signaling, journal of ethnopharmacology 120: 267-271

31. Zhen Wu,Lijun Wu,Linhao Li,Shin-ichi Tashi Onodera ,Takashi Ikejima,2004,p-53-Mediated Cell Cycle Arrest and Apoptosis Induced by Shikonin via a Caspase-9-Dependent Mechanism in Human Malignant Melanoma A375-S2 Cells,Jurnal of Pharmacological Sciences,94,166-176.

The investigation of cytotoxic effects of standard shikonin and extraction shikonin from *Arnebia euchroma o*n astrocytes

Mirrazavi M.[1], Sabouni F.[2], Abbasi Sh.[2], Haghbin K.[2], Hajihosseini R.[1], and Nazem H.A.[1]

[1] Payam e Nour University, Tehran, I.R. of IRAN

[2] National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, I.R. of IRAN

Abstract

Astrocytes are the abundent cell type in the central nervous system .They play role in maintenance of normal brain physiology. In addition, astrocytes become reactive during injury of the central nervous system and have important roles during CNS inflammation. Shikonin, is a main compound of the roots of *Lithospermum erythrohizon* and *Arnebia euchroma* that has various biological activities, including anti-inflammatory, anti- HIV1, antimicrobial, anti- thrombotic and anti-tumor properties. The aim of the present study was to investigate the cytotoxic effects of different concentration (20µM-5µM) of shikonin on primary astrocytes and cell line 1321N1. We used MTT reaction to assay cell viability and stained the cells with DAPI to investigate the cell death. The results show that shikonin have dose dependent effects on this cells, in high concentration it is toxic for cells but in its low concentration shikonin has not the cytotoxic effect on cells.

Keywords: astrocyte, toxicity, shikonin

Archive of SID

www.SID.ir