فصلنامه علمی پژوهشی فیزیولوژی و تکوین جانوری
شماره پیاپی ۳۵، جلد ۹، شماره ۴، پائیز۹۵، صفحه ۶۵ تا ۷۶

# بررسی اثرات آنتی اکسیدانی و ضد سرطانی عصاره متانولی کالوس *Lithospermum officinale* بر رده سلولی NB4 پرومیلوسیت حادلوسمی انسانی

پروانه یاوری[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:۹٤/۵/۲۳ 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(ROSگونه 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 LO(*Lithospermum officinale*) می باشد. در این مطالعه، اثرات آنتی اکسیدانی و آنتی لوکمیک عصاره متانولی این گیاه در رده ی 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 ۲٤ و ٤۸ 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.**

**نتیجه‌گیری: با توجه به خواص آنتی اکسیدانیLO، 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، لیتوسپرمام آفیسینال، سلول NB4.

## مقدمه

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 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-RARα و RARα-PML می شود(۵). PML-RARα انکوژن اصلی APL است که عملکرد رونویسی RARα را سرکوب می کند که در نتیجه تمایز در مرحله پرومیلوسیتیک مسدود می شود(۲۱). این نوع

www.SID.ir

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 می‌باشند. 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، ضدالتهابی، آنتی گنادوتروپی، آنتی تیروتروپی، آنتی اورمی و آنتی اکسیدانی LO را نشان می دهند(۱۳، ۱۱). یکی از بهترین منابع از آنتی اکسیدان‌های طبیعی، ترکیبات فنولی هستند. LO یک منبع غنی از این ترکیبات مانند رزمارینیک اسید، کافئیک 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). ۵گرم 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 ۱گرم بر میلی لیتر برای مراحل بعدی کار تهیه شد. این عصاره تا

Archive of SID

www.SID.ir

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 ۱۰درصد سرم جنین گاوی( Fetal bovine serum)(Bio Sera، انگلستان) و آنتی بیوتیک-های استرپتومایسین(۱۰۰میلی گرم در میلی لیتر) و پنی سیلین(۱۰۰واحد در میلی لیتر)(سیناژن، تهران) بودند، در انکوباتور کشت سلول در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، ۵ درصد $CO_2$ و رطوبت ۹۵ درصد کشت و نگه داری شد. سلول ها هر ۴۸ ساعت یک بار با محیط کشت جدید تیمار شدند(۱۵).

**بررسی اثرعصارهLO برزشدوزیستایی سلولهایNB4**

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 $۲\times۱۰^{۴}$ 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 ۲۴و ۴۸ ساعت اضافه گردید. در هر بازه زمانی تعداد سلول های هر چاهک با استفاده از لام هموسایتومتر ورنگ 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 اثرعصارهLOبرمیزان سمیت ومرگ سلولی**

جهت بررسی اثر عصاره LO بر میزان سمیت و مرگ سلولی، آزمون نمک تترازولیوم به کار گرفته شد، که بر پایه احیا و شکسته شدن کریستال های زرد رنگ تترازولیوم(به وسیله آنزیم سوکسینات دهیدروژناز) و تشکیل کریستال های آبی رنگ نامحلول انجام می شود. به این منظور $۱۰^{۴}$ سلول توسط لام نئوبار شمارش و به پلیت ۹۶ خانه ای انتقال یافت و با توجه به نتایج به دست 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 $CO_2$ 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 سولفوکساید(DMSO) استفاده و پس از گذشت یک شبانه روز، جذب نوری در ۵۸۰ نانومتر ثبت شد(۲۵).

**بررسی اثرات عصارهLO برریخت شناسی سلول های NB4**

به منظور بررسی اثرات عصاره LO بر خصوصیات ریخت شناسی(مورفولوژیک) سلول های NB4، تعداد $۵\times۱۰^{۵}$ Cell/ml ۵ سلول در پلیت ۲۴ چاهکی، کشت داده شد و سلول ها با غلظت های متفاوت از عصارهLO در فواصل زمانی ۲۴ و ۴۸ ساعت تیمار شدند. تغییرات ریخت شناسی سلول های تیمار شده با عصارهLO، 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($۵\times۱۰^{۵}$Cell/ml) با ۱۰ میکرولیتر از محلول آکریدین اورنج(A0) 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 ازآزمون قطعه قطعه شدنDNA**

Archive of SID

www.SID.ir

برای بررسی مرگ برنامه ریزی سلولی از آزمون قطعه قطعه شدن DNA با کمک الکتروفورز ژل آگارز استفاده گردید. بدین منظور تعداد $۵\times۱۰^{۵}$ 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 ترا استیک اسید (EDTA) ۱۰۰میلی مولار، سدیم دو دسیل سولفات ۰/۸SDS درصد وزنی- حجمی و بافر تریس- اسید کلریدریک ۲۰ میلی مولار با pH=۸(شرکت Merck، آلمان) لیز وسپس ۱۰ میکرولیتر پروتئیناز 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 ۶x( ۳۰ درصد گلیسرول و ۲۵ درصد برومونفول 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 اثرعصارهLO 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 $۵\times۱۰^{۵}$ 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 Microsoft و آزمون آماری t-test مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و داده ها با ارزش P<۰/۰۵ از نظر آماری معنی دار تلقی شدند.

## نتایج

**کاهش رشد و زیستایی سلول های NB4 بر اثرتیمار با عصارهLO**

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 نمودار۱-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، ۱۰۰۰میکروگرم بر میلی لیتر به ترتیب ۹۲، ۸۵، ۸۱، ۶۲، ۶۸درصد بوده است و پس از تیمار سلول ها در طول ۴۸ساعت، رشد سلولی به صورت چشمگیری کاهش یافت به نحوی که میانگین مهار رشد درغلظت های۱۰، 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 ۴۸ساعت 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).

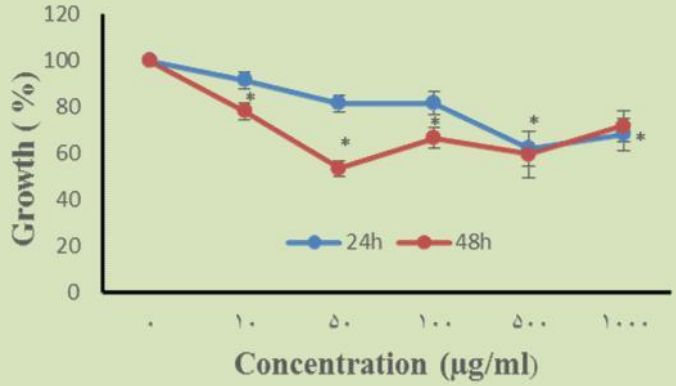
Archive of SID

www.SID.ir

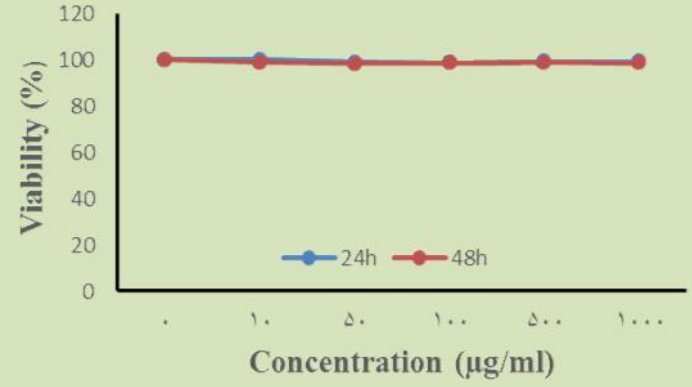
**جدول ۱- مقایسه درصد رشد سلول های NB4در حضور غلظت های مختلف عصاره LO**

| غلظت(میکروگرم بر میلی لیتر) | درصد رشد نسبت به کنترل متانولی | |
|---|---|---|
| | ۲۴ساعت | ۴۸ساعت |
| ۰(کنترل) | ۱۰۰ | ۱۰۰ |
| ۱۰ | ۹۲<br>P=۰/۰۰۱ | ۷۹<br>P<۰/۰۵ |
| ۵۰ | ۸۵<br>P=۰/۰۵ | ۵۴<br>P<۰/۰۱ |
| ۱۰۰ | ۸۱ | ۶۷<br>P=۰/۰۱ |
| ۵۰۰ | ۶۲<br>P<۰/۰۵ | ۶۰<br>P=۰/۰۱ |
| ۱۰۰۰ | ۶۸<br>P<۰/۰۵ | ۷۳<br>P=۰/۰۱ |

الف)




ب)

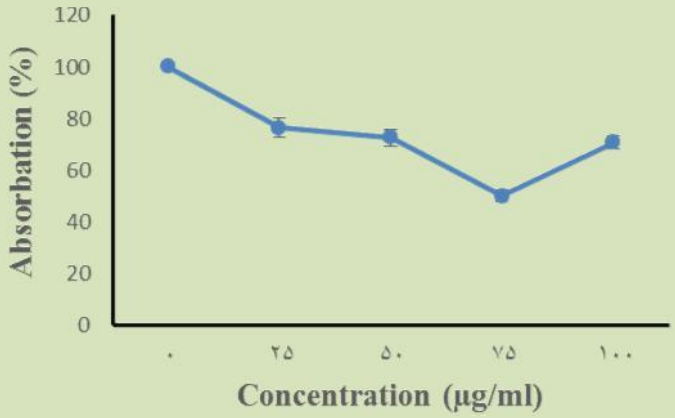



**نمودار ۱- الف) اثرات عصاره LOبر رشد سلول های NB4. LOبه صورت وابسته به غلظت و زمان سبب کاهش میزان رشد و تکثیر سلولی می شود و ب) اثرات عصاره LOبر زیستایی سلول هایNB4. میزان زیستایی در سلول های تیمار شده با LO نسبت به سلول-های کنترل تفاوت معنی داری نشان نداد. نتایج میانگین سه آزمایش مستقل است که هر یک سه بار تکرار شده و به صورت میانگین سه تکرار مستقل ± انحراف استاندارد (SD) می باشد.**

www.SID.ir

**اثرسایتوتوکسیتی عصاره یLO،بررده سلولیNB4**

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 یLO به صورت تابعی از غلظت و زمان دارای اثرات سمی بر سلول های NB4 می باشد ومیزان OD در طول ۴۸ ساعت نسبت به کنترل در غلظت های ۱۰۰، ۷۵، ۵۰، ۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر به ترتیب ۷۰ ٪، ۵۰ ٪، ۷۳ ٪، ۷۷ ٪ بود. $IC_{50}$(غلظتی از عصاره که باعث مهار رشد سلول ها به میزان ۵۰٪ می شود) نیز در غلظت ۷۵ میکروگرم بر میلی لیتر و ۴۸ ساعت بعد از تیمار بوده است.




**نمودار۲-میزان اثر سایتوتوکسیک عصاره ی LOروی سلول های سرطانی NB4 پس از ۴۸ساعت. 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 ± انحراف استاندارد (SD) می باشد.**

**تغییرات ریخت شناسی سلول هایNB4تیمارشده 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 هایNB4 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**

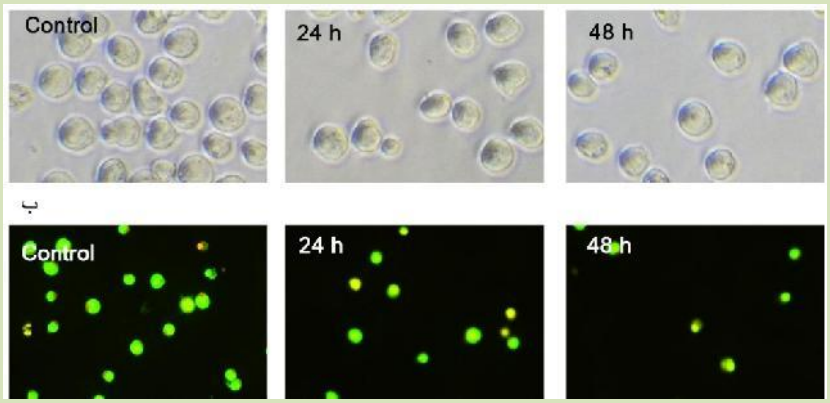
برای مطالعه آپوپتوز در ابتدا از میکروسکوپ فلورسنت استفاده گردید، همان طور که در شکل۱-ب مشاهده می شود، مشخص گردید که مقایسه میان سلول-های تیمار شده با عصاره LO و سلول های کنترل، تفاوت معنی داری مبتنی بر وقوع آپوپتوز مشاهده نمی-شود. به منظور اثبات عدم مرگ سلولی آپوپتوزی از آزمون قطعه قطعه شدن DNA توسط 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 وفقط 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

Archive
www.SID.ir

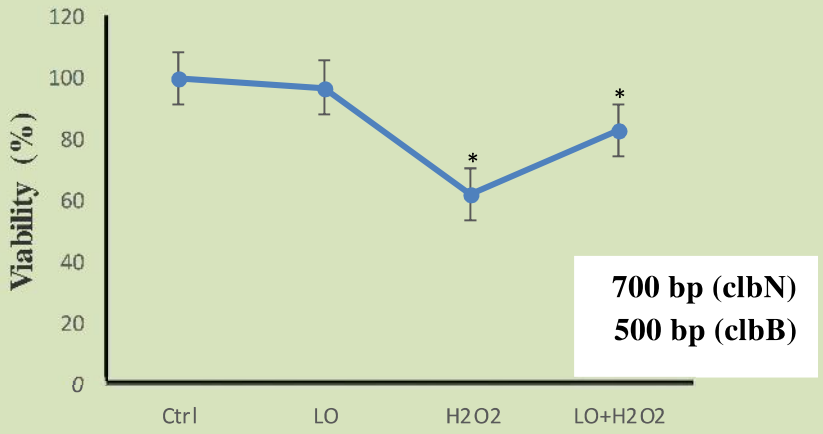
اثرات این عصاره در مهار اثر اکسیدانی پراکسید هیدروژن در غلظت ۵۰ میکرو مولار در طی ۲۴ ساعت موجب مرگ ۴۰درصد از سلول های NB4 در مقایسه با سلول های کنترل می گردد. این در حالی بود که ترکیب عصاره LO در غلظت ۷۵ میکروگرم بر میلی لیتر و پراکسیدهیدروژن درغلظت ۵۰ میکرو مولار و در طول ۲۴ ساعت موجب مرگ ۱۹درصدی سلول های NB4 شده و این نتیجه گویای این بود که عصاره LO خاصیت مهارکنندگی۲۱ 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(نمودار۳).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 LO بر فعالیت اکسیدانی پراکسید هیدروژن را تائید کرد و بیان گر کاهش آپوپتوز در این راستا بود(شکل ۳- الف) به منظور مطالعه دقیق تر وتعیین 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(شکل۳- 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 ۲۴ساعت با سلول‌های کنترل انجام گرفت. در سلول های تیمار شده، رنگ قرمز که حاکی از القا مرگ سلولی از نوع آپوپتوز در این سلول هامی باشد، 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




**شکل ۱- الف) بررسی تغییرات ریخت شناسی سلول های NB4 تیمار شده با عصاره یLO. سلول های NB4 با غلظت های متفاوت از عصاره ی LO تیمار شدند و سپس خصوصیات ظاهری سلول ها با استفاده از میکروسکوپ نوری(بزرگنمایی۴۰X) مورد بررسی قرار گرفت که نتایج نشان دهنده ی عدم تغییرات ظاهری معنی داری نسبت به کنترل در آن ها شد. ب) تصویر میکروسکوپ فلورسنت پس از تیمار سلول های NB4 با عصاره LOدر غلظت ۷۵میکروگرم 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.**

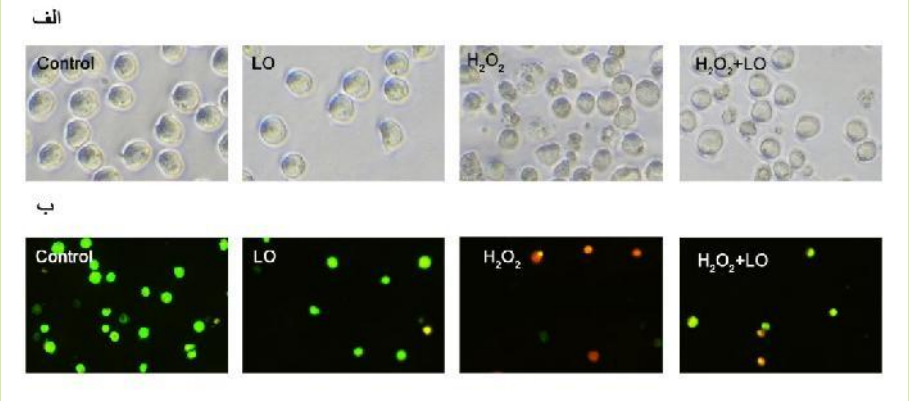
www.SID.ir

شکل ۲- بررسی اثرات عصاره LOبر قطعه قطعه شدن DNA. پس از تیمار سلول های NB4 با عصاره LO، با غلظت ۷۵میکروگرم بر میلی لیتر، در زمان ٤٨ساعت، با استفاده ازالکتروفورز DNA به کمک ژل آگارز، اثرات آپوپتوزی عصاره LOبررسی شد که حاکی از عدم وقوع آپوپتوز توسط این عصاره بود.




نمودار۳-بررسی خاصیت مهارکنندگی عصاره LOبر فعالیت اکسیدانی پراکسید هیدروژن. خاصیت مهارکنندگی عصاره LOبر روی فعالیت اکسیدانی پراکسید هیدروژن بررسی شد. نتایج نشان داد که پراکسید هیدروژن در غلظت ۵۰ میکرو مولار در زمان ٢٤ ساعت باعث مرگ ٤٠درصد از سلول های NB4 شد در حالی که در ترکیب عصاره LOو پراکسید هیدروژن ،عصاره LO، ۲۱درصد میزان مرگ را کاهش داده است.

www.SID.ir




**شکل۳-الف) مقایسه تغییرات ریخت شناسی سلول های NB4 تیمار شده با پراکسید هیدروژن وسلول های تیمار شده با ترکیب عصاره LO و پراکسید هیدروژن. خصوصیات ظاهری سلول ها با استفاده از میکروسکوپ نوری (بزرگنمایی۴۰X) 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 ۷۵میکروگرم بر میلی لیترو 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

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 ومبنای پرتودرمانی نیز بر این است که پرتوهای یونیزان سلول های توموری را از بین 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 ودر 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 می‌شوند که این داده ها توسط Weijl و همکاران جمع بندی شده است(۲۳). با این وجود هنوز فعل و انفعالات بین آنتی

Archive of SID

www.SID.ir

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 مهار کننده 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 استرس‌های 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 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، ضدالتهابی، ضدسرطانی 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.

## تشکرو 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.

## 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-Zając, 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.

Archive of SID

www.SID.ir

(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). *A*ntioxidants 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 chemotherapyinduced 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.

Archive of SID

www.SID.ir

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

P. Yavari[1], **M. A. Moosavi**[2], T. Naji[3]

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

**Received:2016.13.8** **Accepted: 2016.5. 11**

## Abstract

**Inroduction & 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.



Archive

www.SID.ir