

Investigation of Cytotoxic and Apoptogenic Effects of Terminalia Chebula Hydro-Alcoholic Extract on Glioblastoma Cell Line

Amir Reza Afshari¹, Mostafa Karimi Roshan², Mohammad Soukhtanloo², Vahid Reza Askari¹, Hamid Mollazadeh³, Mohammad Jalili Nik², Amir Ali Jahani Yazdi², Fatemeh Aria Kia⁴, Seyed Hadi Mousavi^{1,4*}

¹Pharmacological Research Center of Medicinal Plants, Faculty of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

²Department of Medical Biochemistry, Faculty of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

³Natural Products and Medicinal Plants Research Center, Faculty of Medicine, North Khorasan University of Medical Sciences, Bojnurd, Iran

⁴Medical Toxicology Research Center, Faculty of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

Article Info:

Received: 20 Jan 2018

Revised: 20 May 2018

Accepted: 29 Jul 2018

ABSTRACT

Introduction: Glioblastoma multiforme is the most prevalent group of primary brain tumors. Terminalia chebula has traditionally been used for its anti-cancer, laxative, diuretic, and anti-oxidant properties. The aim of this study was to investigate the effects of alcoholic extract of Terminalia Chebula (TCAE) on the glioblastoma multiforme (U87) cell line. **Materials and Methods:** Cellular cytotoxicity was measured by MTT assay and intracellular active oxygen species were measured using DCFDA (2',6'-dichloro fluorescein diacetate) assay kit. In addition, apoptotic cells were detected with an Annexin V-FITC early apoptosis staining. **Results:** TCAE reduced the proliferation of U87 cells in a concentration- dependent manner. IC₅₀ was 145.3 and 192.3 µg/mL after 24 and 48 hours, respectively. Activated reactive species decreased significantly at 2 and 6 hours after treatment compared to the control group. Furthermore, induction of apoptosis occurred in the first 24 hours. **Conclusion:** TCAE caused the destruction of cancer cells enhance the free radical species of oxygen and induce apoptosis on glioblastoma cell line. It seems that TCAE has the potential to use as an adjuvant drug for treatment of glioblastoma.

Key words:

1. Neoplasms
2. Brain Neoplasms
3. Glioblastoma
4. Apoptosis

*Corresponding Author: Seyed Hadi Mousavi

E-mail: Mousaviah@mums.ac.ir

بررسی اثرات سایتوتوکسیک و آپوپتوزنیک عصاره هیدروالکلی هلیله کابلی بر روی رده سلولی گلیوبلاستوما

امیررضا افشاری^۱، مصطفی کریمی روشن^۲، محمد سوختانلو^۳، وحیدرضا عسکری^۱، حمید ملازاده^۲، محمد جلیلی نیک^۲، امیرعلی جهانی یزدی^۲، فاطمه آریا کیا^۴، سید هادی موسوی^{۱،۴*}

^۱مرکز تحقیقات فارماکولوژیک گیاهان دارویی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

^۲گروه بیوشیمی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

^۳مرکز تحقیقات فراورده‌های طبیعی و گیاهان دارویی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی، بجنورد، ایران

^۴مرکز تحقیقات سم‌شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

اطلاعات مقاله:

تاریخ پذیرش: ۷ مرداد ۱۳۹۷

اصلاحیه: ۳۰ اردیبهشت ۱۳۹۷

تاریخ دریافت: ۳۰ دی ۱۳۹۶

چکیده

مقدمه: گلیوبلاستوما مولتی‌فرم شایع‌ترین گروه از تومورهای مغزی اولیه است. هلیله کابلی به طور سنتی برای خواص ضد سرطانی، ملین، دیورتیک و آنتی‌اکسیدانی استفاده شده است. هدف از این مطالعه بررسی اثرات عصاره الکلی هلیله کابلی بر روی رده سلولی گلیوبلاستوما مولتی‌فرم بود. **مواد و روش‌ها:** سمیت سلولی به روش زنده‌مانی سلولی و گونه‌های فعال اکسیژن درون سلولی با استفاده از رنگ ۱۲ و ۷-دی کلرو فلورسئین دی استات اندازه‌گیری شد. به علاوه سلول‌های آپوپتوزی با رنگ‌آمیزی آپوپتوز اولیه Annexin V-FITC تشخیص داده شدند. **یافته‌ها:** عصاره الکلی هلیله کابلی زنده‌مانی سلول‌های گلیوبلاستوما مولتی‌فرم را به صورت وابسته به غلظت کاهش داد. کمترین غلظت مهاری به ترتیب ۱۴۵/۳ و ۱۹۲/۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر برای ۲۴ و ۴۸ ساعت بود. گونه‌های فعال اکسیژن در ۲ و ۶ ساعت پس از درمان در مقایسه با گروه کنترل کاهش معنی‌داری داشت. همچنین القای آپوپتوز در ۲۴ ساعت اول رخ داد. **نتیجه‌گیری:** عصاره الکلی هلیله کابلی با افزایش گونه‌های رادیکال آزاد اکسیژن باعث از بین رفتن سلول‌های سرطانی و القای آپوپتوز در رده سلول گلیوبلاستوما می‌شود. به نظر می‌رسد که عصاره الکلی هلیله کابلی دارای پتانسیل استفاده به‌عنوان داروی کمکی برای درمان گلیوبلاستوما است.

کلید واژه‌ها:

۱. نئوپلاسم‌ها
۲. نئوپلاسم‌های مغزی
۳. گلیوبلاستوما
۴. آپوپتوز

* نویسنده مسئول: سید هادی موسوی

آدرس الکترونیکی: Mousaviah@mums.ac.ir

مقدمه

و ضد دیابتی (۱۶) و درمانی جهت آلزایمر (۱۷) و مالتیپل اسکروز (۱۸) از این گیاه گزارش شده است. عصاره متانولی هلیله کابلی و ترکیبات آن گالیک اسید ۱،۲،۳،۴،۵،۶ پنتا-آ-گالوئیل-بتا-دی-گلوکوپیرانوز، اسیدکبولاژیک و کبولینیک اسید، سایتوتوکسیسیته متوسطی بر علیه سلول‌های توموری انسان از جمله SK-MEL-2، SK-OV-3، A-549، XF-389 و HCT-15 را نشان داده است (۱۹، ۱۵). گالیک اسید، استیل گلات و لوتولین استخراج شده از Terminalia arjuna، به‌عنوان مهار کننده رشد برخی سلول‌های توموری معرفی شده است (۲۰). لوتولین، به‌عنوان یک فلاوون موجود در هلیله، اثرات مهاری بر رشد سلول‌های سرطانی سینه MCF-7 نشان داده است (۲۱). عصاره هلیله کابلی با اثر بر برخی رده‌های سلولی شامل سلول‌های انسانی MCF-7 و موشی S115، انسانی HOS-1 و رده سلولی سرطانی پروستات انسانی PC-3 باعث کاهش پایداری مهار تکثیر سلول‌ها و القای آپپتوز شده است (۱۵).

تاکنون اثرات بیولوژیکی هلیله کابلی به طور اختصاصی بر روی گلیوما مورد بررسی قرار نگرفته است. از آنجا که مهار مسیرهای مولکولی در تنظیم پرولیفراسیون سلولی یک راهبرد مهم در توسعه داروهای ضد سرطان است، برای اولین بار در مطالعه حاضر اثرات محافظتی عصاره هیدروالکلی هلیله کابلی بر روی رده سلولی گلیوبلاستوم مولتی‌فرم با تمرکز بر سمیت سلولی و ارزیابی پارامتر ROS^۷ به‌عنوان شاخصی از استرس اکسیداتیو و رنگ‌آمیزی پروپیدیوم دید^۸ جهت بررسی آپپتوز مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد شیمیایی و معرف‌ها

کیت فلورسنت ۲ و ۷-دی کلرو فلورسنتین دی استات (DCFDA Cellular ROS Detection Assay Kit، #ab113851، Abcam Annexin، پروپیدیوم دید (V-FITC Early Apoptosis Detection Kit، #6592، Cell Signaling) و رنگ (MTT) خریداری شده است. همچنین تریپسین از شرکت Sigma Aldrich و DMEM^۹ و FBS^{۱۰} از Gibco تهیه گردید.

کشت سلول

سلول‌های مورد استفاده در این تحقیق سلول‌های انسانی گلیوبلاستوما مولتی‌فرم می‌باشد که از بانک سلول انسیتو پاستور (تهران، ایران) تهیه شده است. سلول‌های U87 در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۹۰٪ و ۵٪ CO₂ نگهداری شده و در محیط DMEM حاوی

گلیوبلاستوما مولتی‌فرم (GBM)^۱، شایع‌ترین گروه از تومورهای مغزی اولیه بوده و گلیوماهای بدخیم، کشنده‌ترین نوع تومورهای مغز بزرگسالان محسوب می‌شوند. گلیوبلاستوما بیش از ۵۰ درصد تمام انواع گلیوماها را به خود اختصاص داده است. شیوع کلی تومور ۲-۳ نفر در صد هزار نفر و ۲۰ درصد کل تومورهای داخل جمجمه‌ای را تشکیل می‌دهد و در مردان بالای شصت سال شایع‌تر است (۱). در مطالعات سلولی، سلول‌های گلیوبلاستوم مولتی‌فرم (U87)^۲ به شکل ستاره‌ای و اندازه بسیار متفاوت هستند و پرولیفراسیون عروقی و میزان بروز نکروز بالایی داشته و دست اندازی سلول‌های تومورال را به نواحی مختلف مغز افزایش می‌دهد. این نوع تومور، دارای پیش‌آگهی ضعیف با ویژگی‌های بالینی مختلف مانند نقص شناختی، تغییرات شخصیتی، سردرد، از دست دادن حس (پارستزیا) و عدم تعادل در راه رفتن می‌باشد. علی‌رغم افزایش دانش ما در فهم پاتوفیزیولوژی گلیوبلاستوما و پیشرفت‌های به دست آمده در زمینه درمان بیماری، این نوع سرطان همچنان علاج ناپذیر در نظر گرفته می‌شود، چرا که با وجود درمان‌های رایج شامل خارج کردن تومور با عمل جراحی و به دنبال آن پرتو درمانی به اضافه تیمار دارویی با تموزولوماید (TMZ)^۳، افراد مبتلا معمولاً در بازه زمانی ۱۲ تا ۱۵ ماه فوت می‌کنند (۲). یکی از درمان‌های گلیوما ایجاد سمیت سلولی و همچنین القای آپپتوز می‌باشد تا روند تکثیر سلول‌های سرطانی را مهار نماید (۳). از این رو نیاز به روش‌های درمانی یا داروهای جدید کاملاً ضروری به نظر می‌رسد (۴).

فراورده‌های طبیعی به دست آمده از گیاهان، به‌عنوان منابع ارزشمند مواد اولیه دارویی مدرن محسوب می‌شوند. از فراورده‌های طبیعی مشتق شده از گیاهان می‌توان به ترکیبات پاکلیتاکسل، کامپتوتسین، اتوپوزید، وین بلاستین و وین کریستین^۴ که همگی برای درمان انواعی از سرطان تأیید شده‌اند، نام برد (۵-۸). هلیله کابلی^۵ یک گیاه بومی در هند و جنوب شرقی آسیا است و به طور سنتی دارای کاربردهای ضد سرطانی، ملین، دیورتیک و درمان کننده بیماری‌های قلبی بوده است (۹). هلیله کابلی در شرایط برون تن^۶ فعالیت آنتی اکسیدان داشته و از بین برنده رادیکال آزاد معرفی شده است (۱۰). در مطالعات نشان داده شده است که عصاره آبی آن دارای خواص خنثی کننده رادیکال آزاد (۹) و محافظ در برابر رادیواکتیو است (۱۱). خاصیت‌های ضد میکروبی، ضد ویروسی (۱۳)، ضد قارچ (۱۴) ضد سرطانی (۱۵)، آنتی آنفیلاکسی

¹ Glioblastoma multiforme² U87 cell line³ Temozolomide⁴ Paclitaxel, Camptothecin, Etoposide, Vinblastine, Vincristine⁵ Terminalia chebul⁶ In vitro⁷ Reactive oxygen species⁸ Propidium Iodid⁹ 2', 7'-dichloro fluorescein diacetate¹⁰ 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5- diphenyl tetrazolium bromide¹¹ Dulbecco's modified eagles medium¹² Fetal bovine serum

طور خلاصه، حدود ۷۰۰۰ سلول در هر چاهک کشت شده و اجازه داده می‌شود سلول‌ها به کف پلیت بچسبند. چاهک‌های کنترل و آزمایش انتخاب شده و غلظت‌های مختلف از عصاره هلیله کابلی را به چاهک‌ها اضافه می‌کنیم و پلیت ۹۶ خانه را به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت انکوبه می‌کنیم. پس از اتمام زمان انکوباسیون محیط کشت روئی را دور ریخته به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت حاوی ۵ میلی گرم در میلی لیتر از محلول MTT (حل شده در بافر فسفات یا آب مقطر) اضافه نموده و به مدت ۲ تا ۴ ساعت در انکوباتور CO₂ در ۳۷ درجه سانتی گراد قرار می‌دهیم. در طی زمان انکوباسیون، MTT توسط سیستم سوکسینات دهیدروژناز که یکی از آنزیم‌های چرخه تنفسی میتوکندری است احیا می‌شود. احیا و شکسته شدن این حلقه موجب تولید کریستال‌های آبی رنگ فورمازان می‌شود که در زیر میکروسکوپ به راحتی قابل تشخیص هستند. میزان رنگ تولید شده با تعداد سلول‌هایی که از نظر متابولیک فعال هستند رابطه مستقیم دارد. کریستال‌های فورمازان در آب غیرمحلول بوده و بایستی قبل از رنگ‌سنجی توسط ماده حلالی نظیر DMSO (۱۰۰ میکرولیتر) به مدت ۲ ساعت به حالت محلول درآیند. در نهایت جذب نوری محلول به دست آمده را در طول موج ۵۷۰ نانومتر قرائت کرده و به کمک منحنی استاندارد تعداد سلول‌ها را محاسبه می‌کنیم.

بررسی میزان آپوپتوز

بررسی آپوپتوز با استفاده از کیت Annexin V-FITC Early Apoptosis Detection Kit شرکت Cell Signaling مورد بررسی قرار گرفت. به صورت خلاصه، ۷۰۰۰۰۰ سلول در هر چاهک پلیت ۶ خانه قرار گرفت. هیچ تیماری روی نمونه کنترل صورت نگرفت و حجم برابری از محیط کشت دریافت کرد. تیمارها به صورت سه بار تکرار انجام شد. بعد از طی زمان مورد نظر تیمار (۲۴ ساعت)، سلول‌ها به وسیله محیط کشت و بافر فسفات سالین (PBS)^{۱۵} شسته شد. به سلول‌ها بافر Annexin V IX اضافه شد. سپس، ۹۶ میکرولیتر از سلول‌ها در تیوب مخصوص فلوسایتومتری ریخته شد. سپس، ۱ میکرولیتر از Annexin V-FITC کوئوگه و ۱۲/۵ میکرولیتر محلول پروپیدیوم ید به سلول‌ها افزوده شد. بعد از انکوباسیون، به مدت ۱۰ دقیقه در جای تاریک و روی یخ با بافر اتصالاتی Annexin V IX حجم ۲۵۰ میکرولیتر رسانده و با دستگاه فلوسایتومتر bd FACS Calibur™ Flow Cytometer خوانده شد.

بررسی تولید گونه‌های اکسیژن فعال

کیت DCFDA Cellular ROS Detection Assay گونه‌های هیدروکسیل، پروکسیل و سایر گونه‌های فعال ROS را

FBS ۱۰ درصد، پنی‌سیلین (۱۰۰ U/ml) و استرپتومایسین (۱۰۰ µg/ml) کشت داده شده است. سلول‌ها به صورت Overnight کشت شده و با غلظت‌های مختلف عصاره هیدروالکلی هلیله کابلی به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت تیمار شد. بر روی نمونه‌های کنترل هیچ گونه تیماری انجام نشد و حجم برابری از محیط کشت دریافت کردند. همه تیمارها به صورت سه بار تکرار انجام شد.

جمع آوری گیاه و عصاره‌گیری

میوه رسیده هلیله کابلی از بخش گیاهان دارویی داروخانه امام (دانشگاه علوم پزشکی مشهد) تهیه شده و در مرکز گیاه‌شناسی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد (با شماره هرباریوم ۹۲۱۵۷) شناسایی گردید. بخش‌های میوه گیاه، بعد از خشک شدن در سایه و در مجاورت هوا پودر گردید و برای تهیه عصاره مورد استفاده قرار گرفت. پودر گیاه به مدت سه روز در حلال اتانول ۸۰ درصد در دمای اتاق نگهداری گردید. مخلوط به دست آمده با کاغذ صافی صاف شد و عصاره به دست آمده در مکانی تاریک نگهداری شد. بار دیگر روی تفاله، اتانول ریخته شد و ۲۴ ساعت شیک گردید. حلال عصاره با دستگاه تبخیرکننده چرخشی تبخیر شد. جهت حل کردن رسوب، ۲۰۰ میلی لیتر آب مقطر به آن افزوده شد. عصاره به دست آمده وزن شده و میزان بازده عصاره معادل ۵۵/۵۲٪ وزنی-وزنی به دست آمد. عصاره در شرایط دمایی یخچال ۸-۲ درجه سانتی گراد نگهداری شد.

تهیه رقت‌های مختلف از عصاره گیاه

۱۰ میلی گرم عصاره گیاه در ۱۰۰۰ میکرولیتر DMSO^{۱۳} حل شد. رقت‌های بعدی مورد نظر توسط محیط کشت DMEM تهیه گردید. بازه رقت‌های مورد استفاده در این مطالعه شامل ۸۰۰-۰ میکروگرم بر میلی لیتر می‌باشد. میزان DMSO در محلول نهایی موجود در چاهک‌های کشت سلول کمتر از ۱٪ برآورد می‌شود که این مقدار فاقد سمیت می‌باشد.

سنجش زنده ماننی سلولی با روش رنگ سنجی MTT

جهت بررسی اثر سایتوتوکسیسیته هلیله کابلی بر رشد و تکثیر سلول‌های U87 و تعیین غلظت مهاری ۵۰ درصد (IC₅₀)^{۱۴} این ترکیبات، از روش رنگ سنجی MTT استفاده شد (۲۲). اساس این روش، شکستن نمک تترازولیوم با فرمول شیمیایی ۳-(۴-دی متیل تiazول-۲-یل)-۵ فرمول تترازولیوم توسط آنزیم سوکسینات دهیدروژناز میتوکندریایی سلول‌های زنده است. جذب نوری رنگ ارغوانی ظاهر شده در طول موج ۴۹۰-۵۴۰ نانومتر با استفاده از دستگاه الیزا ریدر اندازه گیری می‌شود. به

^{۱۳} Dimethyl sulfoxide

^{۱۴} Fifty percent inhibitory concentration

^{۱۵} Phosphate buffer saline

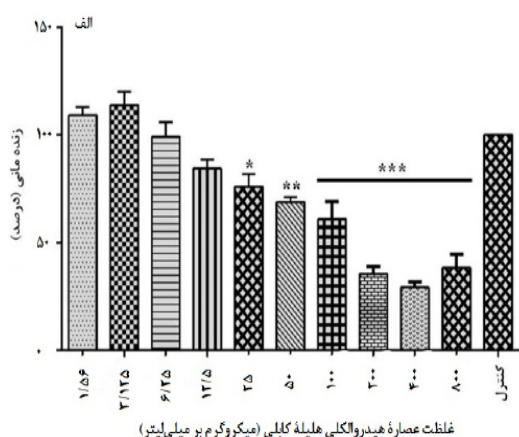
در سلول اندازه می‌گیرد. DCFDA بعد از نفوذ در سلول توسط دی استرازهای سلولی به ترکیبی غیرفلورسنت داستیله می‌شود. در مرحله بعد توسط ROS به '۲،۷' دی کلروفلورسئین که ترکیبی با قدرت فلورسنت بالاست تبدیل می‌شود که توسط فلورسایتمتری با طول موج تهییج ۴۹۵ و نشر ۵۲۹ قابل تشخیص می‌گردد. ابتدا سلول‌های U87 در پلیت ۹۶ خانه تیره ریخته شد (۷۰۰ سلول در هر چاهک و ۳ چاهک برای هر گروه) و شبانه انکوبه گردید. بعد از آن سلول‌ها با بافر 1X شسته و با DCFDA به مدت ۳۰-۴۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه رنگ شدند و بار دیگر سلول‌ها با بافر 1X شسته شدند. تیمار سلول‌ها با ۳ غلظت مختلف هلیله کابلی ($50, 100, 200 \mu\text{g/mL}$) به مدت ۲ و ۶ ساعت انجام شد. محیط رویی به لوله فالكون منتقل گردید و سلول‌های چسبنده توسط تریپسین جدا شده و به همان لوله فالكون انتقال داده شد. بعد از دو بار شستشو با PBS، شدت فلورسانس DCFDA با استفاده از دستگاه الیزا ریدر با طول موج ۴۸۵ nm تهییج شده و طول موج انتشار ۵۳۵ nm اندازه‌گیری شد.

آنالیز داده‌ها

کلیه نتایج به صورت میانگین $\pm$ خطای معیار ذکر گردیده‌اند. برای آنالیز داده‌ها از نرم‌افزار Graph Pad



تصویر ۱- سمیت عصاره هیدروالکلی هلیله کابلی با غلظت‌های ۲۰۰ و ۸۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در مقایسه با گروه کنترل (No treatment). همانطور که مشاهده می‌شود تغییر شکل ساختاری (کاهش حجم سلول و گرد شدن آن) به صورت وابسته به غلظت افزایش می‌یابد (بزرگمایی ۴۰x) که در تصویر با علامت فلش مشخص شده است.



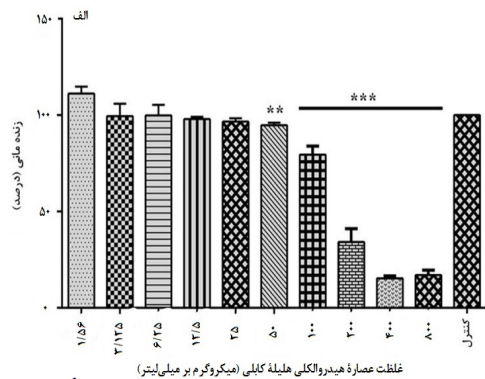
شفاخته

نمودار ۱- سمیت هلیله کابلی در سلول‌های U87 در ۲۴ ساعت در مقایسه با گروه کنترل. سمیت سلولی با سنجش MTT بررسی شد. میزان کمترین غلظت مهاری سلولی (IC_{50})، ۱۴۵/۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر محاسبه گردید. هر ستون بیانگر میانگین $\pm$ خطای استاندارد در نمونه‌ها می‌باشد ($P < 0.05$ ، $P < 0.01$ ، $P < 0.001$ در مقایسه با گروه کنترل).

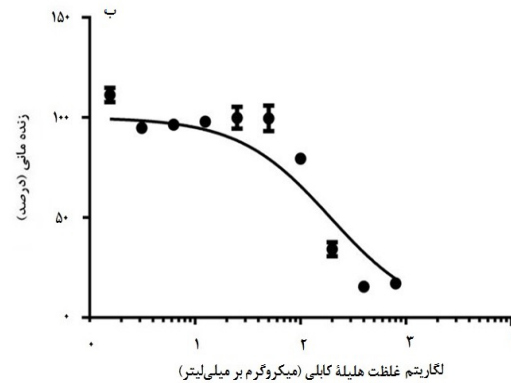
¹⁶ One-way ANOVA

¹⁷ Tukey-Kramer

¹⁸ FlowJo vX.0.7



شکل ۱



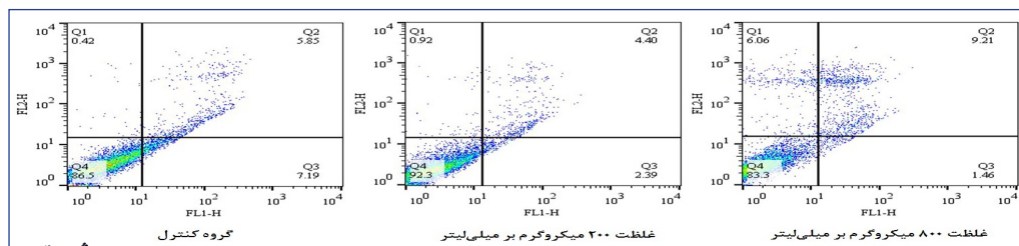
نمودار ۲- سمیت هلیله کابلی در سلول‌های U87 در ۴۸ ساعت در مقایسه با گروه کنترل. سمیت سلولی با سنجش MTT بررسی شد. میزان کمترین غلظت مهاری سلولی (IC_{50}) ۱۹۲/۳ میکروگرم بر میلی لیتر محاسبه گردید. هر ستون بیانگر میانگین $\pm$ خطای استاندارد در نمونه‌ها می‌باشد ($P < 0.001$ ، $P < 0.01$ ، $P < 0.05$ در مقایسه با گروه کنترل).

و نکروتیک در غلظت‌های ۲۰۰ و ۸۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر، به ترتیب ۵/۳۲٪ و ۱۵/۲۷٪ گزارش گردید. همچنین میزان سلول‌های Early apoptotic با افزایش غلظت، نسبت به گروه کنترل و همچنین مقایسه غلظت‌ها کاهش داشته است.

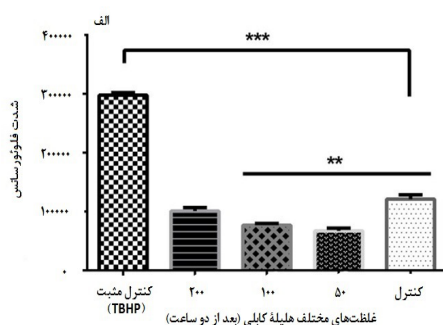
بررسی گونه‌های فعال اکسیژنی

اثر هلیله کابلی بر تشکیل گونه‌های فعال اکسیژنی در آنالیز الایزا ریدر مورد بررسی قرار گرفت. سطح ROS در سلول‌های تیمار شده توسط عصاره هیدروالکلی هلیله کابلی نسبت به گروه کنترل به صورت وابسته به غلظت کاهش معنی‌دار نشان داد. این نتیجه پیشنهاد می‌کند که عصاره هلیله کابلی می‌تواند کاهش ROS را القاء کند و نقش معنی‌داری از طریق فعالیت‌های آنتی اکسیدانی داشته باشد.

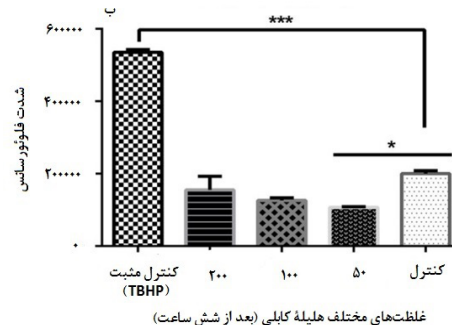
فلوسایتومتری مورد بررسی قرار گرفت. پروتئین کونژوگه Annexin V-FITC به سطوح سلولی بیان‌کننده فسفاتیدیل سرین متصل شده که یک نشانگر Early Apoptosis است. سلول‌ها توسط PI که یک رنگ غیرقابل نفوذ به DNA است رنگ شده که نشان‌دهنده سلول‌های نکروتیک است. سلول‌های رنگ شده به وسیله PI و Annexin V-FITC نشان‌دهنده فاز انتهایی آپوپتوز و فاز اولیه نکروز می‌باشد. عصاره هیدروالکلی هلیله کابلی، باعث القای پیک فسفاتیدیل سرین (یکی از شاخص‌های موثق آپوپتوز) در هیستوگرام فلوسایتومتری در مقابل گروه کنترل گردید (تصویر ۲). درصد آپوپتوز (٪) = تعداد سلول‌های آپوپتیک / تعداد کل سلول‌های شمارش شده (۱۰۰۰۰ سلول) نشان داده شد. همانطور که در تصویر مشاهده می‌شود میزان سلول‌های آپوپتوتیک



تصویر ۲- نمای هیستوگرام القای آپوپتوز توسط عصاره هیدروالکلی هلیله کابلی با غلظت‌های ۲۰۰ و ۸۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر در ۲۴ ساعت پس از تیمار توسط نرم‌افزار FlowJo. همانطور که در تصویر مشاهده می‌شود میزان سلول‌های آپوپتوتیک و نکروتیک در غلظت‌های ۲۰۰ و ۸۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر، به ترتیب ۵/۳۲٪ و ۱۵/۲۷٪ گزارش گردید.



شکل ۳



نمودار ۳- هلیله کابلی میزان تولید ROS را در سلول‌های U87 در مقایسه با گروه کنترل کاهش داد ($P < 0.001$ ، $P < 0.01$ ، $P < 0.05$ در مقایسه با گروه کنترل). سلول‌ها به مدت ۲ و ۶ ساعت با غلظت‌های ۱۰۰، ۲۰۰ و ۵۰ هلیله کابلی تیمار شدند و سطح داخل سلولی ROS توسط دستگاه فلوریمتر مورد بررسی قرار گرفت. نمودار الف بیان‌کننده شدت فلورسانس غلظت‌های مختلف هلیله کابلی پس از دو ساعت است و نمودار ب بیان‌کننده شدت فلورسانس غلظت‌های مختلف هلیله کابلی پس از ۶ ساعت است. در نمونه کنترل مثبت TBHP (به‌عنوان القا کننده رادیکال‌های آزاد اکسیژن، با غلظت ۵۰ میکرومولار) شدت فلورسانس به طور معنی‌دار در مقایسه با گروه کنترل افزایش یافت ($P < 0.001$).

بحث و نتیجه گیری

دوزهای افزایشنده عصاره هیدروالکلی هلیله کابلی ($\mu\text{g/mL}$) ۸۰۰-۰ به صورت وابسته به غلظت و وابسته به زمان کاهش یافت. ما ۵۰ درصد مهار پرولیفراسیون سلولی را در غلظت ۱۴۵/۳ و ۱۹۲/۳ میکروگرم بر میلی لیتر در ۲۴ و ۴۸ ساعت به ترتیب مشاهده کردیم. همچنین، مشاهده گردید که با گذشت زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت، غلظت مهاری به صورت وابسته به دوز تغییر می کند به عبارتی با کاهش دوز عصاره هیدروالکلی هلیله کابلی میزان زنده مانده سلول ها افزایش می یابد، بنابراین می توان نتیجه گرفت که عصاره ما به صورت وابسته به غلظت سلول را از بین می برد. از طرف دیگر، سلول های گلیوبلاستوما به صورت خوشه ای رشد می کنند و زمان دو برابر شدن این سلول ها حدود ۳۶ ساعت تخمین زده می شود اما در طی درمان ۲۴ ساعته با عصاره هیدروالکلی هلیله کابلی، تغییرات زیادی در ریخت شناسی و الگوی رشد سلولی و همچنین کاهش رشد شاخه ای و تجمعات سلولی، ایجاد شده بود.

در مطالعات زیادی به اثرات آنتی اکسیدان، ضد التهاب و القای آپوپتوز هلیله کابلی اشاره شده است. هلیله کابلی، رادیکال های آزاد ناشی از $^1\text{DPPH}$ را به خوبی جاروب نموده و به صورت معنی داری از ایجاد مالون دی آلدئید ناشی از آب اکسیژنه جلوگیری می نماید. همچنین مرگ سلولی و تولید رادیکال نیتریک اکسید (NO)¹⁹ ناشی از لیپوپولی ساکارید را به صورت برون تن کاهش می دهد (۳۴، ۹). در مطالعه دیگری نشان داده شد که عصاره آبی هلیله از طریق اثرات آنتی اکسیدانتی خود از آسیب کبدی ناشی از بوتیل هیدروپراکسید ($t\text{-BHP}$)²⁰ به صورت برون تن و درون تن جلوگیری می نماید (۳۵). یک مطالعه نیز نشان داد که عصاره متانولی هلیله دارای اثرات قدرتمند آنتی اکسیدانتی و جاروب کنندگی رادیکال آزاد اکسیژن به صورت برون تن می باشد که عمدتاً ناشی از محتوی غنی فنولیک اسیدها و فلاونوئیدی آن می باشد (۳۶).

اخیراً در مطالعه ای نشان داده شد که عصاره های آبی، اتانولی و متانولی هلیله کابلی، غنی از ترکیبات فنلی، تاننی و تری ترپنوئیدی بوده و به اندازه آنتی اکسیدانت های شناخته شده ویتامین C و ترلوکس از خود فعالیت آنتی اکسیدانتی نشان می دهند و از مرگ سلول های PC12 ناشی از آب اکسیژنه به صورت معنی داری جلوگیری می نماید (۳۷). درمان با عصاره هیدروالکلی هلیله کابلی نشان داد که با گذشت زمان های اولیه، تغییرات در کاهش میزان رادیکال های آزاد اکسیژن به وجود می آید، بنابراین می توان نتیجه گرفت همانطور که مطالعات هم نشان داده است اثرات سمیت سلولی این گیاه می تواند بیشتر ناشی از اثرات ضد التهابی (مثلاً

گیاهان منبع بسیاری از مولکول های ضد سرطان قوی بالینی هستند. به دلیل تنوع بسیار زیاد گیاهان، بررسی و تحقیق گسترده برای کشف مولکول های بالقوه درمانی قرار نگرفته است. نیاز به تحقیق و توسعه بر روی گیاهان برای تولید محصولات درمانی طبیعی حتی امروزه با توجه به پیشرفت روش ها و فناوری ها برای تهیه آنالوگ از محصولات جدا شده طبیعی، بیشتر از پیش محسوس می باشد (۲۷-۲۳). در مطالعه حاضر اثرات محافظتی عصاره هیدروالکلی هلیله کابلی بر روی رده سلولی گلیوبلاستوم مولتی فرم (U87) بررسی گردید. همچنین مطالعات قبلی ما نشان دهنده اثرات مهاری بالقوه دیگر ترکیبات طبیعی و شیمیایی بر روی گلیوبلاستوم مولتی فرم نیز می باشد (مقالات هنوز منتشر نشده است). همانطور که می دانیم سرطان مشکلی رو به رشد در سراسر جهان و از عوامل مهم مرگ و میر در جوامع انسانی می باشد. فرآورده های گیاهی نیز در طول زمان به دلیل عوارض جانبی زیاد داروهای شیمی درمانی و سایتوتوکسیک جهت پیشگیری و درمان بسیاری بیماری ها از جمله سرطان مورد استفاده قرار گرفته اند (۲۸). همانطور که می دانیم، گیاهان گنجینه ای از داروهای مؤثرند که امروزه آگاهی در مورد اهمیت آن ها افزایش یافته است (۲۹). داروهای به دست آمده از گیاهان در دسترس، ارزان، ایمن و کارآمد هستند و معمولاً عوارض جانبی کمتری دارند (۳۰). میوه گیاه هلیله کابلی به خاطر فعالیت فارماکولوژیکی خود شناخته شده است. در سال ۲۰۰۳ عصاره آبی این گیاه را به عنوان آنتی اکسیدانت قوی مورد مطالعه قرار دادند (۹).

عصاره آبی هلیله کابلی یک مهارکننده مؤثر پراکسیداسیون لیپید و آنزیم سوپراکسید دیسموتاز معرفی شد که می تواند از آسیب های DNA جلوگیری کند، لذا عصاره هلیله کابلی به عنوان یک خنثی کننده رادیکال آزاد شناخته شده است (۱۷، ۱۱). تا آنجا که دانش محققین اجازه می دهد، این اولین مطالعه ای است که اثر عصاره هیدروالکلی هلیله کابلی را بر رده سلولی گلیوبلاستوم مولتی فرم بررسی می کند. نتایج مطالعات قبلی بر روی هلیله کابلی خاصیت ضد توموری آن را بر روی رده های سلولی دیگر نشان داده است (۳۱). ردی و همکاران نشان داده اند هلیله کابلی می تواند باعث مهار پرولیفراسیون سلولی در رده سلولی سرطان کولون شود (۳۲). تنها مطالعه نزدیک، بررسی اثرات کبولاژیک اسید بر روی رده سلولی رتینوبلاستوما با مکانیسم های القای G1-arrest، مهار NF-kB و القای آپوپتوز بود (۳۳). در مطالعه حاضر سمیت هلیله کابلی در رده سلولی U87 نشان داده شد که پرولیفراسیون سلولی U87 در اثر

¹⁹ 2,2-Diphenyl-1-(2,4,6-trinitrophenyl) hydroxyl

²⁰ Nitric oxide

²¹ Tert-butyl hydroperoxide

نشان‌دهنده اثر القای آپوپتوز این عصاره به صورت وابسته به دوز می‌باشد. البته در آپوپتوز نشانگرهای متفاوتی مورد بحث می‌باشد که یکی از آن‌ها می‌تواند عدم تعادل بین پروتئین‌های Bax و Bcl2 باشد (۴۳، ۴۲).

این مطالعه برای اولین بار تأثیر عصاره هیدروالکلی هلیله کابلی را بر روی رده سلولی گلیوبلاستوم مولتی‌فرم مورد بحث قرار می‌دهد. با توجه به نتایج به دست آمده، عصاره هیدروالکلی گیاه هلیله کابلی می‌تواند به‌عنوان یک داروی مؤثر کمکی در درمان انواع سرطان از جمله تومورهای مغزی (گلیوبلاستوم مولتی‌فرم) در کنار داروهای استاندارد شیمی درمانی و رادیوتراپی مورد استفاده قرار گیرد. البته تحقیقات بیشتر روی مکانیسم‌های مؤثر این گیاه در القای اثرات سایتوتوکسیک و آپوپتوزیک بر روی رده سلولی گلیوبلاستوم مولتی‌فرم ضروری به نظر می‌رسد.

مهار سیستم‌های سیکلواکسیژناز و لیپواکسیژناز و یا مهار مسیر NF-kB و آنتی اکسیدانی باشد که البته دلیل آن را هم می‌توان به ترکیبات جدید مهارکننده التهاب از جمله کبولازیک اسید (ترکیب مؤثره موجود در میوه هلیله) نسبت داد (۳۲). همچنین، القاء آپوپتوز یکی از راهبردهای مهم در پیشگیری و درمان سرطان به‌خصوص تومورهای مغزی است (۴۰-۳۸). بسیاری از موادی که در رژیم‌های غذایی و گیاهان اثرات پیشگیری کننده از سرطان دارند از طریق القاء آپوپتوز اثرات مهاري خود را بر سرطان اعمال می‌کنند (۴۱). عصاره هیدروالکلی هلیله کابلی در زمان ۲۴ ساعت نشان داد که با افزایش غلظت می‌تواند باعث تبدیل سلول‌های زنده به سمت سلول‌های آپوپتوتیک و نکروتیک شود به طوری که با غلظت پایین‌تر ($200 \mu\text{g/mL}$)، مجموع ۵/۳۲ درصد از سلول‌ها و با غلظت بالاتر ($800 \mu\text{g/mL}$)، مجموع ۱۵/۲۷ درصد به سمت آپوپتوز و نکروز پیشروی داشته‌اند که

منابع

- Wang X, Qiu Y, Yu Q, Li H, Chen X, Li M, et al. Enhanced glioma therapy by synergistic inhibition of autophagy and tyrosine kinase activity. *Int J Pharm*. 2018; 536(1): 1-10.
- Anjum K, Shagufta BI, Abbas SQ, Patel S, Khan I, Shah SAA, et al. Current status and future therapeutic perspectives of glioblastoma multiforme (GBM) therapy: A review. *Biomed Pharmacother*. 2017; 92: 681-9.
- Yan Y-Y, Bai J-P, Xie Y, Yu J-Z, Ma C-G. The triterpenoid pristimerin induces U87 glioma cell apoptosis through reactive oxygen species-mediated mitochondrial dysfunction. *Oncol Lett*. 2013; 5(1): 242-8.
- Wang X, Jia Y, Wang P, Liu Q, Zheng H. Current status and future perspectives of sonodynamic therapy in glioma treatment. *Ultrasonics Sonochemistry*. 2017; 37: 592-9.
- Mann J. Natural products in cancer chemotherapy: past, present and future. *Nat Rev Cancer*. 2002; 2(2): 143-8.
- Mahdian D, Shafiee-Nick R, Mousavi SH. Different effects of adenylyl cyclase activators and phosphodiesterases inhibitors on cervical cancer (HeLa) and breast cancer (MCF-7) cells proliferation. *Toxicol Mech Methods*. 2014; 24(4): 307-14.
- Sadeghnia HR, Ghorbani Hesari T, Mortazavian SM, Mousavi SH, Tayarani-Najaran Z, Ghorbani A. Viola tricolor induces apoptosis in cancer cells and exhibits antiangiogenic activity on chicken chorioallantoic membrane. *Biomed Res Int*. 2014; 2014.
- Tayarani-Najaran Z, Asili J, Parsaee H, Mousavi SH, Mashhadian NV, Mirzaee A, et al. Wogonin and neobaicalein from *Scutellaria litwinowii* roots are apoptotic for HeLa cells. *Rev Bras Farmacogn*. 2012; 22(2): 268-76.
- Cheng H-Y, Lin T-C, Yu K-H, Yang C-M, Lin C-C. Antioxidant and free radical scavenging activities of terminalia chebula. *Biol Pharm Bull*. 2003; 26(9): 1331-5.
- Kumar R, Arora R, Agarwal A, Gupta Y. Protective effect of terminalia chebula against seizures, seizure-induced cognitive impairment and oxidative stress in experimental models of seizures in rats. *J Ethnopharmacol*. 2018; 215: 124-31.
- Naik G, Priyadarsini K, Naik D, Gangabhairathi R, Mohan H. Studies on the aqueous extract of terminalia chebula as a potent antioxidant and a probable radioprotector. *Phytomedicine*. 2004; 11(6): 530-8.
- Ahn M-J, Kim CY, Lee JS, Kim TG, Kim SH, Lee C-K, et al. Inhibition of HIV-1 integrase by galloyl glucoses from Terminalia chebula and flavonol glycoside gallates from euphorbia peginensis. *Planta Medica*. 2002; 68(05): 457-9.
- Badmaev V, Nowakowski M. Protection of epithelial cells against influenza a virus by a plant derived biological response modifier Ledretan-96. *Phytother Res*. 2000; 14(4): 245-9.
- Dutta B, Rahman I, Das T. Antifungal activity of Indian plant extracts: antimyzetische Aktivität indischer Pflanzenextrakte. *Mycoses*. 1998; 41(11-12): 535-6.

15. Saleem A, Husheem M, Härkönen P, Pihlaja K. Inhibition of cancer cell growth by crude extract and the phenolics of terminalia chebula retz. fruit. J Ethnopharmacol. 2002; 81(3): 327-36.
16. Sabu M, Kuttan R. Anti-diabetic activity of medicinal plants and its relationship with their antioxidant property. J Ethnopharmacol. 2002; 81(2): 155-60.
17. Afshari AR, Sadeghnia HR, Mollazadeh H. A review on potential mechanisms of terminalia chebula in Alzheimer's disease. Adv Pharmacol Sci. 2016; 2016.
18. Sadeghnia HR, Jamshidi R, Afshari AR, Mollazadeh H, Forouzanfar F, Rakhshandeh H. Terminalia chebula attenuates quinolinate-induced oxidative PC12 and OLN-93 cell death. Mult Scler Relat Disord. 2017; 14: 60-7.
19. Jinukuti MG, Giri A. Anticancer activity of acetone and methanol extracts of terminalia chebula Retz and withania somnifera (Linn.) dunal on HeLa cell line. Annals of Phytomedicine. 2015; 4(2): 88-92.
20. Pettit GR, Hoard MS, Doubek DL, Schmidt JM, Pettit RK, Tackett LP, et al. Antineoplastic agents 338. the cancer cell growth inhibitory. constituents of terminalia arjuna (combretaceae). J Ethnopharmacol. 1996; 53(2): 57-63.
21. Wang L-M, Xie K-P, Huo H-N, Shang F, Zou W, Xie M-J. Luteolin inhibits proliferation induced by IGF-1 pathway dependent ER α in human breast cancer MCF-7 cells. Asian Pac J Cancer Prev. 2012; 13(4): 1431-7.
22. Gerlier D, Thomasset N. Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. J Immunol Methods. 1986; 94(1-2): 57-63.
23. Yuan R, Hou Y, Sun W, Yu J, Liu X, Niu Y, et al. Natural products to prevent drug resistance in cancer chemotherapy: a review. Ann N Y Acad Sci. 2017; 1401(1): 19-27.
24. Sharifi AM, Mousavi SH, Larijani B. Study of interaction between nitric oxide and ACE activity in STZ-induced diabetic rats: role of insulin. Pharmacol Res. 2004; 50(3): 261-6.
25. Boroushaki MT, Mollazadeh H, Afshari AR. Pomegranate seed oil: a comprehensive review on its therapeutic effects. Int J Pharm Sci Res. 2016; 7(2): 430.
26. Mollazadeh H, Boroushaki MT, Soukhtanloo M, Afshari AR, Vahedi MM. Effects of pomegranate seed oil on oxidant/antioxidant balance in heart and kidney homogenates and mitochondria of diabetic rats and high glucose-treated H9c2 cell line. Avicenna J Phytomed. 2017; 7(4): 317-33.
27. Mousavi SH, Moallem SA, Mehri S, Shahsavand S, Nassirli H, Malaekheh-Nikouei B. Improvement of cytotoxic and apoptogenic properties of crocin in cancer cell lines by its nanoliposomal form. Pharm Biol. 2011; 49(10): 1039-45.
28. Smith-Warner SA, Elmer PJ, Tharp TM, Fosdick L, Randall B, Gross M, et al. Increasing vegetable and fruit intake: randomized intervention and monitoring in an at-risk population. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2000; 9(3): 307-17.
29. Tayarani-Najaran Z, Emami SA, Asili J, Mirzaei A, Mousavi SH. Analyzing cytotoxic and apoptogenic properties of Scutellaria litwinowii root extract on cancer cell lines. Evid Based Complement Alternat Med. 2011; 2011.
30. Yadav R, Agarwala M. Phytochemical analysis of some medicinal plants. J Phycol. 2011; 3(12): 10-4.
31. Lee S-H, Ryu SY, Choi SU, Lee CO, No Z, Kim S-K, et al. Hydrolysable tannins and related compound having cytotoxic activity from the fruits of Terminalia chebula. Archives of Pharmacal Research. 1995; 18(2): 118-20.
32. Reddy DB, Reddy T, Jyotsna G, Sharan S, Priya N, Lakshmipathi V, et al. Chebulagic acid, a COX-LOX dual inhibitor isolated from the fruits of Terminalia chebula Retz., induces apoptosis in COLO-205 cell line. J Ethnopharmacol. 2009; 124(3): 506-12.
33. Kumar N, Gangappa D, Gupta G, Karnati R. Chebulagic acid from Terminalia chebula causes G1 arrest, inhibits NF κ B and induces apoptosis in retinoblastoma cells. BMC Complement Altern Med. 2014; 14: 319. doi: 10.1186/1472-6882-14-319.
34. Nair V, Singh S, Gupta YK. Anti-arthritis and disease modifying activity of Terminalia chebula Retz. in experimental models. J Pharm Pharmacol. 2010; 62(12): 1801-6.
35. Bag A, Kumar Bhattacharyya S, Kumar Pal N, Ranjan Chattopadhyay R. Anti-inflammatory, anti-lipid peroxidative, antioxidant and membrane stabilizing activities of hydroalcoholic extract of Terminalia chebula fruits. Pharm Biol. 2013; 51(12): 1515-20.
36. Hazra B, Sarkar R, Biswas S, Mandal N. Comparative study of the antioxidant and reactive oxygen species scavenging properties in the extracts of the fruits of Terminalia chebula, Terminalia belerica and Emblica officinalis. BMC Complement Altern Med. 2010; 10: 20. doi: 10.1186/1472-6882-10-20.

37. Chang CL, Lin CS. Phytochemical composition, antioxidant activity, and neuroprotective effect of Terminalia chebula Retzius extracts. Evid Based Complement Alternat Med. 2012; 2012.
38. Sharma A, Kaur M, Katnoria J, Nagpal A. Polyphenols in food: cancer prevention and apoptosis induction. Curr Med Chem. 2017. doi: 10.2174/0929867324666171006144208.
39. Mousavi SH, Tayarani-Najaran Z, Hersey P. Apoptosis: from signalling pathways to therapeutic tools. Iranian Journal of Basic Medical Sciences. 2008; 11(3): 121-42.
40. Parsaee H, Asili J, Mousavi SH, Soofi H, Emami SA, Tayarani-Najaran Z. Apoptosis induction of Salvia chorassanica root extract on human cervical cancer cell line. Iran J Pharm Res. 2013; 12(1): 75-83.
41. Kim Mj, Kim Dh, Lee Kw, Yoon Dy, Surh Yj. Jaceosidin induces apoptosis in ras-transformed human breast epithelial cells through generation of reactive oxygen species. Ann N Y Acad Sci. 2007; 1095(1): 483-95.
42. Mousavi SH, Tavakkol-Afshari J, Brook A, Jafari-Anarkooli I. Role of caspases and bax protein in saffron-induced apoptosis in MCF-7 cells. Food Chem Toxicol. 2009; 47(8): 1909-13.
43. Mousavi SH, Tavakkol-Afshari J, Brook A, Jafari-Anarkooli I. Direct toxicity of rose bengal in MCF-7 cell line: role of apoptosis. Food Chem Toxicol. 2009; 47(4): 855-9.