

تأثیر سایتوتوکسیک سه گونه گیاهی جنس گل گندم (*Centaurea*) بر رده سلولی لوسمی لنفوبلاستیک حاد (Nalm-6)

فروزان بهمنی^۱، سمیه اسماعیلی^۲، داود بشاش^۳، احمد قره‌باغیان^{۴*}

- ۱- کارشناسی ارشد خون‌شناسی آزمایشگاهی و بانک خون، گروه خون‌شناسی آزمایشگاهی و بانک خون، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
 - ۲- دکتری تخصصی فارماکونوزی، دانشیار مرکز تحقیقات طب سنتی و مفردات پزشکی، دانشکده طب سنتی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
 - ۳- دکتری تخصصی خون‌شناسی و بانک خون، استادیار گروه هماتولوژی و بانک خون، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
 - ۴- دکتری تخصصی ایمونوهما‌تولوژی بالینی، استاد دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، مرکز تحقیقات بیماری‌های مادرزادی خونی کودکان دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
- * آدرس مکاتبه: تهران، میدان قدس، خیابان دربند، گروه خون‌شناسی آزمایشگاهی و بانک خون، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، کدپستی: ۱۵۴۶۸-۱۵۵۱۴
تلفن: ۲۲۷۲۱۱۵۰ (۰۲۱)، نمابر: ۲۲۷۳۱۹۹۹ (۰۲۱)
پست الکترونیک: gharehbaghian@sbmu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۶/۵/۹

تاریخ تصویب: ۹۶/۷/۱۷

چکیده

مقدمه: امروزه گیاهان دارویی به سبب محتوای زیست فعال و سمیت انسانی محدود به عنوان منبع ایده‌آل برای پیشگیری یا درمان سرطان مورد توجه قرار گرفته‌اند. گیاهان جنس *Centaurea* که تأثیر سایتوتوکسیک آنها بر چندین رده سلولی سرطانی در مطالعات پیشین نشان داده شده است، دسته‌ای از این گیاهان محسوب می‌شوند.

هدف: در این مطالعه، تأثیر سایتوتوکسیک سه گونه *Centaurea* (*C. albonitens*، *C. pseudoscabiosa* و *C. salicifolia*) بر سلول‌های مشتق شده از لوسمی لنفوبلاستیک حاد Nalm-6 مورد بررسی قرار گرفته است.

روش بررسی: سلول‌های لوسمیک Nalm-6 و همچنین MDBK به عنوان رده سلولی نرمال با غلظت‌های افزایشدهنده عصاره‌های متانلی بخش‌های هوایی گونه‌های مختلف *Centaurea* تیمار و سپس قدرت کشندگی و مهارت نکثیر گونه‌ها، با روش‌های تریپان‌بلو، MTT و رنگ‌آمیزی DAPI بررسی شد. در نهایت جهت تأیید و درک چگونگی اثر سایتوتوکسیک عصاره‌ها، رنگ‌آمیزی Annexin V/PI و بررسی چرخه سلولی انجام شد.

نتایج: نتایج حاصل از آزمون‌های تریپان‌بلو، MTT و رنگ‌آمیزی DAPI، بیانگر القاء مرگ و کاهش تکثیر در سلول‌های Nalm-6، تحت تأثیر تیمار با هر سه عصاره متانلی به صورت وابسته به دوز و زمان بوده است ($P \leq 0/001$). برخلاف سلول‌های Nalm-6، سلول‌های MDBK حساسیت کمی نسبت به عصاره‌ها نشان دادند. به علاوه، آنالیز داده‌های فلوسایتمتری تأییدکننده القاء مرگ سلولی از طریق آپوپتوز و توقف تکثیر در فاز G1 سلول‌های Nalm-6 تیمار شده با عصاره *Centaurea* می‌باشد ($P \leq 0/001$).

نتیجه‌گیری: با توجه به ماهیت غیرسمی محصولات طبیعی، مطالعه ما نشان می‌دهد که *Centaurea* ممکن است به عنوان استراتژی جدید یا عامل مکمل در درمان لوسمی لنفوبلاستیک حاد کمک‌کننده باشد که نیازمند مطالعات بیشتر است.

کل واژگان: لوسمی لنفوبلاستیک حاد، *Centaurea*، آپوپتوز، Nalm-6، MDBK



مقدمه

گونه‌های مختلف این جنس را مورد بررسی قرار داده و اثر مثبت آنها را نشان داده‌اند [۱۷-۱۵، ۱۲]. با توجه به بررسی منابع علمی گذشته، گزارشی از مطالعه این جنس گیاهی بر سلول‌های سرطانی با منشا لوسمی لنفوبلاستیک حاد یافت نشد. از این رو ما بر آن شدیم تا در این مطالعه تأثیر عصاره متانلی بخش‌های هوایی سه گونه (*Centaurea C. salicifolia* و *C. pseudoscabiosa*، *C. albonitens*) را بر رده سلولی لوسمی لنفوبلاستیک حاد Nalm-6 مورد بررسی قرار دهیم.

مواد و روش‌ها

آماده‌سازی عصاره

گونه‌های *C. pseudoscabiosa* و *C. albonitens* با کد هرباریومی TMRC3234 و TMRC3233 از شهرستان کیوردآهنگ استان همدان و *C. salicifolia* با کد هرباریومی TMRC3195 از شهرستان ارسباران استان آذربایجان شرقی جمع‌آوری و توسط کارشناسان گیاه‌شناسی مرکز تحقیقات طب سنتی و مفردات پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی شناسایی شده‌اند. پودر حاصل از اندام‌های هوایی خشک شده هر کدام *C. albonitens*، *C. pseudoscabiosa* و *C. salicifolia* توسط متانل (به نسبت ۱ به ۱۰) با استفاده از روش خیساندن (Maceration) به مدت ۲۴ ساعت عصاره‌گیری شدند. عصاره‌های به دست آمده با استفاده از کاغذ صافی از پودر گیاه جدا و سپس با استفاده از دستگاه روتاری در دمای کمتر از ۴۰ درجه سانتی-گراد تغلیظ شدند [۱۸]. عصاره‌های تغلیظ شده در زیر هود خشک و تا قبل از بررسی در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. به منظور آماده‌سازی عصاره‌ها و رساندن آنها به غلظت مورد نظر، ابتدا ۵۰ میلی‌گرم از هر عصاره در میکروتیوبی استریل با ترازوی دیجیتال وزن و سپس در ۱ میلی لیتر DMSO استریل حل شدند و به این ترتیب استوک‌های اولیه عصاره‌ها با غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تهیه و تا زمان استفاده در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

لوسمی لنفوبلاستیک حاد (Acute Lymphoblastic Leukemia = ALL) به عنوان شایع‌ترین بدخیمی کودکان، به تنهایی ۷۷ درصد کل لوسمی در دوران کودکی را تشکیل می‌دهد و با علائمی از جمله آنمی، خونریزی به دلیل ترومبوسایتوپنی و عفونت ناشی از نوتروپنی شناخته می‌شود [۱]. پروتکل درمانی این بیماری شامل شیمی‌درمانی، رادیوتراپی و پیوند مغز استخوان می‌باشد. با وجود اینکه امروزه ALL در بسیاری از موارد به دلیل بهبود قابل توجه کارایی داروهای شیمی‌درمانی مانند گلوکوکورتیکواستروئیدها و وین کریستین سولفات قابل درمان می‌باشد، این بیماری همچنان به عنوان یکی از کشنده‌ترین بدخیمی‌های هماتولوژیک در سراسر جهان محسوب می‌شود [۳، ۲]. عملکرد غیراختصاصی، مقاومت دارویی و عوارض جانبی شدید از جمله مشکلات اصلی داروهای شیمی‌درمانی حال حاضر محسوب می‌شوند. از این رو نیاز شدیدی به مطالعات گسترده جهت پیدا کردن درمان‌های جایگزین و مکمل احساس می‌شود [۴]. امروزه بخش قابل توجه‌ای از این مطالعات، گیاهان و محصولات طبیعی مشتق شده از گیاهان را هدف قرار داده‌اند. تعداد زیادی از گیاهان به عنوان عوامل ضد سرطان بالقوه شناسایی شده‌اند و روز به روز بر تعداد آنها افزوده می‌شود [۵، ۶]. مطالعات اخیر در حدود ۳۰ داروی ضد سرطانی مشتق شده از گیاهان را معرفی کردند که اکثر آنها هم اکنون تحت کارآزمایی بالینی هستند [۷]. گیاه جنس *Centaurea* دارای ترکیباتی است که خواص سایتوتوکسیک آنها اثبات شده است، از جمله: سزکوئی‌ترین لاکتون‌ها، فلاوونوئیدها، آلکالوئیدها و لیگنان‌ها [۸-۱۰]. گیاه جنس *Centaurea* از خانواده Asteraceae و رده Asterales می‌باشد. این جنس شامل حدود ۵۰۰ گونه است که در نواحی اطراف مدیترانه و غرب آسیا از جمله ایران پراکنده‌اند [۱۲، ۱۱]. بسیاری از گونه‌های *Centaurea* در طب سنتی در مواردی همچون رماتیسم، التهاب چشم، عفونت باکتریایی، مشکلات گوارشی و مشکلات پوستی استفاده می‌شوند [۱۴، ۱۳]. مطالعات بسیاری قدرت سایتوتوکسیک و مهارتی تکثیر



کشت و تیمار سلول‌ها

مطالعه انجام شده از نوع تجربی می‌باشد. در این مطالعه سلول‌های Nalm-6 که رده سلولی مربوط به لوسمی لنفوبلاستیک حاد می‌باشند و MDBK به عنوان رده سلولی نرمال، در محیط کشت RPMI-1640 حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی، ۱۰۰ U/ml پنی‌سیلین و ۱۰۰ µg/ml استریتومایسین در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد دی‌اکسید کربن کشت داده شده‌اند. سلول‌های Nalm-6 و MDBK با غلظت‌های ۱۰ تا ۹۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره‌ها (غلظت‌های مؤثر) به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تیمار شدند. لازم به ذکر است که جهت جلوگیری از اثرات حلال عصاره‌ها بر روی میزان تکثیر و بقا سلولی، سلول‌ها با غلظت مشخص شده‌ای از DMSO به عنوان کنترل منفی مواجه شدند. تمامی آزمایش‌ها به منظور افزایش دقت کار با سه بار تکرار انجام شدند [۱۹].

رنگ‌آمیزی تریپان‌بلو

برای شمارش سلول‌های زنده جهت بررسی میزان بقا و تکثیر سلول‌های تیمار شده نسبت به کنترل از رنگ‌آمیزی تریپان‌بلو و لام هموسایتومتر (لام نئوبار) استفاده شد. اساس این آزمایش بدین ترتیب است که سلول‌های زنده نسبت به ورود رنگ تریپان‌بلو نفوذناپذیر می‌باشند، حال آنکه سلول‌های مرده رنگ را جذب می‌نمایند [۲۰]. میزان زنده‌مانی، سلول‌های زنده با فرمول زیر محاسبه شد:

میزان زنده‌مانی (%) = تعداد سلول‌های زنده / تعداد کل سلول‌ها (زنده + مرده) × ۱۰۰.

آزمون MTT

برای ارزیابی تأثیر عصاره‌های مذکور بر میزان فعالیت متابولیک سلولی، سلول‌های لوسمیک Nalm-6 و نرمال MDBK تیمار شده با دوزهای ۱۰-۹۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره‌ها با سه بار تکرار به چاهک‌های پلیت‌های ۹۶ تایی اضافه شدند. پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت انکوباسیون در

انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد CO₂ دار، به سلول‌های داخل هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر محلول MTT 5mg/ml اضافه شد و پلیت مجدداً به مدت ۳ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. در طی زمان انکوباسیون، رنگ تترازولیوم موجود در پودر MTT بوسیله سوکسینات دهیدروژناز که یکی از آنزیم‌های چرخه تنفسی میتوکندری است، احیا می‌شود. احیا و شکسته شدن این رنگ موجب تولید کریستال‌های آبی رنگ فورمازان می‌شود. میزان رنگ تولید شده با تعداد سلول‌هایی که از نظر متابولیک فعال هستند (سلول‌های زنده) رابطه مستقیم دارد. در ادامه پلیت با دور ۱۰۰۰ g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شده و پس از خالی کردن محلول رویی ۱۰۰ میکرولیتر DMSO برای حل رسوب رنگی فورمازان به هر چاهک اضافه شد و میزان فعالیت متابولیک با استفاده از دستگاه رنگ‌سنجی ELAISA-reader در طول موج ۵۷۰ نانومتر بررسی شد [۲۱].

رنگ‌آمیزی DAPI

این تست جهت تأیید تأثیر سایتوتوکسیک و آنتی-پرولیفراتیو عصاره مورد استفاده قرار گرفت. رنگ DAPI تهیه شده از شرکت Sigma منطبق بر دستور کیت در آب مقطر دیونیزه حل و استوک اصلی با غلظت ۱ mg/ml ساخته شد. ذکر این نکته ضروری است که این رنگ برای استفاده باید با متانول به غلظت ۱ µg/ml برسد. بدین‌منظور سلول‌های Nalm-6 با غلظت‌های ۵۰، ۷۰ و ۹۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره تیمار و پس از ۴۸ ساعت سلول‌ها با دور ۳۵۰ g به مدت ۴ دقیقه سانتریفیوژ و پس از یک بار شستشو با محلول DAPI-methanol، به مدت ۱۵ دقیقه با ۲۰۰ میکرولیتر از این محلول رنگی انکوبه شدند. سپس سلول‌ها مجدداً سانتریفیوژ شده و PBS جایگزین محلول رویی شد و در انتها یک لام از نمونه تهیه و توسط میکروسکوپ فلورسنت مشاهده شد. رنگ فلورسنت DAPI با اتصال به پیوند بازهای A-T در DNA دو رشته‌ای به صورت اختصاصی سبب رنگ‌آمیزی DNA می‌شود. از آنجایی‌که تغییرات مورفولوژیک حاصل از آپوپتوز همچون فشردگی و چروکیدگی هسته و تشکیل اجسام آپوپتوتیک (Apoptotic body) با این رنگ‌آمیزی قابل

مورد بررسی قرار گرفت. در صورت بروز آپوپتوز و آسیب غشاء سلولی، رنگ PI توان عبور از غشاء را پیدا می‌کند و با توجه به میزان محتوای DNA که بیانگر فازهای مختلف چرخه سلولی است، درصد جمعیت سلولی در فازهای مختلف را نشان می‌دهد [۲۴]. بدین منظور، پس از جمع‌آوری سلول-های تیمار شده و شستشوی یکباره آنها با PBS سرد، اتانول ۷۰٪ سرد (۲۰- درجه سانتی‌گراد) جهت فیکس کردن سلول‌ها به میزان ۱ ml به نمونه‌ها به صورت قطره قطره اضافه شد. پس از گذشت ۲ ساعت انکوباسیون در یخچال، سلول‌ها مجدداً با PBS شستشو داده شدند و پس از خروج PBS، ۱ ml محلول RNase master mix که حاوی ۴۰ μl رنگ PI، ۱۰ μl آنزیم RNase و ۹۵۰ μl محلول PBS می‌باشد به سلول‌ها اضافه شد. سپس سلول‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شده و توسط دستگاه فلوسایتومتری مورد بررسی قرار گرفتند و در نهایت داده‌ها توسط نرم‌افزار FlowJo 7.6 آنالیز شد.

آنالیز آماری

تمامی آزمایشات به شکل سه آزمون مستقل انجام و مقادیر گزارش شده به شکل $Mean \pm SD$ قید شدند. همچنین برای محاسبات آماری از روش t-test و نرم‌افزار SPSS17 و GraphPad Prism7 استفاده شد [۲۵، ۲۶].

نتایج

بررسی اثر عصاره‌های متانلی *C. albonitens*، *C. pseudoscabiosa* و *C. salicifolia* بر شاخص زنده-

مانی سلول‌های Nalm-6 و MDBK

همان‌طور که در شکل شماره ۱ نشان داده شده است؛ عصاره هر سه گونه *Centaurea* به صورت وابسته به دوز و زمان قادر به کاهش درصد زنده‌مانی سلول‌های Nalm-6 می‌باشند، به گونه‌ای که سلول‌های Nalm-6 حساسیت بیشتری نسبت به عصاره *C. albonitens* در مقایسه با *C. pseudoscabiosa* و *C. salicifolia* نشان دادند. غلظت ۹۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره *C. salicifolia*

تشخیص می‌باشند، این رنگ که در طول موج ۳۴۰ نانومتر جذب و در طول موج ۴۸۸ نانومتر تشعشع آبی دارد، جهت بررسی آپوپتوز مورد استفاده قرار می‌گیرد [۲۲].

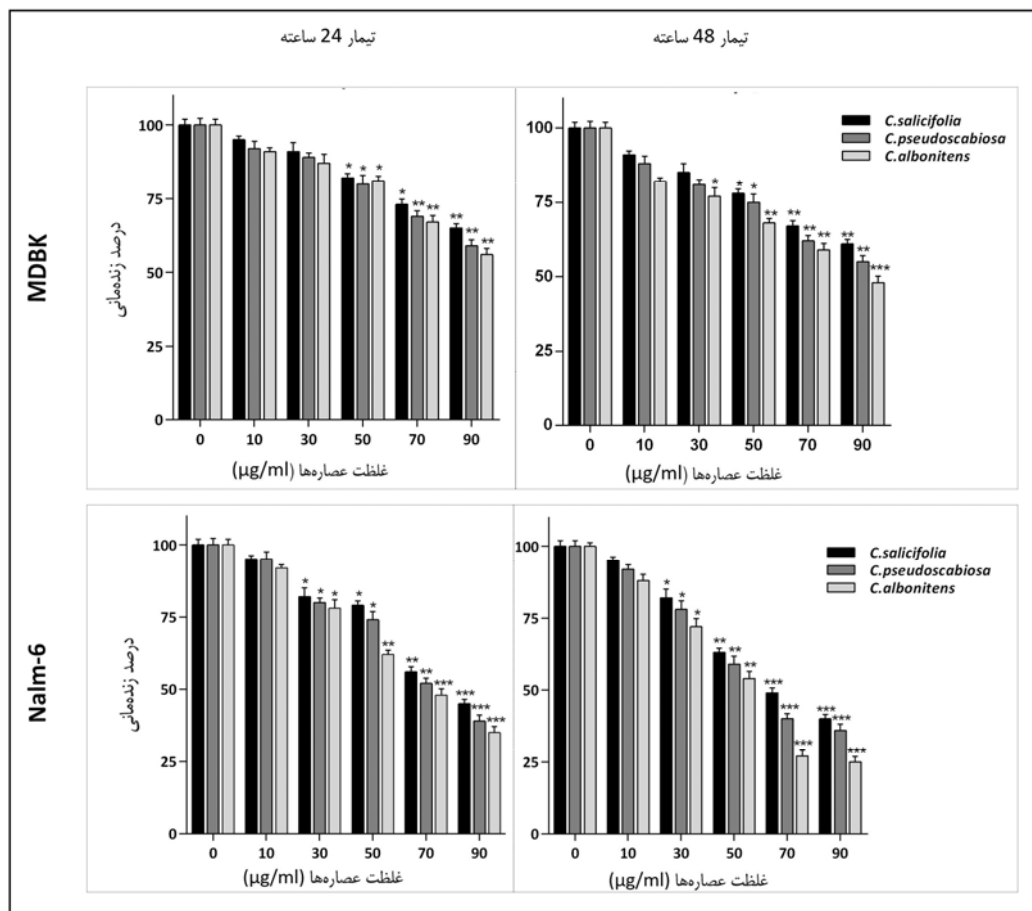
آزمون فلوسایتومتری آنکسین PI/V

به منظور بررسی القاء آپوپتوز در سلول‌های لوسمیک تحت تأثیر عصاره‌های متانلی بخش‌های هوایی *Centaurea*، آزمون فلوسایتومتری آنکسین PI/V انجام شد. آنکسین V باند شده به رنگ فلورسنت FITC به عنوان مارکری برای تشخیص فسفاتیدیل سرین که در طی آپوپتوز از غشاء داخلی به سطح سلول اکسترنالیزه می‌شود، به کار می‌رود. بدین منظور سلول‌های Nalm-6 به تعداد ۵۰۰ هزار با غلظت‌های مؤثر دارو یعنی ۵۰، ۷۰ و ۹۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، در پلیت‌های ۶ خانه به مدت ۴۸ ساعت تیمار شدند. بعد از انکوباسیون، رسوب سلولی با استفاده از سانتریفیوژ جدا شده و پس از یک بار شستشو با PBS با ۵۰۰ میکرولیتر از بافر باند کننده IX مواجه شد. در ادامه ۵ میکرولیتر آنکسین V به نمونه‌ها اضافه و پس از ۱۰ دقیقه انکوباسیون در تاریکی این بار ۵ میکرولیتر رنگ PI (Propidium Iodide) اضافه و مجدداً ۱۰ دقیقه در تاریکی انکوبه شد. لازم به ذکر است که جهت حذف رنگ زمینه برای هر نمونه یک نمونه کنترل (بدون آنکسین V و PI) در نظر گرفته شد. نمونه‌ها به ویال‌های مربوط به فلوسایتومتری منتقل شدند، سپس میزان خروج فسفاتیدیل سرین در سطح سلول‌ها توسط دستگاه فلوسایتومتری مورد سنجش واقع شد و نتایج توسط نرم‌افزار FlowJo 7.6 آنالیز شد [۲۳].

آزمون بررسی چرخه سلولی

جهت ارزیابی تأثیر عصاره بر چرخه سلولی سلول‌های Nalm-6، از روش رنگ‌آمیزی PI و بررسی فلوسایتومتری استفاده شد. رنگ PI، رنگی متصل شونده به DNA دو رشته-ای می‌باشد که غشاء سلولی نسبت به آن نفوذناپذیر است. بدین منظور سلول‌های Nalm-6 به مدت ۴۸ ساعت با غلظت-های افزاینده عصاره (۵۰، ۷۰ و ۹۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) تیمار شدند و سپس توزیع سلول‌ها با استفاده از این روش





شکل شماره ۱- تأثیر عصاره‌های متانلی *C. salicifolia* و *C. pseudoscabiosa*، *C. albonitens* بر شاخص زندهمانی سلول‌های Nalm-6 و MDBK. (*، P < 0.05، **، P < 0.01 و ***، بیانگر P < 0.001).

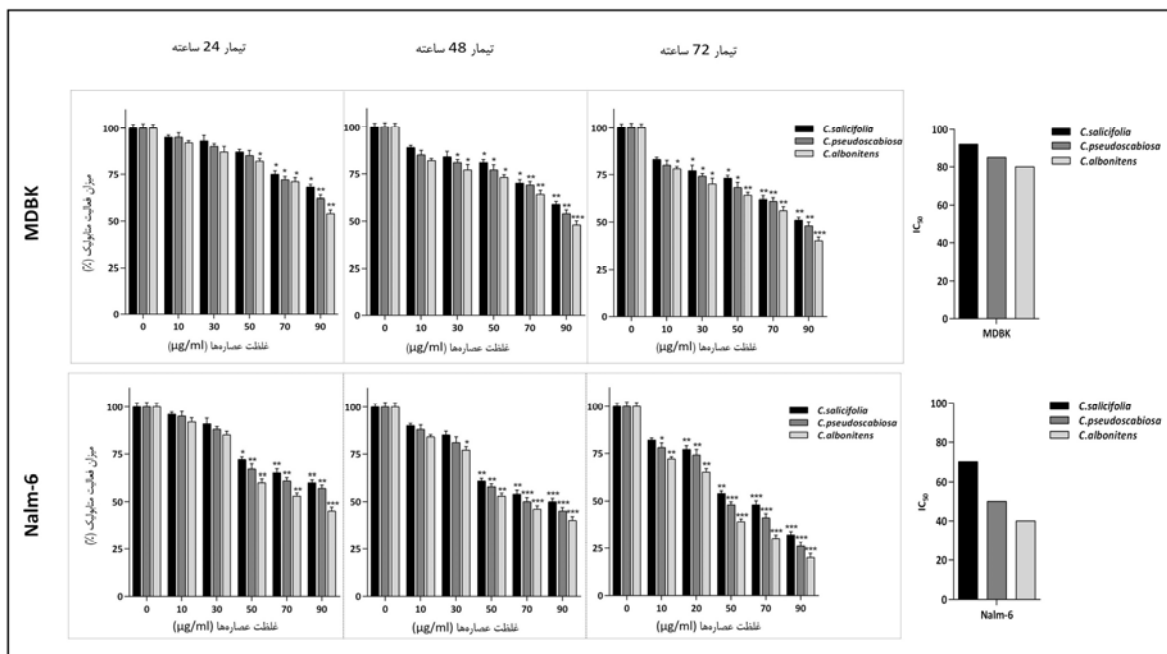
Centaurea، به صورت وابسته به دوز و زمان فعالیت متابولیک سلول‌های Nalm-6 تیمار شده را در مقایسه با سلول‌های کنترل به شکل قابل توجهی کاهش می‌دهد، به گونه‌ای که بیشترین کاهش فعالیت متابولیک را در سلول‌های تیمار شده با *C. albonitens* و بعد از آن به ترتیب *C. pseudoscabiosa* و *C. salicifolia* مشاهده کردیم. همان‌طور که در شکل شماره ۲ نشان داده شده است؛ در حالی که غلظت ۷۰ µg/ml عصاره *C. albonitens* میزان فعالیت متابولیک سلول‌های Nalm-6 را پس از گذشت ۴۸ ساعت به ۴۵٪ کاهش داده است، *C. pseudoscabiosa* و *C. salicifolia* این شاخص را در این رده سلولی به ترتیب به

میزان زندهمانی سلول‌های Nalm-6 را به ترتیب به ۴۲ و ۳۷ درصد کاهش داده است، در حالی که *C. albonitens* در همین غلظت این شاخص را به ۲۵ درصد رسانده است. به علاوه تیمار سلول‌های MDBK به عنوان رده سلولی نرمال، کاهش مختصری در میزان زندهمانی سلول‌های MDBK نسبت به سلول‌های لوسمیک Nalm-6 نشان داد.

مقایسه تأثیر عصاره متانلی سه گونه *Centaurea* بر فعالیت متابولیک سلول‌های Nalm-6 و MDBK

نتایج به دست آمده از بررسی فعالیت متابولیک سلولی با روش MTT حاکی از آن است که گونه‌های مختلف





شکل شماره ۲- بررسی و مقایسه میزان فعالیت متابولیک سلول‌های Nalm-6 و MDBK پس از تیمار با عصاره‌های متانلی *C. albonitens*. *C. salicifolia* و *C. pseudoscabiosa*. (*، بیانگر $P < 0.05$ ، **، بیانگر $P < 0.01$ و ***، بیانگر $P < 0.001$).

نسبت به کنترل را به ترتیب به ۱۰، ۲۱ و ۲۵ درصد رساندند. همان‌طور که مشاهده می‌کنید؛ بر خلاف سلول‌های Nalm-6، سلول‌های نرمال MDBK حساسیت بسیار کمی نسبت به هر سه عصاره متانلی نشان دادند.

تأیید اثرات سایتوتوکسیک و آنتی‌پرولیفراتیو عصاره متانلی

C. albonitens با استفاده از رنگ‌آمیزی DAPI

تصاویر حاصل از مطالعه میکروسکوپی، به شکلی واضح بیان‌گر کاهش تعداد سلول‌ها و ایجاد تغییرات مورفولوژیک همچون چروکیدگی هسته و تشکیل اجسام آپوپتوتیک در سلول‌های Nalm-6 تیمار شده با عصاره *C. albonitens* در مقایسه با سلول‌های کنترل می‌باشند که به ترتیب تأییدکننده مهار تکثیر سلولی و القاء مرگ سلولی به صورت وابسته به دوز هستند (شکل شماره ۴).

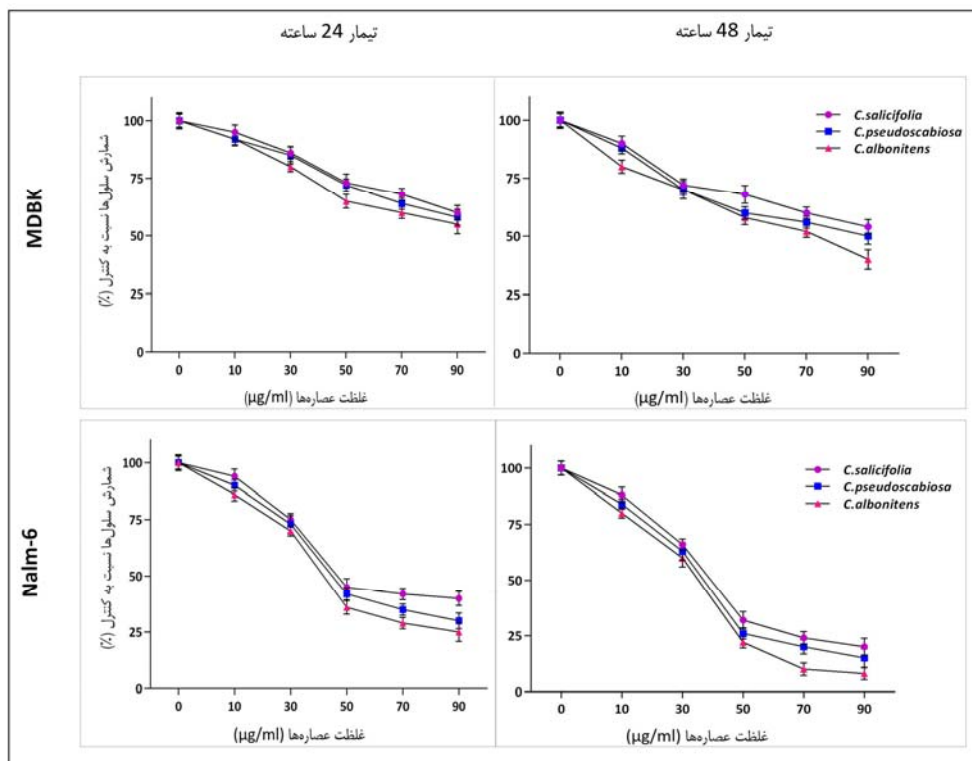
۵۲ و ۵۶ درصد رساندند. نتایج حاصل از بررسی فعالیت متابولیک سلول‌های MDBK در تأیید آزمون بررسی زنده‌مانی با روش تریپان بلو نشان‌دهنده کاهش مختصری در میزان فعالیت متابولیک این سلول‌ها نسبت به رده سلولی Nalm-6 پس از تیمار با هر سه عصاره متانلی می‌باشد.

بررسی و مقایسه اثر مهاری عصاره متانلی سه گونه

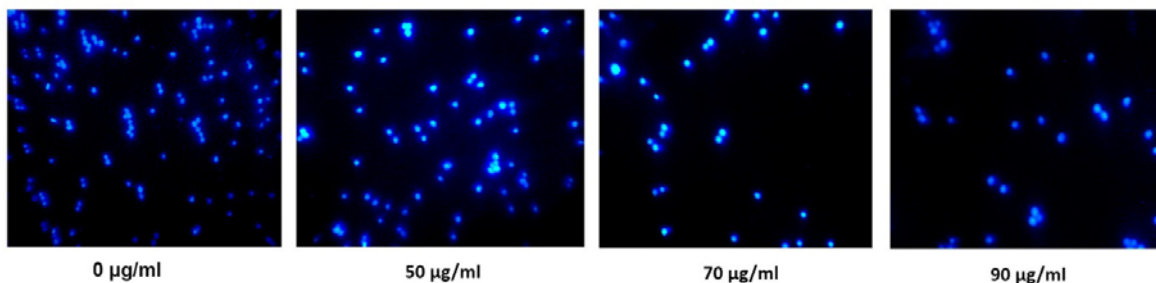
Centaurea بر تکثیر سلول‌های Nalm-6 و MDBK

همان‌طور که در شکل شماره ۳ مشخص شده است؛ نتایج این بررسی بیان‌گر کاهش درصد تعداد هر دو رده سلولی نسبت به کنترل پس از تیمار با هر سه گونه *Centaurea* به صورت وابسته به دوز و زمان بوده است، هرچند گونه *C. albonitens* اثر مهاری بیشتری بر تکثیر سلولی نشان داد. به این صورت که غلظت ۷۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره‌های *C. albonitens*، *C. pseudoscabiosa* و *C. salicifolia* پس از ۴۸ ساعت درصد تعداد سلول‌های Nalm-6 تیمار شده





شکل شماره ۳- بررسی اثر عصاره‌های *C. salicifolia* و *C. pseudoscabiosa*، *C. albonitens* بر شمارش سلولی در سلول‌های MDBK و Nalm-6.



شکل شماره ۴- تأیید اثر سایتوتوکسیک و آنتی‌پرولیفراتیو عصاره *C. albonitens* بر سلول‌های Nalm-6 توسط رنگ فلورسنت DAPI

سلول‌های فاز G1 را از ۳۶ درصد در سلول‌های کنترل به ترتیب به ۴۰، ۵۲ و ۵۴ درصد افزایش داده است، حال آنکه میزان جمعیت سلولی فاز S در غلظت‌های ذکر شده از ۴۲ درصد در سلول‌های کنترل به ترتیب به ۳۹، ۲۲ و ۱۲ درصد کاهش پیدا کرده است. به علاوه افزایش درصد جمعیت سلولی فاز sub-G1، القاء مرگ و میر وابسته به دوز را در سلول‌های تیمار شده Nalm-6 در مقایسه با کنترل نشان می‌دهد.

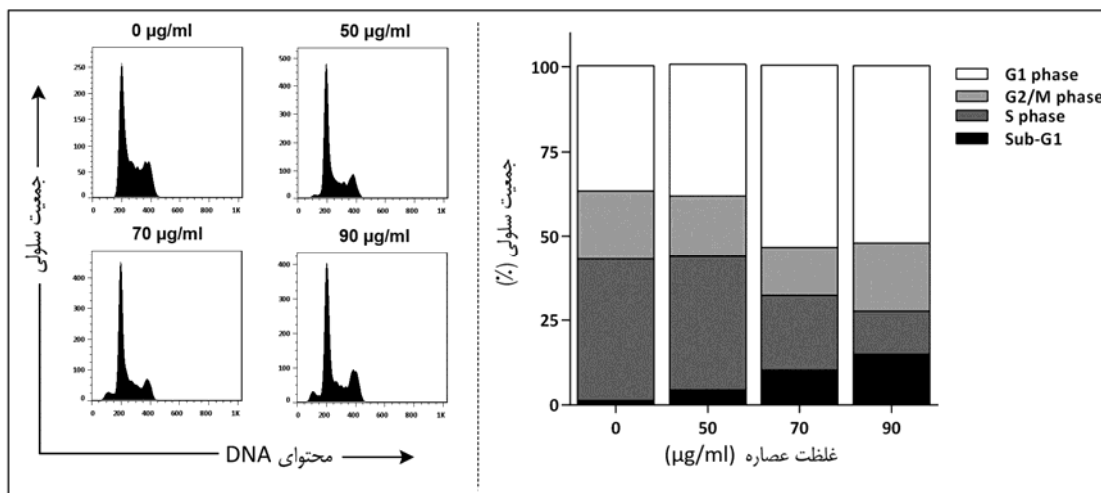
تأثیر عصاره متانلی *C. albonitens* بر فازهای مختلف

چرخه سلولی در سلول‌های Nalm-6

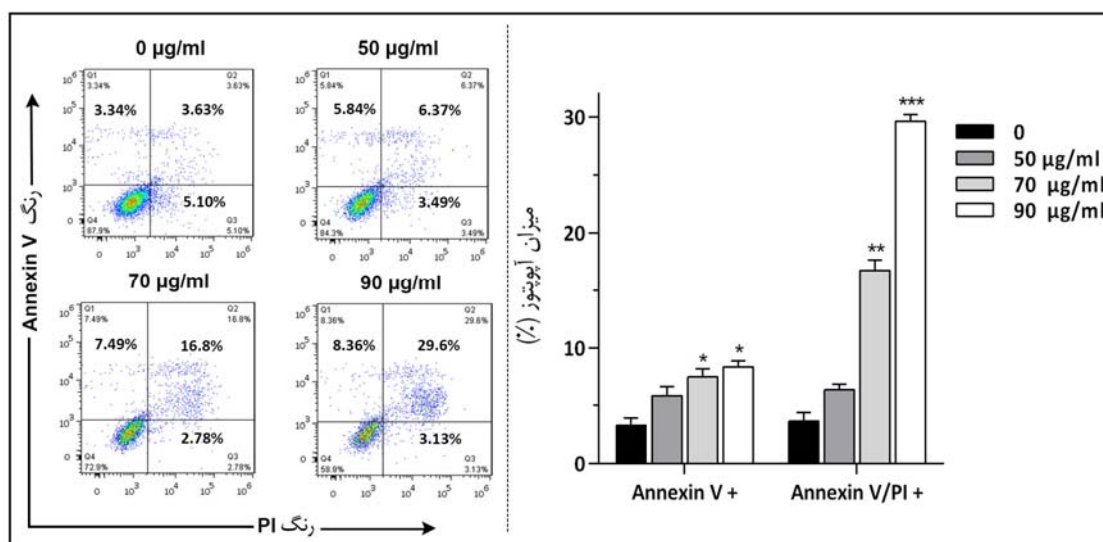
همانگونه که در شکل شماره ۵ مشخص شده است؛ عصاره متانلی *C. albonitens* به صورت وابسته به دوز منجر به افزایش جمعیت سلولی در فاز G1 و همچنین کاهش جمعیت سلولی فاز S شده است که خود نشان‌دهنده توقف چرخه سلولی در فاز G1 به صورت وابسته به دوز می‌باشد. به گونه ای که غلظت‌های ۵۰، ۷۰ و ۹۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، درصد

۹۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از ۳/۳۴ درصد در سلول‌های کنترل تنها به ۸/۵۴ درصد تغییر پیدا کرده است، حال آنکه میزان سلول‌های آنکسین PI/V مثبت از ۳/۶۳ درصد در کنترل به ۲۹/۳۵ درصد افزایش یافته است. یافته‌های ما نشانگر این موضوع است که عصاره *C. albonitens* سایتوتوکسیک خود را بر سلول‌های Nalm-6 با القاء آپوتوز اولیه و بخصوص آپوتوز تأخیری اعمال می‌کند.

تأیید القاء آپوتوز با روش فلوسایتومتری آنکسین PI/V همان‌گونه که در شکل شماره ۶ نشان داده شده است؛ عصاره *C. albonitens* قادر به افزایش قابل توجه آپوتوز در سلول‌های Nalm-6 به صورت وابسته به دوز می‌باشد، به گونه ای که این عصاره نه تنها باعث افزایش سلول‌های آنکسین V مثبت می‌شود، بلکه به شکل بارزتری درصد سلول‌های آنکسین PI/V مثبت را افزایش می‌دهد. همان‌گونه که مشاهده می‌شود؛ درصد سلول‌های آنکسین V مثبت طی تیمار سلولی با غلظت



شکل شماره ۵- بررسی اثر عصاره متانلی *C. albonitens* بر فازهای مختلف چرخه سلول‌های Nalm-6.



شکل شماره ۶- بررسی اثر عصاره متانولی *C. albonitens* بر القاء مرگ سلولی در رده سلولی Nalm-6. (*، بیانگر $P < 0.05$ ، **، بیانگر $P < 0.01$ و ***) بیانگر $P < 0.001$.



بحث

عنوان رده سلولی نرمال نشان داد که این جنس گیاه علی‌رغم خاصیت سایتوتوکسیک بر رده سلولی لوسمیک Nalm-6، تأثیر سمیت کمی بر سلول‌های نرمال دارد.

در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۷ توسط Nahed El-najjar و همکارانش بر روی تأثیر گونه‌ای از *Centaurea* در رده سلولی HCT-116 صورت گرفت، نشان داد که این عصاره گیاهی اثر سایتوتوکسیک خود را با القاء آپوپتوز اعمال می‌کند [۱۷]. نتایج حاصل از مطالعه ما نیز تأییدکننده این موضوع است که عصاره این گیاه به صورت وابسته به دوز و زمان قادر به القاء آپوپتوز در سلول‌های لوسمیک Nalm-6 می‌باشد. همچنین در مطالعه دیگری که در همان سال Akram Ghatous و همکارانش انجام دادند، تأثیر گونه‌ای متفاوت *Centaurea* بر رده سلولی SP1 و PAM212 مورد بررسی قرار گرفت. مطالعه اخیر بیانگر این موضوع بوده است که این عصاره گیاهی علاوه بر القاء آپوپتوز قادر به مهار تکثیر سلولی از طریق توقف در فاز G1 می‌باشد [۳۱]. بررسی چرخه سلولی در این مطالعه نیز نتایج مشابه‌ای نشان داد، به گونه‌ای که این عصاره با توقف تکثیر در فاز G1 چرخه سلولی و کاهش درصد فاز S، در نهایت منجر به آپوپتوز و در نتیجه افزایش جمعیت سلولی فاز sub-G1 می‌شود. نتایج حاصل از آزمون‌های فلوسایتومتریک بررسی چرخه سلولی و رنگ‌آمیزی آنکسین PI/V تأییدکننده نتایج حاصل از آزمون‌های تریپان بلو و MTT مبنی بر مهار تکثیر و کاهش بقاء رده سلولی مشتق شده از لوسمی لنفوبلاستیک حاد Nalm-6 بوده است.

به طور کلی، به نظر می‌رسد که گونه‌های مختلف *Centaurea* مورد مطالعه ما با تأثیر سایتوتوکسیک بسیار ناچیز بر سلول‌های نرمال قادرند به صورت کارآمد تأثیر آپوپتوتیک و آنتی‌پرولیفراتیو خود را بر سلول‌های لوسمیک Nalm-6 اعمال کنند. از این رو می‌توان این جنس گیاهی را به عنوان عاملی سایتوتوکسیک بر رده سلولی Nalm-6 برای بررسی‌های بیشتر جهت یافتن مکانیسم مولکولی پیشنهاد کرد.

عوارض جانبی شدید و مقاومت به درمان از اصلی‌ترین مشکلات داروهای شیمی‌درمانی حال حاضر به شمار می‌آیند. از این رو امروزه مطالعات گسترده‌ای جهت یافتن عوامل درمانی مکمل یا جایگزین برای درمان سرطان‌ها از جمله ALL انجام می‌شود [۱۹]. بخش عمده‌ای از مطالعات در این زمینه، اثرات سایتوتوکسیک گیاهان و مشتقات آنها را بر رده‌های سلولی سرطانی، نمونه‌های حیوانی و در مراحل نهایی داوطلبان انسانی مورد بررسی قرار داده‌اند [۲۹-۲۷]. به گونه‌ای که بخش قابل توجه‌ای از داروهای بازدارنده یا درمان‌کننده سرطان امروزی از ترکیبات گیاهی ساخته شده‌اند [۳۰]. به همین دلیل ما بر آن شدیم که اثر سایتوتوکسیک *Centaurea* به عنوان جنسی از خانواده‌ی گیاهان دارویی Asteraceae که در مطالعات پیشین اثر ضدسرطان آنها در چندین رده سلولی نشان داده شده است را بر رده سلولی لوسمی لنفوبلاستیک حاد Nalm-6 مورد مطالعه قرار دهیم.

نتایج حاصل از بررسی سه گونه متفاوت *Centaurea* در این مطالعه، بیانگر قدرت سایتوتوکسیک و آنتی‌پرولیفراتیو این جنس گیاهی بر سلول‌های مشتق شده از لوسمی لنفوبلاستیک حاد می‌باشد. همان‌طور که در نتایج مربوط به MTT و تریپان-بلو نشان داده شده است (شکل‌های شماره ۱-۳)؛ عصاره متانلی بخش‌های هوایی سه گونه جنس *Centaurea* نقش بسزایی در کاهش بقاء و تعداد سلول‌های Nalm-6 تیمار شده با غلظت‌های بالای ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، به صورت وابسته به دوز و زمان داشتند. مطالعات بیشمار هم‌راستا با نتایج این مطالعه، اثرات سایتوتوکسیک و آنتی‌پرولیفراتیو عصاره گونه‌های مختلف *Centaurea* را بر سلول‌های سرطانی COLO320، MIA PaCa-2، MCF-7، CaCo2 نشان داده‌اند [۳۱، ۱۷، ۱۵، ۱۲]. این در حالی است که در مطالعه حاضر غلظت‌های پایین‌تر عصاره نتایج مشابه‌ای نشان دادند. لازم به ذکر است که بررسی سلول‌های MDBK به



1. Inaba H, Greaves M and Mullighan CG. Acute lymphoblastic leukaemia. *The Lancet*. 2013; 381 (9881): 1943-55.
2. Lei J, Li Q, Gao Y, Zhao L and Liu Y. Increased PKC α activity by Rack1 overexpression is responsible for chemotherapy resistance in T-cell acute lymphoblastic leukemia-derived cell line. *Scientific Reports* 2016; 6.
3. Yang Y, Zhang Z, Li S, Ye X, Li X and He K. Synergy effects of herb extracts: pharmacokinetics and pharmacodynamic basis. *Fitoterapia* 2014; 92: 133-47.
4. Prakash O, Kumar A and Kumar P. Anticancer potential of plants and natural products: a review. *American Journal of Pharmacological Sciences* 2013; 1 (6): 104-15.
5. Nirmala MJ, Samundeeswari A and Sankar PD. Natural plant resources in anti-cancer therapy-A review. *Research in Plant Biology* 2011; 1 (3).
6. Gach K, Długosz A and Janecka A. The role of oxidative stress in anticancer activity of sesquiterpene lactones. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacol.* 2015; 388 (5): 477-86.
7. Gülcemal D, Alankuş-Çalışkan Ö, Karaalp C, Örs AU, Ballar P and Bedir E. Phenolic glycosides with antiproteasomal activity from *Centaurea urvillei* DC. subsp. *urvillei*. *Carbohydrate Res.* 2010; 345 (17): 2529-33.
8. Sak K. Cytotoxicity of dietary flavonoids on different human cancer types. *Pharmacognosy Reviews* 2014; 8 (16): 122.
9. Shabestari ESB, Attar F, Riahi H and Sheidai M. Pollen morphology of *Centaurea L.* (Asteraceae) in Iran. *Acta Botanica Brasilica* 2013; 27 (4): 669-79.
10. Esmacili S, Naghibi F, Mosaddegh M, Sahranavard S, Ghafari S and Abdullah NR. Screening of antiplasmodial properties among some traditionally used Iranian plants. *Journal of Ethnopharmacol.* 2009; 121 (3): 400-4.
11. Forgo P, Zupkó I, Molnár J, Vasas A, Dombi G and Hohmann J. Bioactivity-guided isolation of antiproliferative compounds from *Centaurea jacea L.* *Fitoterapia* 2012; 83 (5): 921-5.
12. Shoeb M, Celik S, Jaspars M, Kumarasamy Y, MacManus SM, Nahar L and et al. Isolation, structure elucidation and bioactivity of schischkiniin, a unique indole alkaloid from the seeds of *Centaurea schischkiniii*. *Tetrahedron* 2005; 61 (38): 9001-6.
13. Rodríguez A, Mendia A, Sirvent J-M, Barcenilla F, de la Torre-Prados MV, Solé-Violán J and et al. Combination antibiotic therapy improves survival in patients with community-acquired pneumonia and shock. *Critical Care Medicine* 2007; 35 (6): 1493-8.
14. Surh Y-J. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nature Reviews Cancer* 2003; 3 (10): 768.
15. Chicca A, Tebano M, Adinolfi B, Ertugrul K, Flamini G and Nieri P. Anti-proliferative activity of aguerin B and a new rare nor-guaianolide lactone isolated from the aerial parts of *Centaurea deflexa*. *European Journal of Medicinal Chem.* 2011; 46 (7): 3066-70.
16. Csapi B, Hajdú Z, Zupkó I, Berényi Á, Forgo P, Szabó P and et al. Bioactivity-guided isolation of antiproliferative compounds from *Centaurea arenaria*. *Phytotherapy Res.* 2010; 24 (11): 1664-9.
17. El-Najjar N, Dakdouki S, Darwiche N, El-Sabban M, Saliba NA and Gali-Muhtasib H. Anticancer effects of Salograviolide A isolated from *Centaurea ainetensis*. *Oncology Reports* 2008; 19 (4): 897-904.
18. Trusheva B, Trunkova D and Bankova V. Different extraction methods of biologically active components from propolis: a preliminary study. *Chemistry Central J.* 2007; 1 (1): 13.
19. Darvishi M, Esmacili S, Dehghan-Nayeri N, Mashati P and Gharehbaghian A. Anticancer effect



- and enhancement of therapeutic potential of Vincristine by extract from aerial parts of *Juniperus excelsa* on pre-B acute lymphoblastic leukemia cell lines. *Journal of Applied Biomedicine*. 2017; 15 (3): 219-226.
- 20.** Tennant JR. Evaluation of the trypan blue technique for determination of cell viability. *Transplantation*. 1964; 2 (6): 685-94.
- 21.** Gerlier D and Thomasset N. Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. *Journal of Immunological Methods* 1986; 94 (1-2): 57-63.
- 22.** Kapuscinski J. DAPI: a DNA-specific fluorescent probe. *Biotechnic & Histochem*. 1995; 70 (5): 220-33.
- 23.** Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H and Reutellingsperger C. A novel assay for apoptosis flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled annexin V. *Journal of Immunological Methods* 1995; 184 (1): 39-51.
- 24.** Labarca C and Paigen K. A simple, rapid, and sensitive DNA assay procedure. *Analytical Biochem*. 1980; 102 (2): 344-52.
- 25.** Bryman A and Cramer D. Quantitative data analysis with IBM SPSS 17, 18 and 19: Routledge; 2011.
- 26.** Motulsky H. Analyzing data with GraphPad prism: GraphPad Software Incorporated; 1999.
- 27.** Greenwald P. Science, medicine, and the future: cancer chemoprevention. *BMJ: British Medical Journal* 2002; 324 (7339): 714.
- 28.** Newman DJ and Cragg GM. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *Journal of Natural Products* 2012; 75 (3): 311-35.
- 29.** Kaczirek K, Schindl M, Weinhausel A, Scheuba C, Passler C, Prager G and et al. Cytotoxic activity of camptothecin and paclitaxel in newly established continuous human medullary thyroid carcinoma cell lines. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2004; 89 (5): 2397-401.
- 30.** Cragg GM and Newman DJ. Plants as a source of anti-cancer agents. *Journal of Ethnopharmacol*. 2005; 100 (1): 72-9.
- 31.** Ghantous A, Tayyoun AA, Lteif GA, Saliba NA, Gali-Muhtasib H, El-Sabban M and et al. Purified Salograviolide A isolated from *Centaurea ainetensis* causes growth inhibition and apoptosis in neoplastic epidermal cells. *International Journal of Oncol*. 2008; 32 (4): 841-9.



Cytotoxicity of Three Species of *Centaurea* Genus on Acute Lymphoblastic Leukemia Cell Line (Nalm-6)

Bahmani F (M.Sc.)¹, Esmaeili S (Ph.D.)², Bashash D (Ph.D.)³, Gharehbaghian A (Ph.D.)^{3*}

1- Department of Hematology and Blood Banking, School of Allied Medicine Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

2- Traditional Medicine and Materia Medica Research Center (TMRC), School of Traditional Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

3- Pediatric Congenital Hematologic Disorders Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

*Corresponding author: Department of Hematology and Blood banking, School of Allied Medical Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Darband St., Qods Sq., P.O.Box: 15468-15514, Tehran, Iran

Tel: +98-21-22721150; Fax: +98-21-22731999

E-mail: gharehbaghian@sbmu.ac.ir

Abstract

Background: Medicinal plants are considered as one of the ideal therapeutic sources for cancer prevention or treatment due to their bioactive contents and low side effects to humans. *Centaurea* genus have shown potential anti-tumor activity on some cancer cell lines in previous studies.

Objective: The aim of this study was to evaluate the cytotoxic effect of three species of *Centaurea* genus (*C. albonitens*, *C. pseudoscabiosa*, *C. salicifolia*) on Nalm-6 cells.

Methods: Nalm-6 cells were treated with increasing concentrations of the methanolic extracts of the aerial parts of three *Centaurea* species, then, their cytotoxic and anti-proliferative effects were evaluated using trypan blue, MTT and DAPI staining assays. Moreover, annexin V/PI staining and cell cycle analysis were performed for further investigation.

Results: The results of trypan blue, MTT assay and DAPI staining revealed that all 3 extracts exhibit cytotoxic and anti-proliferative properties against Nalm-6 cells in a dose- and time-dependent manner ($P \leq 0.001$). Interestingly, there was no considerable cytotoxicity in normal cells, MDBK. The flow cytometric analysis validated that *Centaurea* dose dependently induces apoptosis and G1 phase arrest in Nalm-6 cells ($P \leq 0.01$).

Conclusion: Due to the safety profile of the natural products, our study suggests that *Centaurea* extracts might provide insight into a novel therapeutic strategy and may confer advantages for acute lymphoblastic leukemia treatment, however further researches are necessary.

Keywords: *Centaurea*, Acute Lymphoblastic Leukemia, Apoptosis, MDBK, Nalm-6

