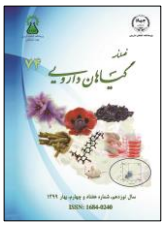
فصلنامه گیاهان دارویی

Journal homepage: www.jmp.ir

پژوهشکده گیاهان دارویی
جهاد دانشگاهی



مقاله تحقیقاتی

اثر گایلاردین بر تکثیر و مرگ سلول‌های سرطانی لوسمی لنفوبلاستیک حاد رده سلولی Nalm-6

افشین کرمی[۱]، مریم حمزه‌لومقدم[۲]، امیر یامی[۱]، محی‌الدین برزگر[۱]، پرگل مشاتی[۱]، احمد قره‌باغیان[۳،*]

[۱] گروه خون‌شناسی آزمایشگاهی و بانک خون، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

[۲] دانشکده طب سنتی و مرکز تحقیقات طب سنتی و مفردات پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

[۳] دانشکده پیراپزشکی و مرکز تحقیقات بیماری کودکان مادرزادی خونی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

اطلاعات مقاله

گل‌واژگان:
Inula-oculus-christi
آپوپتوز
گایلاردین
لنفوبلاستیک
لوسمی

چکیده

مقدمه: در سال‌های اخیر به دلیل افزایش مقاومت به داروهای شیمی درمانی، استفاده از ترکیبات طبیعی مورد توجه قرار گرفته است. مصفای چشم مسیح (*Inula oculus-christi* L.) یکی از گونه‌های گیاهی از خانواده کامپوزیته (Asteraceae) می‌باشد که در حوزه طب سنتی نیز این گونه دارای اهمیت زیادی است. علاوه بر این، در مطالعات اخیر مشاهده شده که عصاره‌ی این گیاه دارای اثر سایتوتوکسیک روی سلول‌های سرطان سینه است. **هدف:** در این مطالعه اثر سایتوتوکسیک گایلاردین بر روی رده سلولی لوسمی لنفوبلاستیک حاد مورد بررسی قرار گرفت. **روش بررسی:** گایلاردین از بخش‌های هوایی گیاه مصفای چشم مسیح استخراج شد. اثر سایتوتوکسیک آن روی رده لوسمی لنفوبلاستیک حاد Nalm-6 و PBMC به عنوان رده سلولی نرمال در دوزهای مختلف برای ۲۴ و ۴۸ ساعت بررسی شد. در این مطالعه از آزمون‌های تریپان بلو، MTT و رنگ‌آمیزی DAPI استفاده شد. همچنین جهت شناخت مکانیسم مرگ سلولی از آزمون فلوسیتومتری *Annexin V-PI* استفاده شد. **نتایج:** نتایج حاصل از آزمون‌های blue Trypan و MTT بیانگر القاء آپوپتوز و کاهش تکثیر در سلول‌های Nalm-6 تیمار شده با گایلاردین به صورت وابسته به دوز و زمان بود ($P < ۰/۰۰۱$). این در حالی است که در رده سلولی PBMC حساسیت نسبت به غلظت‌های مختلف گایلاردین کم بود. نتایج رنگ‌آمیزی DAPI و آنالیز داده‌های فلوسایتومتری نیز تأییدی بر القاء آپوپتوز در رده سلولی Nalm-6 بود ($P < ۰/۰۰۱$). **نتیجه‌گیری:** با توجه به نتایج حاصل، گایلاردین دارای اثر سایتوتوکسیک بر روی سلول‌های رده لوسمی لنفوبلاستیک حاد Nalm- 6 می‌باشد اما برای اثبات اثربخشی آن به عنوان یک عامل مکمل در درمان این لوسمی مطالعات بیشتری نیاز است.

مخففها: Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL)؛ Sesquiterpene Lactones (Sls)؛ Fetal Bovine Serum (FBS)؛ 4',6- (DAPI)؛ Diamidino-2-Phenylindole
Peripheral Blood Mononuclear Cell (PBMC)؛

* نویسنده مسؤول: gharehbaghian@sbmu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۱ شهریور ۱۳۹۷؛ **تاریخ دریافت اصلاحات:** ۲۲ دی ۱۳۹۷؛**تاریخ پذیرش:** ۸ بهمن ۱۳۹۷

doi: 10.29252/jmp.19.74.108

© 2020. Open access. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)

۱. مقدمه

لوسمی لنفوبلاستیک حاد (ALL) یک نوع بدخیمی خونی همراه با تکثیر سلول‌های پیش‌ساز لنفوئیدی در خون و مغز استخوان است [۱]. این لوسمی دومین لوسمی حاد شایع در بزرگسالان است، به شکلی که در کشور امریکا سالیانه ۶۵۰۰ مورد شناسایی می‌شود و فراوانی شیوع آن به صورت دو موج است که موج اول شیوع در دوران کودکی و موج دوم در حدود سن ۵۰ سالگی می‌باشد [۲]. با این وجود، این بدخیمی در کودکان با پیش آگهی مطلوب و میزان بقا ۹۰ درصد همراه است اما در بزرگسالان به صورت یک بیماری کشنده بروز می‌یابد [۳]. امروزه با وجود نرخ بالای پاسخ به درمان در کودکان، تنها ۳۰-۴۰ درصد از بیماران بزرگسال مبتلا به ALL به بهبودی طولانی مدت دست می‌یابند [۴]. یکی از درمان‌های رایج در این بیماران شیمی درمانی است اما همان‌طوری که می‌دانیم این نوع درمان دارای عوارضی از جمله سرکوب شدید سیستم ایمنی، پوکی استخوان و غیره است که باعث ایجاد مشکلاتی برای این بیماران می‌شود. از آنجایی که گیاهان دارویی به علت داشتن منشأ طبیعی نسبت به داروهای شیمیایی دارای سازگاری بیشتری با ارگانیسم‌های زنده از جمله بدن انسان هستند و عوارض جانبی کمتری هم ایجاد می‌کند بنابراین، به عنوان منبع مکملی برای داروهای شیمی درمانی مورد توجه هستند [۵].

گیاهان مدت زمان زیادی است کـه در درمان بیماری‌های مختلف استفاده می‌شوند اما استفاده از داروهای گیاهی در زمینه سرطان به تازگی مورد توجه قرار گرفته است، به طوری که مطالعات مختلفی برای بررسی خواص ضدتوموری داروهای گیاهی در کشورهای مختلف انجام شده است. این ترکیبات می‌توانند باعث مهار رشد و در نتیجه مرگ سلول‌های سرطانی شوند. همچنین با توجه به اثرات طولانی مدت و پایدار، عوارض جانبی کمتر و به صرفه بودن از لحاظ اقتصادی، این منابع گیاهی می‌توانند جایگزین یا مکمل مطلوب برای داروهای سنتتیک باشند [۶]. تقریباً ۵۵ درصد داروهایی که در بالین به عنوان ضـدسرطان استفاده می‌شوند، از منابع طبیعی به دست آمـده یـا با آن مرتبط هستند [۷].

اینولا یکی از گونه‌های بزرگ در خانواده کامپوزیته یا Asteraceae می‌باشد که دارای بیش از صد زیرگونه است و عمدتاً در قاره‌های آفریقا، آسیا و اروپا یافت می‌شوند. در برخی از کشورهای آسیایی تقریبا ۱۶ گونه از اینولا به عنوان گیاهان مورد استفاده در طب سنتی شناسایی شده است [۸]. سزکوئی ترپن لاکتون‌ها (SLs) یک دسته از متابولیت‌های ثانویه هستند که به طور گسترده در طب سنتی برای درمان بیماری‌های انسانی مانند التهاب، سردرد و عفونت استفاده می‌شوند [۹].

گایلاردین یک سزکوئی ترپن لاکتون است که برای اولین بار در سال ۱۹۶۹ در کشور جمهوری سوسیالیستی آذربایجان شوروی استخراج شد و در کشور ما نیز برای اولین بار توسط مرکز تحقیقات طب سنتی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی استخراج شد [۱۰]. در سال‌های اخیر مطالعاتی بر روی فعالیت سایتوتوکسیک گایلاردین در رده‌های سلولی MCF-7، HepG-2 و A-542 انجام گرفته و به دلیل توانایی عصاره مذکور در القا آپوپتوز امکان کاربرد این ترکیب برای درمان بدخیمی‌ها از جمله لوسمی مطرح می‌باشد [۱۱]. در این راستا ما از گایلاردین برای بررسی اثر سایتوتوکسیک آن روی سلول‌های لوسمی حاد لنفوبلاستیک استفاده کردیم.

۲. مواد و روش‌ها

۱.۲. آماده‌سازی عصاره

در یک مطالعه بنیادی، گیاه مصفای چشم مسیح با کد هرباریومی TMRC ۲۶۵۸ از مناطق جنگلی استان گلستان در فصل بهار جمع‌آوری شد. تشخیص این گیاه توسط حمزه‌لو مقدم و همکارانش در مرکز تحقیقات طب سنتی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تهران، ایران انجام گرفت. ۲۵۰ گرم از پودر خشک شده بخش‌های هوایی این گیاه را با ۲۵۰۰ میلی‌لیتر از

محلول n هگزان با روش خیساندن (maceration) به مدت ۲۴ ساعت عصاره‌گیری شد. سپس عصاره به دست آمده را فیلتر کرده و باقی‌مانده آن دوباره با محلول تازه تریس خیسانده شد. این عمل برای ۳ بار متوالی انجام شد و سپس مخلوط عصاره تغلیظ شده با کلروفرم برای جداسازی گایلاردین مورد استفاده قرار گرفت. در ادامه به منظور جداسازی اجزای تشکیل‌دهنده عصاره، از روش کروماتوگرافی مایع در خلأ (VLC) استفاده شد و با استفاده از روش استخراج فاز جامد (SPE) پره پراتیو، ترکیبات فراکسیون‌های به دست آمده مورد آنالیز قرار گرفتند. سرانجام، ترکیب خالص گایلاردین به صورت کریستالیزه جداسازی شد [۱۳، ۱۲].

برای آماده‌سازی گایلاردین و رساندن آن به غلظت مورد نظر، ابتدا میزان ۵ میلی‌گرم از آن را با ۱ میلی‌لیتر از DMSO استریل حل کرده (غلظت نهایی استوک اولیه ۱۶/۳ میلی‌مولار بود.)، سپس با رقیق کردن‌های متوالی استوک اولیه غلظت‌های نهایی موردنیاز به دست آمد. همچنین باید به این نکته اشاره کرد که با توجه به رقیق‌سازی‌های متوالی استوک اولیه، غلظت نهایی DMSO به زیر ۰/۰۱ رسید. بنابراین، نیازی به کنترل DMSO نیست.

۲.۲. *کشت سلولی و تیمار سلول*

مطالعه انجام شده از نوع تجربی می‌باشد و از رده سلولی Nalm-6 مربوط به لوسمی لنفوبلاستیک حاد و PBMC به عنوان رده سلولی نرمال استفاده شد. به منظور کشت سلولی ابتدا سلول‌ها از تانک ازت خارج و یخ زدایی شدند، سپس در محیط کشت RPMI-1640 حاوی ۱۰ درصد FBS و ۱ درصد پن استرپ کشت داده شدند. فلاسک‌های کشت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد با ۵ درصد CO_2 انکوبه شدند. بعد از این که سلول‌ها به قدر کافی رشد کردند، سلول‌های Nalm-6 و PBMC با غلظت‌های ۲ تا ۸ میکرومولار از گایلاردین به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت تیمار شدند. غلظت‌های مختلف عصاره با استفاده از محیط کشت استریل تهیه شدند و همه آزمایش‌ها برای افزایش دقت کار سه بار تکرار شدند [۵].

۳.۲. *رنگ‌آمیزی تریپان بلو*

برای شمارش سلول‌های زنده جهت بررسی میزان بقاء و تکثیر سلول‌های تیمار شده نسبت به کنترل از رنگ‌آمیزی تریپان بلو و لام هموسایتومتر (لام نئوبار) استفاده شد. پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت از کشت سلول‌ها با غلظت‌های ۸، ۶، ۴، ۲ میکرو مولار از گایلاردین، رنگ تریپان آبی به چاهک‌ها اضافه شد و پس از ۳–۵ دقیقه زیر میکروسکوپ بررسی شد. اساس این آزمایش بدین‌ترتیب است که سلول‌های زنده نسبت به ورود رنگ تریپان بلو نفوذناپذیر می‌باشند، درحالی که سلول‌های مرده رنگ را جذب می‌نمایند [۱۴]. میزان زنده‌مانی سلول‌های زنده با فرمول زیر محاسبه شد:

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

۴.۲. *آزمون MTT به منظور سنجش فعالیت متابولیک*

برای ارزیابی تأثیر گایلاردین بر میزان فعالیت متابولیک سلولی، سلول‌های لوسمیک Nalm-6 و نرمال PBMC تیمار شده با دوزهای ۲ تا ۸ میکرو مولار گایلاردین با سه بار تکرار به چاهک‌های پلیت ۹۶ تایی اضافه شدند. پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت انکوباسیون در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد CO_2 دار، به سلول‌های داخل هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر محلول MTT با غلظت ۵ mg/ml اضافه شد و پلیت مجدداً به مدت ۳ ساعت در انکوباتور قرار گرفت. در طی زمان انکوباسیون، رنگ تترازولیوم موجود در پودر MTT بوسیله سوکسینات دهیدروژناز 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 g ۱۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شده و پس از خالی کردن محلول رویی ۱۰ میکرولیتر DMSO برای حل رسوب رنگی فورمازان به هر چاهک اضافه شد و میزان فعالیت متابولیک با استفاده از دستگاه رنگ سنجی ELISA-reader در طول موج ۵۷۰ نانومتر بررسی شد [۱۵].

۲.۵. تشخیص آپوپتوز با استفاده از رنگ‌آمیزی DAPI

این آزمون جهت تأیید اثر سایتوتوکسیک و آنتی پرولیفراتیو عصاره مورد استفاده قرار می‌گیرد. به طور خلاصه، سلول‌ها با غلظت‌های انتخابی ازعصاره تیمار و به مدت ۴۸ ساعت تحت انکوباسیون قرار گرفتند. پس از ۴۸ ساعت، سلول‌ها به مدت ۴ دقیقه در g ۳۵۰ 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. در انتها یک لام از نمونه تهیه و تغییرات مورفولوژیک ناشی از آپوپتوز در هسته سلول‌ها توسط میکروسکوپ فلورسنت مشاهده شد [۱۴].

۲.۶. آزمون فلوسیتومتری به منظور سنجش میزان آپوپتوز

به منظور تأیید آپوپتوز در سلول‌های لوسمیک تحت تأثیر گایلاردین از آزمون فلوسایتومتری آنکسین PI/V استفاده شد. ابتدا سلول‌ها در محیط RPMI حاوی ۱۰ درصد FBS در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد حاوی CO_2 به منظور دسترسی به جمعیت مورد نظر کشت شدند. طبق دستورالعمل کیت برای هر آزمون به ۵۱۰ × ۵ سلول نیاز است. سلول‌ها در پلیت ۶ خانه با غلظت‌های مختلف گایلاردین تیمار شده و به مدت ۴۸ ساعت انکوبه شدند.

بعد از انکوباسیون، سلول‌ها به فالکون منتقل شده و سانتریفیوژ شدند و مایع رویی آن دور ریخته شد. رسوب سلولی پس از یک بار شستشو با PBS، با ۵۰۰ میکرولیتر از بافر باند کننده X ۱ 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 دوباره ۱۰ دقیقه انکوبه شد. سپس نمونه‌ها به ویال‌های مربوط به فلوسایتومتری منتقل شدند و میزان خروج فسفاتیدیل سرین در سطح سلول‌ها توسط دستگاه فلوسایتومتری مورد سنجش قرار گرفت و نتایج توسط نرم‌افزار FlowJo7.6 آنالیز شد [۱۶].

۲.۷. آزمون‌های آماری

آنالیز آماری داده‌ها از روش one-way ANOVA و با کمک نرم‌افزار SPSS 24 و Graph Pad Prism7 استفاده شد [۱۸، ۱۷].

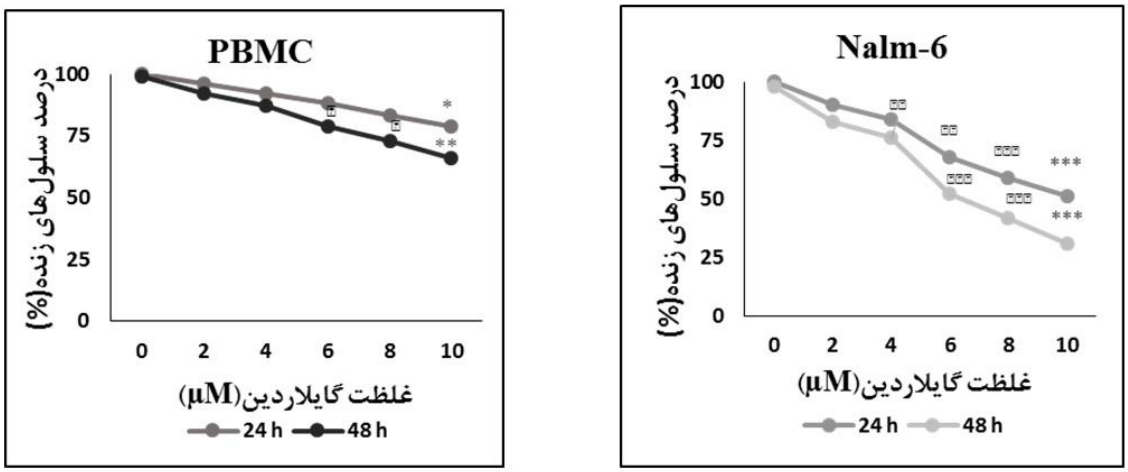
۳. نتایج

۱.۳. اثر گایلاردین بر روی شاخص زنده‌مانی سلول‌های Nalm-6 و PBMC

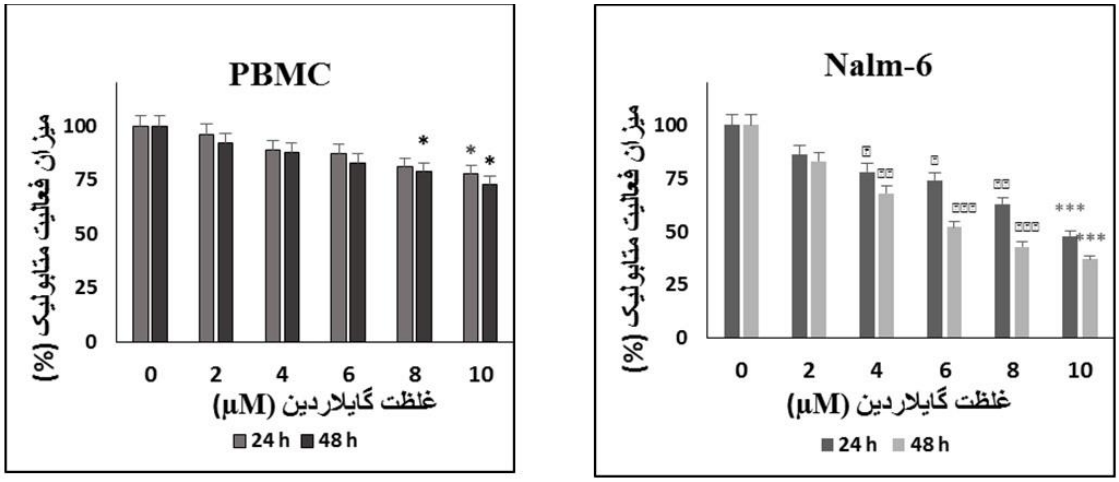
تیمار کردن سلول‌ها با غلظت‌های ۸، ۶، ۴، ۲ میکرومولار از گایلاردین بعد از ۲۴ و ۴۸ ساعت نشان داد که میزان زنده‌مانی سلولی نسبت به گروه کنترل (بدون درمان) به طور قابل توجهی کاهش یافت. همانطور که در شکل ۱ نشان داده شده، گایلاردین به صورت وابسته به دوز و زمان قادر به کاهش درصد زنده‌مانی سلول‌های Nalm-6 می‌باشد. همچنین نشان داده شده است که بیش از ۵۰ درصد سلول‌ها بعد از انکوباسیونبا غلظت ۶ میکرو مولار در طی ۴۸ ساعت دچار آپوپتوز می‌شوند. همچنین در تیمار سلول‌های PBMC به عنوان رده سلولی نرمال، کاهش مختصری در میزان زنده‌مانی سلول‌های PBMC نسبت به سلول‌های لوسمیک Nalm-6 نشان داد.

۲.۳. *اثر گایلاردین بر فعالیت متابولیک سلول‌های Nalm-6 و PBMC*

نتایج به دست آمده از بررسی فعالیت متابولیک سلولی با روش MTT حاکی از آن است که گایلاردین 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. همچنین در شکل ۲ نشان داده شده که بیشترین کاهش در فعالیت متابولیک سلول‌های Nalm-6 با غلظت ۶ میکرو مولار پس از ۴۸ ساعت است. نتایج حاصل از بررسی فعالیت متابولیک در سلول‌های PBMC نیز در تأیید نتایج تریپان بلو نشان‌دهنده کاهش مختصری در میزان فعالیت متابولیک این سلول‌ها نسبت به رده سلولی Nalm-6 پس از تیمار با گایلاردین می‌باشد.



شکل ۱. تأثیر گایلاردین بر شاخص زنده‌مانی سلول‌های Nalm-6 و PBMC.
(* بیانگر $P < ۰/۰۵$، ** بیانگر $P < ۰/۰۱$، *** بیانگر $P < ۰/۰۰۱$).



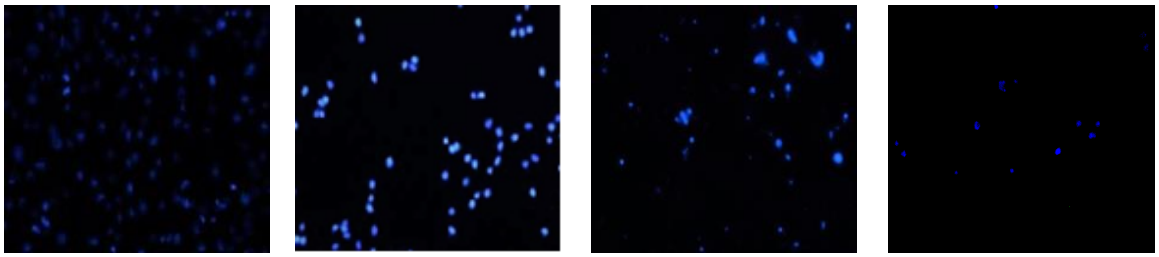
شکل ۲. بررسی و مقایسه میزان فعالیت متابولیک سلول‌های Nalm-6 و PBMC پس از تیمار با گایلاردین.
(* بیانگر $P < ۰/۰۵$، **بیانگر $P < ۰/۰۱$، *** بیانگر $P < ۰/۰۰۱$).

۳.۳. تأیید اثر سایتوتوکسیک گایلاردین با استفاده از رنگ‌آمیزی DAPI

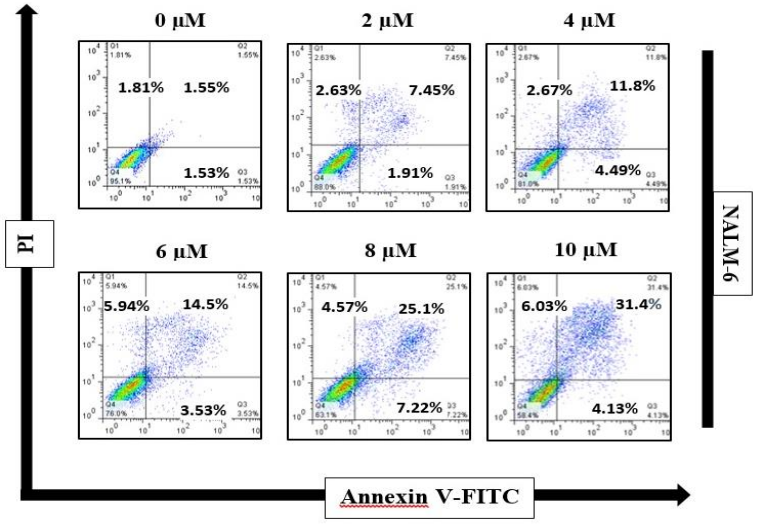
رنگ‌آمیزی DAPI برای تأیید آپوپتوز پس از درمان با گایلاردین انجام شد. همانطور که در شکل ۳ نشان داده شده است، به صورت واضح در غلظت ۶ میکرومولار، کاهش تعداد سلول‌ها و ایجاد تغییرات مورفولوژیک مانند چروکیدگی هسته و تشکیل اجسام آپوپتوتیک در سلول‌های Nalm-6 تیمارشده با گایلاردین در مقایسه با سلول‌های کنترل قابل مشاهده است و این نتایج تأییدکننده مهار تکثیر سلولی و القاء مرگ سلولی به صورت وابسته به دوز هستند (شکل ۳).

۴.۳. تأیید اثر القاء آپوپتوز با روش فلوسیتومتری آنکسین PI/V

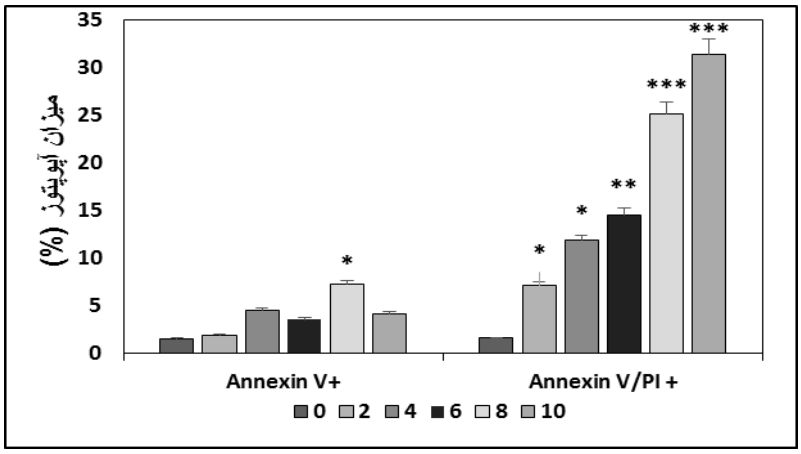
نتایج حاصل از آنالیز فلوسیتومتری نشان داد که گایلاردین قادر به افزایش قابل توجه القاء آپوپتوز در سلول‌های Nalm-6 به صورت وابسته به دوز می‌باشد، به گونه‌ای که این عصاره نه تنها باعث افزایش سلول‌های آنکسین V مثبت می‌شود، بلکه به شکل بارزتری درصد سلول‌های آنکسین PI/V مثبت را افزایش می‌دهد. همانگونه که در شکل‌های ۴ و ۵ مشاهده می‌شود درصد سلول‌های آنکسین V مثبت طی تیمار سلولی با غلظت ۶ میکرومولار از ۱/۸۱ درصد در سلول‌های کنترل تنها به حدود ۴/۱۳ درصد تغییر پیدا کرده است اما میزان سلول‌های آنکسین PI/V مثبت از ۱/۵۵ درصد در سلول‌های کنترل به ۳۱/۴ درصد افزایش یافته است. یافته‌های ما نشانگر این موضوع بود که گایلاردین خاصیت سایتوتوکسیک خود را بر سلول‌های Nalm-6 با القاء آپوپتوز اولیه و بخصوص آپوپتوز تأخیری اعمال می‌کند.



شکل ۳. تأیید اثر سایتوتوکیک و آنتی‌پرولیفراتیو گایلاردین بر سلول‌های DAPI بوسیله‌ی رنگ‌آمیزی Nalm-6



شکل ۴. بررسی اثر گایلاردین بر القاء مرگ سلولی در رده سلولی Nalm-6



شکل ۵. بررسی اثر گایلاردین بر القاء آپوپتوز اولیه و تأخیری در رده سلولی Nalm-6 (* بیانگر $P < ۰/۰۵$، **بیانگر $P < ۰/۰۱$، *** بیانگر $P < ۰/۰۰۱$).

۴. بحث

لوسمی لنفوبلاستیک حاد (ALL) شایع‌ترین سرطان رخ داده در بین کودکان و نوجوانان می‌باشد [۱۹]. علیرغم پیشرفت‌های قابل توجه در درمان آن، حدود ۲۰ درصد از بیماران به علت مقاومت دارویی عود می‌کنند. در سال‌های اخیر توجه زیادی به استفاده از ترکیبات طبیعی و گیاهی برای درمان سرطان شده است [۲۰]. از دلایل مهم این توجه زیاد می‌توان به آگاهی داشتن انسان‌ها از ایمنی این ترکیبات اشاره کرد چون انسان‌ها از سالیان دور از ترکیبات طبیعی و گیاهی استفاده می‌کردند [۲۱]. گایلاردین یک نوع از سزکوئی‌ترپن لاکتون‌های استخراج شده از بخش‌های هوایی گیاه مصفای چشم مسیح است. این ترکیبات شامل یک گروه بزرگ از متابولیت‌های گیاهی ثانویه با فعالیت‌های مختلف بیولوژیکی هستند که غالب اثرات بیولوژیک آن‌ها منتسب به گروه آلفا – متیلن گامالاکتون (α-MγL) است. این ساختار به صورت حلقوی شکل و حاوی اکسیژن بوده که لازمه فعالیت سایتوتوکسیک این ترکیبات می‌باشد [۲۲]. همان‌طور که در مطالعات قبلی به نقش آن در القا آپوپتوز در رده‌های توموری پی برده شده است اخیراً نیز مطالعاتی در زمینه مکانیسم‌های احتمالی و کاربردهای بالقوه SLsها به عنوان ترکیباتی با فعالیت ضدسرطانی صورت گرفته است که در پایین به تعدادی از آنها اشاره شده است.

در مطالعه‌ای که تحت عنوان بررسی اثر Bigelovin سزکوئی‌ترپن لاکتون مشتق شده از گیاه *Inula helianthus-aquatica* بر القا آپوپتوز روی سلول‌های لوسمی حاد میلوئیدی (U937) انجام گرفت نشان داد که این ترکیب باعث القا آپوپتوز و توقف چرخه سلولی در مرحله G0/G1 می‌شود [۲۳]. مطالعه دیگری در سال ۲۰۰۵ توسط Song و همکارانش تحت عنوان بررسی اثرات آپوپتوتیک و سایتوتوکسیک Ergolide به عنوان یک ترپن لاکتون دیگر مشتق شده از گیاه مورد مطالعه ما، به این نتیجه رسیدند که این ترکیب باعث القا آپوپتوز از طریق مهار مسیر nuclear factor (NF) - κBدر رده‌های سلولی سرطانی می‌شود. همچنین، روند آپوپتوز با ترشح سیتوکروم C به سیتوزول و افزایش فعالیت کاسپاز ۳ بررسی شد. نتایج این مطالعه نشان داد که این ترکیب یک مهارکننده مؤثر NF-κB بوده که با توجه به

نقش مؤثر این مسیر پیام‌رسانی، استفاده از این ترکیب در درمان بیماران سرطانی می‌تواند مؤثر واقع شود [۲۴].

در مطالعه‌ای تحت عنوان بررسی اثر سایتوتوکسیک و القا آپوپتوز گایلاردین بر روی رده‌های سلولی HepG-2، A-549، HT-29 و MCF-7 نشان داده شد که این سزکوئی ترپن لاکتون دارای اثرات قوی در القا آپوپتوز است [۱۱] در راستای این مطالعه، نتایج مربوط به MTT و تریپان‌بلو در مطالعه ما نیز نشان داد که گایلاردین نقش بسزایی در کاهش بقاء و تعداد سلول‌های Nalm-6 تیمار شده با غلظت‌های بالای ۶ میکرو مولار، به صورت وابسته به دوز و زمان دارد. همچنین در مطالعه‌ی سال ۲۰۱۵ که توسط Fallahian و همکارانش بر روی شناخت مکانیسم مولکولی گایلاردین در سلول‌های سرطان سینه (MCF-7 & MB-MDA-468) انجام گرفت، مشاهده شد که این ترکیب طبیعی از طریق افزایش در میزان ROS داخل سلولی و بیان نسبی ژن‌های Bax/Bcl2 باعث آلقای آپاپتوز در سلول‌های سرطانی می‌شود [۱۳].

در مطالعه حاضر نتایج حاصل از آزمون فلوسیتومتری نشان داد که در غلظت‌های سریالی از گایلاردین میزان آپاپتوز القاء شده در سلول‌ها بخصوص آپاپتوز تأخیری افزایش یافته و غلظت ۶ میکرومولار از آن که در آزمایشات اولیه به عنوان دوز IC_{50} شناخته شد، تأثیر قابل توجهی بر روی آپوپتوز در رده سلولی Nalm-6 دارد. بنابراین این میزان آپوپتوز با کاهش معنادار درصد زنده‌مانی در آزمون‌های تریپان‌بلو و MTT مطابقت دارد. با این وجود، در رده سلولی PBMC حساسیت سلول‌ها نسبت به ترکیب مورد نظر ناچیز بود ($IC_{50} > 10\mu M$). در این مطالعه نتایج بررسی تغییرات مورفولوژیک هسته با رنگ‌آمیزی DAPI نیز حاکی از افزایش میزان آپوپتوز در سلول‌های Nalm-6 تیمار شده با گایلاردین به صورت وابسته به دوز بود.

در مجموع، این مطالعه برای اولین بار نشان داد که گایلاردین با تأثیر سایتوتوکسیک بسیار ناچیز بر سلول‌های نرمال (PBMC) می‌تواند به طور مؤثر باعث القاء اثرات آپوپتوتیک و آنتی‌پرولیفراتیوی خود بر سلول‌های لوسمیک Nalm-6 شود. بنابراین برای اثبات این اثربخشی، انجام تحقیقات بیشتری در زمینه شناخت مکانیسم مولکولی این اثر و کارآمدی آن روی سلول‌های هماتولوژیک اولیه پیشنهاد می‌شود. همچنین این نتایج به وضوح نشان می‌دهد که می‌توان از گایلاردین به عنوان یک جایگزین مؤثر و امیدوارکننده برای مطالعات مرتبط با یافتن داروهای ضدسرطانی جدید استفاده کرد.

مشارکت نویسندگان

تعریف موضوع و بیان مسأله: تمام نویسندگان؛ روش پژوهش: افشین کرمی؛ تحلیل داده ها: افشین کرمی؛ نگارش متن و بازبینی: تمام نویسندگان

تضاد منافع

در این پژوهش هیچ تعارضی در منافع وجود ندارد.

تقدیر و تشکر

از پرسنل محترم دانشکده طب سنتی و مرکز تحقیقات طب سنتی و همچنین مسئول محترم آزمایشگاه تحقیقاتی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی به خاطر همکاری در اجرای این مطالعه کمال تشکر و قدردانی را داریم.

منابع

1. Harrison CJ. Acute lymphoblastic leukemia. *Clinics in Laboratory Medicine* 2011; 31 (4): 631 - 47.

2. Terwilliger T and Abdul-Hay M. Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review and 2017 update. *Blood Cancer J*. 2017; 7 (6): e577.

3. Felice MS, Zubizarreta PA, Alfaro EM and Sackmann-Muriel F. Childhood acute lymphoblastic leukemia: prognostic value of initial peripheral blast count in good responders to prednisone. *J. Pediatric Hematology/Oncology* 2001; 23 (7): 411 - 5.

4. Jabbour E, O'brien S, Konopleva M and Kantarjian H. New insights into the pathophysiology and therapy of adult acute lymphoblastic leukemia. *Cancer* 2015; 121 (15): 2517 - 28.

5. Darvishi M, Esmaeili 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. *J. Applied Biomedicine* 2017; 15 (3): 219 - 26.

6. Prakash O, Kumar A and Kumar P. Anticancer potential of plants and natural products. *Am. J. Pharmacol. Sci*. 2013; 1: 104-15.

7. 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.

8. Seca AM, Pinto DC and Silva AM. Metabolomic profile of the genus Inula. *Chemistry & Biodiversity* 2015; 12 (6): 859 - 906.

9. Ochwang'i DO, Kimwele CN, Oduma JA, Gathumbi PK, Mbaria JM and Kiama SG. Medicinal plants used in treatment and management of cancer in Kakamega County, Kenya. *J. Ethnopharmacol*. 2014; 151 (3): 1040 - 55.

10. Trendafilova A, Ivanova V, Todorova M and Aneva I. New sesquiterpene lactones from *Inula oculus-christi* L. *Phytochemistry Letters* 2017; 21: 221 - 5.

11. Moghadam MH, Naghibi F, Atoofi A, Rezaie MA, Irani M and Mosaddegh M. Cytotoxic activity and apoptosis induction by gaillardin. *Zeitschrift Für Naturforschung C*. 2013; 68 (3 - 4): 108 - 12.

12. Mosaddegh M, Moghadam MH, Ghafari S, Naghibi F, Ostad SN and Read RW. Sesquiterpene lactones from Inula oculus-christi. *Natural Product Communications* 2010; 5 (4): 511 - 4.

13. Fallahian F, Aghaei M, Abdolmohammadi MH and Hamzeloo-Moghadam M. Molecular mechanism of apoptosis induction by Gaillardin, a sesquiterpene lactone, in breast cancer cell lines. *Cell Biology and Toxicol*. 2015; 31 (6): 295 - 305.

14. Kapuscinski J. DAPI: a DNA-specific fluorescent probe. *Biotechnic & Histochemistry* 1995; 70 (5): 220 - 33.

15. Gerlier D and Thomasset N. Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. *J. Immunological Methods* 1986; 94 (1 - 2): 57 - 63.

16. 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. *J. Immunological Methods* 1995; 184 (1): 39 - 51.

17. Bryman A and Cramer D. Quantitative data analysis with IBM SPSS 17, 18 & 19: A guide for social scientists: Routledge; 2012. Aug;80(2):334-5.

18. Motulsky H. Analyzing data with GraphPad prism: GraphPad Software Incorporated; 1999. 397 pp.

19. Begum M, Jahan S, Tawfique M, Mannan MA. Out come of induction of remission in undernourished children with acute lymphoblastic leukaemia. Mymensingh medical journal: MMJ. 2012 Oct;21(4):691-5.

20. Santos JM, Cury NM, Yunes JA, López JA, Hernández-Macedo ML. Effect of Anacardium occidentale leaf extract on human acute lymphoblastic leukaemia cell lines. Natural product research. 2019 Jun 3;33(11):1633-6.

21. Seca AM and Pinto DC. Plant secondary metabolites as anticancer agents: successes in clinical trials and therapeutic application. *International J. Molecular Sciences* 2018; 19 (1): 263.

22. Schmidt TJ. Helenanolide-type sesquiterpene lactones-III. Rates and stereochemistry in the reaction of helenalin and related helenanolides with sulfhydryl containing biomolecules. *Bioorganic & Medicinal Chem*. 1997; 5 (4): 645 - 53.

23. Zeng GZ, Tan NH, Ji CJ, Fan JT, Huang HQ, Han HJ, Zhou GB. Apoptosis inducement of bigelovin from Inula helianthus-aquatica on human Leukemia U937 cells. Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives. 2009 Jun;23(6):885-91.

24. Song YJ, Lee DY, Kang DW, Kim YK, Kim SN, Lee KR and et al. Apoptotic potential of sesquiterpene lactone ergolide through the inhibition of NF-κB signaling pathway. *J. Pharmacy and Pharmacol*. 2005; 57 (12): 1591 - 7.

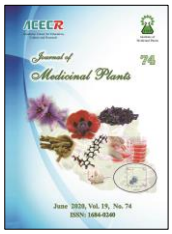
How to cite this article: Karami A, Hamzeloo – Moghadam M, Yami A, Barzegar M, Mashati P, Gharehbaghian A. The effect of gaillardin on proliferation and apoptosis of acute lymphoblastic leukemia cell line (Nalm-6). ***Journal of Medicinal Plants*** 2020; 19(74): 108-117.
doi: 10.29252/jmp.19.74.108

J. Med. Plants 2020; 19(74): 108-117

Institute of Medicinal Plants

Journal of Medicinal Plants

Journal homepage: www.jmp.ir



Research Article

The Effect of Gaillardin on Proliferation and Apoptosis of Acute Lymphoblastic Leukemia Cell Line (Nalm-6)

Afshin Karami[1], Maryam Hamzeloo-Moghadam[2], Amir Yami[1], Mohyedin Barzegar[1], Pargol Mashati[1], Ahmad Gharehbaghian[3,*]

[1] *Department of Hematology and Blood Banking, School of Allied Medical Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran*

[2] *Department of Traditional Pharmacy, 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*

ARTICLE INFO

Keywords:
Acute lymphoblastic
Leukemia
Apoptosis
Inula-oculus-christi
Gaillardin
Nalm-6
PBMC

ABSTRACT

Background: Due to increased cancer chemotherapy resistance, the use of natural compounds in cancer treatment has been considered in recent years. *Inula-Oculus-Christi*, is one of the high importance plants in the field of traditional medicine. It has been shown that extract of this plant has cytotoxic effects on breast cancer cells. **Objective:** Therefore, the aim of this study was to evaluate the cytotoxic effect of Gaillardin and apoptosis induced by this extract on acute lymphoblastic leukemia cells. **Methods:** Gaillardin from Inula-Oculus-Christi plant was extracted by Traditional Medicine Research Center of Shahid Beheshti University of Medical Sciences. The cytotoxic effect of Gaillardin on the acute lymphoblastic leukemia (Nalm-6) and PBMC (as a normal cell line) was investigated at different doses for 24 and 48 hours. In this study, Trypan blue, MTT assay and DAPI staining were used. In addition, Annexin V/PI staining was utilized for confirming apoptosis. **Results:** The results of Trypan blue and MTT assay demonstrated the induction of apoptosis and reduction in proliferation of Nalm-6 cells treated by Gaillardin, showing a time and dose-dependent manner ($P < 0.001$). However, low sensitivity to the different concentrations of Gaillardin was observed in PBMCs. DAPI staining and Flow cytometry analysis confirmed a significantly high percentage of apoptotic cells compared with control groups ($P < 0.001$). **Conclusion:** According to the results, Gaillardin demonstrated cytotoxic effects on Nalm-6 cells, but

Abbreviations: (FBS) Fetal Bovine Serum; (Sls) Sesquiterpene Lactones; (ALL) Acute Lymphoblastic Leukemia; (DAPI) 4',6-Diamidino-2-Phenylindole; (PBMC) Peripheral Blood Mononuclear Cell

* Corresponding author: gharehbaghian@sbmu.ac.ir

doi: 10.29252/jmp.19.74.108

Received 2 September 2018; Received in revised form 12 January 2019; Accepted: 28 January 2019

© 2020. Open access. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)