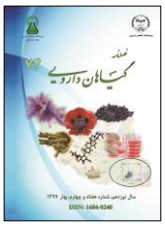
پژوهشکده گیاهان دارویی
جهاد دانشگاهی

فصلنامه گیاهان دارویی

Journal homepage: www.jmp.ir



مقاله تحقیقاتی

بررسی اثر ماده خالصه ارگولاید در القاء مرگ سلولی در رده سلولی MOLT4

امیر یامی[۱]، مریم حمزه‌لو مقدم[۲]، افشین کرمی[۱]، محی‌الدین برزگر[۱]، وحید امیری[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 کودکان‌های مادرزادی خونی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران*

اطلاعات مقاله

گل‌واژگان:
آپوپتوز
اتوفاژی
ارگولاید
لوسمی

چکیده

مقدمه: سرطان بیماری با ظاهری متفاوت متشکل از اختلالات ژنتیک، اپی ژنتیک، درگیری متابولیتی و سیگنال سلولی، به تنهایی یا در ترکیب با هم است، که درنهایت نظم سلولی را به نفع بدخیمی به کار می گیرد. امروزه با گسترش داروهای هدفمند برای مهار مسیر خاص که منجر به پیشرفت‌هایی نیز شده است، باز هم نتوانسته جایگزین ترکیبات شناخته شده شوند که دارای خاصیت چند گانه در برخورد با سرطان هستند. **هدف:** بررسی مکانیسم‌های ارگولاید به عنوان یک ماده با خاصیت‌های درمانی متعدد. **روش بررسی:** ارگولاید ماده خالصه از گونه اینولا (*Inula Oculus-Christi*) جزء خانواده *Asteraceae* می باشد. در این مقاله ارگولاید برروی سل لاین لوسمی لنفوبلاستیک حاد (MOLT-4) با استفاده از تکنیک های MTT assay, Cell cycle assay, q-RTpcr, acridine orange, Annexin V/Pi مورد بررسی قرار گرفت. **نتایج:** ارگولاید از طریق تولید ROS از طریق مسیر وابسته به اتوفاژی موجب مهار چرخه سلولی در فاز G0/G1 شد و درنهایت از طریق آبشار کاسپازی، سلول بدخیم را به سمت مرگ می‌برد. اپوپتوز القا شده با تکنیک انکسین V-PI بررسی شد. ارگولاید با مهار بیان ژن bcl2 و افزایش بیان ژن‌های bax, Beclin1, ATG5 و همچنین ژن p21 که در تنظیم چرخه سولی دخیل است سلول را به طور وابسته به دوز مهار و سپس به سمت مرگ می‌کشاند. **نتیجه‌گیری:** با توجه به مطالعات انجام شده و همچنین نتایج این مطالعه می‌توان پی برد ارگولاید نه تنها موجب مهار سرطان به طور مؤثر می‌باشد بلکه همچنین موجب فعالیت مسیرهای دیگری از جمله اتوفاژی می‌شود که در درمان سرطان می‌تواند به عنوان هدف بالقوه مورد استفاده قرار گیرد.

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

* نویسنده مسؤول: gharehbaghian@sbmu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۷ شهریور ۱۳۹۷؛ **تاریخ دریافت اصلاحات:** ۱۲ آذر ۱۳۹۷؛ **تاریخ پذیرش:** ۲ دی ۱۳۹۷

doi: 10.29252/jmp.19.74.155

© 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 شایع‌ترین لوسمی‌های دوران کودکی به شمار می‌رود و همچنین در سنین بالا با شانس درمان کمتر یکی از چالش‌های پزشکی محسوب می‌شود به گونه‌ای که در بزرگسالان دومین لوسمی حاد شایع با میزان شیوع ۶۵۰۰ مورد در سال فقط در ایالات متحده است. شاخصه‌ی این نوع لوسمی اختلالات کروموزومی و تغییرات ژنتکی‌ای که در بلوغ و تکامل رده‌های لنفوسیتی نقش دارند، می‌باشد [۱]. منظور از واژه‌ی حاد در این نوع سرطان، سرعت بیماری و تولید سلول‌های نابالغ و ناکارامد در مغز استخوان می‌باشد. امروزه بدون در نظر گرفتن عوامل خاص در پیدایش و گسترش سرطان‌های خاص تحقیقات بسیاری انجام شده است که نشان می‌دهد دلیل عمده اکثر سرطان‌ها مربوط به اختلال عملکرد بیشتر ژن‌های کد کننده مسئول پروتئین‌ها مانند پروتئین‌های ضدآپوپتوزی، مهار گرهای آپوپتوز، فاکتورهای رونویسی، فاکتورهای رشد، گیرنده‌های فاکتورهای رشد و سرکوبگرهای تومور می‌باشد که به عنوان هدفی برای درمان سرطان مورد استفاده قرار می‌گیرند [۲]. علیرغم گسترش داروهای شیمی درمانی در درمان سرطان دو ضعف عمده برای این داروها وجود دارد یکی عدم موفقیت های کامل در درمان و همچنین بیش از اندازه سمی بودن برای بدن و سایر سلول‌های نرمال بدن. با گسترش داروهای اختصاصی برای مهار مسیرهای سیگنالینگ که منجر به کشتن سرطان با اتصال به دومین‌های خارج سلولی و گیرنده‌های تیروزین کینازی می‌شود، پاسخ‌های متنوعی گرفته شده است و این به دلیل مقاومت ثانویه سلول‌های سرطانی به این نوع داروهای بخصوص می‌باشد از آنجا که سرطان یک بیماری چند مرحله‌ای گسترش یافته در بدن است و محدود به جهش های تک و یا منحصر به فرد نمی‌شود بنابراین انتظار توقف سرطان صرفاً با استفاده از داروهای تک کاربردی تا به امروز نتوانسته است موفق عمل کند [۴، ۳]. در طی چند دهه اخیر نیاز به پیدایش داروهایی با منشاء طبیعی که منجر به عدم آسیب به سایر ارگان‌های بدن می‌شود همچنین بتواند با قابلیت‌های مختلف با سرطان وارد مبارزه شود. گیاهان تاریخچه بسیار وسیعی در استفاده به عنوان داروهای مهارکننده سرطان دارند که همواره مورد توجه قرار گرفته است، با توجه به کاربردهای سنتی داروهای گیاهی دانشمندان در این عرصه سعی کرده‌اند با استخراج ماده اصلی این گیاهان به طور اختصاصی با سرطان مقابله کنند، دلایل مختلفی برای این ادعا که داروهای گیاهی می‌توانند جانشین خوبی برای داروهای موجود باشند، وجود دارد. اول از همه در حال حاضر بیش از ۶۰ درصد داروهای گیاهی موجود دارای تأییدیه سازمان غذا داروی جهانی می‌باشند که از گیاهان استخراج شده‌اند این در حالی است که این مقدار تنها شامل ده درصد از گیاهان موجود می‌باشد به طوری که در دنیا تا ۵ میلیون گونه گیاهی با ارزش درمانی وجود دارد [۳]. دوم اینکه از زمان‌های قدیم تا الان طبیعت به عنوان یک منشأ و منبع برای درمان بیماری‌ها مورد توجه بوده است وسوم، طی مطالعات اخیر ثابت شده است که مسیرهای سیگنالینگ مشترکی بین انسان و اکثر گیاهان وجود دارد که می‌توان از این وجه اشتراک بین انسان و گیاهان طبیعت برای درمان سرطان و کشف داروهای جدید جهت توقف این مسیرها و همچنین مسیرهای دیگر بهره جست [۷-۵].

گیاه مصفای چشم مسیح برای اولین بار در شوروی سابق کشف شد این گیاه به طور بالقوه در چین باستان برای درمان بیماری‌های التهابی مورد استفاده قرار می‌گرفته است در کشور ما نیز این گیاه بالقوه در اکثر استان‌ها یافت می‌شود برای اولین بار در دانشکده طب سنتی دانشگاه علوم پزشکی شهیدبهشتی موفق به استخراج سه ماده خالص از این گیاه شده‌ایم. یکی از این ماده‌های خالصه که نسبت به ماده‌های دیگر خاصیت کشندگی بالایی در سلول‌های بدخیم دارد ارگولاید نام دارد که جزئی از خانواده سزکوئی‌ترپن‌ها محسوب می‌شود [۸].

۲. مواد و روش‌ها

۲.۱. آماده‌سازی عصاره

در یک مطالعه بنیادی، گیاه مصفای چشم مسیح با کد هرباریومی TMRC۲۶۵۸ از مناطق جنگلی استان گلستان در فصل بهار جمع‌آوری شد. تشخیص این گیاه توسط مرکز تحقیقات طب سنتی انجام شد. 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 باقی مانده 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 اجزا تشکیل دهنده 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 ارگولاید به صورت پودر جداسازی شد.

برای آماده‌سازی ارگولاید و رساندن آن به غلظت مورد نظر، ابتدا میزان ۳ میلی‌گرم از آن را با ۱ میلی‌لیتر از DMSO استریل حل کرده (غلظت نهایی استوک اولیه ۱۰ میلی‌مولار بود.)، سپس با رقیق کردن‌های متوالی استوک اولیه غلظت های نهایی مورد نیاز 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 رسانده شد، بنابراین نیازی به کنترل DMSO نیست.

۲.۲. کشت سلولی و تیمار با دارو

در این مطالعه تجربی از سلول‌های MOLT-4 که مربوط به رده سلولی لوسمی لنفوبلاستیک حاد نوع تی (T) می‌باشد، استفاده شده است. همچنین برای سلول نرمال از لنفوسیت های خون محیطی جدا شده از خون انسان استفاده شده است. این سلول‌ها در محیط کشت حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی ۱۰۰ U/ml پنی‌سیلین و ۱۰۰ µg/ml استرپتومایسین در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد دی اکسید کربن داده شده‌اند، کشت داده شدند سلول‌های لوسمیک و نرمال با غلظت‌های ۶، ۴، ۲ میکرومولار بر میلی لیتر ماده خالصه به مدت ۴۸ ساعت تیمار شدند. لازم به ذکر است که جهت جلوگیری از اثرات حلال بر روی میزان تکثیر و بقای سلولی سلول‌ها با غلظت مشخص شده‌ای از DMSO به عنوان کنترل منفی مواجه شدند و تمامی آزمایش‌ها به منظور افزایش دقت کار با سه بار تکرار انجام شده‌اند.

۲.۳. آزمون MTT

به منظور ارزیابی تأثیر ارگولاید بر میزان فعالیت متابولیک سلولی، سلول‌های لوسمیک و نرمال با دوزهای ۶، ۴، ۲ میکرومولار بر میلی‌لیتر ماده خالصه در پلیت ۹۶ خانه کشت داده شده‌اند. پس از گذشت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به سلول‌های داخل هر چاهک ۱۰۰ لاندا محلول ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر ام‌تی‌تی (MTT) اضافه شد و پلیت مجدداً به مدت سه ساعت در انکوباتور قرار گرفت در طی زمان انکوباسیون و در تاریکی رنگ تترازولیوم موجود در پودر ام‌تی‌تی بوسیله سوکسینات دهیدروژناز یکی از آنزیم‌های چرخه تنفسی میتوکندری است احیا می‌شود درنتیجه موجب تولید کریستال‌های آبی رنگ 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 ۱۲ دقیقه ساتریفیوژ شده و پس از خالی کردن محیط رویی ۱۰۰ لاندا حلال برای حل رسوب رنگی به هر چاهک اضافه شد و میزان فعالیت متابولیک با استفاده از دستگاه الایزا در طول موج ۵۷۰ نانومتر بررسی شد.

۴.۲. آزمون فلوسایتومتری انکسین (V-PI)

برای ارزیابی مرگ سلولی القا شده توسط این ماده آزمون فلوسایتومتری انکسین V-PI انجام شد. طبق دستورالعمل در حدود یک میلیون سلول در پلیت ۶ خانه کشت داده شد سپس با غلظت‌های مختلف ماده خالص تیمار شد. انکسین باند شده (V) به رنگ فلورسنت (FITC) به عنوان مارکری برای تشخیص فسفاتیدیل سرین که در طی آپوپتوز از غشاء داخلی به سمت بیرون اکسترنالیزه می‌شود. بعد از گذشت ۴۸ ساعت انکوباسیون سلول‌ها با دارو، سلول‌ها سانتریفیوژ شده و یک بار با PBS شستشو داده شد. سپس با بافر باند کننده IX مواجه شد و ۵ لاندا انکسین V به نمونه‌ها اضافه شد بعد از ۱۰ دقیقه انکوباسیون در تاریکی این بار PI به همان مقدار اضافه و به همان مدت انکوبه شد. نتایج توسط نرم‌افزار Flowjo ۷,۶ آنالیز شد.

۵.۲. آزمون بررسی چرخه سلولی

جهت ارزیابی تأثیر ارگولاید بر چرخه سلولی سلول‌های (MOLT4) توسط رنگ‌آمیزی PI و با استفاده از تکنیک فلوسایتومتری مورد ارزیابی قرار گرفت. رنگ PI رنگی متصل شونده به DNA ۲ رشته‌ای می‌باشد که غشای سلولی نسبت به آن نفوذناپذیر است. بدین‌منظور سلول‌ها به مدت ۴۸ ساعت با دارو توسط غلظت‌های افزاینده تیمار شد و سپس طبق پروتکل مورد ارزیابی قرار گرفت. با توجه به میزان محتوای DNA که بیانگر فازهای مختلف چرخه سلولی درصد جمعیت سلولی در فازهای مختلف را بررسی کردیم. نتایج توسط نرم‌افزار فلوجو آنالیز شد.

۶.۲. رنگ‌آمیزی اختصاصی اتوفاژی اکریدین اورنج

جهت ارزیابی تأثیرارگولاید بر سایر مسیرهای درگیر در بقا و مرگ سلول‌های بدخیم از رنگ‌آمیزی حیاتی اکریدین اورنج استفاده شد. این رنگ می‌تواند به اتوفاگولیزوزوم‌های تشکیل شده در اواخر مسیر اتوفاژی که درنهایت موجب مرگ سلول می‌شود و به دلیل PH اسیدی به این ارگانل‌ها متصل شود. سلول‌ها بعد از تیمار با دارو سانتریفیوژ شده و سپس با غلظت ۱۰۰ µg/ml این رنگ به مدت ده دقیقه در انکوباتور کشت، انکوبه شد. با استفاده از میکروسکوپ فلوئورسنت و فیلتر مخصوص سلول‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت.

۷.۲. آزمون Real time-pcr (RT-PCR)

برای تأیید مرگ سلولی القا شده توسط ارگولاید بر روی سلول بدخیم از تکنیک ریل تایم جهت اندازه‌گیری میزان بیان ژن‌های دخیل در آپوپتوز استفاده شد. سلول MOLT4 پس از تیمار با دوز IC۵۰ ارگولاید در این سل لاین (۶ µM/ml) استخراج RNA صورت گرفت و سپس با سنتز CDNA میزان بیان ژن BAX و XIAP با پرایمر مربوطه مورد آزمون قرار گرفت.

۸.۲. آنالیز آماری

تمامی آزمایشات به شکل سه آزمون مستقل (۳ بار تکرار) انجام و مقادیر گزارش شده به شکل Mean ± SD ثبت شده‌اند. میزان بیان ژن در مقایسه با گروه کنترل از روش لیواک محاسبه شده و سطح معناداری آن با نرم‌افزار spss نسخه ۲۰ و آزمون آماری paired-T test محاسبه شده است. همچنین از نرم‌افزار GraphPad prism ۷ برای رسم نمودارها استفاده شده است.

۳. نتایج

۱.۳. تأثیر ارگولاید بر فعالیت متابولیک سلول بدخیم و نرمال

ارگولاید می‌تواند فعالیت متابولیک سلول بدخیم را به طور وابسته به دوز و زمان کاهش دهد. همان‌طور که در شکل ۱ نمایش داده شده است این ماده در دوز ۶ می‌تواند در حدود ۵۰ درصد از فعالیت متابولیکی سلول را کاهش دهد این در حالی است که این ماده در همین دوز اثر معناداری بر روی سلول نرمال انسانی (PBMC) در مقایسه با گروه کنترل ندارد ($P < ۰/۰۱$).

۲.۳. ارزیابی مرگ سلولی با روش فلوسیتومتری آنکسین PI/V

ارگولاید می‌تواند به صورت وابسته به دوز موجب افزایش سلول‌های انکسین V مثبت شود؛ همچنین به شکل قابل توجهی میزان سلول‌های PI/V مثبت که مؤید مراحل انتهایی آپوپتوز است را می‌تواند افزایش دهد. طبق شکل ۲ میزان کلی آپوپتوز در غلظت IC_{50} (۶ میکرومولار) در حدود ۴۲٪ می‌باشد.

۳.۳. بررسی تأثیر ارگولاید بر روی چرخه سلول MOLT4

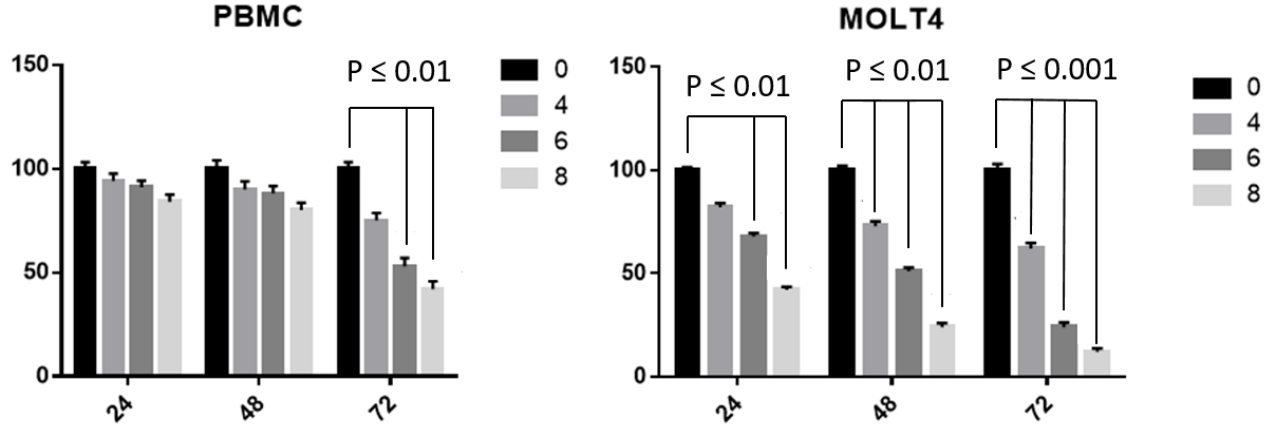
برای بررسی میزان مهارگری این ماده در چرخه سلولی و توقف همانندسازی از رنگ آمیزی PI با تکنیک فلوسیتومتری استفاده شد. همان‌گونه که در شکل ۳ مشخص شده است؛ ارگولاید به صورت وابسته به دوز منجر به افزایش جمعیت سلولی در فاز G1 که بیانگر توقف در این مرحله و همین طور افزایش در جمعیت SUB-G1 که بیانگر سلول‌های آپوپتوز شده است، می‌شود.

۴.۳. بررسی فعالیت مسیر اتوفاژی در تیمار با ارگولاید

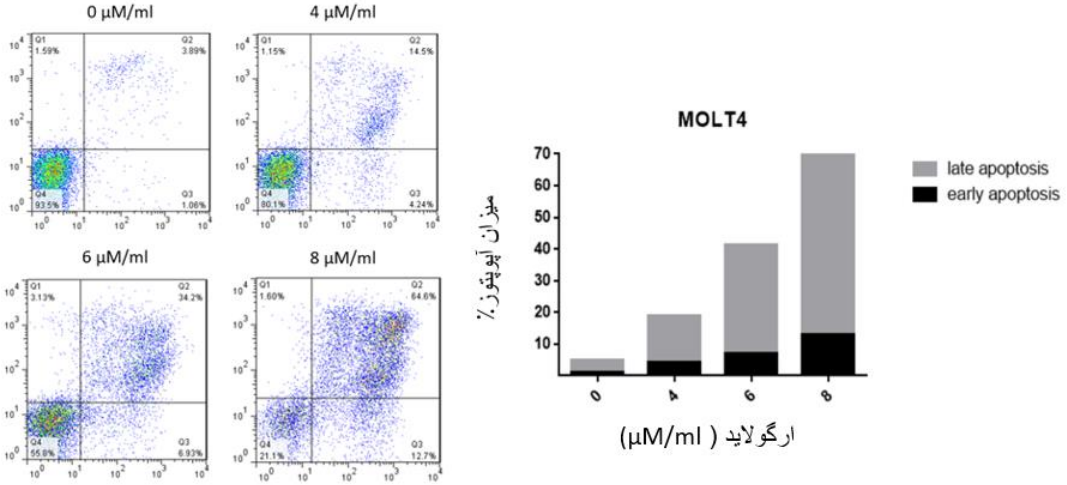
اتوفاژی همانند یک شمشیر دو لبه می‌تواند هم باعث بقاء شود و هم می‌تواند در شرایط استرسی سلول را به سمت مرگ بکشاند. از آنجا که در دوزهای تیمار شده با ارگولاید وجود اپوپتوز ثابت شده است، می‌توان نتیجه گرفت اتوفاژی به مرگ سلول بدخیم همراه با اپوپتوز کمک کرده است. برای بررسی فعالیت مسیر اتوفاژی از رنگ مخصوص این مسیر که می‌تواند ارگانل‌های تشکیل شده با PH اسیدی را به صورت اختصاصی رنگ کند، استفاده شد. همان‌طور که در شکل ۴ مشخص شده است ارگولاید می‌تواند وابسته به دوز باعث فعال شدن این مسیر شود.

۵.۳. تأیید مولکولی مرگ سلولی ایجاد شده توسط ارگولاید

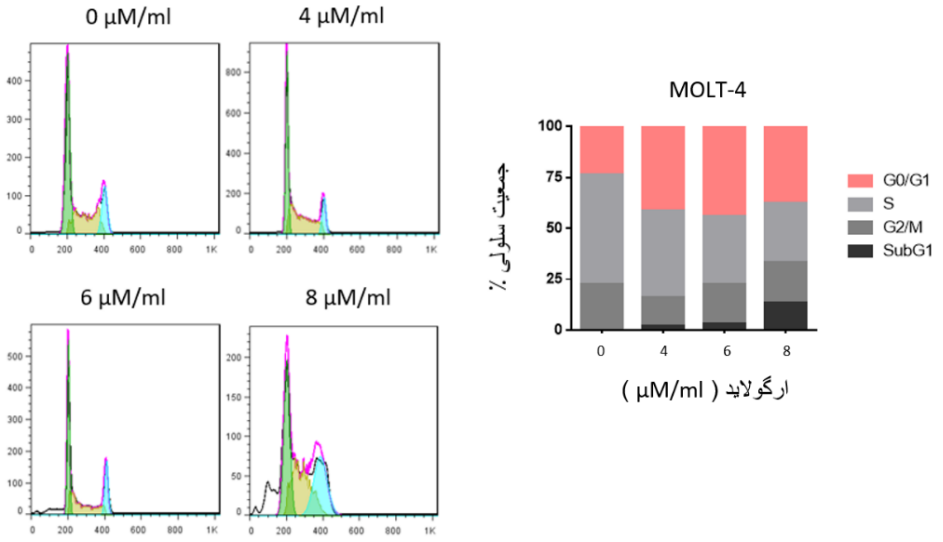
ژن‌های BAX و BCL-2 از جمله ژن‌های مهم دخیل در مسیر میتوکندریایی آپوپتوز محسوب می‌شود. سلول‌های سرطانی برای رشد و تکثیر بی‌رویه خود نیاز به مهار آپوپتوز دارند. از اینرو این دو ژن می‌توانند هدف خوبی برای مهار سرطان باشند. بیان ژن اپوپتوزی BAX و همچنین ژن مهارکننده اپوپتوز BCL-2 توسط تکنیک ریل تایم در سطح مولکولی بررسی شد. همان‌طور که در شکل ۵ مشخص شده است ارگولاید می‌تواند باعث افزایش بیان ژن BAX و همچنین باعث کاهش بیان XIAP در مقایسه با گروه کنترل شود ($P < ۰/۰۵$).



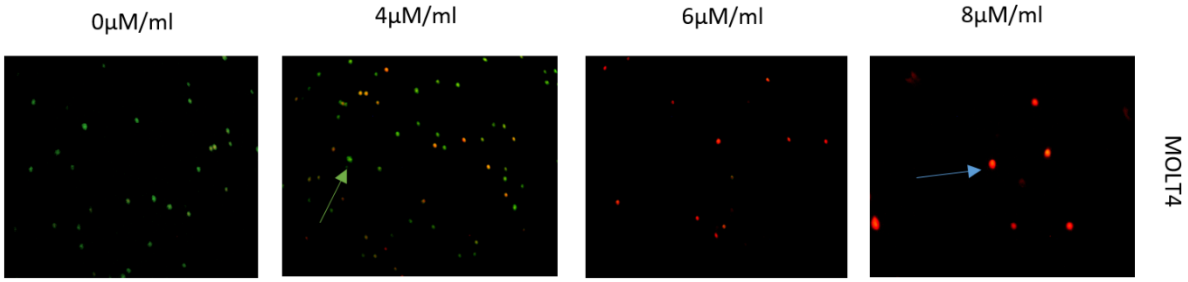
شکل ۱. تأثیر ارگولاید بر روی فعالیت متابولیکی سلول‌های MOLT-4 و PBMC نسبت به گروه کنترل (**؛ بیانگر $P < ۰/۰۱$)



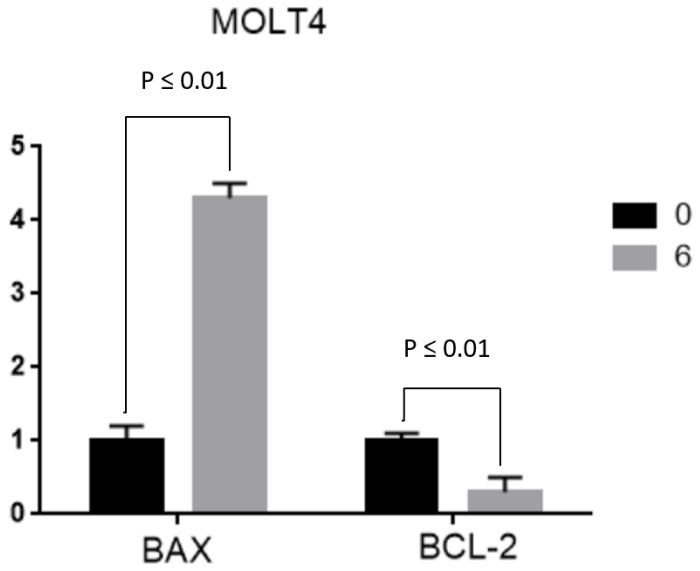
شکل ۲. بررسی اثر ارگولاید بر القاء مرگ **سلولی در رده سلولی MOLT-4 (*، بیانگر P < ۰/۰۵؛ **، بیانگر P < ۰/۰۱ و***، بیانگر P < ۰/۰۰۱)**



شکل ۳. تأثیر ارگولاید بر فازهای مختلف چرخه سلولی MOLT4



شکل ۴. بررسی فعالیت مسیر اتوفاژی با رنگ‌آمیزی اکریدین نارنجی. پیکان آبی رنگ نمایانگر سلول اکریدین مثبت و پیکان سبز نمایانگر سلول زنده



شکل ۵. میزان بیان ژن‌های BAX و BCL-2 دخیل در مسیر مرگ سلولی نسبت به گروه کنترل (**، بیانگر P < ۰/۰۱)

۴. بحث

مهار سرطان با استفاده از ماده‌های طبیعی به خاطر ایمن بودن و کاهش هزینه‌ها می‌تواند یک نوع جایگزین خوب برای درمان باشد. گیاهان تاریخچه بسیار طولانی در درمان سرطان دارند که به طور مستقیم یا غیرمستقیم به طور روزانه در رژیم غذایی انسان مورد استفاده قرار می‌گیرند. با توجه به گسترش داروهای بسیار خاص در درمان سرطان ولی هنوز هم سرطان یکی از کشنده‌ترین بیماری‌های انسان می‌باشد شرکت‌های داروسازی همواره در تلاش بودند تا داروهای نوینی را ارائه دهند که بتوانند جلوی رشد سلول‌های سرطانی را بگیرند. سلول‌های سرطانی برای رشد و بقای خود نیازمند مهار مسیرهای دخیل در مرگ سلولی و افزایش مسیرهای درگیر در تکثیر می‌باشند. طبق تحقیقات گذشته برخی از داروهای گیاهی می‌توانند از طریق مسیر اتوفاژی باعث مهار چرخه سلولی شوند مسیر اتوفاژی، از طریق استرس سلولی می‌تواند فعال شده و سلول را در فاز خاصی متوقف سازد. وقتی سلول توانایی ترمیم آسیب وارده را نداشته باشد اتوفاژی می‌تواند منتهی به مرگ سلولی شود [۹]. بسیاری از داروهای موجود می‌توانند با افزایش ژن‌های دخیل در مرگ سلولی همانند Bax, Bad, Bid موجب مهار تکثیر شوند ولی در چند دهه اخیر توجه فزاینده‌ای بر مسیر اتوفاژی بوده است. در تحقیقی که در سال ۲۰۰۵ بر روی ماده خالصه ارگولاید صورت گرفت توانایی این ماده به صورت ویژه در مهار مسیر NF-kb مشخص شد این مسیر جزئی از مسیرهای درگیر در التهاب می‌باشند و همچنین می‌تواند باعث فعال شدن پروتئین‌های دخیل در تکثیر شود. در این تحقیق این ماده را به عنوان یک ماده قوی در فعال کردن پروتئین JNK که می‌تواند منتهی به اتوفاژی و مرگ سلول شود، یاد کردند [۱۱، ۱۰]؛ بنابراین ما در این تحقیق توانایی این ماده در فعال کردن هر دو مسیر آپوپتوز و اتوفاژی در لوسمی لنفوبلاستیک حاد از نوع لنفوبلاست نوع T (MOLT-4) مورد بررسی قرار دادیم. از نتایج حاصل از این تحقیق می‌توان نتیجه گرفت ارگولاید به طور وابسته به دوز می‌تواند سلول بدخیم را در مرحله خاصی (G1) از چرخه سلولی مهار کرده و سپس از طریق مسیرهای اتوفاژی و همچنین آپوپتوز سلول را به سمت مرگ بکشاند همچنین این ماده خالص در دوزهای توکسیک

برای سلول‌های بدخیم اثر سوئی بر روی سلول‌های نرمال کشت داده شده از خون نرمال انسان (PBMC) نداشتند؛ بنابراین از این ماده می‌توان در مهار سرطان چه به صورت تنها و چه به صورت ترکیبی با سایر داروهای شیمی درمانی موجود بهره جست هرچند نیاز به تحقیقات گسترده‌تری بر روی این ماده با پتانسیل بالا وجود دارد.

مشارکت نویسندگان

تعریف موضوع و بیان مسأله: تمام نویسندگان؛ روش پژوهش: امیر یامی ؛ تحلیل داده‌ها: امیر یامی؛ 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 دانشکده پیراپزشکی شهید بهشتی به خاطر همکاری در اجرای این مطالعه کمال تشکر و قدردانی را داریم.

منابع

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

2. Millimouno FM and et al. Targeting apoptosis pathways in cancer and perspectives with natural compounds from mother nature. *Cancer Prevention Res*. 2014; Nov 1;7(11):1081-107 .

3. Coco S and et al. Identification of ALK germline mutation (3605delG) in pediatric anaplastic medulloblastoma. *J. Human Genetics* 2012; 57 (10): 682.

4. Holohan C and et al. Cancer drug resistance: an evolving paradigm. *Nature Reviews Cancer*. 2013; 13 (10): 714.

5. Dall'Acqua S. Natural products as antimitotic agents. *Current Topics in Medicinal Chem*. 2014; 14 (20): 2272-85.

6. Borris RP. Natural products research: perspectives from a major pharmaceutical company. *J. Ethnopharmacol*. 1996; 51 (1 - 3): 29-38.

7. Juárez P. Plant-derived anticancer agents: a promising treatment for bone metastasis. *BoneKEy Reports*. 2014 Dec 10;3:599.

8. Whan Han J and et al. Ergolide, sesquiterpene lactone from Inula britannica, inhibits inducible nitric oxide synthase and cyclo-oxygenase-2 expression in RAW 264.7 macrophages through the inactivation of NF-κB. *British J. Pharmacol*. 2001; 133 (4): 503-12.

9. Khan M and et al. Killing cancer with platycodin D through multiple mechanisms. *J. Cellular and Molecular Medicine* 2016; 20 (3): 389-402.

10. Song YJ 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.

11. Chun JK and et al. Suppression of the NF-kB signalling pathway by ergolide, sesquiterpene lactone, in HeLa cells. *J. Pharmacy and Pharmacol*. 2007; 59 (4): 561-6.

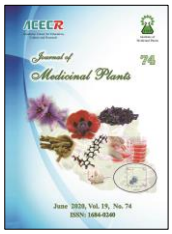
How to cite this article: Yami A, Hamzeloo-moghadam M, Karami A, Barzegar M, Amiri V, Gharehbaghian A. The apoptotic potential of ergolide to induce apoptosis in molt4 cell lines. ***Journal of Medicinal Plants*** 2020; 19(74): 155-162.
doi: 10.29252/jmp.19.74.155

J. Med. Plants 2020; 19(74): 155-162

Institute of Medicinal Plants

Journal of Medicinal Plants

Journal homepage: www.jmp.ir



Research Article

The apoptotic potential of ergolide to induce apoptosis in molt4 cell lines

Amir Yami[1], Maryam Hamzeloo-Moghadam[2], Afshin Karami[1], Mohyedin Barzegar[1], Vahid Amiri[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
Ergolide
MOLT4
Apoptosis
Autophagy

ABSTRACT

Background: Cancer is a multi-faceted diseases caused cell proliferation in an out of control manner due to accumulation of defects and mutation in their DNA and with an impendence to invade or spread to parts of the body. During last decades new compounds with natural roots have emerged as a new paradigm for effective anti-cancer treatment. **Objective:** The aim of this study is to evaluate the potential of ergolide a sesquiterpene lactone with multi-functional history to induce apoptosis. **Methods:** Ergolide from Inula-Oculus-Christi a sesquiterpene lactone from Asteraceae plant was extracted by Traditional Medicine Research Center of Shahid Beheshti University of Medical Sciences. The cytotoxic effects of Ergolide on the acute lymphoblastic leukemia (MOLT4) and PBMC (normal cell line) were investigated at different doses for 48 hours. In this study, MTT assay and acridine orange staining were used. Also, annexin V-PI assays was utilized for further evaluation. In addition the gene expression level of BAX and BCL2 were analyzed by q-RealTime-PCR (quantitive RT-PCR). **Results:** The results of MTT assay demonstrated the induction of apoptosis and reduction in proliferation of MOLT4 cells treated by ergolide. ($P < 0.001$). Interestingly Ergolide could be less toxic in normal cells (PBMCs). AO staining and Flow cytometry analysis confirmed a significantly high percentage of autophagic and apoptotic cells compared with control groups respectively ($P < 0.05$). **Conclusion:** According to the results, ergolide demonstrated cytotoxic effects on MOLT-4, but further studies are needed to confirm its effectiveness as a complementary agent in the treatment of acute lymphoblastic leukemia.

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.19.74.155

Received 8 Sebtember 2018; Received in revised form 3 December 2018; Accepted: 23 December 2018

© 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/)