مقاله پژوهشی
مجله دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان
دوره ۱۳، فروردین ۱۳۹۳، ۵۲-۴۱

اثرات آپاپتوزی آلوئه‌امودین (Aloe-emodin) برده سلولی MCF-7

جواد حسینی[۱]، مهدی محمودی[۲]، محمدسعید هخامنشی[۳]، علی جلیلی[۴]، علیرضا خوشدل[۵]، محمود شیخ‌فتح‌الهی[۶]، شهره فخاری[۷]، سید مصطفی حسینی‌ذیجود[۸]

دریافت مقاله: ۹۲/۴/۱۱ ارسال مقاله به نویسنده جهت اصلاح: ۹۲/۴/۲۹ دریافت اصلاحیه از نویسنده: ۹۲/۷/۲۹ پذیرش مقاله: ۹۲/۱۰/۴

چکیده

زمینه و هدف: در مطالعات متعددی به خواص بیولوژیکی آلوئه‌امودین شامل: خاصیت ضد ویروسی، ضد میکروبی و اثرات حفاظتی آن بر کبد اشاره شده است. اخیراً خواص ضدتوموری آلوئه‌امودین توجه بسیاری از محققین را به خود جلب کرده است. سرطان پستان شایع‌ترین بدخیمی زنان در سراسر دنیاست. به طوری که ۳۰٪ از کل سرطان‌ها و ۱۵٪ از مرگ‌های ناشی از سرطان در میان زنان، و کمتر از ۱٪ سرطان‌ها در مردان مربوط به آن است. هدف از مطالعه حاضر، بررسی اثر ضد سرطانی آلوئه‌امودین بر سلول‌های سرطان پستان، MCF-7 بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه آزمایشگاهی، سلول‌های سرطان پستان (MCF-7) در محیط کشت RPMI با ۱۰٪ سرم جنین گاوی کشت داده شدند. اثر سایتوتوکسیسیتی غلظت‌های ۵، ۱۰، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکرومول آلوئه‌امودین، بعد از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت انکوبه کردن سلول‌های کشت داده شده، به وسیله آزمون MTT ارزیابی گردید. آنالیز آپاپتوز و بیان Fas(CD95) به وسیله دستگاه فلوسایتومتری با کیت انکسین- پروپیدیوم یدید (Annexin-PI) و کیت بیان فعالیت Fas(CD95)، طبق دستورالعمل کیت انجام گرفت.

یافته‌ها: با افزایش غلظت آلوئه‌امودین به صورت وابسته به دوز و زمان، توان زیستی سلول‌ها کاهش پیدا کرد. به طوری که بیشترین تأثیر آلوئه‌امودین مربوط به غلظت ۱۰۰ میکرومول و در زمان ۷۲ ساعت پس از تیمار سلول‌ها بود. آپاپتوز القا شده و میزان بیان Fas نیز وابسته به دوز بودند. غلظت ۱۰۰ میکرومول از آلوئه‌امودین بیشترین درصد آپاپتوز و بیشترین میزان بیان فعالیت Fas را در سلول‌های MCF-7 نشان داد.

نتیجه‌گیری: یافته‌های مطالعه حاضر نشان داد که آلوئه‌امودین (Aloe-emodin) دارای خواص ضد سرطانی است که می‌تواند در درمان سرطان پستان مؤثر باشد. البته نیاز است تحقیقات بیشتر، به خصوص بررسی‌های درون‌تنی انجام گیرد.

واژه‌های کلیدی: آلوئه‌امودین (Aloe-emodin)، سرطان پستان، آپاپتوز، MCF-7

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد بیوشیمی بالینی، گروه بیوشیمی- بیوفیزیک و ژنتیک، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان، رفسنجان، ایران
۲- استاد گروه آموزشی بیوشیمی- بیوفیزیک و ژنتیک، مرکز تحقیقات پزشکی مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان، رفسنجان، ایران
تلفن: ۰۳۹۱-۵۲۳۴۰۰۳، دورنگار: ۰۳۹۱-۵۲۲۵۲۰۹، پست الکترونیکی: mahmoodies@yahoo.com
۳- استادیار گروه آموزشی بیوشیمی و تغذیه، مرکز تحقیقات پزشکی دانشکده پزشکی، مولکولی دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران
۴- دانشیار گروه آموزشی ایمونولوژی، مرکز تحقیقات پزشکی مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران
۵- استادیار گروه آموزشی بیوشیمی- بیوفیزیک و ژنتیک، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان، رفسنجان، ایران
۶- استادیار آمار حیاتی گروه آموزشی پزشکی اجتماعی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان، رفسنجان، ایران
۷- دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران
۸- دانشجوی دکترای تخصصی بیوشیمی بالینی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

مقدمه

آنتراکینون‌ها ترکیبات شیمیایی با عملکردهای مختلفی هستند که ساختاری مرتبط با آنتراس ندارند. هم به صورت صنعتی و هم طبیعی سنتز می‌شوند و به طور وسیعی در صنعت و پزشکی کاربرد دارند، به طوری که مردم به صورت مستقیم و غیرمستقیم با آن‌ها در ارتباط هستند [۱]. آنتراکینون‌ها به دلیل این که از یک هسته مادر مشترک مشتق شده‌اند در بسیاری از فعالیت‌هایشان شبیه هم هستند اما چون دارای گروه‌های جانشینی متفاوتی هستند شدت فعالیت و اثراتشان متفاوت است. در اکثر فعالیت‌ها مانند خواص آنتی‌بیوتیکی، ضد سرطانی و امثال آن‌ها یک وابستگی بین ساختار و عملکرد آنتراکینون‌ها وجود دارد [۲].

آلوئه‌امودین (Aloe-emodin)، هیدروکسی آنتراکینونی (Hydroxyanthraquinone) است که در برگ‌های آلوئه‌ورا وجود دارد و دارای خواص ضد توموری است [۳]. در مطالعات متعددی به خواص بیولوژیکی آلوئه‌امودین شامل: خاصیت ضد ویروسی، ضد میکروبی و اثرات حفاظتی آن بر کبد اشاره شده است [۴]. همچنین، گزارش شده که آلوئه‌امودین خاصیت ضدسرطانی بر تومورهای پوستی، سلول‌های سرطانی ریه و کبد دارد [۶-۵]. آلوئه‌امودین از پیشرفت و تکثیر هر دو رده سلولی گلیا و گلیوما در فاز S چرخه سلولی جلوگیری می‌کند [۸-۷]. و باعث آسیب به DNA با تولید ROS (Reactive Oxygen Species) در سلول‌های سرطانی ریه می‌شود [۳]. همچنین، با کاهش فسفوریلاسیون BH3, BID و مولکول‌های پروآپوپتتیک باعث القاء آپاپتوز در سلول‌های سرطانی معده می‌گردد [۹].

سرطان پستان شایع‌ترین بدخیمی زنان در سراسر دنیاست [۱۰]. به طوری که ۳٪ از کل سرطان‌ها و ۱۵٪ از مرگ‌های ناشی از سرطان، در میان زنان مربوط به آن است [۱۱]. در ایران، سرطان پستان ۲۱/۴٪ از کل موارد گزارش شده سرطان را تشکیل می‌دهد. میزان خام بروز سرطان پستان در ایران معادل ۲۲/۴ در هر ۱۰۰۰۰۰ زن برآورد شده و داده‌های موجود حکایت از آن دارد که بیماری روند افزایشی در پیش گرفته است [۱۲]. این بیماری علی‌رغم پیشرفت‌های مهم در تشخیص و درمان از معضلات شایع زنان است. اگرچه وجود داروهای مؤثری مانند تاموکسیفن و رالوکسیفن و یا داروهای ضد توموری آناسترازول که به همراه اشعه درمانی و یا ادجوانت‌های درمانی در طی ۳۰ سال گذشته جان بسیاری از زنان مبتلا را نجات داده است [۱۳]. با این وجود، معایب مختلفی از جمله عود بیماری ناشی از متاستاز در چند ماه پس از درمان، اثرات ناشی از مصرف داروها بر روی متابولیسم گلوکوکورتیکوئیدها و خطرات سرطان بعد از شیمی درمانی سرطان پستان، سبب محدودیت استفاده از این سیستم‌های درمانی شده است [۱۵-۱۴]. این اطلاعات نشان‌دهنده نیازمندی به استراتژی‌های پیشگیرانه و درمانی در زمینه سرطان پستان است [۱۶]. یکی از سازوکارهای عملکردی داروهای ضد سرطانی القاء آپاپتوز است که موجب مرگ سلول‌های سرطانی می‌شوند [۱۷].

آپاپتوز، مرگ برنامه‌ریزی شده سلول است که در خلاف جهت تکثیر سلول تکامل یافته و در پاسخ به برخی محرک‌ها و همچنین، در طی فرایند تمایز مورفولوژیکی رخ می‌دهد [۱۸]. هرگونه اختلال در این روند منجر به بیماری می‌شود [۱۹] که می‌تواند ناشی از کاهش مرگ سلولی بوده و موجب ایجاد و رشد سلول‌های سرطانی و یا

اختلالات خود ایمنی گردد [۲۰]. مولکول‌های متعددی در فرایند آپاپتوز درگیر هستند. تحریک مولکول‌های پروآپاپتوزی و یا مهار فاکتورهای آنتی‌آپاپتوزی بستگی به نوع سلول و محرک دارد. دو مسیر اصلی آپاپتوز، مسیر خارجی یا مسیر وابسته به گیرنده‌های مرگ و مسیر داخلی یا مسیر میتوکندریایی می‌باشد [۲۱]. از جمله پروتئین‌هایی که جزء گیرنده‌های مسیر خارجی آپاپتوز می‌باشد، مولکول Fas(CD95) است. Fas(CD95) یکی از پروتئین‌های غشایی نوع I با وزن مولکولی ۴۵ کیلو دالتون است [۲۲]. فعال شدن Fas(CD95) با اتصال به آنتی‌بادی آن یا در نتیجه اتصال به لیگاندش (FasL) در سلول‌های آپاپتوز شده یا سلول‌های مستعد آپاپتوز اتفاق می‌افتد [۲۳]. در این مطالعه، اثرات سیتوتوکسیسیتی، القاء آپاپتوز و سازوکار القاء آپاپتوز آلوئه‌امودین بر سلول‌های سرطانی پستان رده MCF-7 مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مطالعه حاضر از نوع مطالعه آزمایشگاهی است که از شهریور ماه ۱۳۹۱ تا اردیبهشت ماه سال ۱۳۹۲ به طریق زیر انجام گرفت.

مواد و دستگاه‌ها: رده سلولی سرطان پستان انسان (MCF-7) از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران خریداری گردید. آلوئه‌امودین (Aloe-emodin) و دی‌متیل سولفوکساید (DMSO) از شرکت سیگما آلدریچ خریداری شد. آلوئه‌امودین در دی‌متیل‌سولفوکساید ۰/۱٪ به صورت محلول در آمده و با غلظت ۱۰ میلی‌مول تا زمان استفاده در دمای ۲۰°C- نگهداری گردید. محیط کشت Roswell Park Memorial Institute (RPMI)1640، سرم جنین گاوی از شرکت Gibco (انگلستان) و محلول پنیسیلین-استرپتومایسین از شرکت Roche (آلمان) خریداری شد. محلول ۳- (۴- دی‌متیل‌تیازول- ۲-ئیل)-۲-۵-دیفیل تترازولیوم بروماید (MTT) و کیت‌های رنگ‌آمیزی انکسین (Annexin)، کیت پروپیدیوم یدید (PI) و کیت سنجش بیان Fas (CD95) از شرکت Roche (آلمان) خریداری گردید. در این مطالعه از دستگاه الایزا Awareness ساخت کشور آمریکا و دستگاه فلوسایتومتری Becton Dickinson Facscalbur ساخت کشور آمریکا استفاده شد.

کشت سلولی: سلول‌های MCF-7 در محیط کشت RPMI-1640 غنی شده با سرم جنین گاوی (۱۰٪ حجم/حجم) و محلول پنیسیلین/استرپتومایسین (۱٪ حجم/حجم) تحت شرایط کنترل شده دما (۳۷°C) و اتمسفر مرطوب حاوی CO2 (۵٪) کشت داده شد. این سلول‌ها به صورت تک لایه در فلاسک رشد می‌کنند. محیط کشت هفته‌ای سه بار تعویض و برای برداشت کردن سلول‌ها نیز از محلول سترون تریپسین-EDTA استفاده شد [۲۴].

بررسی اثر سیتوتوکسیسیتی آلوئه‌امودین به وسیله آزمون MTT: آزمون MTT، آزمونی کمی و رنگی است که اساس آن بر پایه احیاء نمک زرد رنگ محلول در آب ۳- (۴- دی متیل تیازول- ۲-ئیل)-۲-۵-دیفیل تترازولیوم بروماید [Methy Thiazol Tetrazolium (MTT)] و تشکیل کریستال‌های آبی رنگ تیره و نامحلول فورمازان در آب می‌باشد. احیا MTT، به وسیله آنزیم میتوکندریایی سوکسینات دهیدروژناز و تنها در سلول‌های زنده رخ می‌دهد. بلورهای فورمازان در حلال‌های آلی چون ایزوپروپانول و DMSO قابل حل می‌باشند که با سنجش میزان جذب نوری آن می‌توان تعداد سلول‌های زنده را که فعالیت سوخت و سازی دارند تعیین نمود. روش کار به

این صورت انجام گرفت که در هر یک از چاهک‌های یک پلیت ۹۶ خانه‌ای، 10^4 سلول کشت داده شد و پس از ۲۴ ساعت و رسیدن به پراکنش سطحی ۸۰٪، محیط رویی را با محیط جدید حاوی غلظت‌های مختلف ۵، ۱۰، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکرومول آلوئه‌امودین جایگزین و سلول‌ها را برای ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در شرایط کشت نگهداری نمودیم. هر غلظت از دارو در سه چاهک تکرار صورت می‌گیرد. در هر ردیف از چاهک‌های هر پلیت در کنار غلظت‌های مختلف آلوئه‌امودین یک چاهک به عنوان کنترل در نظر گرفته شد، که شامل تمامی مواد اضافه شده به سلول‌ها به استثنای آلوئه‌امودین بود. بعد از گذشت زمان‌های مورد نظر، پلیت‌ها را از انکوباتور خارج کرده، محیط رویی چاهک‌ها را برداشته و به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر محیط RPMI بدون آلفانفتول همراه با ۱۰ میکرولیتر MTT اضافه گردید. سپس پلیت‌ها را مجدداً به انکوباتور منتقل کردیم و به مدت ۳ تا ۴ ساعت در ۳۷ درجه نگه داشته شدند. در مرحله بعد محصول فورمازان تولید شده با افزودن ۵۰ میکرولیتر حلال دی‌متیل‌سولفوکساید (DMSO) حل و میزان رنگ تولیدی توسط دستگاه الایزا ریدر در طول موج ۵۷۰ نانومتر تعیین شد. توان زیستی سلول‌های تیمار شده با آلوئه‌امودین به شکل نسبت درصد جذب نوری نمونه در قیاس با میزان جذب نوری فورمازان تولیدی در نمونه کنترل تعیین و در یک منحنی دو بعدی (درصد توان زیست یا بقاء سلول‌ها در مقابل غلظت آلوئه‌امودین) نشان داده شد. اختلاف میانگین در حد ۰/۰۵ معنی‌دار تلقی گردید [۲۵].

بررسی آپاپتوز به روش فلوسایتومتری: به منظور تعیین درصد سلول‌های آپاپتوز شده در یک جمعیت سلولی تیمار شده با دارو و قیاس آن با جمعیت سلولی در کنترل منفی، رنگ‌آمیزی سلول‌ها با دو رنگ Annexin-V و پروپیدیوم یدید (PI) انجام گرفت. به این صورت که، بعد از تیمار کردن سلول‌ها با سه غلظت ۵، ۲۵ و ۱۰۰ میکرومول (بیشترین، کمترین و غلظت میانی) از آلوئه‌امودین و ۷۲ ساعت انکوباسیون (در این زمان بیشترین اثر در تست MTT مشاهده شد) سلول‌ها را تریپسینه کرده و با بافر فسفات سالین (PBS) استریل شستشوی سلول‌ها انجام گرفت. به رسوب حاصل از سانتریفوژ سلول‌ها، ۱۰۰ میکرولیتر بافر بایندینگ در میکروتیوب ۱/۵ میلی‌لیتر اضافه گردید. به دنبال اضافه کردن بافر بایندینگ، ۱۰ میکرو لیتراز رنگ پروپیدیوم یدید (PI) و ۵ میکرولیتر از رنگ آنکسین (Annexin-V) نیز به محتویات موجود در میکروتیوب اضافه شد. سپس، تمامی محتویات را به آرامی با حرکت دست و تکان دادن میکروتیوب با یکدیگر مخلوط و یک دست نموده به طوری که رسوب سلول‌ها با مواد موجود به راحتی حل شود. در مرحله بعد، نمونه‌ها در دمای اتاق (۲۵ درجه سانتی‌گراد) به مدت زمان ۱۰ دقیقه در تاریکی انکوبه شد در نهایت آنالیز سلولی توسط دستگاه فلوسایتومتری انجام گرفت. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار دستگاه و تقسیم نقاط ثبت شده در منحنی دوبعدی به چهار ناحیه Q_1 تا Q_4 صورت گرفت. به نحوی که ناحیه Q_1 نمایانگر سلول‌های نکروزی با ویژگی: $Annexin\text{-}V^-$ و PI^+، ناحیه Q_2 نمایانگر سلول‌های آپاپتوز شده دیررس یا نکروزی با ویژگی: Annexin-V+ و +PI، ناحیه Q_3 نمایانگر سلول‌های سالم با ویژگی: $Annexin\text{-}V^-$ و PI^- و ناحیه Q_4 نمایانگر سلول‌های آپاپتوز شده جوان با ویژگی: Annexin-V+ و PI^- می‌باشد. فلوئوروکروم‌های مورد استفاده فلوئورسین ایزوتیوسیانات (FITC) کنژوگه با Annexin-V بود که در

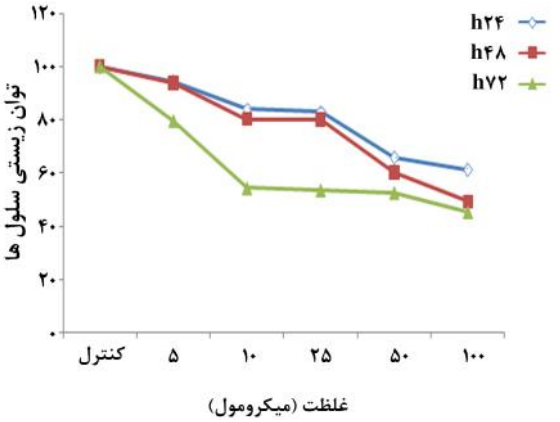
کانال FL1 و فیکواریترین (PE) کنژوگه با PI بود که در کانال FL2 مورد ارزیابی قرار گرفت. به منظور تعیین اثرات آلوئه‌امودین در جهت القاء آپاپتوز و یا نکروز، درصد سلول‌های مستقر در هر ناحیه توسط نرم‌افزار دستگاه فلوسایتومتری (FCS Express) محاسبه و گزارش گردید.

بررسی میزان بیان Fas(CD95): بعد از تیمار سلول‌ها با غلظت‌های ۵ و ۱۰۰ میکرومول آلوئه‌امودین، و ۷۲ ساعت انکوبه کردن، سلول‌ها را تریپسینه کرده و با بافر FCM (PBS+BSA.1%) شستشو داده شد. به رسوب سلولی حاصل از سانتریفوژ، طبق دستورالعمل کیت ۱۰۰ میکرولیتر بافر FCM و آنتی‌بادی‌های ISO و CD95 اضافه گردید و ۴۵ دقیقه در $4^{o}C$ انکوبه شد. در آخر با بافر FCM شستشو سلول‌ها انجام گرفت و با پارافرم آلدئید ۱٪ فیکس شد. فلوئوروکروم مورد استفاده فیکواریترین (PE) بود که در کانال FL2 مورد ارزیابی قرار گرفت. آنالیز سلول‌ها جهت بررسی میزان بیان Fas(CD95) به وسیله فلوسایتومتری با نرم‌افزار(FCS Express) انجام گرفت.

تجزیه و تحلیل داده‌ها: جهت انجام محاسبات آماری از برنامه آماری SPSS و نرم‌افزار اکسل ۲۰۱۰ استفاده شد. اطلاعات پس از ورود به رایانه با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون توکی تجزیه و تحلیل شد. سنجش‌ها سه بار تکرار شد و از میانگین نتایج در محاسبات آماری استفاده شد. اختلاف در سطح ۰/۰۵ معنی‌دار تلقی گردید.

نتایج

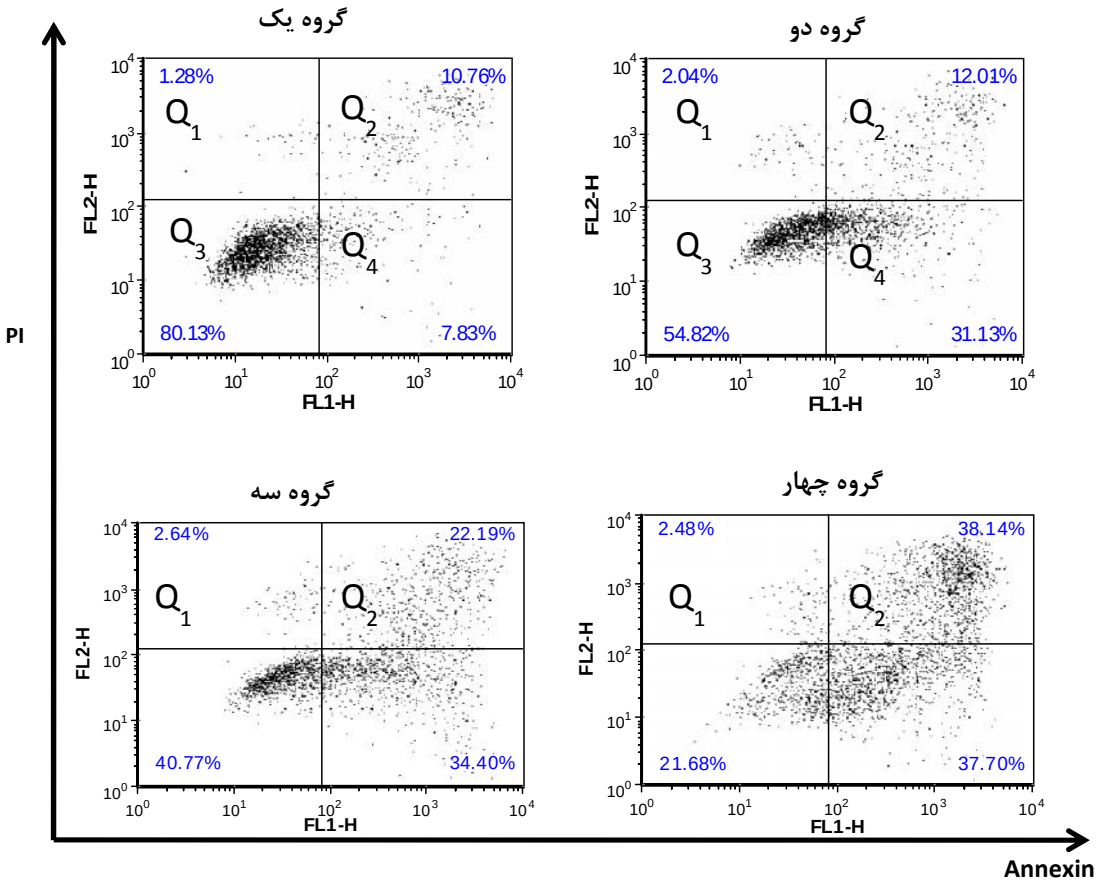
اثر آلوئه‌امودین (AE) بر مرگ سلولی: آنالیز آماری نشان داد که در زمان انکوباسیون ۲۴ ساعته، درصد مرگ سلولی با افزایش دوز آلوئه‌امودین در سلول‌های MCF-7 افزایش یافته است. همان‌طور که در نمودار ۱ نشان داده شده است درصد مرگ سلولی وابسته به دوز در زمان ۴۸ ساعت انکوباسیون سلول‌های MCF-7 دیده می‌شود و این میزان در مقایسه با زمان ۲۴ ساعت انکوباسیون این سلول‌ها افزایش یافت، ولی این افزایش از نظر آماری معنی‌دار نبود (p=۰/۶۲). در انکوباسیون ۷۲ ساعته سلول‌های MCF-7 با آلوئه‌امودین افزایش درصد مرگ سلولی مشاهده شد که این اختلاف نسبت به انکوباسیون ۲۴ ساعته سلول‌ها از نظر آماری معنی‌دار بود (p=۰/۰۴). اما نسبت به انکوباسیون ۴۸ ساعته هرچند که روند افزایشی داشت، از نظر آماری معنی‌دار نبود (p=۰/۱۴). همان‌طور که در نمودار ۱ مشاهده می‌شود میزان درصد مرگ سلولی روند افزایشی وابسته به دوز دارد که با گذشت زمان بیشتر شده است.



نمودار ۱- درصد مرگ سلول‌های MCF-7 در انکوباسیون ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعته با غلظت‌های مختلف آلوئه‌امودین کنترل (بدون تیمار سلول‌ها با آلوئه‌امودین)

اثر آلوئه‌امودین بر آپاپتوز: در طی مرگ برنامه‌ریزی شده یا آپاپتوز، فسفاتیدیل سرین از سطح داخلی به سطح خارجی غشاء منتقل می‌شود که آنکسین-v به فسفاتیدیل سرین موجود در سطح خارج سلولی متصل شده و توسط دستگاه فلوسایتومتری تشخیص داده می‌شود. همچنین، PI نیز به DNA قطعه قطعه شده هسته سلول‌های مرده متصل شده و قابل تشخیص توسط دستگاه فلوسایتومتری

می‌باشد. در نمودار ۲ سلول‌های آپاپتوز شده در سه غلظت از آلوئه‌امودین، همراه با گروه کنترل که نشان‌دهنده سلول‌ها بدون اثر آلوئه‌امودین می‌باشد مشخص شده است. همان‌طور که در نمودار ۲ دیده می‌شود، درصد سلول‌های زنده (ناحیهQ_3) در گروه کنترل که ۸۰٪ است بیشتر از سایر گروه‌ها می‌باشد. درصد سلول‌های آپاپتوز شده جوان (ناحیه Q_4) یعنی سلول‌هایی که در مراحل اولیه آپاپتوز هستند از ۳۱٪ در غلظت ۵ میکرومول آلوئه‌امودین و ۳۴٪ در غلظت ۲۵ میکرومول به ۳۷٪ در غلظت ۱۰۰ میکرومول رسیده است. درصد سلول‌های آپاپتوز شده دیررس یا نکروزی (ناحیه Q_2)، سلول‌هایی که در مراحل آخر آپاپتوز هستند نیز، با افزایش غلظت آلوئه‌امودین بیشتر شده، به گونه‌ای که از ۱۲٪ به ۳۸٪ افزایش یافته است. همان‌گونه که در نمودار ۲ مشخص است، با افزایش غلظت آلوئه‌امودین درصد بیشتری از سلول‌ها در ناحیه Q_4 که نشان‌دهنده سلول‌های آپاپتوز شده است قرار گرفته‌اند که نشان می‌دهد درصد آپاپتوز در سلول‌ها به صورت وابسته به دوز بیشتر شده است.

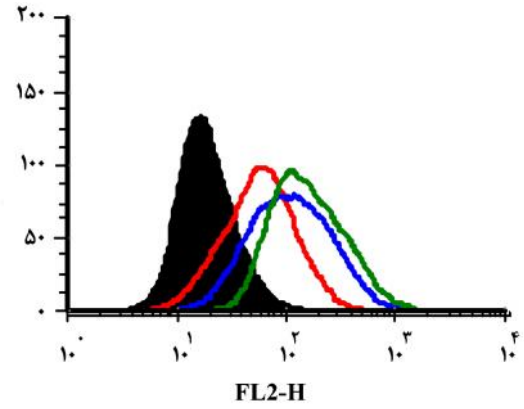


نمودار ۲- اثر غلظت‌های مختلف آلوئه‌امودین بر آپاپتوز در سلول‌های MCF-7

گروه یک: گروه کنترل (بدون تیمار سلول‌ها با آلوئه‌امودین). گروه دو:تیمار سلول‌ها با غلظت ۵ میکرو مول آلوئه‌امودین

گروه سه: تیمار سلول‌ها با غلظت ۲۵ میکرو مول آلوئه‌امودین. گروه چهار: تیمار سلول‌ها با غلظت ۱۰۰ میکرومول الوئه‌امودین Q_1: سلول‌های نکروزی با ویژگی: $Annexin\text{-}V^-$ و PI^+. Q_2: سلول‌های آپاپتوزی دیررس با ویژگی: $Annexin\text{-}V^+.PI^+Q_3$: سلول‌های سالم با ویژگی: $Annexin\text{-}V^-$ و PI^-. Q_4: سلول‌های آپاپتوز شده جوان با ویژگی: $Annexin\text{-}V^+$ و PI^-

اثر آلوئه‌امودین بر بیان Fas (CD95): نمودار ۳ میزان بیان Fas(CD95) در سلول‌های MCF-7 بعد از ۷۲ ساعت تیمار سلول‌ها با غلظت‌های ۵ و ۱۰۰ میکرومول آلوئه‌امودین را نشان می‌دهد. همان‌طور که در نمودار مشخص است میزان بیان Fas نسبت به کنترل (هیستوگرام قرمز رنگ) بیشتر شده است و میزان بیان در غلظت ۱۰۰ میکرومول (هیستوگرام سبز رنگ) بیشتر از غلظت ۵ میکرومول (هیستوگرام آبی رنگ) است. بیان Fas(CD95) با افزایش غلظت آلوئه‌امودین رابطه مستقیم داشت.



نمودار ۳- اثر آلوئه‌امودین بر میزان بیان Fas(CD95) در سلول‌های MCF-7 هیستوگرام سیاه (آنتی‌بادی ایزوتایپ): تعداد سلول‌ها در حالت پایه. هیستوگرام قرمز(کنترل CD95): میزان بیان CD95 بدون تأثیر آلوئه‌امودین. هیستوگرام آبی: میزان بیان CD95 با غلظت ۵ میکرومول آلوئه‌امودین. هیستوگرام سبز: میزان بیان CD95 با غلظت ۱۰۰ میکرومول آلوئه‌امودین

بحث

آلوئه‌امودین (Aloe-emodin) یکی از ترکیبات فعال طبیعی است که در برگ‌های آلوئه‌ورا وجود دارد. در مطالعات متعددی به خواص ضد سرطانی آن اشاره شده است [۲۶]. در مطالعه حاضر برای اولین بار اثر ضد سرطانی آلوئه‌امودین (Aloe-emodin) و سازوکار آلقاء آپاپتوز آن برسلول‌های سرطانی پستان (MCF-7) بررسی شد. این مطالعه نشان داد آلوئه‌امودین می‌تواند باعث کاهش توان زیستی سلول‌های سرطانی پستان و همین طور موجب القاء آپاپتوز همراه با افزایش بیان Fas(CD95) در این سلول‌ها شود.

دو مسیر مهم آپاپتوز شناخته شده است. اتصال محرک مرگ سلولی به رسپتورهایی نظیر فاکتور نکروز دهنده تومور (TNF) در سطح سلول‌ها باعث آپاپتوز از طریق مسیر خارجی می‌شود. از طرفی دیگر عوامل شیمی درمانی، استرس‌های ژنوتوکسیک و سایر عوامل محرک مرگ سلولی موجب آغاز آپاپتوز از طریق یک مسیر داخلی یا میتوکندری می‌گردد [۲۷]. گیرنده‌های مرگ، اعضای ابر خانواده گیرنده فاکتور نکروزدهنده تومور (TNF) می‌باشند. زمانی که این گیرنده‌ها توسط لیگاندهای مربوطه تحریک شوند، سبب فعال شدن کاسپازها و القای آپاپتوز می‌گردند. از مولکول‌های مهم القاکننده آپاپتوز در مسیر خارج سلولی TNF مرتبط با لیگاندهای القاکننده آپاپتوز، Fas لیگاند است. مولکول Fas لیگاند در بین مسیرهای مختلف که باعث القاء آپاپتوز می‌گردد، یک مسیر مهم کنترل شده است [۲۸].

در مطالعات گذشته اثر ضد سرطانی آلوئه‌امودین بر توان زیستی بعضی رده‌های سلولی و القاء آپاپتوز همراه با افزایش بیان Fas(CD95)، انجام گرفته که سازگار با یافته‌های این پژوهش می‌باشد. در مطالعه Chiu و همکارانش که بر روی اثر ضد سرطانی آلوئه‌امودین در سلول‌های سرطانی زبان (SCC-4) انجام گرفت، نشان دادند آلوئه‌امودین باعث آپاپتوز در این سلول‌ها می‌شود. که آپاپتوز ایجاد شده همراه بود با افزایش بیان Fas(CD95) و فعال شدن کاسپاز هشت [۲۹].

در بررسی حاضر اثر سایتوتوکسیک آلوئه‌امودین بر سلول‌های MCF-7 با استفاده از تست MTT انجام گرفت.

همان‌طور که نتایج این مطالعه نشان داد با افزایش غلظت آلوئه‌امودین درصد مرگ سلولی به صورت وابسته به دوز و زمان بیشتر شده است. به صورتی که بیشترین درصد مرگ سلولی مربوط به غلظت ۱۰۰ میکرومول و زمان ۷۲ ساعت پس از تیمار سلول‌ها بود. در مطالعه‌ای موافق با مطالعه حاضر، Guo و همکارانش، اثر سایتوتوکسیسیتی آلوئه‌امودین را به وسیله آزمون MTT بر سلول‌های سرطانی معده (MGC-803) بررسی کردند. آن‌ها نشان دادند توان زیستی سلول‌های سرطانی معده به صورت وابسته به دوز و زمان در اثر تیمار با آلوئه‌امودین کاهش پیدا می‌کند [۳۰]. در ادامه ما به بررسی آپاپتوز و مکانیسم القاء آن در سلول‌های MCF-7 پرداختیم. جهت بررسی آپاپتوز غلظت‌های ۱۰۰ میکرومول آلوئه‌امودین که بیشترین اثر سایتوتوکسیسیتی را نشان داد، غلظت ۵ میکرومول که کمترین سایتوتوکسیستی را داشت و غلظت میانی ۲۵ میکرومول را استفاده کردیم و چون بیشترین اثر سیتوتوکسیسیتی مربوط به زمان ۷۲ ساعت پس از تیمار بود، سلول‌ها را با غلظت‌های گفته شده، ۷۲ ساعت انکوبه کردیم. آنالیز فلوسایتومتری نشان داد درصد زیادی از سلول‌ها در اثر تیمار با آلوئه‌امودین دچار مرگ برنامه‌ریزی شده سلول یا آپاپتوز شده‌اند، هر چند که درصد بسیار کمی هم از سلول‌ها دچار نکروز شدند ولی این میزان نسبت به درصد سلول‌های آپاپتوز شده قابل توجه نبود. یافته‌های این مطالعه همچنین، نشان داد که آپاپتوز سلولی به صورت وابسته به دوز بود. این یافته‌ها که موافق با سایر مطالعات بود بیانگر این مطلب است که آلوئه‌امودین می‌تواند سلول‌های سرطانی را به سوی آپاپتوز پیش ببرد و از تکثیر آن‌ها جلوگیری کند.

جهت پی بردن به سازوکار اثر آلوئه‌امودین بر سلول‌های MCF-7 به بررسی میزان بیان مولکول Fas پرداختیم. یافته‌های ما نشان‌دهنده افزایش بیان Fas همراه با افزایش دوز آلوئه‌امودین بود. احتمالا آلوئه‌امودین با اثر بر روی غشاء سلول‌های MCF-7 و تحریک کردن گیرنده‌های مرگ و مشخصاً پروتیئن Fas موجب فعال کردن کاسپازها و در نهایت باعث مرگ برنامه‌ریزی شده سلول یا آپاپتوز از طریق مسیر خارج سلولی می‌شود.

در مطالعه Lin و همکارانش، مشخص شد آلوئه‌امودین از تکثیر سلول‌های سرطانی جلوگیری می‌کند و باعث توقف چرخه سلولی در فاز G_2/M_1 می‌شود. این گروه که بر روی سلول‌های سرطان مثانه (T24) کار می‌کردند. نشان دادند که آلوئه‌امودین باعث القاء آپاپتوز همراه با فعال کردن P53, P21, Bax, Fas و Caspase3 می‌شود [۳۱]. در مطالعات متعددی اشاره شده که آپاپتوز القا شده به وسیله آلوئه‌امودین همراه است با تغییراتی در بیان ژن‌های غشایی خانواده bcl2، تنظیم کننده‌های آپاپتوز و این که آلوئه‌امودین می تواند باعث رها سازی سیتوکروم C از میتوکندری‌ها در سلول‌های سرطانی ریه در رده CH27 شود .به علاوه، مشاهده شده که آلوئه‌امودین آپاپتوز را در سلول‌های سرطانی کبد در هر دو رده HPG-2 و HPG-3 همراه با بیان p21 و p53 القاء می‌کند [۳۲]. در پژوهشی دیگر که به وسیله Pecere و همکارانش بر روی سلول‌های توموری نورواکتودرم (neuroectodermal) انجام گرفت نشان داده شد که آلوئه‌امودین بر روی انواع گوناگونی از سلول‌های نرمال اثر معناداری چه به صورت حاد یا مزمن ندارد. ولی می‌تواند به صورت انتخابی بر روی سلول‌های توموری نورواکتودرم اثر سمی داشته باشد [۵]. البته علی‌رغم این تحقیقات، جهت مشخص شدن اثرات

آلوئه‌امودین بر روی سلول‌های سالم انسانی، تحقیقات بیشتری نیاز است.

نتیجه‌گیری

یافته‌های این مطالعه نشان داد آلوئه‌امودین باعث کاهش توان زیستی سلول‌های سرطانی پستان (MCF-7) می‌شود. همچنین، آپاپتوز را در این سلول‌ها القا می‌کند و باعث افزایش بیان Fas که یکی از مارکرهای آپاپتوز خارج سلولی است، می‌شود. این بافته‌ها می‌تواند آلوئه‌امودین را به عنوان یک داروی ضد سرطان البته همراه با بررسی‌های بیشتر به خصوص انجام تحقیقات درون‌تنی در این زمینه، جهت استفاده در درمان سرطان پستان یا به عنوان یک داروی کمکی همراه با سایر داروهای رایج که در درمان سرطان پستان استفاده می‌شود مطرح کند.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از معاونت آموزشی و پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی کردستان و دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان به خاطر حمایت‌های علمی و مالی تقدیر و تشکر می‌شود.

References

[1] Sendelbach L. A review of the toxicity and carcinogenicity of anthraquinone derivatives. Toxicology 1985; 57(3):.227-40.

[2] Zong JR, Chao ZM, Liu ZL, Wang J [Review about structure-function relationships of anthraquinone derivatives from Radix etRhizoma Rhei. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, 2008. 33(20): p. 2424-7.

[3] lee HZ, Lin CJ, Yang WH, Leung WC, Chang SP. Aloe-emodin induced DNA damage throuhg generation of reactive oxygen species in human lung carcinoma cells. *Cancer Lett* 2006; 239: 55-63.

[4] Eshun K and He Q. Aloe vera: a valuable ingredient for the food, pharmaceutical and cosmetic industries – a review. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2004; 44: 91-6.

[5] Pecere T, Gazzola MV, Mucignat C, Parolin C, Vecchia FD,Cavaggioni A, et al. Aloe-emodin is a new type of anticancer agent with selective activity against neuroectodermal tumors. *Cancer Res* 2000; 60: 2800-04.

[6] Kuo PL, Lin TC and Lin CC. The antiproliferative activity of aloe-emodin is through p53-dependent and p21-dependent apoptotic pathway in human hepatoma cell lines. *Life Sci* 2002; 71: 1879-92.

[7] Macevedo-Duncan M, Russell C, Patel S and Patel R. Aloe-emodin modulates PKC isoenzymes, inhibits proliferation and induces apoptosis in U-373MG glioma cells. *Int Immunopharmacol* 2004; 4: 1775-84.

[8] Mijatovic S, Maksimovic-Ivanic D, Radovic J, Miljkovic D,Kaludjerovic GN, Sabo TJ, et al. Aloe emodin decreases the ERK-dependent anticancer activity of cisplatin. *Cell Mol Life Sci* 2005; 62: 1275-82.

[9] Chen SH, Lin KY, Chang CC, Fang CL and Lin CP. Aloe-emodin induced apoptosis in human gastric carcinoma cells. *Food Chem Toxicol* 2007; 45: 2296-303.

[10] Sakorafas GH, Krespis E and Pavlakis G. Risk estimation for breast cancer development; a clinical perspective. *Surg Oncol* 2002; 10(4): 183-92.

[11] Chu K and Kessler LG. Recenttrends in US breast cancer incidence, survival, and mortality rates. *J Natl Cancer Lnst* 1996. 2(3): 133-40.

[12] Seyed Noori T, Zahmatkesh T, Molaei T. Assessment breast cancer risk using Gill modeles. Journal of Iran Breast Disease 2008; 2: 53-7.[Farsi]

[13] Baum M. The changing face of breast cancer--past, present and future perspectives. *Breast Cancer Res Treat*, 2002; 75 Suppl 1(1): 1-5.

[14] Wickerham L. Tamoxifen--an update on current data and where it can now be used. *Breast Cancer Res Treat*, 2002; 75 Suppl 1(1): 7-12.

[15] Rubino C, Adjadj E, Guérin S, Klotz JB, Wilcox HB. Radiation dose, chemotherapy and risk of lung cancer after breast cancer treatment. *Breast Cancer Res Treat* 2002; 75(1): 15-24.

[16] Bar Sade RB, Chetritb A, Figerd A, Moshe Z. Hormone replacement therapy is more prevalent among Jewish BRCA1/2 mutation carriers. *Eur J Cancer* 2006; 42(5): 650-5.

[17] Park E.J., Pezzuto J.M. Botanicals in Cancer Chemoprevention. *Cancer and Metastasis Reviews* 2002; 21: 231-55.

[18] Hetz C.A., Torres V., Quest A.F. Beyond apoptosis: nonapoptotic cell death in physiology and disease. *Biochemistry and Cell Biology* 2005; 83: 579-588.

[19] Ghavami S, Hashemi M, Kadkhoda K. Apoptosis in liver diseases--detection and therapeutic applications. *Med Sci Monit* 2005; 11: RA337-45. [Farsi]

[20] Hashemi M. Apoptosis and autoimmune disease. Anti-Inflammatory and Anti-Allergy agents. *Curr Med chem* 2005; 4: 429-37. [Farsi]

[21] Xu G. and Shi Y. Apoptosis signaling pathways and lymphocyte homeostasis. *Cell Res* 2007; 17(9): 759-71.

[22] T. Suda, T. Takahashi, P. Golstein, and S. Nagata. Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell Mol Life Sci* 1993;75:1169-78.

[23] KY Jen, VG. Cheung. Identification of novel p53 target genes in ionizing radiation response. *Cancer Res* 2005; 17: 7666-73.

[24] M Ghrici, M El zowalaty, A Rahman omar, A Ideris. Induction of apoptosis in MCF-7 cells by the

hemagglutinin-neuraminidase glycoprotein of Newcastle disease virus Malaysian strain AF2240. *Oncol Rep* 2013; 30(3): 1035-44.

[25] Gilberto C, Franchi Jr, Cleber S, Moraes, Viviane C. Toreti A D, Alexandre E, Nowill, and Yong K. Park. Comparison of Effects of the Ethanolic Extracts of Brazilian Propolis on Human Leukemic Cells As Assessed with theMTT Assay. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine 2012, *Article ID* 918956, 6 pages.

[26] Kai-Yuanlin, Yih-Huei uen. Aloe-emodin, an anthraquinone, in vitro inhibits proliferation and induces apoptosis in human colon carcinoma cells. Oncol Lett 2010; 1: 541-7.

[27] Kemnitzer W, Kasibhatla S, Jiang S, Zhang H, Zhao J, Jia S, et al. Discovery of 4-aryl-4 H-chromenes as a new series of apoptosis inducers using a cell- and caspase-based high-throughput screening ssay. 2. Structure–activity relationships of the 7- and 5-, 6-, 8-positions. *J Med Chem* 2005; 50: 2858-64.

[28] Kolomecki K, Maciaszczyk P, Stepien H, Stepien T, Kuzdak K, Ulanska J. P53 concentration and soluble FasL (sFasL) serum level as indicators of apoptosis in patients with benign and malignant thyroid tumors. *Bratisl Lek Listy* 2005; 106: 297-300.

[29] Tsan-Hung Chiu, Wan-Wen Lai, Te-Chun Hsia, Jai-Sing Yang, Tung-Yuan Lai, Ping Wu. Aloe-emodin Induces Cell Death through S-Phase Arrest and Caspase-dependent Pathways in Human Tongue Squamous Cancer SCC-4 Cells. *Anticancer Res* 2009; 29: 4503-12.

[30] Guo J, Xiao B, Zhang S, Liu D, Liao Y, Sun Q. Growth Inhibitory Effects of Gastric Cancer Cells with an Increase in S Phase and Alkaline Phosphatase Activity Repression by Aloe-Emodin. *Cancer Biol Ther* 2007; 6: 85-8.

[31] Lin JG, Chen GW, Li TM, Chouh ST, Tan TW, Chung JG. Aloe-emodin induces apoptosis in T24 human bladder cancer cells through the p53 dependent apoptotic pathway. *The J Urol* 2006; 175: 343-47.

[32] Kuo Pl, Lin Tc, Lin Cc. The antiproliferative activity of aloe-emodin is through p53-dependent and p21-dependent apoptotic pathway in human hepatoma cell lines. *Life Sci* 2002;71:1879-92.

Apoptosis Effects of Aloe-emodin against MCF-7 Cell Line

J. Hosseini[1], M. Mahmoodi[2], M. Hakhamaneshi[3], A. Jalili[4], A. Khoshdel[5], M. Sheikhfathollahi[6], Sh. Fakhari[7], S.M. Hosseini-zijoud[8]

Received: 02/07/2013 Sent for Revision: 20/07/2013 Received Revised Manuscript: 21/10/2013 Accepted: 25/12/2013

Background and Objective: Aloe-emodin is a Hydroxyanthraquinone that exists in Aloe Vera leaves and has been known to have anti-tumor effects. Various studies have mentioned the biological effects of Aloe Vera such as antiviral, antimicrobial and some hepato-protective effects. Recently its antitumor effects have attracted the attention of many researchers. Breast cancer is the most common malignancy in women, accounting for 30% of all female cancers and < 1% of all cancer cases in men. Breast cancer is also responsible for 15% of cancer deaths in women. The aim of the present study was to investigate the anti-cancer effects of aloe-emodin on human breast cancer MCF-7 cell line.

Materials and Methods: In this laboratory study MCF-7 cells were cultured in RPMI medium with 10% fetal bovine serum (FBS). The cytotoxic effect of different concentrations (5, 10, 25, 50, and 100 µM) of Aloe-emodinon cultured cells were evaluated by MTT assay at different times (24, 48, 72 h). Apoptosis and CD95 (Fas) expression were analyzed by flow-cytometry using an Annexin V-FITC/PI kit and Fas (CD95) kit according to the manufacturer's protocol.

Results: Aloe-emodin decreases the viability of MCF-7 cell line in a time and dose dependent manner, so that the most effective concentration of this substance was 100µM and 72 h after treatment. According to the data of Fas (CD95) expression and Annexin-PI, the highest apoptosis induction rate was seen in 100µM and 72 h.

Conclusion: The findings of the present study indicated that Aloe-emodinhas has some antitumor effects and can be used in the treatment of breast cancer. However, further investigation of its cytotoxic effects against tumor cells, both in vitro and in vivo, is recommended.

Key words: Breast Cancer, Aloe-emodin, Apoptosis, MCF-7

Funding: This research was funded by Rafsanjan University of Medical Sciences.

Conflict of interest: None declared.

Ethical approval: The Ethics Committee of Rafsanjan University of Medical Sciences approved the study.

How to cite this article: Hosseini J, Mahmoodi M, Hakhamaneshi M, Jalili A, Khoshdel A, Sheikhfathollahi M, Fakhari Sh, Hosseini-zijoud SM. Apoptosis Effects of Aloe-emodin against MCF-7 Cell Line *J Rafsanjan Univ Med Sci* 2014; 13(1): 41-52. [Farsi]

1- MSc Student of Clinical Biochemistry, Dept. Of Biochemistry, Biophysics & Genetics, Faculty of Medicine, Rafsanjan University of Medical Sciences, Rafsanjan, Iran

2- Prof. of Clinical Biochemistry, Dept. of Biochemistry, Biophysics & Genetics, Faculty of Medicine and the Molecular Medicine Research Centre, Rafsanjan University of Medical Sciences, Rafsanjan, Iran
(Corresponding Author): (0391) 5234003, Fax:(0391) 5225209, E-mail:mahmoodies@yahoo.com

3- Assistant Prof of Clinical Biochemistry, Dept. of Biochemistry and Nutrition, Faculty of Medicine, Kurdestan University of Medical Sciences, Kurdestan,Sanandaj, Iran

4- Associate Prof. Dept. of Immunology, Faculty of Medicine, Kurdestan University of Medical Sciences, Kurdestan, Sanandaj, Iran

5- Assistant Prof.of Clinical Biochemistry, Dept. of Biochemistry, Biophysics & Genetics, Faculty of Medicine Rafsanjan University of Medical Sciences, Rafsanjan, Iran

6- Assistant Prof.of Biostatistics, Dept. of Social Medicine, Faculty of Medicine, Rafsanjan University of Medical Sciences, Rafsanjan, Iran

7- MSc of Clinical Microbiology, Dept. of Clinical microbiology, Faculty of Medicine, kurdestan University of Medical Sciences, Kurdestan, Sanandaj, Iran

8- PhD Student, Department of Biochemistry, Faculty of medicine, Hamedan University of Medical Sciences, Hamedan, Iran