بررسی مقایسه‌ای اثرات رزمارینیک اسید وکارنوزیک اسید بر بقای سلولی، متابولیسم سرآمید و واکنش‌های آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت در سلول‌های سرطانی رده Hep-G2

نرگس نجارپور[1*]، مسعود مشهدی اکبر بوجار[1]

دریافت: ۱۳۹۴/۱۰/۱۵ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۳/۲۳

[1]گروه علوم سلولی مولکولی، دانشکدهٔ علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران
*مسئول مکاتبات: najarpour@khu.ac.ir

چکیده. کارنوزیک اسید و رزمارینیک اسید جزء خانوادهٔ پلی‌فنول‌ها هستند که در گیاه رزماری یافت می‌شوند. این مطالعه به بررسی مقایسه‌ای اثرات این دو ترکیب با تکیه بر متابولیسم سرآمید در سلول‌های Hep-G2 پرداخته است. در این مطالعهٔ تجربی سلول‌های Hep-G2 در محیط DMEM حاوی سرم جنین گاو و آنتی بیوتیک کشت شدند. سپس سلول‌ها با رقت دوگانه از دو مادهٔ کارنوزیک اسید و رزمارینیک اسید از غلظت ۰ تا ۷۰ میکرو مولار به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شدند و زیست پذیری سلول‌ها به روش MTT تعیین شد. جهت سنجش فعالیت آنزیم کاسپاز ۳ از دستگاه اسپکترفتومتر و برای اندازه‌گیری سطح سرآمید از روش HPLC استفاده شد. در این مطالعه همچنین فعالیت آنزیم‌های اسفنگومیلیناز، اسید سرآمیداز و گلوکوزیل سرآمید سنتاز سنجش شد. کارنوزیک اسید سبب افزایش حیات سلولی در سلول‌های Hep-G2 به گونهٔ وابسته به دوز با کاهش سطح سرآمید و کاهش فعالیت آنزیم‌های کاسپاز ۳، اسفنگومیلیناز، گلوکوزیل سرآمید سنتاز و افزایش فعالیت آنزیم اسید سرآمیداز شد. رزمارینیک اسید از غلظت ۵۰ میکرومولار به بعد سبب کاهش بقای سلولی با افزایش سطح سرآمید و افزایش فعالیت آنزیم اسفنگومیلیناز و کاهش فعالیت آنزیم‌های اسید سرآمیداز و گلوکوزیل سرآمید سنتاز شد. همچنین این ماده از غلظت ۴۰ میکرومولار به بعد سبب افزایش فعالیت آنزیم کاسپاز ۳ شده است. هرچند در اغلب موارد پلی‌فنول‌ها باعث القاء آپوپتوز و کاهش درصد بقای سلولی شده‌اند اما در بعضی مواقع اثر معکوس داشته و سبب رشد سلولی شده‌اند.

واژه‌های کلیدی. پلی‌فنول‌ها، کاسپاز ۳، اسید سرآمیداز، اسفنگومیلیناز، گلوکوزیل سرآمید سنتاز

A comparative study on the effects of rosmarinic acid and carnosic acid on the cell viability, ceramide metabolism and antioxidant enzyme responses in the Hep-G2 cancer cell line

Narges Njarpour[1*], Masoud Mashhadi Akbar Boojar[1]

Received: 04/01/2016 / Accepted: 12/06/2016

[1] Department of Cell and Molecular Biology, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran.
[*]**Correspondent author:** najarpour@khu.ac.ir

Abstract. Carnosic acid and Rosmarinic acid belong to a family of polyphenols found in Rosemary. In this study the effects of these two compounds were compared based on ceramide metabolism in cell line of Hep-G2. Hep-G2 cells were cultured in DMEM, supplemented with fetal bovine serum and antibiotics. Cells with double dilution were then cultured with Carnosic acid and Rosmarinic acid (with concentrations 0 to 70 µM for 24 h) and viability of cells was determined by MTT method. A spectrophotometer and HPLC assay was used to measure of caspase-3 activity and the level of ceramide. The activity of such enzymes as sphingomylinase, acid ceramidase, glucosylceramide synthase was also measured. Carnosic acid increased cell viability in Hep-G2 cells by reducing ceramide levels and the activity of the other enzymes such as caspse-3, sphingomylinase, glucosylceramide synthase and also by increasing the activity of the ceramidase enzyme acid. Rosmarinic acid in concentrations of up to 50 µM decreased cell viability by increasing ceramide levels and the activity of caspse-3, sphingomylinase and also by decreasing activity of enzymes such as acid ceramidese and glucosylceramide synthase. This substance also in concentrations of up to 40 µM caused increasing activity of caspase-3 enzyme. Although in most cases polyphenols resulted in induction of apoptosis and decreased cell viability, in some cases they affected inversely and caused cell growth.

Keywords. polyphenols, caspase-3, acid ceramidase, sphingomylinase, glucosylceramide synthase

[Downloaded from nbr.khu.ac.ir on 2024-03-28]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1395.3.1.6.0]
[DOI: 10.21859/acadpub.nbr.3.1.61]

مقدمه

کارسینومای کبدی (Hcc) نوعی سرطان کبدی است که اکثراً پس‌از ابتلا به بیماری‌هایی مثل هپاتیت ویروسی B و C یا سیروز کبدی که در بیشتر موارد به‌علت مصرف الکل است رخ می‌دهد (Kumar *et al.*, 2003). هپاتوسل کارسینوما هنگامی که یک موتاسیون در ماشین سلولی رخ دهد، به تکثیر بی‌رویهٔ سلول‌ها منجر شود و یا ناشی از پرهیز سلول از پدیدهٔ مرگ سلولی آپوپتوز باشد به وجود می‌آید (Kumar *et al.*, 2003).

ازآنجاکه بسیاری از میوه‌ها، سبزی‌ها و گیاهان یک‌ساله نقش مهمی در مرحلهٔ شروع و نیز جلوگیری از پیشرفت سرطان ایفا می‌کنند، تعداد بی‌شماری از بیماران در سراسر دنیا از گیاهان دارویی به منظور حفظ سلامتی استفاده می‌کنند. بنابراین، دانشمندان نگاه عمیقی به خواص بیولوژیکی و قدرت درمانی این محصولات دارند (Nejad Shahrokhabadi, 2009) . دو ترکیب رزمارینیک اسید و کارنوزیک اسید در گیاه رزماری (*Rosmarinus Officinalis* L) یافت می‌شوند که خواص ویژه‌ای ازجمله ضدسرطان، ضدالتهاب و آنتی‌اکسیدان دارند (Jin min *et al.*, 2014; Shahadat & Rahman, 2014).

در تحقیقات اخیر، مشخص شده که ارزیابی سطح سرامید می‌تواند در تعیین خوش‌خیم و بدخیم بودن سلول‌ها نقش داشته باشد به‌نحوی که بین میزان افزایش سطح سرآمید در بافت تومور بدخیم ارتباطی وجود دارد (Levy & Futerman, 2010) .

براین‌اساس، مطالعهٔ حاضر به بررسی تأثیر رزمارینیک اسید و کارنوزیک اسید بر بقای سلول‌های ردهٔ Hep-G2 می‌پردازد و بیان می‌کند که تغییر در متابولیسم سرآمید به‌وسیلهٔ این دو ماده چه عملکردی بر متابولیسم این سلول‌ها دارد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه، دو مادهٔ رزمارینیک اسید و کارنوزیک اسید از شرکت سیگماآلدریچ خریداری شد و غلظت‌های ۰، ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۶۰ و ۷۰ میکرومولار از این دو ماده تهیه شد و در پلیت‌های ۹۶تایی با تعداد سلول‌های ۵۰۰۰ به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شد و اثر عصاره بر زنده‌بودن سلول‌ها با استفاده از آزمون MTT بررسی شد.

کشت سلولی

سلول‌های سرطانی کبد (Hep-G2) از سرم‌سازی رازی حصارک، ایران تهیه شد. سپس، در محیط کشت DMEM به همراه ۵ درصد سرم جنین گاوی (FBS)، پنی‌سیلین و استرپتومایسین کشت شد. سلول‌ها در انکوباتور ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد در رطوبت ۹۰ درصد و CO_2 ۵ درصد قرار گرفتند. بعد از ۲۴ ساعت، سلول‌ها درمعرض غلظت‌های مختلف دو ترکیب قرار گرفتند. هم‌زمان، نمونه‌های کنترل بدون تیمار به‌صورت سه‌تایی در نظر گرفته شد.

بررسی زنده‌بودن سلول‌ها

زنده‌بودن سلول‌ها توسط آزمایش MTT [۵،۴، ۳ دی‌متیل‌تیازول ۵، ۲ دی‌فنیل‌تترازولیوم (Masada, 1973) ارزیابی شد. به‌طور خلاصه، سلول‌ها به تعداد ۵۰۰۰ در هر چاهک از پلیت ۹۶ تایی سلولی قرار گرفت و با غلظت‌های مختلف دو ترکیب رزمارینیک اسید و کارنوزیک اسید تحت تیمار قرار گرفت. محیط کشت‌رویی دور ریخته شد. سلول‌ها در محلول MTT (۵ میلی‌لیتر در PBS) به‌مدت چهار ساعت قرار گرفتند و پس‌از محلول‌سازی فورمازان توسط ۱۰۰ میکرولیتر DMSO و جذب نوری در ۵۷۰ نانومتربا دستگاه اسپکترفتومتر خوانده شد.

سنجش فعالیت آنزیم کاسپاز ۳

جهت سنجش فعالیت آنزیم کاسپاز ۳، بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون سلول‌ها با مواد تیماری، محیط رویی دور ریخته شد. به سلول‌ها تریپسین افزوده، سانتریفوژ صورت گرفته و بافر لیزکنندهٔ سلول به نمونه‌ها اضافه شد (Aly, 2014). سپس، مخلوط لیزشده سانتریفوژ شد. محلول حاوی سوبسترای AC-DEVD-PNA به محلول رویی اضافه شد و در انکوباتور قرارگرفت. جذب محلول رویی حاصل جداشدن پارانیتروآنیلید در ۴۰۵ نانومتر به‌وسیلهٔ اسپکترفتومتر سنجش شد.

سنجش فعالیت آنزیم اسفنگومیلیناز

فعالیت این آنزیم با اضافه‌کردن سوبسترای اسفنگومیلین به عصارهٔ سلولی آغاز می‌شود (Liu, 2014). در اثر فعالیت این

[Downloaded from nbr.khu.ac.ir on 2024-03-28]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1395.3.1.6.0]
[DOI: 10.21859/acadpub.nbr.3.1.61]

آنزیم اسفنگومیلین به سرآمید و فسفریل کولین تبدیل می‌شود. با اضافه‌شدن آنزیم آلکالین فسفاتاز، فسفریل کولین به کولین هیدرولیز می‌شود و کولین هم در حضور آنزیم کولین اکسیداز به بتائین و H_2O_2 تبدیل می‌شود؛ حال، با حضورآنزیم پراکسیداز مادهٔ H_2O_2 با ADHP ترکیب شده و مادهٔ فلورسانس حاصل این واکنش (resorufin) در طول موج تحریک ۵۳۵ نانومتر و طول موج نشر ۵۹۰ نانومتر به‌وسیلهٔ فلورسانس اسپکترفتومتر ارزیابی شد.

سنجش فعالیت آنزیم اسید سرآمیداز

برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم اسید سرآمیداز، در بافر استات سدیم و تریتون X-100 سوبسترای NBD-ceramide اضافه و انکوبه شد (Krishna, 2013). سپس، با افزودن کلروفرم–متانول واکنش متوقف شد و سانتریفوژ انجام گرفت و محلول رویی برداشته شد. این لوله به‌مثابهٔ سوبسترای کلیواژ نشده کنترل در دستگاه فلورسانس اسپکتروفتومتر در طول موج‌های خروج و نشر به‌ترتیب ۴۰۰ و ۵۵۰ نانومتر ازنظر راندمان مورد سنجش قرار گرفت. هم‌زمان با این واکنش یک لوله آزمایش دیگر مانند فوق تهیه شد. با این تفاوت که بعد از افزودن سوبسترا عصارهٔ سلول اضافه شد و راندمان فلورسانس این لوله هم‌زمان با لوله کنترل در طول موج‌های خروج و نشر به‌ترتیب ۴۳۰ و۵۵۰ نانومتر تعیین شده نسبت راندمان کلیواژ شده /کلیواژ نشده برحسب درصد ارزیابی شد.

سنجش فعالیت آنزیم گلوکوزیل– سرآمید سنتاز

آنزیم گلوکوزیل–سرآمید سنتاز واکنش ذیل را کاتالیز می‌کند:

C6- NBD-Cer + udp-glucose = C6- NBD- glucose -Cer + udp

سلول‌های تیمارشده به‌منظور لیزشدن با بافر فسفات–سالین و EDTA مخلوط و سانتریفوژ شد و مایع رویی udp-glucose و سوبسترای C6- NBD- Cer اضافه شد (Hayashi, 2005). آن‌گاه از محلول نهایی حاوی محصول ۲۰ میکرولیتر به دستگاه HPLC با ستون نرمال و قطر داخلی ۴/۵ داده شدکه دتکتور آن در طول موج ۴۷۰ نانومتر بر آب تحریک و ۵۳۰ نانومتر برای دریافت پرتو تابشی تنظیم شده است. فعالیت آنزیم ازطریق محاسبهٔ سطح زیرمنحنی پیک فلورسانس مادهٔ تولیدی که درواقع C6- NBD- glucose – Cer و دارای زمان بازداری ۴/۲ دقیقه است، در مقایسه با پیک استاندارد تعیین شد.

سنجش سطح سرآمید

برای اندازه‌گیری سلولی سرآمید، ابتدا آنزیم اسید سرآمیداز نوترکیب به عصارهٔ سلولی اضافه شدکه درنتیجهٔ آن، سرآمید موجود در نمونه به‌طور کامل هیدرولیز شده و به اسفنگوزین (Sphingosine) تبدیل شد (He, 2005). مادهٔ ویژه‌ای به نام نفتالین ۲و۳ دی‌آلدیید (NDA) که خاصیت فلورسانسی دارد به اسفنگوزین متصل می‌شود. حال، sphingosine-NDA توسط HPLC فاز معکوس از عصارهٔ سلولی جدا شده و در دتکتور فلورسانس تعیین مقدار شد. میزان سرآمید دقیقاً معادل اسفنگوزین به‌دست‌آمده از روش HPLC در همان نمونه است.

بررسی آماری

هر آزمایش در سه‌مرتبه تکرار و مقایسهٔ میانگین داده‌ها با شاهد و تیمارها با هم با آزمون ANOVA و نرم‌افزار SPSS به‌دست آمد.

نتایج

تأثیر دو تیمار کارنوزیک اسید و رزمارینیک اسید بر زیست‌پذیری سلولی

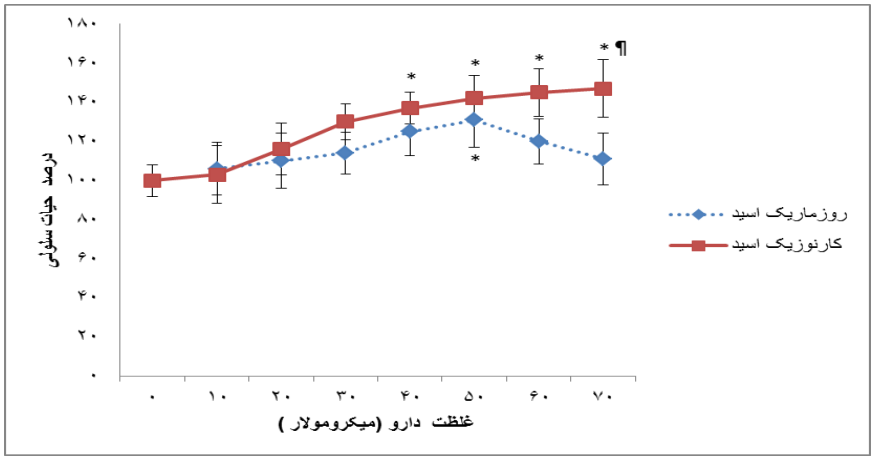
سلول‌های Hep-G2 تحت اثر دو تیمار کارنوزیک اسید و رزمارینیک اسید در غلظت‌های مختلف تفاوت‌های بارز و وابسته به دوز با یکدیگر نشان دادند. تحت اثر تیمار کارنوزیک اسید، با افزایش غلظت این تیمار درصد بقای سلولی افزایش یافت. در اثر تیمار با رزمارینیک اسید با افزایش غلظت از ۵۰ تا ۷۰ میکرومولار کاهش در درصد حیات سلولی مشاهده شد. نتایج سنجش رنگ MTT با اندازه‌گیری جذب نوری (OD) براساس غلظت عصاره‌های مورد استفاده در مقایسه با میزان تکثیر مولکولی به‌صورت رسم نمودار به‌دست آمد.

تأثیر دو تیمار کارنوزیک اسید و رزمارینیک اسید بر فعالیت آنزیم کاسپاز ۳

در اثر تیمار کارنوزیک اسید بر سلول‌های ردهٔ Hep-G2 میزان

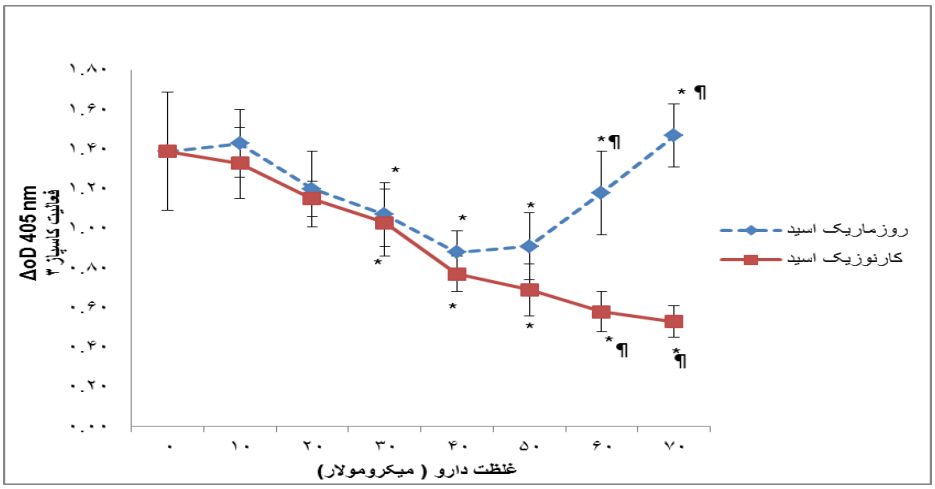
[Downloaded from nbr.khu.ac.ir on 2024-03-28]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1395.3.1.6.0]
[DOI: 10.21859/acadpub.nbr.3.1.61]

فعالیت آنزیم کاسپاز ۳ در روند وابسته به دوز کاهش یافت. در اثر تیمار رزمارینیک اسید مشاهده شد که فعالیت آنزیم کاسپاز ۳ پس‌از طی روند کاهشی با افزایش غلظت تیمار، از غلظت ۴۰ تا ۷۰ میکرومولار افزایش یافت. نمودار زیر نتایج حاصل سنجش فعالیت آنزیم کاسپاز ۳ را تحت اثر دو تیمار کارنوزیک اسید و رزمارینیک اسید نشان می‌دهد.



شکل ۱- تأثیر غلظت های مختلف دو مادهٔ تحت مطالعه بر بقای سلول‌های Hep-G2 بعداز ۲۴ ساعت انکوباسیون.* تفاوت معنی‌دار نسبت به شاهد ($P<0.05$)؛ تفاوت معنی‌دار یک تیمار نسبت به تیمار دیگر ($P<0.05$).

Fig. 1. Effects of the various concentrations of the two studied substances on Hep-G2 cell viability after 24 h of incubation. Significant difference compared to control ($P<0.05$); significant difference of a treatment compared to the other treatment ($P<0.05$).



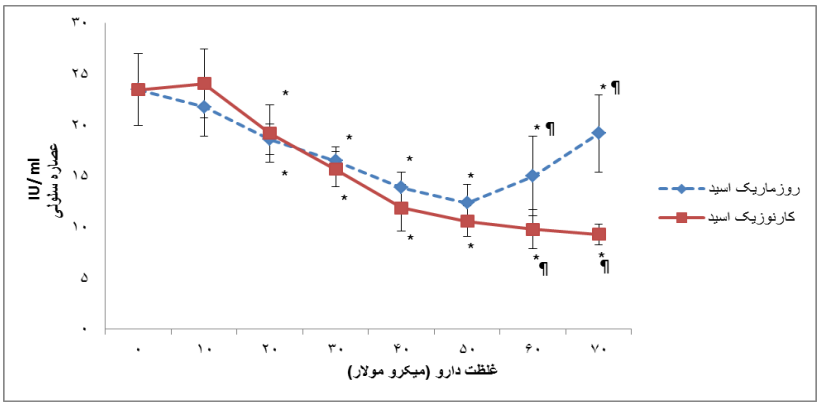
شکل ۲- فعالیت آنزیم کاسپاز ۳ در سلول‌های ردهٔ Hep-G2 تحت تیمار با غلظت‌های مختلف دو مادهٔ رزمارینیک اسید و کارنوزیک اسید. * تفاوت معنی‌دار نسبت به شاهد ($P<0.05$)؛ تفاوت معنی‌دار یک تیمار نسبت به تیمار دیگر ($P<0.05$).

Fig. 2. The activity of Caspse-3 enzyme in Hep-G2 cells line treated with various concentrations of rosmarinic and carnosic acids. Significant difference compared to control ($P<0.05$); significant difference of a treatment compared to the other treatment ($P<0.05$).

سنجش سطح سرآمید در سلول‌های Hep-G2

تیمار سلول‌های Hep-G2 با کارنوزیک اسید سبب کاهش سطح سرآمید در روند وابسته به دوز شد. همچنین، تیمار این سلول‌ها با مادهٔ رزمارینیک اسید پس‌از طی روند کاهشی، از غلظت ۵۰ میکرومولار رو به افزایش گذاشت. نتایج حاصل از سنجش سطح سرآمید در سلول‌های Hep-G2 در نمودار زیر مشاهده می‌شود.

[Downloaded from nbr.khu.ac.ir on 2024-03-28]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1395.3.1.6.0]
[DOI: 10.21859/acadpub.nbr.3.1.61]

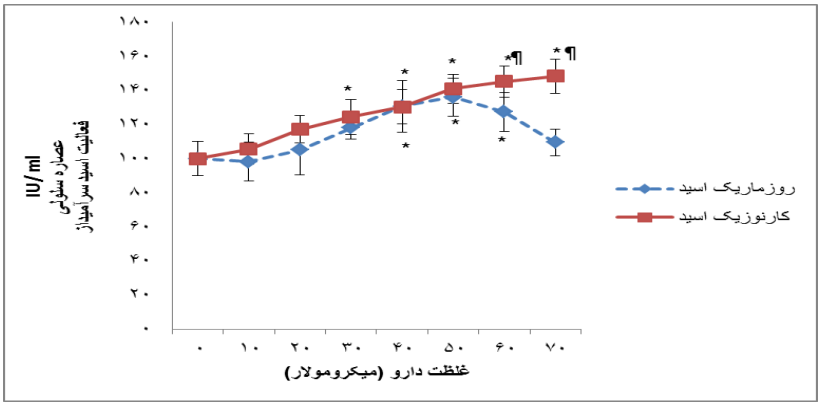


شکل۳- میزان سطح سرآمید در سلول‌های ردهٔ Hep-G2 تحت اثر غلظت‌های مختلف کارنوزیک اسید و رزمارینیک اسید. * تفاوت معنی‌دار نسبت به شاهد (P<0.05)؛ تفاوت معنی‌دار یک تیمار نسبت به تیمار دیگر (P<0.05).

Fig. 3. Ceramide level in Hep-G2 cell line treated with various concentrations of rosmarinic and carnosic acids. Significant difference compared to control (P <0.05); significant difference of a treatment compared to the other treatment (P <0.05).

تأثیر دو تیمار کارنوزیک اسید و رزمارینیک اسید بر فعالیت آنزیم اسید سرآمیداز

تأثیر تیمار کارنوزیک اسید بر سلول‌های ردهٔ Hep-G2، موجب افزایش فعالیت آنزیم اسید سرآمیداز در روند وابسته به دوز شد. تیمار همین سلول‌ها با رزمارینیک اسید پس‌از طی روند افزایشی تا غلظت ۵۰ میکرومولار، سبب کاهش فعالیت آنزیم اسید سرآمیداز شد. نتایج حاصل از سنجش فعالیت آنزیم اسید سرآمیداز در سلول‌های Hep-G2 با دو مادهٔ کارنوزیک‌اسید و رزمارینیک اسید در نمودار ۴ مشاهده می‌شود.



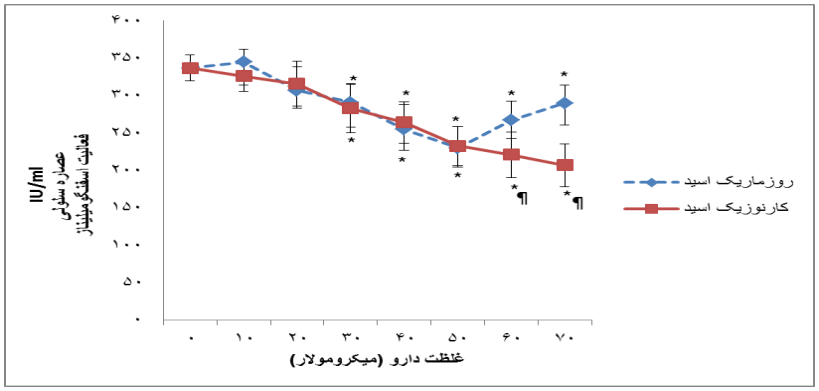
شکل۴- فعالیت آنزیم اسید سرآمیداز را در سلول‌های ردهٔ Hep-G2 تحت تیمار با غلظت‌های مختلف کارنوزک اسید و رزمارینیک اسید. * تفاوت معنی‌دار نسبت به شاهد(P<0.05)؛ تفاوت معنی‌دار یک تیمار نسبت به تیمار دیگر (P<0.05).

Fig. 4. The activity of acid ceramidase enzyme in Hep-G2 cell line treated with various concentrations of rosmarinic and carnosic acids. Significant difference compared to control (P <0.05); significant difference of a treatment compared to the other treatment (P <0.05).

تأثیر دو تیمار کارنوزیک اسید و رزمارینیک اسید بر فعالیت آنزیم اسفنگومیلیناز

تیمار سلول‌های Hep-G2 توسط مادهٔ کارنوزیک اسید سبب کاهش فعالیت آنزیم اسفنگومیلیناز در روند وابسته به دوز شد. در اثر تیمار سلول‌های Hep-G2 با مادهٔ رزمارینیک اسید فعالیت آنزیم اسفنگومیلیناز ابتدا کاهش یافت و سپس، از غلظت ۵۰ میکرومولار افزایش در فعالیت آنزیم اسفنگومیلیناز مشاهده شد. نمودار ۵ نتایج حاصل از سنجش فعالیت آنزیم اسفنگومیلیناز با دو تیمار کارنوزیک اسید و رزمارینیک اسید را در سلول‌های Hep-G2 را نشان می‌دهد.

[Downloaded from nbr.khu.ac.ir on 2024-03-28]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1395.3.1.6.0]
[DOI: 10.21859/acadpub.nbr.3.1.61]

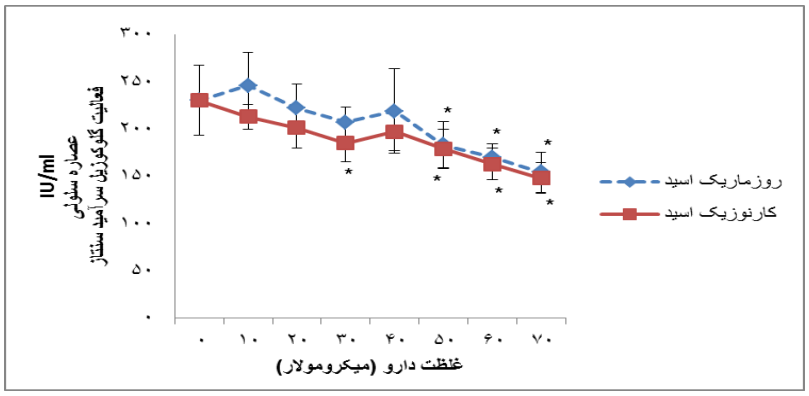


شکل۵- فعالیت آنزیم اسفنگومیلیناز با دوتیمار کارنوزیک اسید و رزمارینیک اسید در سلول‌های ردهٔ Hep-G2. * تفاوت معنی‌دار نسبت به شاهد($P<0.05$)؛ تفاوت معنی‌دار یک تیمار نسبت به تیمار دیگر ($P<0.05$).

Fig. 5. The activity of sphingomylinase enzyme with two treatment of carnosic and rosmarinic acids in Hep-G2 cell line. Significant difference compared to control ($P <0.05$); significant difference of a treatment compared to the other treatment ($P <0.05$).

تأثیر دو تیمار کارنوزیک اسید و رزمارینیک اسید بر فعالیت آنزیم گلوکوزیل سرآمید سنتاز

تیمار سلول‌های Hep-G2 با کارنوزیک اسید و رزمارینیک اسید سبب کاهش فعالیت آنزیم گلوکوزیل سرآمید سنتاز در روند وابسته به دوز شد. نتایج حاصل در نمودار ۶ نمایش داده می‌شود.



شکل۶- فعالیت آنزیم گلوکوزیل سرآمید سنتاز در اثر تیمار سلول‌های Hep-G2 با کارنوزیک اسید و رزمارینیک اسید را نشان می‌دهد.* تفاوت معنی‌دار نسبت به شاهد($P<0.05$).

Fig. 6. The activity of glucosylceramide synthase enzyme in Hep-G2 cells treated by rosmarinic and carnosic acids. Significant difference compared to control ($P <0.05$).

بحث

مسیر سیگنالینگ اسفنگومیلین/ سرآمید مسیری تکاملی است که از مخمر تا انسان حفظ شده است. عملکرد سرآمید به‌منزلهٔ یک پیام‌بر ثانویه در این مسیر و القای پاسخ‌های مختلف، بسته به نوع سلول شامل تکثیر، تمایز، توقف رشد یا اغلب موارد آپوپتوز گزارش شده است (Nardini *et al.*, 2001). به‌منظور درک بهتر و بنیادی از نقش مؤثر پلی‌فنول‌ها در بسیاری از وضعیت آسیب‌شناسی‌های درگیر در مسیر سرآمید، در این تحقیق به بررسی اثر کارنوزیک‌اسید و رزمارینیک‌اسید بر ردهٔ سلولی سرطان کبد Hep-G2 پرداخته شده است. کارنوزیک‌اسید رشد سلول‌های Hep-G2 را با افزایش دوز بیشتر کرده است؛ رزمارینیک‌اسید پس‌از طی روند افزایشی، از غلظت ۵۰ میکرومولار سبب کاهش رشد سلول‌های Hep-G2 شده است. علت رشد سلول‌های Hep-G2 را می‌توان به کاهش سطح سرآمید نسبت داد (Narddini *et al.*, 2001). خاصیت ضد سرطانی رزمارینیک اسید از غلظت ۵۰ تا ۷۰ میکرومولار براساس مشاهدات و مطالعات دیگر محققان به اثبات رسیده است (Lin *et al.*, 2007)، درحالی‌که نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که این ماده از غلظت صفر تا ۵۰ میکرومولار موجب

[Downloaded from nbr.khu.ac.ir on 2024-03-28]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1395.3.1.6.0]
[DOI: 10.21859/acadpub.nbr.3.1.61]

رشد سلول‌های سرطانی تحت مطالعه شده است.کاسپازها خانواده‌ای از سیستئین پروتئازها، تنظیم‌کنندهٔ مرکزی آپوپتوز هستند. درمیان اعضای خانوادهٔ کاسپازها، کاسپاز ۳ یکی از مهم-ترین کاسپازهای اجراکننده در راه‌اندازی آپوپتوز است. فعال-شدن کاسپاز ۳ به‌عنوان مارکر متعارف سلول‌های آپوپتوتیک در نظر گرفته می‌شود. فعال‌شدن کاسپازهای اجراکننده، مانند کاسپاز ۳ و ۷ می‌تواند موجب ازهم‌پاشیدگی بسترهای سیتوپلاسمی، هسته‌ای، کلیواژ درون سلولی و قطعه‌قطعه‌شدن DNA شود (Xiang *et al*., 2015). در این تحقیق، همچنین مشخص شده است که کارنوزیک اسید در روندی وابسته به دوز سبب کاهش فعالیت آنزیم کاسپاز ۳ شده و به تبعیت از آن درصد بقای سلولی در سلول‌های Hep-G2 افزایش یافته است. تحت تأثیر رزمارینیک اسید، میزان فعالیت این آنزیم پس‌از طی روند کاهشی، از غلظت ۴۰ میکرومولار افزایش داشته است که به نظر می‌رسد علت کاهش بقای سلولی، افزایش سطح سرآمید و گرایش سلول به سمت فرآیندهای آپوپتوتیک باشد.

یافته‌های این تحقیق نشان می‌دهد که تحت تیمار کارنوزیک اسید، میزان سطح سرآمید در روندی وابسته به دوز کاهش یافت که علت را می‌توان به سبب افزایش آنزیم اسیدسرآمیداز که موجب تجزیهٔ سرآمید شده (Park & Schuchman, 2006) و کاهش آنزیم اسفنگومیلیناز که سبب تولید سرآمید از طریق تجزیه اسفنگومیلین می‌شود (Pavoine & Pecker ,2009) نسبت داد. تیمار رزمارینیک‌اسید پس‌از طی روند کاهشی از غلظت ۵۰ میکرومولار به بعد سبب افزایش سطح سرآمید شد که علت آن به نظر می‌رسد کاهش فعالیت آنزیم اسید سرآمیداز و افزایش فعالیت اسفنگومیلیناز در این غلظت است. در این تحقیق مشخص شده که در اثر تیمار کارنوزیک اسید فعالیت آنزیم اسید سرآمیداز در روند وابسته به دوز افزایش یافته که کاهش سطح سرآمید تأییدکنندهٔ این امر است. همچنین تیمار با رزمارینیک‌اسید سبب کاهش فعالیت این آنزیم از غلظت ۵۰ میکرومولار شد که افزایش سطح سرآمید توجیه کنندهٔ این روند است.

نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که تحت تیمار با کارنوزیک‌اسید فعالیت آنزیم اسفنگومیلیناز در روند وابسته به دوز کاهش می-یابد و سطح سرآمید سلولی کم می‌شود، که این کاهش درنهایت باعث افزایش بقای سلولی می‌شود. تیمار با رزمارینیک اسید سبب افزایش فعالیت آنزیم اسفنگومیلیناز از غلظت ۵۰ میکرومولار شد که به نظر می‌رسد این افزایش باعث بالارفتن سطح سرآمید و درنتیجه، افزایش رشد سلولی در این غلظت شد.

ازاین گذشته یافته‌های این تحقیق نشان می‌دهد که فعالیت آنزیم گلوکوزیل سرآمیدسنتاز دراثر تیمار با کار نوزیک‌اسید و رزمارینیک‌اسید کاهش یافته است که علت این کاهش را می-توان به افزایش فعالیت آنزیم اسید سرآمیداز، کاهش فعالیت اسفنگومیلیناز و همچنین کاهش سطح سرآمید نسبت داد.

از نتایج این تحقیق می‌توان در طب سنتی و کاربرد گیاهان دارویی که در درمان و بهبود روند سرطان نقش دارند استفاده کرد. عصارهٔ گیاه رزماری که حاوی دو ترکیب کارنوزیک اسید و رزمارینیک‌اسید است در درمان بیماری سرطان در دیگر رده‌های سلولی کاربرد دارد، اما روی سلول‌های سرطانی ردهٔ Hep-G2، که در این تحقیق تحت بررسی قرار گرفته‌اند، اثر تحریک‌کنندهٔ رشد داشته و موجب رشد بیشتر این سلول‌های سرطانی شده است؛ بنابراین، نمی‌توان از این مواد در غلظت‌های نام‌برده به‌عنوان داروی ضدسرطان کبد استفاده کرد.

نتیجه‌گیری

در اغلب موارد پلی‌فنول‌ها باعث القای آپوپتوز و کاهش درصد بقای سلولی شده‌اند، اما در بعضی مواقع اثر معکوس داشته و سبب رشد سلولی شده‌اند.

References

Abdullaev, F.I. 2001. Plant-derived agents in cancer. In: Gupta SK, ed. Pharmacology and therapeutics in the New Millennium. – New Delhi: Narosa Publishing House: 345-354.

Aly, A., Hamdy, A. and Kafagy, R.M. 2014. Taurine reverses endosulfan induced oxidative stress and apoptosis in adult rat testis. – Food Chem. Toxicol. 6: 1-9.

[Downloaded from nbr.khu.ac.ir on 2024-03-28]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1395.3.1.6.0]
[DOI: 10.21859/acadpub.nbr.3.1.61]

Hayashi, Y., Horibata, Y., sakaguchi, k., okino, N. and Ito, M. 2005. Asensitive and reproducible assay to measure the activity of glucosylceramide synthase and lactosyl seramide synthase using HPLC and fluorescent substrates. – Anal. Biochem. 345: 181-186.

Hamdy, A., Aly, A. and Kafagy, R.M. 2014. Taurine reverses endosulfan induced oxidative stress and apoptosis in adult rat testis. – Food Chem. Toxicol. 64:1-9.

He, X., Dagan, A., Gatt, S. and Schuchman, E. H. 2005. Simaltaneous quantitative analysis of ceramide and sphingosine in mouse blood by naphthalene-2,3- dicarboxy aldehyde (NDA) derivatization after ydrolysis with ceramidase. – Anal. Biochem. 340: 113-122.

Jinmin, k., Jin jung, k. and Kyu kwon, T. 2014. Carnosic acid induces apoptosis through reactive oxygen species-mediated endoplasmic reticulum stress induction in human renal carcinoma Caki cells. – J. Cancer Prev. 19: 170-178.

Kumar, V., Fausto, N. and Abbas, A. 2003. Robbins & Cotran pathologic basis of disease. 7th ed. – Philadelphia W.B. Saunders 914-917.

Levy, M., and Futerman, A.H. 2010. Mammalian ceramide synthases. – IUBMB Life 62: 347-356.

Krishna, P.B., Burkard, k., Andrea, H. and Chistrophen, A. 2013. Effect on inhibition of acid and natural ceramidase by novel B-13 and LCL -464 analogues. – Bioorganic Med. Chem. 21: 824-888.

Lin, C.S., Kuo, C.L., Wang, J.P. and Cheng, J.S. 2007. Growth inhibitory and apoptosis inducing effect of *Perilla frutescens* extract on human hepatoma HepG2 cells. – J. Ethnopharmacol. 112: 557-567.

Masada, Y., Inoue, T., Hashimoto, K., Fujioka, M. and Shiraki, K. 1973. Studies on the pungent principles of ginger (Zingiber officinale Roscoe) by GC-MS. – Yakugaku Zasshi 93: 318-321.

Nardini, M., Leonardi, F., Scaccini, C. and Virgili, F. 2001. Modulation of ceramide -induced nf-kb binding activity and apoptotic response by caffeic acid in u937 cells: comparison with other antioxidants. – Free Radic. Biol. Med. 30: 722-733.

Nejad Shahrokhabadi, K.H., Tavakkol Afshari, J., Rakhshandeh, H. and Barouk, A. 2009. Study Of cytotoxicity effect of total saffron extract on hepatocarcinoma cell line (HepG2). – Med. Sci. J. Islamic Azad University 3: 154-159.

Pavoine, C. and Pecker, F.O. 2009. Sphingomyelinases: their regulation and roles in cardiovascular physiology. – Cardiovascular Res. 82: 175-181.

Park, J.H. and Schuchman, E.H. 2006. Acid ceramidase and human disease. – Biochim. Biophys. 1758: 2133-2138.

Shahada, T., Hossa, Md., Rahman, Sh., Anwarul Basha, A.B.M., Jahan, R., Al-Nahain, A. and Rahmatullah, M. 2014. Rosmaric acid: a review of its anticancer action. – World J. Pharmacy Pharmaceutical Sci. 3: 57-70.

Xiang, Q., Yunfang, M., Dong, J. and Shen, R. 2015. Carnosic acid induces apoptosis associated with mitochondrial dysfunction and Akt inactivation in HepG2 cells. – Int. J. Food Sci. Nutr. 66(1): 76-84.

*****

Njarpour, N. and Mashhadi Akbar Boojar, M. 2016. A comparative study on the effects of rosmarinic acid and carnosic acid on the cell viability, ceramide metabolism and antioxidant enzyme responses in the HEP-G2 cancer cell line. – Nova Biol. Rep. 3: 61-68.

نجارپور، ن. و مشهدی اکبر بوجار، م. ۱۳۹۵. بررسی مقایسه‌ای اثرات رزمارینیک اسید وکارنوزیک اسید بر بقای سلولی، متابولیسم سرآمید و واکنش-های آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت در سلول‌های سرطانی رده Hep-G2. – یافته‌های نوین در علوم زیستی ۳: ۶۸-۶۱.

[Downloaded from nbr.khu.ac.ir on 2024-03-28]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1395.3.1.6.0]
[DOI: 10.21859/acadpub.nbr.3.1.61]