

اثر هسپرتین بر القای آپوپتوز و نکروز در لاین سلولی لنفوبلاستیک Jurkat Cells

معین شیرزاد^۱، اسفندیار حیدریان^۲، بتول پورقیصری^۳، نعمت‌اله امینی سرتشنیزی^۴، زهرا سورانی^۵، پژمان بشکار^۶

چکیده

سابقه و هدف

لوسمی لنفوبلاستیک حاد (ALL)، یک اختلال نئوپلاستیک و یک بدخیمی شایع در کودکان است. آپوپتوز، مرگ برنامه‌ریزی شده و فیزیولوژیک سلولی بوده که جهت هموستاز بافت‌ها ضروری می‌باشد. در برخی از سرطان‌ها، ناکارآمدی در این پروسه باعث پیشرفت سرطان می‌گردد. این پروسه می‌تواند توسط عوامل مختلف درمانی از جمله شیمی درمانی القا شود. هسپرتین یک فلاونوئید در آب میوه‌هایی هم چون پرتقال و میوه‌های درون سرخ بوده و بر اساس تحقیقات آپوپتوز را در سلول‌های پانکراس انسان تحریک می‌کند. هم چنین به عنوان فعال‌کننده NOTCH-1 و سرکوبگر تومور کارسینوئید می‌باشد.

مواد و روش‌ها

این مطالعه از نوع بنیادی - کاربردی بود. لاین سلولی مورد استفاده در این مطالعه، C121 (Jurkat cell)، در محیط مکمل RPMI1640 با ۱۰٪ سرم جنینی گاو (FBS) و پنی سیلین / استرپتومایسین کشت داده شد. میزان رشد و بقای سلولی با غلظت‌های مختلف هسپرتین توسط کیت MTS بررسی گردید. میزان مرگ سلولی توسط رنگ آمیزی تریپان‌بلو و هم چنین توسط کیت آپوپتوزیس و با دستگاه فلوسایتومتری (Partec) مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها

رده سلول‌های لنفوبلاستیک (C121) در مواجهه با غلظت‌های مختلف هسپرتین (محلول شده در DMSO ۰/۱٪) تحت تاثیر قرار گرفته و غلظت ۲۰۰ μM دارو در زمان ۴۸ ساعت به عنوان غلظت مهاري یا IC50 گزارش شد. نوع مرگ القایی توسط این دارو با استفاده از بررسی مورفولوژیک و نیز فلوسیتومتری به صورت آپوپتوز بوده است.

نتیجه‌گیری

با توجه به این که هسپرتین توانایی القای آپوپتوز را دارد و هم چنین باعث کاهش فعالیت سلولی می‌شود، به نظر می‌رسد داروی مناسبی برای مهار رشد سلول‌های توموری باشد.

کلمات کلیدی: لوسمی لنفوبلاستیک حاد، هسپرتین، Jurkat Cells، آپوپتوز

تاریخ دریافت: ۹۳/۵/۲۷

تاریخ پذیرش: ۹۳/۱۲/۹

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد بیوشیمی بالینی - دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد - شهرکرد - ایران

۲- PhD بیوشیمی - استاد مرکز تحقیقات سلولی مولکولی - دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد - شهرکرد - ایران

۳- PhD هماتولوژی - دانشیار دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد - شهرکرد - ایران

۴- دانشجوی کارشناسی ارشد زیست‌شناسی سلولی و مولکولی - دانشکده علوم دانشگاه محقق اردبیلی - اردبیل - ایران

۵- دانشجوی کارشناسی ارشد ایمنی‌شناسی - دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد - شهرکرد - ایران

۶- مؤلف مسؤول: دانشجوی PhD هماتولوژی - مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد - شهرکرد - ایران - صندوق پستی: ۱۴۶۶۵-۱۱۵۷

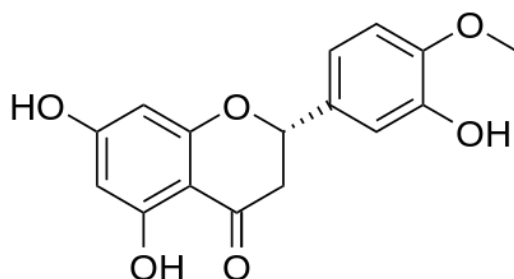
مقدمه

امروزه سرطان با بیش از ۱۰ میلیون مورد جدید و بیش از ۶ میلیون مرگ ناشی از آن هر ساله در سراسر جهان یکی از مهم‌ترین دلایل مرگ و میر محسوب می‌گردد. پیش‌بینی می‌شود که تا سال ۲۰۲۰، هر ساله ۱۵ میلیون مورد جدید و ۱۰ میلیون مرگ در اثر سرطان داشته باشیم. سرطان‌های خون یا لوسمی‌ها حدود ۸٪ از کل سرطان‌های جمعیت انسان را شامل می‌شوند و به عنوان پنجمین سرطان شایع جهان محسوب می‌گردند (۱). لوسمی لنفوبلاستیک حاد (ALL)، یک اختلال نئوپلاستیک لنفوسیتی می‌باشد (۲). این بیماری یک بدخیمی شایع در کودکان است (۳). به طوری که این بیماری به سرطان کودکان نیز معروف است. شیوع این بیماری در جنس مذکر بیشتر از جنس مؤنث است (۴). ALL اغلب با یک توده توموری همراه با پیشرفت سریع بیماری می‌باشد (۵). در حدود ۳۰٪ از موارد ALL در همان سال اول عود می‌کنند و سرانجام منجر به مرگ می‌گردد (۶). دو عامل ممکن است مقاومت سلول‌های لوسمی نابالغ را به داروهای شیمی درمانی متداول بیشتر کند. یکی این که گمان می‌رود که درصد بالایی از سلول‌های پیش‌ساز لوسمی، به صورت خاموش می‌باشند و این فاز خاموشی باعث کاهش حساسیت آن‌ها نسبت به داروهای اختصاصی سیکل سلولی می‌شود و دیگری، سلول‌های نابالغ خصوصیات سلول‌های بنیادی را با خود دارند که ممکن است باعث افزایش بیان ژن‌های انتقالی چند دارویی همانند MPR-1 و یا P-gp شود (۷). این خاصیت منجر به پاکسازی سریع داروهای سایتوتوکسیک می‌گردد (۷).

علی‌رغم پیشرفت خوب و موفقیت در درمان، در تعدادی از کودکان بیماری عود کرده و نهایتاً باعث از پا درآمدن بیمار می‌شود (۸). داروهای سایتوتوکسیک مورد استفاده در درمان هر چند موفقیت‌های قابل توجهی در سیر پیشرفت درمان ایجاد کرده‌اند اما عوارض جانبی آن‌ها از قبیل عوارض قلبی، کلیوی، سرکوب خونسازی و سیستم ایمنی هم چنان از علل مهم مرگ و میر بیماران به حساب می‌آید. ترکیبات مشتق از گیاهان که همواره از منابع مهم دارویی در درمان بیماری‌های مختلف محسوب می‌شوند،

اخیراً از جهت اثرات سایتوتوکسیک و نیز باز دارنده سرطان مورد توجه قرار گرفته‌اند (۹). آپوپتوز یک مرگ برنامه‌ریزی شده می‌باشد که بدون ایجاد التهاب باعث هموستاز بافت‌ها می‌گردد. نقص در این برنامه می‌تواند باعث ایجاد سرطان و یا در برخی سرطان‌ها، باعث پیشرفت آن گردد.

یکی از اهداف درمان‌های ضد سرطان و دارویی، القای آپوپتوز در سلول‌هاست (۱۰). گیاهان منبع بسیار مهمی از محصولات طبیعی و فعالی هستند که از نظر ساختاری و خواص بیولوژیکی، وسعت و تنوع بسیاری دارند. آن‌ها نقش قابل توجهی را در طب سنتی کشورهای مختلف ایفا می‌کنند. در سال‌های اخیر پیشگیری از سرطان و بیماری‌های قلبی و عروقی با خوردن میوه، سبزیجات و گیاهان غنی از آنتی اکسیدان‌های تازه و طبیعی همراه شده است (۱۱). هسپرتین (Hesperitin) یک فلاونوئید است که در آب میوه‌هایی هم چون پرتقال و میوه‌های درون سرخ یافت می‌گردد (شکل ۱).



شکل ۱: ساختار شیمیایی آنتی‌اکسیدان هسپرتین

تحقیقات نشان داده است که هسپرتین آپوپتوز را در سلول‌های پانکراس انسان تحریک می‌کند، هم چنین به عنوان فعال‌کننده NOTCH-1 (افزایش دهنده تمایز سلول‌های اجدادی) و سرکوبگر تومورهای کارسینوئید می‌باشد (۱۲، ۱۳). آنتی‌اکسیدان‌ها توانایی بالایی در پاکسازی رادیکال‌های آزاد و هم چنین دارای فعالیت‌های ضد سرطانی هم چون ازدیاد سلولی، مهار رگ‌زایی، مهار پیام درون سلولی و تحریک آنزیم‌های درگیر در ترمیم DNA دارند (۱۴). هسپرتین فعالیت آنزیمی مرتبط با دفاع

زنده با شمارش مستقیم سلول‌های زنده و مرده محاسبه می‌شود. درصد سلول‌های زنده برابر است با تعداد سلول‌های زنده به تعداد کل سلول‌ها (Hogberg j 1981)، Moldeus). در این روش پس از جدا کردن سلول‌ها، ۵۰ μL سوسپانسیون سلولی را با ۵۰ μL محلول تریپان بلو مخلوط نموده و توسط هموسیتومتر (لام نئوبار) مورد شمارش قرار گرفت.

تیمار سلول‌ها:

پس از شمارش سلولی، میزان ۱۰۰۰۰ سلول را در هر خانه از پلیت ۹۶ خانه قرار داریم. آنتی‌اکسیدان هسپرتین در ۱٪ DMSO حل گردید. پس از ۲۴ ساعت انکوبه شدن در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، ۵٪ CO₂ و رطوبت کافی، سلول‌ها را با غلظت‌های مختلف هسپرتین (۰ تا ۱۰۰۰ میکرومولار) مواجهه کرده و در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در انکوباتور قرار گرفتند.

آزمایش MTS (بررسی میزان زیستایی سلول‌ها):

بعد از گذشت زمان ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت از درمان، سلول‌ها با ۲۰ میکرولیتر محلول MTS به مدت ۳ ساعت انکوبه شدند. (3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-MTS)-2H - (4-sulfophenyl) - 2H - carboxymethoxyphenyl tetrazolium)، میزان حیات سلولی را بررسی می‌کند. معرف واکنشگر، ترکیبی از MTS و فنازین متوسولفات (PMS) جفت شده با الکترون می‌باشد.

حاصل این واکنش احیا (کاهشی)، تولید فومارازان است و این واکنش در سلول‌هایی که آنزیم‌های میتوکندریایی فعال دارند، اتفاق می‌افتد (سلول‌های زنده). پس از ۳ ساعت انکوبه شدن در تاریکی (محلول MTS به نور حساس می‌باشد) جذب نوری در طول موج ۴۹۰ تا ۶۳۰ نانومتر توسط الیزا ریدر (stat fax-2100 awarenes) خوانده شده است. میزان سلول‌های زنده در هر چاهک محاسبه شده و نسبت به گروه کنترل (تیمار نشده) بررسی گردید و غلظت IC₅₀ مشخص شد، که در این غلظت ۵۰٪ سلول‌ها زنده می‌باشند و این درصد بقای سلولی (Viability) است.

آنتی‌اکسیدانی سلول‌ها را افزایش می‌دهد و نیز فعالیت ضد سرطانی بالقوه‌ای مثل عامل ضد رگزایی در سلول‌های MES (Embryonic stem cells) را نشان می‌دهد (۱۵). وقتی که سلول‌های MCF-7 با هسپرتین برای ۴۸ تا ۷۲ ساعت درمان شده بودند، توقف سیکل سلولی در فاز G1 مشاهده شده بود (۱۶). هم چنین هسپرتین فلاوونوئیدی از دسته کوئرستین‌ها (Quercetin) بوده که در تومورهای پوستی نقش پروموتور و القاکننده آپوپتوز را دارد (۱۷).

مواد و روش‌ها

این مطالعه از نوع بنیادی- کاربردی بود که بر روی رده سلول‌های لوسمی لنفوبلاستیک (Jurkat) انجام پذیرفت.

تهیه مواد:

محیط کشت RPMI1640، پنی‌سیلین، استرپتومایسین، دی‌متیل سولفوکساید (DMSO)، تریپان بلو و آنتی‌اکسیدان هسپرتین از شرکت سیگما تهیه شدند. سرم جنینی گاو (Fetal Bovine Serum) از شرکت گیبکو (آمریکا)، MTS از شرکت مرک و پلیت‌های ۹۶ و ۶ خانه و فلاسک‌های کشت از شرکت جت بایوفیول خریداری گردید. کیت رنگ آمیزی Annexin/PI از شرکت BD آمریکا خریداری شد.

کشت سلولی:

رده سلولی لنفوبلاستیک C121 یا jurkat cell از انستیتو پاستور ایران خریداری شد و در محیط RPMI1640 با FBS ۱۰٪ و PEN/STREP و در فلاسک T۲۵ و TV۵ کشت داده شدند. پس از کشت، سلول‌ها در انکوباتور CO₂ دار (۵٪) با رطوبت کافی (۹۸٪) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

شمارش سلولی:

برای شمارش سلول‌ها پس از رشد ۸۰ درصدی، سلول‌ها جمع‌آوری شده و با رنگ آمیزی توسط تریپان بلو (سیگما)، درصد سلول‌های زنده تعیین شدند. سلول‌های زنده نسبت به ورود رنگ نفوذناپذیر بوده و حال آن که سلول‌های مرده رنگ را جذب می‌نمایند. درصد سلول‌های

بررسی آپوپتوز:

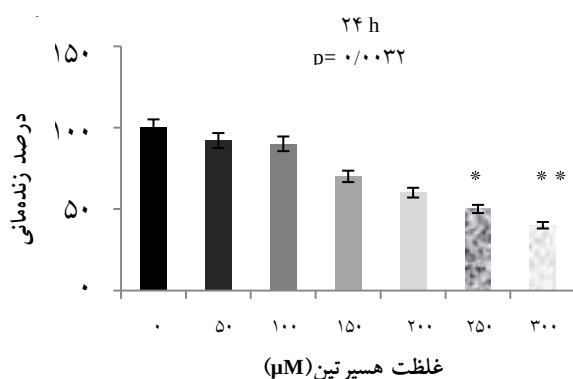
برای بررسی آپوپتوز، پس از شمارش، میزان ۲۰۰۰۰۰ سلول به هر چاهک از پلیت ۶ خانه منتقل شد. پس از ۲۴ ساعت در انکوباتور، سلول‌ها تحت درمان با غلظت‌های نزدیک به IC_{50} از آنتی‌اکسیدان هسپریتین قرار گرفته و مجدداً به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور نگهداری شدند. سپس سلول‌ها را جمع‌آوری کرده و با سانتریفوژ کردن محلول رویی را دور ریخته و رسوب را براساس کیت آپوپتوز (بیوساینس BD) با binding buffer به صورت سوسپانسیون درآوردیم. به میزان ۱۰۰۰۰۰ سلول را به دو لوله برده و به یکی FITC/PI افزوده و دیگری بدون FITC/PI به عنوان کنترل منفی به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی قرار داده شد. سپس توسط دستگاه فلوسیتومتری (Cyflow Partec Germany) مورد بررسی قرار گرفتند. با استفاده از رنگ Annexin/PI سلول‌ها از نظر وجود فسفاتیدیل سرین در سطح (آپوپتوز) و نفوذپذیری سلولی به رنگ PI (propidium Iodide) (نکروز) به کمک فلوسایتومتری بررسی شدند. اساس این روش بر این مبنا است که در طی آپوپتوز، فسفاتیدیل سرین از سطح داخلی به سطح خارجی غشای سلول منتقل می‌شود و آنکسین به فسفاتیدیل سرین در سطح خارجی متصل می‌گردد و توسط دستگاه تشخیص داده می‌شود. PI در طول موج ۴۸۸ نانومتر تهییج و در موج ۶۱۷ نانومتر، بازتابش دارد. FITC (Fluorescein Isothiocyanat) در طول موج ۴۸۸ نانومتر تهییج و در طول موج ۵۱۹ نانومتر بازتابش دارد. هر غلظت حداقل ۴ مرتبه تکرار گردید و نتایج به صورت $Mean \pm SD$ گزارش شد. داده‌ها با استفاده از آزمون آماری ANOVA یا آزمون Kruskal-Wallis و با کمک نرم‌افزار SPSS ۱۷ و (آمریکا، ۵/۰۱ V. GraphPad Prism مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

یافته‌ها

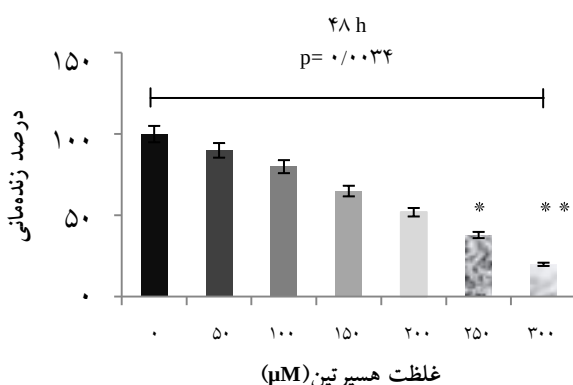
اثر آنتی‌اکسیدان هسپریتین بر فعالیت تکثیری رده سلولی لنفوبلاستیک JURKAT:

سلول‌های JURKAT در مجاورت غلظت‌های مختلف از آنتی‌اکسیدان هسپریتین قرار گرفتند. در بررسی MTS،

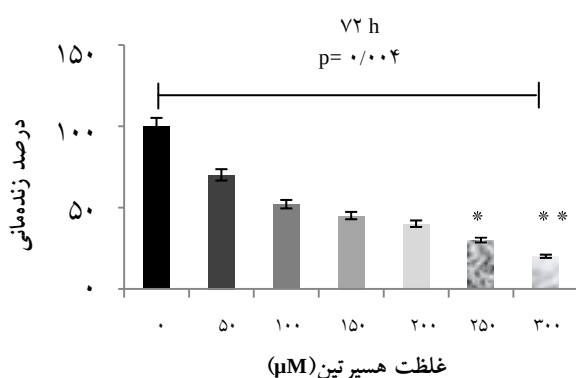
کریستال‌های زرد رنگ MTS توسط آنزیم سوکسینات دهیدروژناز (از آنزیم‌های چرخه تنفسی میتوکندری) احیا شده و موجب تشکیل کریستال‌های ارغوانی رنگ می‌شود.



نمودار ۱: اثر آنتی‌اکسیدان هسپریتین بر فعالیت تکثیری رده سلولی لنفوبلاستیک JURKAT بعد از ۲۴ ساعت (p = p value)



نمودار ۲: اثر آنتی‌اکسیدان هسپریتین بر فعالیت تکثیری رده سلولی لنفوبلاستیک JURKAT بعد از ۴۸ ساعت (p = p value)



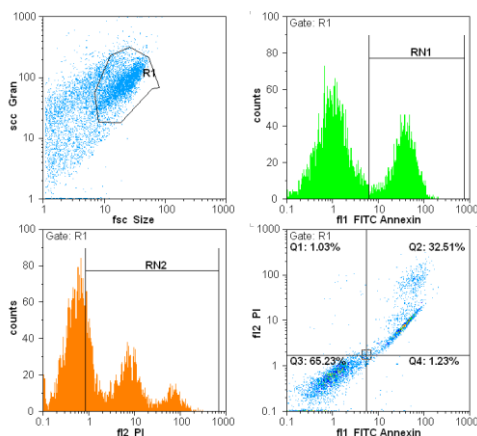
نمودار ۳: اثر آنتی‌اکسیدان هسپریتین بر فعالیت تکثیری رده سلولی لنفوبلاستیک JURKAT بعد از ۷۲ ساعت (p = p value)

۲۵۰ میکرومول، از بین رفته‌اند و یا به عبارت دیگر ۵۰٪ بقای سلولی داشته‌ایم (IC50). بدین معنی که در غلظت IC50، سلول نسبت به کنترل (غلظت صفر) ۵۰٪ سلول زنده دارد. هم چنین یک اثر سایتوتوکسیک وابسته به دوز و زمان نشان داده شده است (نمودارهای ۱-۳).

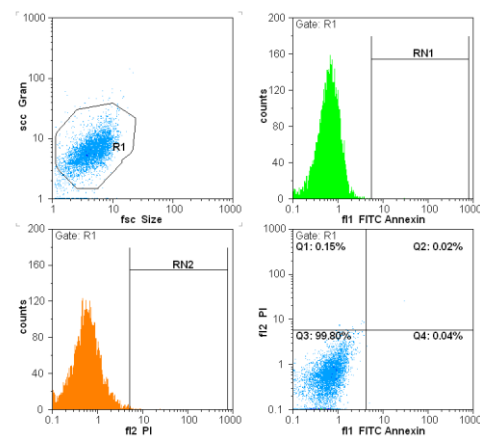
میزان رنگ تولید شده با تعداد سلول‌های زنده رابطه مستقیم دارد. در این مطالعه مشاهده شد که پس از درمان سلول‌های سرطانی با هسپریتین در غلظت‌های مختلف (۱۰۰۰-۰، ۵۰٪ سلول‌های سرطانی در زمان ۲۴ و ۴۸ و ۷۲ ساعت به ترتیب در غلظت ۱۰۰، ۲۰۰ و

جدول ۱: میانگین و انحراف معیار آزمایش MTT assay در ساعت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ (Mean $\pm$ SD)

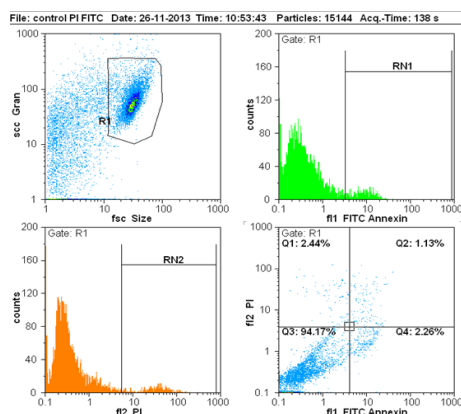
غلظت	۰	۵۰	۱۰۰	۱۵۰	۲۰۰	۲۵۰	۳۰۰
ساعت ۲۴	۱۰۰ $\pm$ ۰	۹۳ $\pm$ ۲	۸۷/۶۷ $\pm$ ۳/۰۵۵	۷۲ $\pm$ ۴	۶۰/۶۷ $\pm$ ۳/۰۵۱	۵۰ $\pm$ ۴/۵۸	۳۸/۶۷ $\pm$ ۵/۵
ساعت ۴۸	۱۰۰ $\pm$ ۰	۸۸/۳۳ $\pm$ ۵/۵	۷۴ $\pm$ ۶/۵۵	۶۱/۶۷ $\pm$ ۶/۰۲	۵۱/۶ $\pm$ ۶/۵	۳۴ $\pm$ ۶/۵	۲۰/۳۳ $\pm$ ۶/۱۱
ساعت ۷۲	۱۰۰ $\pm$ ۰	۷۴ $\pm$ ۶/۵	۵۳/۳۳ $\pm$ ۷/۵	۴۲/۶۷ $\pm$ ۶/۵	۳۵/۳۳ $\pm$ ۴/۵۰۹	۲۵ $\pm$ ۷	۱۳/۳۳ $\pm$ ۵/۵۰



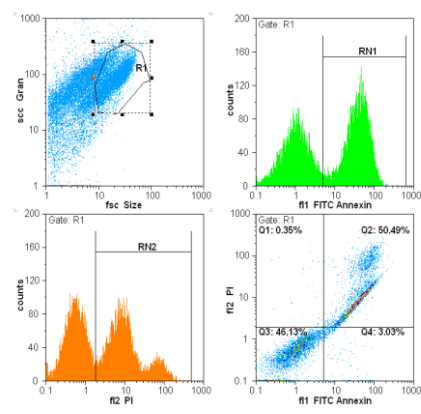
شکل ۳: تاثیر غلظت ۱۵۰ میکرومولار بر سلول‌های Jurkat



شکل ۲: سلول‌های Jurkat بدون رنگ FITC و PI



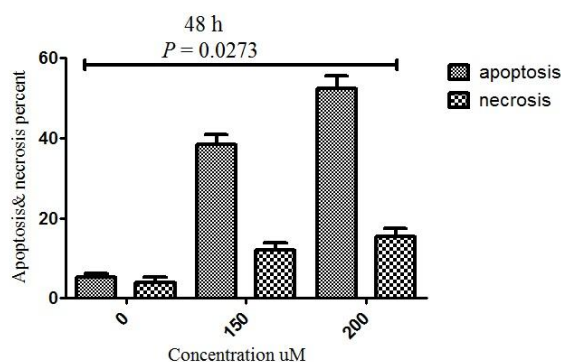
شکل ۵: تاثیر غلظت ۰ میکرومولار بر سلول‌های Jurkat



شکل ۴: تاثیر غلظت ۲۰۰ میکرومولار بر سلول‌های Jurkat

بررسی آپوپتوز در رده سلولی لنفوبلاستیک:

برای بررسی اثر آپوپتوزی هسپریتین در رده سلولی لنفوبلاستیک، از دستگاه فلوسایتمتری استفاده گردید. سلول‌ها پس از ۴۸ ساعت درمان با این آنتی‌اکسیدان، با رنگ Annexin/PI رنگ‌آمیزی گردیدند. مطابق با تاثیر ضد تکثیری که توسط MTS نشان داده شده است، در بررسی آپوپتوز نیز هسپریتین در غلظت‌های مختلف (نزدیک به IC50) بر روی سلول مؤثر بوده و توانسته آپوپتوز را القا کند. برای تجزیه و تحلیل اطلاعات به دست آمده از دستگاه فلوسایتمتری از برنامه Flow-max استفاده گردید. (شکل‌های ۲-۵) (نمودار ۴).



نمودار ۴: اثر آنتی‌اکسیدان هسپریتین بر القای آپوپتوز رده سلولی لنفوبلاستیک JURKAT بعد از ۴۸ ساعت

بحث

شیمی درمانی به عنوان درمان اصلی برای بیشتر سرطان‌ها در نظر گرفته می‌شود، اما به علت اثرات جانبی فراوان این نوع درمان، تلاش‌های اخیر بیشتر بر روی ترکیبات طبیعی برای جلوگیری از گسترش سرطان صورت می‌گیرد.

در این مطالعه اثر آنتی‌اکسیدان هسپریتین بر فعالیت تکثیری سلول‌های لنفوبلاستیک (C515) مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس نتایج به دست آمده از آزمایش MTS، هسپریتین در غلظت ۲۰۰ μM موجب کاهش معناداری در میزان تکثیر سلول (تیمار شده) نسبت به گروه کنترل شد. این بررسی نشان داد که غلظت بالای ۲۰۰ μM آنتی‌اکسیدان هسپریتین دارای اثرات مشخص سیتوتوکسیک

در *in vitro* می‌باشد. در روش MTS، شدت رنگ ایجاد شده با سلول‌هایی که دارای میتوکندری فعال می‌باشند، متناسب است. مطالعه انجام شده توسط ویل کوکس و همکاران در همین راستا نیز نشان‌دهنده این بود که هسپریتین ترشح apoB هپاتوسیت‌ها را در غلظت ۲۰۰ میکرومولار به طور معناداری کاهش می‌دهد (۱۸). در مطالعه‌های دیگر غلظت‌های مختلفی از این ترکیب استفاده شد که این موضوع به دلیل تفاوت در نوع سلول‌ها و هم چنین شرایط انجام آزمایش می‌باشد. در بررسی دیگری اثر آپوپتوزی هسپریتین بر روی سلول‌های سرطانی رحم، مشاهده گردید که این آنتی‌اکسیدان در غلظت ۶۵۰ میکرومولار، حدود ۵۰٪ سلول‌ها را متوقف نموده است. آلشای و همکارانش نیز در این مطالعه گزارش کردند که این ترکیب دارای اثرات ضد سرطانی از طریق کاهش توانایی سلول‌های زنده (Viability) و القای آپوپتوز می‌باشد (۱۹). در مطالعه دیگری بر روی سلول‌های PC-3 پروستات، هسپریتین در غلظت ۴۰ میکرومولار باعث از بین رفتن ۵۰٪ (IC50) سلول‌ها گردیده است (۲۰).

آپوپتوزیس، اتوفاژی و نکروز انواعی از مرگ سلولی محسوب می‌شوند و در میان این سه مسیر مرگ سلولی، آپوپتوزیس بهترین مسیر مرگ سلولی می‌باشد (۲۱). در صورتی که این فرآیند مختل شود، باعث ایجاد سرطان یا دیگر اختلالات می‌گردد. بیش از ۴۰٪ از نوپلاسماها در سیستم آپوپتوزی دچار اختلال می‌شوند که منجر به ازیاد سلولی غیر نرمال می‌گردد (۲۲). از این رو، تنظیم آپوپتوز در درمان سرطان با اهمیت است (۲۳). در مطالعه حاضر برای اثبات القای آپوپتوز توسط هسپریتین در لاین سلولی لوسمی لنفوبلاستیک حاد (C515)، از آنالیز فلوسایتمتری استفاده شد و مشخص گردید که با افزایش غلظت دارو، میزان سلول‌های آپوپتوز شده (آنکسین مثبت و PI منفی) افزایش می‌یابد. بدین صورت که در غلظت ۲۰۰ μM، حدود ۵۰٪ آپوپتوز نسبت به گروه کنترل مشاهده گردید. این نتایج در تایید MTS به ما نشان می‌دهد که سلول‌هایی که در روش MTS تحت تاثیر هسپریتین بوده‌اند، دچار آپوپتوز شده‌اند و این آنتی‌اکسیدان بر روی این رده سلولی در شرایط آزمایشگاهی مؤثر می‌باشد. مطالعه‌ای بر روی

قبل و مطالعه ما می‌باشد (۲۹). هم چنین مطالعه‌های دیگر نشان دادند که هسپرتین بیان GLUT1، GLUT4 را در سلول‌های سرطانی پستان کاهش می‌دهد که موجب کاهش جذب گلوکز می‌گردد. پس این آنتی‌اکسیدان می‌تواند از یاد سلول‌های سرطانی را کاهش دهد که در نتیجه موجب اختلال در جذب گلوکز باشد (۳۰).

علاوه بر مطالعه‌های *In vitro*، در بررسی هسپرتین بر روی رت‌ها مشخص گردید که این آنتی‌اکسیدان به طور قابل توجهی میزان آپوپتوز را افزایش می‌دهد. طی مطالعه دیگری سلوک کارا و همکارانش گزارش نمودند که هسپرتین به دلیل دارا بودن خاصیت آنتی‌آپوپتوزی مانع صدمات ناشی از ایسکمی در بافت چشم موش می‌شود که با مطالعه ما از نظر القای آپوپتوز متفاوت است. آن‌ها ذکر نمودند که این دارو در بیماری‌های ایسکمیک می‌تواند مفید باشد. مطالعه‌های کامل تری جهت بررسی این تناقض لازم است، اما احتمالاً مسیر القا در این سلول‌ها متفاوت باشد (۳۱). هم چنین عدن و همکارش در یک مطالعه دیگر با تاثیر هسپرتین بر روی لاین سلولی پرومیلوسیتیک گزارش نمودند که این ترکیب باعث کاهش سلول‌ها از طریق القای آپوپتوز می‌شود (۳۲).

نتیجه‌گیری

گرچه مطالعه‌ها در زمینه اثرات آپوپتوزی محدود می‌باشد، اما با توجه به نتایج حاصل گردیده از این مطالعه به نظر می‌رسد این آنتی‌اکسیدان در درمان بدخیمی‌های لنفوسیتی از طریق القای آپوپتوز مفید باشد، گرچه پیشنهاد می‌شود مطالعه‌هایی در *In vivo* نیز صورت پذیرد تا با اطمینان بیشتری این موضوع تایید شود.

تشکر و قدردانی

از کلیه همکاران محترم در مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد که ما را در انجام این مطالعه یاری نمودند تشکر می‌کنیم.

آرتريت در رده سلولی مایع مفصلی فیروبلاست مانند FLS، نشان داده است که هسپرتین آپوپتوز را در محیط *in vitro* تحریک می‌نماید. این یافته توسط رنگ‌آمیزی هوخست و بررسی مورفولوژی که با بی‌نظمی در شکل، چروکیدگی هسته و تراکم شدن کروماتین همراه بود و نیز رنگ آمیزی Annexin V-FITC/PI و آنالیز فلوسایتومتری تایید گردید (۲۴). اما در مطالعه‌ای دیگر مشخص گردید که هسپرتین درصد سلول‌های آپوپتوز شده را در سلول‌های H9C2 تحریک شده با LPS کاهش می‌دهد. آن‌ها یافتند که هسپرتین از طریق افزایش بیان Bcl-2 و کاهش بیان Bax و از طریق مسیر JNK، خواص آنتی‌آپوپتوزی خود را آشکار می‌کند (۲۵). این یافته با یافته‌های اکثر مطالعه‌ها که اثر آپوپتوزی این ترکیب را اثبات نمودند، مغایرت دارد. مطالعه سیواگامی و همکاران نیز تاثیر هسپرتین بر روی لاین سلولی HT-29 سرطان کولورکتال را ثابت کردند. آن‌ها دریافتند که این آنتی‌اکسیدان آپوپتوز را توسط فعال کردن BAX و سیتوکروم C و هم چنین مهار BCL-2، تحریک می‌کند (۲۶). در مطالعه حاضر تنها القا و میزان آپوپتوز و نه مسیر آن بررسی گردیده است.

جیونگ چوی و همکارانش دریافتند که هسپرتین در سلول‌های MCF-7 سرطان پستان موجب توقف چرخه سلولی در مرحله G1 می‌گردد (۱۶). هم چنین در مطالعه‌ای دیگر نشان داده شده است که هسپرتین که از هسپریدین (شکل گلیکوزیدی) متابولیزه می‌گردد، سلول‌ها را از آسیب به DNA محافظت می‌کند (۲۷). به علاوه اثرات ضد التهابی هسپرتین بررسی گردید و نتایج بدین صورت بود که این ترکیب بیان سیتوکاین‌های التهابی را کاهش می‌دهد و آن‌ها از این آنتی‌اکسیدان در درمان آسم استفاده نمودند (۲۸). اما جیونگ سوک چوی و همکاران نشان دادند که هسپرتین و اپی گالوکاتکین چین گالات (Epigallocatechin gallate) در سلول‌های اندوتلیال مواجهه شده با LDL نقش آنتی‌آپوپتوزی دارند که این اطلاعات برخلاف مطالعه‌های

References :

- 1- Zand AM, Imani S, Saadati M, Borna H, Ziaei R, Honari H. Effect of age, gender and blood group on different types of leukemia. Kowsar Medical Journal 2010; 15(2): 111-4. [Article in Farsi]
- 2- Graux C, Cools J, Michaux L, Vandenberghe P, Hagemeyer A. Cytogenetics and molecular genetics of T-cell acute lymphoblastic leukemia: from thymocyte to lymphoblast. Leukemia 2006; 20(9): 1496-510.
- 3- Ebinger M, Witte K-E, Ahlers J, Schäfer I, André M, Kerst G, *et al.* High frequency of immature cells at diagnosis predicts high minimal residual disease level in childhood acute lymphoblastic leukemia. Leuk Res 2010; 34(9): 1139-42.
- 4- Van Vlierberghe P, Ferrando A. The molecular basis of T cell acute lymphoblastic leukemia. J Clin Invest 2012; 122(10): 3398-406.
- 5- Van Vlierberghe P, van Grotel M, Beverloo HB, Lee C, Helgason T, Buijs-Gladdines J, *et al.* The cryptic chromosomal deletion del (11)(p12p13) as a new activation mechanism of LMO2 in pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia. Blood 2006; 108(10): 3520-9.
- 6- Pui CH. Acute lymphoblastic leukemia: introduction. Semin Hematol 2009; 46(1): 1-2.
- 7- de Figueiredo-Pontes LL, Pintão MCT, Oliveira LC, Dalmazzo LF, Jácomo RH, Garcia AB, *et al.* Determination of P-glycoprotein, MDR-related protein 1, breast cancer resistance protein, and lung-resistance protein expression in leukemic stem cells of acute myeloid leukemia. Cytometry B Clin Cytom 2008; 74(3): 163-8.
- 8- Sengupta TK, Leclerc GM, Hsieh-Kinser TT, Leclerc GJ, Singh I, Barredo JC. Cytotoxic effect of 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-4-ribofuranoside (AICAR) on childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL) cells: implication for targeted therapy. Mol Cancer 2007; 6: 46.
- 9- Shashi B, Jaswant S, Madhusudana RJ, Kumar SA, Nabi QG. A novel lignan composition from Cedrus deodara induces apoptosis and early nitric oxide generation in human leukemia Molt-4 and HL-60 cells. Nitric Oxide 2006; 14(1): 72-88.
- 10- Denicourt C, Dowdy SF. Medicine. Targeting apoptotic pathways in cancer cells. Science 2004; 305(5689): 1411-3.
- 11- Choi EJ. Hesperetin induced G1-phase cell cycle arrest in human breast cancer MCF-7 cells: involvement of CDK4 and p21. Nutr Cancer 2007; 59(1): 115-9.
- 12- Wallner L, Dai J, Escara-Wilke J, Zhang J, Yao Z, Lu Y, *et al.* Inhibition of interleukin-6 with CNT0328, an anti-interleukin-6 monoclonal antibody, inhibits conversion of androgen-dependent prostate cancer to an androgen-independent phenotype in orchiectomized mice. Cancer Res 2006; 66(6): 3087-95.
- 13- Zarebczan B, Pinchot SN, Kunnimalaiyaan M, Chen H. Hesperetin, a potential therapy for carcinoid cancer. Am J Surg 2011; 201(3): 329-32.
- 14- Yoshida H, Takamura N, Shuto T, Ogata K, Tokunaga J, Kawai K, *et al.* The citrus flavonoids hesperetin and naringenin block the lipolytic actions of TNF-alpha in mouse adipocytes. Biochem Biophys Res Commun 2010; 394(3): 728-32.
- 15- Choi EJ, Kim GD, Chee K-M, Kim G-H. Effects of hesperetin on vessel structure formation in mouse embryonic stem (mES) cells. Nutrition 2006; 22(9): 947-51.
- 16- Ye L, Chan FL, Chen S, Leung LK. The citrus flavonone hesperetin inhibits growth of aromatase-expressing MCF-7 tumor in ovariectomized athymic mice. J Nutr Biochem 2012; 23(10): 1230-7.
- 17- Chinembiri TN, du Plessis LH, Gerber M, Hamman JH, du Plessis J. Review of natural compounds for potential skin cancer treatment. Molecules 2014; 19(8): 11679-721.
- 18- Wilcox LJ, Borradaile NM, de Dreu LE, Huff MW. Secretion of hepatocyte apoB is inhibited by the flavonoids, naringenin and hesperetin, via reduced activity and expression of ACAT2 and MTP. J Lipid Res 2001; 42(5): 725-34.
- 19- Alshatwi AA, Ramesh E, Periasamy V, Subash-Babu P. The apoptotic effect of hesperetin on human cervical cancer cells is mediated through cell cycle arrest, death receptor, and mitochondrial pathways. Fundam Clin Pharmacol 2013; 27(6): 581-92.
- 20- Sambantham S, Radha M, Paramasivam A, Anandan B, Malathi R, Chandra SR, *et al.* Molecular mechanism underlying hesperetin-induced apoptosis by in silico analysis and in prostate cancer PC-3 cells. Asian Pac J Cancer Prev 2013; 14(7): 4347-52.
- 21- Leist M, Jäätelä M. Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. Nat Rev Mol Cell Biol 2001; 2(8): 589-98.
- 22- Pommier Y, Sordet O, Antony S, Hayward RL, Kohn KW. Apoptosis defects and chemotherapy resistance: molecular interaction maps and networks. Oncogene 2004; 23(16): 2934-49.
- 23- Fulda S. Evasion of apoptosis as a cellular stress response in cancer. Int J Cell Biol 2010; 2010: 370835.
- 24- Li R, Cai L, Xie Xf, Peng L, Li J. 7,3'-dimethoxy hesperetin induces apoptosis of fibroblast-like synoviocytes in rats with adjuvant arthritis through caspase 3 activation. Phytothe Res 2010; 24(12): 1850-6.
- 25- Yang Z, Liu Y, Deng W, Dai J, Li F, Yuan Y, *et al.* Hesperetin attenuates mitochondria-dependent apoptosis in lipopolysaccharide-induced H9C2 cardiomyocytes. Mol Med Rep 2014; 9(5): 1941-6.
- 26- Sivagami G, Vinothkumar R, Preethy CP, Riyasdeen A, Akbarsha MA, Menon VP, *et al.* Role of hesperetin (a natural flavonoid) and its analogue on apoptosis in HT-29 human colon adenocarcinoma cell line—A comparative study. Food Chem Toxicol 2012; 50(3): 660-71.
- 27- Kalpana K, Devipriya N, Srinivasan M, Menon VP. Investigation of the radioprotective efficacy of hesperidin against gamma-radiation induced cellular damage in cultured human peripheral blood lymphocytes. Mutat Res 2009; 676(1-2): 54-61.
- 28- Yang YL, Hsu HT, Wang KH, Han CY, Chen CM, Chen CM, *et al.* Hesperetin-7,3'-O-dimethylether selectively inhibits phosphodiesterase 4 and effectively suppresses ovalbumin - induced airway

- hyperresponsiveness with a high therapeutic ratio. J Biomed Sci 2011; 18: 84.
- 29- Choi JS, Choi YJ, Shin SY, Li J, Kang SW, Bae JY, *et al.* Dietary flavonoids differentially reduce oxidized LDL-induced apoptosis in human endothelial cells: role of MAPK-and JAK/STAT-signaling. J Nutr 2008; 138(6): 983-90.
- 30- Yang Y, Wolfram J, Boom K, Fang X, Shen H, Ferrari M. Hesperetin impairs glucose uptake and inhibits proliferation of breast cancer cells. Cell Biochem Funct 2013; 31(5): 374-9.
- 31- Kara S, Gencer B, Karaca T, Tufan HA, Arikan S, Ersan I, *et al.* Protective Effect of Hesperetin and Naringenin against Apoptosis in Ischemia/Reperfusion-Induced Retinal Injury in Rats. ScientificWorldJournal 2014; 2014: 797824.
- 32- Gokbulut AA, Baran Y. Cytotoxic and apoptotic effects of fisetin, hesperin and vitexinon acute promyelocytic leukemia cells. Leuk Res 2014; 38(Suppl 1): S46.

Original Article

The effect of hesperetin in the induction of apoptosis and necrosis in lymphoblastic cell line Jurkat

Shirzad M.¹, Heidarian E.², Poorghesari B.¹, Amini Sarteshnizi N.A.³, Soorani Z.¹, Beshkar P.^{4,2}

¹Shahrekord University Of Medical Sciences, Shahrekord, Iran

²Cellular & Molecular Research Center, Shahrekord University Of Medical Sciences, Shahrekord, Iran

³Faculty Of Basic Science, University Of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran

⁴Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine, Tehran, Iran

Abstract

Background and Objectives

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is a neoplastic disorder and a common malignancy in children. Apoptosis is a normal physiological process which occurs during the maintenance of tissue hemostasis. The defect in this process leads to the development of cancer. It can be induced by a variety of treatments, such as cytotoxic chemotherapy. Hesperetin, a flavonoid isolated from the red fruits, has been examined with regard to the inhibition of proliferation and induction of apoptosis in pancreatic cells. Hesperetin also activates NOTCH-1 and tumor suppressor in carcinoid tumor.

Materials and Methods

In this fundamental-applied research, the cell lines of C121 (Jurkat cell) were cultured in RPMI supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and Penicillin/streptomycin. The growth and survival of cells with various concentrations of hesperetin was evaluated by MTS kit. The amount of cell death by trypan blue staining and flow cytometry as well as by apoptosis kit (Partec) was examined.

Results

Lymphoblastic cell lines (C121) in exposure to different concentrations of hesperetin were affected and MM 200 drug concentration at 48 hours was reported as inhibitory concentration or IC50. The mode of cell death induced by hesperetin was found to be apoptosis, as judged by the morphologic alteration of the cells and by Annexin v conjugated with FITC and flow cytometric analysis.

Conclusions

Since hesperetin can induce apoptosis and reduce cell activity, it seems appropriate to be able to inhibit the growth of tumor cells.

Key words: Leukemia, Acute Lymphoblastic, hesperetin, Jurkat Cells, Apoptosis

Received: 18 Aug 2014

Accepted: 28 Feb 2015

Correspondence: Beshkar P., PhD Student of Hematology. Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine and Cellular and Molecular Research Center, Shahrekord University of Medical Sciences.
Postal Code: 8813833435, Shahrekord, Iran. Tel: (+98381) 3335652-4; Fax: (+98381) 3334911
E-mail: beshkarpezhman@yahoo.com