

بررسی تأثیر ضدسرطانی فرآورده گیاهی ACA1 بر سلول‌های آدنوکارسینومای معده

طوبی غضنفری^۱، شهرزاد زمانی تقی‌زاده‌رابع^۲، رویا یارایی^۳، محمود محمودی^{۴*}

۱- دانشیار، گروه ایمنولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه شاهد، تهران

۲- کارشناس ارشد ایمنولوژی، مرکز تحقیقات ایمنولوژی، پژوهشکده بوعلی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد

۳- دانشیار، گروه ایمنولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه شاهد، تهران

۴- استاد، گروه ایمنولوژی، مرکز تحقیقات ایمنولوژی، پژوهشکده بوعلی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد

*آدرس مکاتبه: مشهد، بلوار توس، میدان بوعلی، پژوهشکده بوعلی، مرکز تحقیقات ایمنولوژی، بخش بیولوژی مولکولی، تلفن و نمابر: ۷۱۱۲۶۱۱ (۰۵۱۱)

پست الکترونیک: mahmoudim@mums.ac.ir

تاریخ دریافت: ۸۹/۱/۱۹

تاریخ تصویب: ۹۰/۱۱/۲۶

چکیده

مقدمه: آپوپتوز راه حل‌هایی را برای درمان‌های ضدسرطانی مؤثر فراهم کرده است و امروزه یکی از استراتژی‌های جالب توجه مداخلات دارویی است که بتواند مرگ سلول‌های سرطانی را از طریق القای آپوپتوز میانجی کند. ترکیبات گیاهی بسیاری شناخته شده‌اند که از این طریق فعالیت ضدتوموری دارند. فرآورده گیاهی ACA1، عصاره آبی گیاهی است که در طب سنتی ایران استفاده شده و سیتوتوکسیسیتی آن بر سلول‌های ملانومای مشخص شده است.

هدف: این تحقیق با هدف بررسی تأثیر ضدسرطانی فرآورده گیاهی ACA1 بر سلول‌های آدنوکارسینومای معده و مکانیسم این تأثیر صورت گرفت.

روش بررسی: تأثیر کشندگی فرآورده ACA1 بر سلول‌های آدنوکارسینومای معده (AGS) و فیروبلاستی (HGF) بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون توسط روش کالریتری MTT بررسی شد. روش رنگ‌آمیزی با انکسین FITC-V و PI مرگ آپوپتوتیک سلولی را تعیین کرد. تغییر فعالیت کاسپازهای ۸ و ۹ نیز توسط روش آنزیماتیک ارزیابی شد. از غشای پایه مدل جهت ارزیابی توانایی تهاجم سلول‌های سرطانی AGS استفاده شد.

نتایج: فرآورده ACA1 تأثیر کشندگی قوی و وابسته به غلظت بر سلول‌های AGS داشت و عمدتاً با القای آپوپتوز اولیه سبب مرگ سلولی شد. افزایش فعالیت کاسپازهای ۸ و ۹ در این فرآیند دخیل بود. فرآورده ACA1 توانایی تهاجم سلول‌های سرطانی را نیز کاهش داد.

نتیجه‌گیری: فرآورده ACA1 با فعال ساختن کاسپازهای ۸ و ۹ منجر به جریان انداختن مرگ آپوپتوتیک سلول‌های سرطان معده انسانی شد. به علاوه، ACA1 با کاهش قدرت فرار و تهاجم سلول‌های سرطانی می‌تواند عامل مؤثری جهت بررسی پیشگیری یا درمان سرطان معده در انسان باشد.

کل واژگان: سرطان، فرآورده گیاهی ACA1، آپوپتوز، کاسپاز



مقدمه

سرطان بزرگ‌ترین عامل مرگ و میر در میان زنان و مردان است. امروزه از روش‌های درمانی متعددی برای درمان سرطان‌ها استفاده می‌شود ولی متأسفانه در اکثر موارد پاسخ به درمان بسیار ضعیف بوده و اغلب با اثرات جانبی نامطلوب همراه می‌باشد. بنابراین، تحقیق در جهت تولید داروهایی با کارایی بیشتر و سمیت کمتر امری ضروری است. ترکیبات گیاهی بسیاری با اثرات بیولوژیکی متنوع شناخته شده‌اند که جزو داروهای ضدسرطانی در علم داروسازی نوین محسوب می‌شوند [۱،۲].

مشخصات مورفولوژیکی فرآیند آپوپتوز (Apoptosis) سلولی شامل کاهش حجم سلول، متراکم شدن هتروکروماتین محیطی، جمع شدگی سیتوپلاسم، حباب‌دار شدن غشای پلاسمایی و فاگوسیتوز شدن (Phagocytosis) اجسام کروی سیتوپلاسمی قطعه قطعه شده توسط ماکروفاژها و یا سایر سلول‌های فاگوسیتیک می‌باشد. از آنجایی که آپوپتوز در یک سلول منجر به القای مرگ در سلول‌های مجاور نمی‌شود، التهاب یا آسیب بافتی نیز ایجاد نمی‌شود [۳]. حفظ هموستاز (Homeostasis) در بافت‌های طبیعی پستانداران ناشی از تعادل بین تکثیر و مرگ سلولی از طریق آپوپتوز است. در اغلب موارد آپوپتوز در تومورها مهار یا مختل شده و در نتیجه میزان تکثیر سلولی بسیار زیاد می‌شود [۴]. فرآیندهای تغییر شکل بدخیمی، پیشرفت سرطان و متاستاز از تغییر در مسیرهای طبیعی آپوپتوز ناشی می‌شوند. آپوپتوز در اغلب سلول‌های توموری از طریق دو مسیر اصلی انتقال سیگنال رخ می‌دهد. مسیر خارجی در اثر فعال شدن گیرنده‌های مرگ آغاز می‌شود و مسیر داخلی با رها شدن فاکتورهای آپوپتوزینیک از میتوکندری به سیتوپلاسم آغاز می‌گردد. به دنبال این دو، آبشاری از مولکول‌ها فعال می‌شود که با فعالسازی کاسپازهای (Caspase) پروتئولیتیک در نهایت به مرگ آپوپتوتیک سلول‌ها می‌انجامد [۵،۶،۷]. کاسپازها که جزو پروتئازهای اختصاصی آسپاراتات وابسته به سیستمین هستند نقش کلیدی در ایجاد

آپوپتوز دارند. بنابراین مهارکننده‌های اختصاصی آنها می‌توانند از آپوپتوز جلوگیری کنند [۸،۹].

آپوپتوز راه حل‌هایی را برای درمان ضدسرطانی مؤثر فراهم کرده است و تاکنون ترکیبات بسیاری گزارش شده‌اند که از طریق القای آپوپتوز اثرات ضدسرطانی دارند [۱۰]. بنابراین، امروزه یکی از استراتژی‌های جالب توجه که در شیمی درمانی سرطان مورد توجه قرار گرفته است مداخلات دارویی است که بتوانند مرگ سلول‌های بدخیم را از طریق القای آپوپتوز میانجی کند [۱۱]. ترکیبات بسیاری در گیاهان دارویی و خوراکی وجود دارند که فعالیت ضدتوموری خود را از طریق القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی القا می‌کنند [۱۲،۱۳].

رشد و متاستاز تومور نیازمند آنژیوژنز (Angiogenesis) یا تشکیل عروق خونی جدید و توانایی حمله (Invasion) و درگیرسازی بافت‌های جدید توسط سلول‌های سرطانی مهاجم است و کنترل آنژیوژنز و توانایی تهاجم سلول‌های سرطانی می‌تواند یک استراتژی ضدتوموری باشد. امروزه مطالعات بسیاری از دانشمندان به سمت استفاده از ترکیبات گیاهی به عنوان مهارکننده‌های آنژیوژنز و توانایی تهاجم سلولی به عنوان راهکارهای ضدتوموری جلب شده است [۱۸ - ۱۴].

در گروه ایمنی‌شناسی دانشگاه شاهد و مرکز تحقیقات ایمنونولوژی پژوهشکده بوعلی مشهد، مطالعاتی جهت شناسایی اثرات ضدسرطانی گیاهان دارویی بومی ایران آغاز شده و در دست انجام است. ACA1 یک فرآورده گیاهی است که حاوی عصاره آبی تهیه شده از اندام‌های هوایی گیاهی است که در طب سنتی ایران به عنوان دافع سموم سرطان‌زا استفاده شده است [۱۹،۲۰،۲۱]. فرآورده‌ای با فورمولاسیون خاص با الهام از طب سنتی ایران توسط پژوهشگران دانشکده پزشکی دانشگاه شاهد از این گیاه تهیه و پس از انجام آزمایش‌هایی با شماره ۳۲۵۰۳ در اداره ثبت مالکیت‌های صنعتی به عنوان اختراع و اکتشاف ثبت شده است. در مطالعه‌ای تأثیر ACA1 بر رده سلول‌های سرطانی ملانومای انسانی بررسی شد و مشخص شد که این فرآورده سلول‌های ملانومای (SK-MEL) را به طور



سلول‌ها توسط محلول تریپسین ۰/۲۵ درصد - EDTA ۰/۱ درصد جدا شده و پس از شستشو، درصد زنده بودن سلولی با استفاده از تریپان بلو توسط هموسیستمتر تعیین شد. از سلول‌های با درصد زنده بودن بالاتر از ۹۰ برای انجام تست‌ها استفاده شد.

سنجش میزان رشد و تکثیر سلولی

به منظور بررسی تأثیر فرآورده گیاهی ACA1 بر رشد و تکثیر سلولی توسط روش رنگ سنجی MTT [۲۴]، تعداد 2×10^4 سلول سرطانی آدنوکارسینومای معده (AGS) و یا فیروبلاستی (HGF) در هر چاهک میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای ریخته شده و با غلظت‌های مختلف فرآورده گیاهی ACA1 (۲۵۰ - ۴۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) به مدت ۲۴ ساعت تیمار شدند. برای هر غلظت حداقل سه چاهک اختصاص داده شد. سه چاهک نیز به عنوان کنترل بدون دارو مورد بررسی قرار گرفت. بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون، ۲۵ میکرولیتر از محلول MTT (۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) به هر چاهک افزوده شد و پلیت به مدت ۳ ساعت دیگر انکوبه شد. سپس دی‌متیل سولفوکساید (DMSO) به هر چاهک اضافه شد. جذب نوری توسط دستگاه خواننده الیزا در طول موج ۵۴۵ نانومتر در مقابل بلانک (DMSO) قرائت شد. درصد مهار رشد سلولی توسط فرمول زیر محاسبه شد:

بررسی آپوپتوز و نکروز سلولی

تعداد 5×10^4 سلول سرطانی HGF در هر چاهک پلیت ۶ خانه‌ای ریخته شده و با غلظت‌های مختلف فرآورده ACA1 (۵۰۰ - ۴۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) تیمار شدند. بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون، سلول‌ها با انکسین V کونژوگه با FITC (انکسین FITC-V) و پروپیدوم آیوداید PI انکوبه شده و توسط دستگاه فلوسایتومتری مورد بررسی قرار گرفتند. جمعیت سلولی انکسین FITC-V مثبت و PI منفی به عنوان آپوپتوز اولیه، جمعیت سلولی انکسین FITC-V مثبت و PI مثبت به عنوان آپوپتوز ثانویه یا نکروز پس آپوپتوتیک و

انتخابی نسبت به سلول‌های طبیعی L929 از بین می‌برد [۲۲]. ترکیبات بسیاری شناخته شده‌اند که سلول‌های سرطانی را هدف قرار می‌دهند ولی موفقیت این ترکیبات به عنوان یک ترکیب ضدسرطانی تا حد زیادی به توانایی آنها در فعال‌سازی مسیرهایی بستگی دارد که مرگ سلول‌های سرطانی را با واسطه توقف سیکل سلولی (Cell Cycle Arrest) و القای آپوپتوز سبب شده و بتوانند با کاهش توانایی تهاجم سلول‌های سرطانی از متاستاز تومور جلوگیری کنند [۲۳]. به منظور کشف داروهای گیاهی ضدسرطانی جدید، در این مطالعه سعی شد تا تأثیر ترکیب ضدسرطانی جدید ACA1 بر رشد و تکثیر سلول‌های سرطان معده انسانی (AGS) و نیز سلول‌های فیروبلاستی طبیعی انسانی (HGF) بررسی شود. همچنین به منظور بررسی کارایی این ترکیب و تعیین مکانیسم تأثیر ضدسرطانی آن توقف سیکل سلولی، نوع مرگ سلولی القا شده (آپوپتوز و یا نکروز) و نیز توانایی تهاجم سلولی در سلول‌های سرطانی معده بررسی شد.

مواد و روش‌ها

تهیه فرآورده گیاهی ACA1

فرآورده ACA1 توسط گروه ایمنی‌شناسی دانشگاه شاهد تهیه شده است و با شماره ۳۲۵۰۳ در اداره ثبت مالکیت‌های صنعتی به عنوان اختراع و اکتشاف ثبت گردیده است. فرآورده ACA1 از اندام هوایی گیاهی به صورت عصاره آبی تهیه شد. محلول با غلظت ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از ACA1 در محیط کشت (PBS) تهیه و با استفاده از فیلتر ۰/۲ میکرون استریل شد و تا زمان مصرف در یخچال نگهداری شد.

کشت سلولی

رده سلولی آدنوکارسینومای معده انسانی (AGS) و فیروبلاست لته انسانی (HGF) در محیط کشت DMEM غنی شده با FCS ۱۰ درصد، $100 \mu\text{g/ml}$ پنی‌سیلین و 100 U/ml پنی‌سیلین برای انجام تست‌های مختلف استرپتومایسین کشت داده شدند.

جمعیت سلولی انکسین FITC- V منفی و PI مثبت به عنوان نکرور در نظر گرفته شدند.

ارزیابی توانایی تهاجم سلول‌های سرطانی معده

در این تحقیق برای بررسی مهاجرت و نیز تهاجم و فرار سلولی از روش Boyden Chamber Assay استفاده شد که در آن تهاجم سلول‌های سرطانی از میان غشای پایه مدل (ECMatrix) می‌باشد [۲۵،۲۶]. بدین منظور، 1×10^5 عدد سلول AGS همراه با محیط کشت DMEM فاقد ماده جاذب (FBS) در گروه‌های کنترل و تست تیمار شده با غلظت‌های مختلف ACA1 (۲۵۰ - ۲۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) به حفره بالایی چاهک اضافه شد. به حفره پایین هر چاهک محیط کشت حاوی FBS ۱۰ درصد اضافه شد و پلیت به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد. سلول‌های سرطانی که توانایی تهاجم داشتند از غشا عبور کرده و توسط بافر جدا کننده از غشا جدا شده، لیز شده و در نهایت توسط رنگ فلورسنت سبز CyQuant GR (Molecular Probes) متصل شونده به اسید نوکلئیک‌های سلولی ردیابی شدند. بعد از تهییج در طول موج ۴۸۰ نانومتر، نور ساطع شده توسط سیستم فلئورسنت پلیت ریدر در طول موج ۵۲۰ نانومتر قرائت شد. شدت نور به دست آمده با تعداد سلول‌های عبور کرده از غشا (سلول‌های مهاجم) متناسب بود.

جمعیت سلولی انکسین FITC- V منفی و PI مثبت به عنوان نکرور در نظر گرفته شدند.

ارزیابی توانایی تهاجم سلول‌های سرطانی معده

در این تحقیق برای بررسی مهاجرت و نیز تهاجم و فرار سلولی از روش Boyden Chamber Assay استفاده شد که در آن تهاجم سلول‌های سرطانی از میان غشای پایه مدل (ECMatrix) می‌باشد [۲۵،۲۶]. بدین منظور، 1×10^5 عدد سلول AGS همراه با محیط کشت DMEM فاقد ماده جاذب (FBS) در گروه‌های کنترل و تست تیمار شده با غلظت‌های مختلف ACA1 (۲۵۰ - ۲۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) به حفره بالایی چاهک اضافه شد. به حفره پایین هر چاهک محیط کشت حاوی FBS ۱۰ درصد اضافه شد و پلیت به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد. سلول‌های سرطانی که توانایی تهاجم داشتند از غشا عبور کرده و توسط بافر جدا کننده از غشا جدا شده، لیز شده و در نهایت توسط رنگ فلورسنت سبز CyQuant GR (Molecular Probes) متصل شونده به اسید نوکلئیک‌های سلولی ردیابی شدند. بعد از تهییج در طول موج ۴۸۰ نانومتر، نور ساطع شده توسط سیستم فلئورسنت پلیت ریدر در طول موج ۵۲۰ نانومتر قرائت شد. شدت نور به دست آمده با تعداد سلول‌های عبور کرده از غشا (سلول‌های مهاجم) متناسب بود.

سنجش فعالیت کاسپازهای ۸ و ۹ در سلول‌های سرطانی AGS

به منظور ارزیابی کمی آپوپتوز، فعالیت آنزیماتیک کاسپازهای ۸ و ۹ با استفاده از روش‌های رنگ سنجی صورت گرفت. تعداد 1×10^6 سلول AGS در هر چاهک به صورت گروه تست (غلظت ۱۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از ACA1) و گروه کنترل به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد. بعد از لیز سلولی، پروتئین‌های سیتوزولی استخراج شده با بافر واکنش و سوبسترای کاسپاز ۸ (IETD-pNA) یا سوبسترای کاسپاز ۹

تأثیر آماری نتایج به دست آمده

به منظور مقایسه نتایج حاصله از نرم‌افزار آماری SPSS 11.0 و آزمون آماری ANOVA استفاده شد. حداقل سطح معنی‌داری $p < 0.05$ در نظر گرفته شد.

نتایج

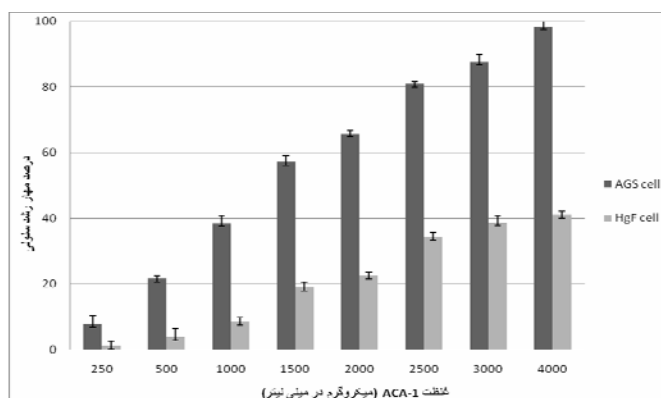
تأثیر غلظت‌های مختلف فرآورده ACA1 بر میزان رشد و تکثیر سلولی

نتایج حاصل از تأثیر فرآورده ACA1 بر رشد و تکثیر سلول‌های آدنوکارسینومای معده انسانی (AGS) و سلول‌های فیروبلاست لته انسانی (HgF) به صورت میانگین سه آزمایش مستقل گزارش شدند (نمودار شماره ۱). غلظت‌های مختلف فرآورده ACA1 رشد و تکثیر سلول‌های آدنوکارسینومای معده را کاهش دادند. درحالی که میزان مهار رشد و تکثیر سلول‌های فیروبلاستی کمتر بود (نمودار شماره ۱).

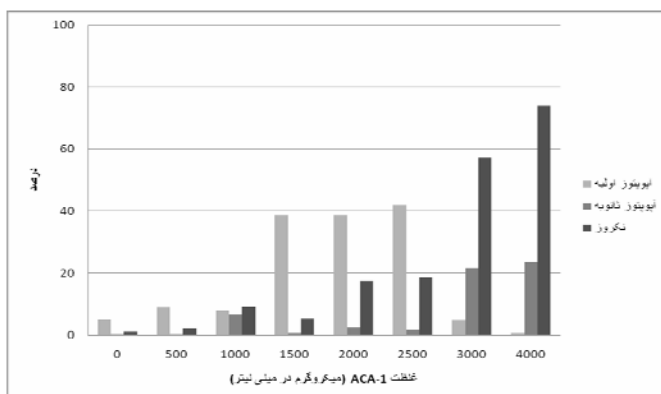
القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی تیمار شده با فرآورده ACA1

در سلول‌های گروه کنترل (تیمار نشده) ۱ درصد نکرور و ۳ درصد آپوپتوز اولیه مشاهده شد. درصد القای نکرور، آپوپتوز اولیه و آپوپتوز ثانویه در سلول‌های AGS به ترتیب ۱، ۳ و صفر توسط غلظت ۱۵۰۰؛ ۱، ۷۶ و ۱ توسط غلظت ۲۰۰۰؛ ۸، ۶۷ و ۴ توسط غلظت ۲۵۰۰؛ ۱۴، ۶۷ و ۴ توسط غلظت ۳۰۰۰ و ۷۲، ۳ و ۵ درصد توسط غلظت ۴۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر ACA1 بود (نمودار شماره ۲).





نمودار شماره ۱- تأثیر غلظت‌های مختلف فرآورده ACA1 بر القای آپتوز در سلول‌های آدنوکارسینومای معده (AGS) و سلول‌های فیبروبلاست لته انسانی (HgF)



نمودار شماره ۲- تأثیر غلظت‌های مختلف فرآورده ACA1 بر القای آپتوز در سلول‌های آدنوکارسینومای معده (AGS)

بحث

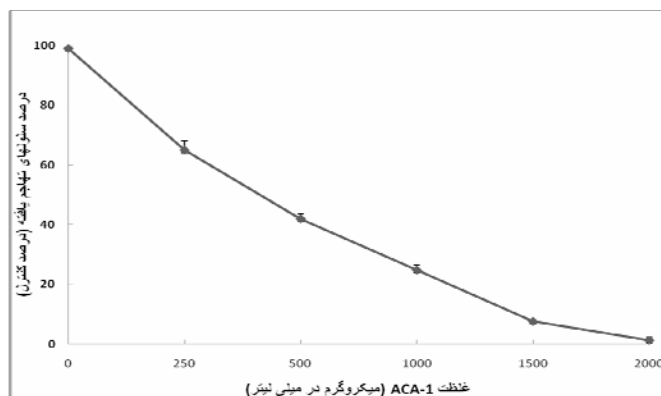
به طور کلی، درمان‌های گیاهی به طور متداول برای درمان ناخوشی‌ها و علائم مختلف بیماری مثل تب، التهاب و درد استفاده می‌شوند بدون اینکه اطلاعات کافی درباره مکانیسم تأثیر آنها وجود داشته باشد. با توجه به این امر که سرطان بزرگ‌ترین عامل مرگ و میر در میان زنان و مردان است، تحقیق و تولید داروهای ضدسرطانی با کارایی بیشتر و سمیت کمتر امری ضروری می‌باشد. مؤثر بودن بسیاری از ترکیبات به دست آمده از گیاهان در پیشگیری و یا درمان سرطان در سلول‌های سرطانی کشت داده شده در آزمایشگاه و نیز بعضی مدل‌های آزمایشگاهی مشخص شده است [۱،۲].

ارزیابی توانایی تهاجم سلول‌های سرطانی تیمار شده با ACA1

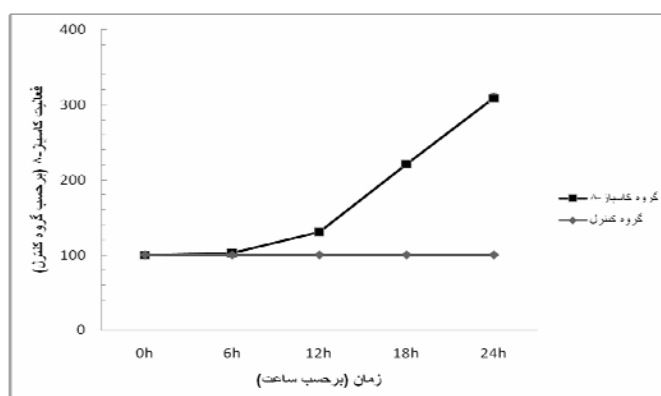
فرآورده ACA1 به طور وابسته به دوز تهاجم سلول‌های AGS را در *In vitro* مهار کرد بدون اینکه در این غلظت‌ها سمیت قوی بر آنها داشته باشد. در این روش تعداد سلول‌های AGS عبور کرده از غشای پایه مدل (مهاجم) با شدت نور به دست آمده متناسب بود (نمودار شماره ۳).

فعالسازی کاسپازهای ۸ و ۹ در مسیر القای آپتوز توسط ACA1

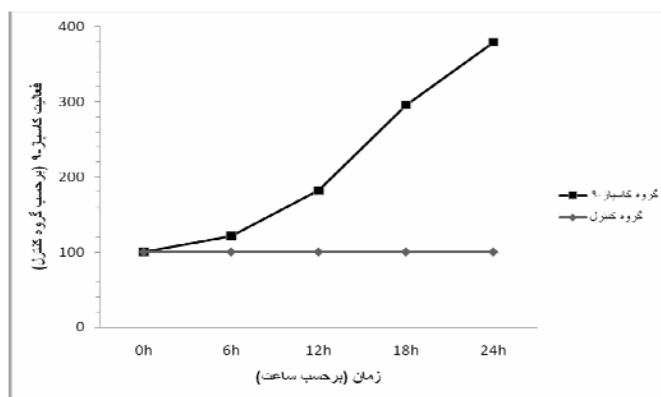
نتایج به دست آمده افزایش وابسته به زمان فعالیت پروتئولیتیک کاسپازهای ۸ و ۹ را در سلول‌های تیمار شده با فرآورده ACA1، در مقایسه با فعالیت آنها در گروه کنترل نشان داد (نمودار شماره ۴ و ۵).



نمودار شماره ۳- تأثیر غلظت‌های مختلف فرآورده ACA1 بر مهاجم سلول‌های آدنوکارسینومای معده (AGS)



نمودار شماره ۴- فعالسازی وابسته به زمان فعالیت کاسپاز ۸ در سلول‌های آدنوکارسینومای معده (AGS) تیمار شده



نمودار شماره ۵- فعالسازی وابسته به زمان فعالیت کاسپاز ۹ در سلول‌های آدنوکارسینومای معده (AGS) تیمار شده

به منظور بررسی تأثیر فرآورده گیاهی ACA1 بر سرطان معده، ابتدا تأثیر آن بر رشد و تکثیر رده سلول‌های سرطانی آدنوکارسینومای معده انسانی (AGS) کشت داده شده در آزمایشگاه توسط تست MTT بررسی شد. غلظت‌های مختلف

ترکیب ACA1 یک فرآورده گیاهی است که در طب سنتی ایران به عنوان دافع سموم سرطان‌زا ذکر شده [۱۹،۲۰،۲۱] و مشخص شده که سلول‌های ملانومایی SK-MEL را به طور انتخابی نسبت به سلول‌های طبیعی L929 از بین می‌برد [۲۲].



سلول‌های سرطان معده را عمدتاً با واسطه مکانیسم‌های آپوپتوز اولیه کاهش داد. میزان نکروز سلولی در غلظت ۳۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر افزایش یافت ولی هنوز مکانیسم عمده کشته سلول آپوپتوز ثانویه بود. غلظت بالای ۴۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از ACA1 سلول‌های سرطانی AGS را عمدتاً با واسطه القای نکروز سلولی از بین برد. بنابراین آپوپتوز نقش مهمی در خاصیت ضدسرطانی بودن فراورده ACA1 به ویژه در غلظت‌های کمتر از ۳۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر ایفا می‌کند.

به منظور شناسایی مکانیسم القای آپوپتوز توسط ACA1، میزان فعالیت کاسپازهای ۸ و ۹ در سلول‌های سرطانی AGS بررسی شد و مشخص شد که ACA1 فعالیت هر دو کاسپاز ۸ و ۹ را افزایش می‌دهد ولی افزایش فعالیت کاسپاز ۹ بسیار بیشتر بود. بنابراین مسیر میتوکندریایی آپوپتوز نقش بیشتری در کشته شدن سلول‌ها دارد.

پس از مشاهده تأثیر ضدسرطانی مناسب و بی‌خطر ACA1 بر سلول‌های سرطانی معده و نیز مشخص شدن القای آپوپتوز به عنوان مکانیسم مؤثر در این تأثیر، اثر فراورده گیاهی ACA1 بر توانایی تهاجم سلول‌های AGS در شرایط برون‌تنی به عنوان نماد تأثیر ضدمتاستاز آن در بدن بررسی شد. تعداد سلول‌های عبور کرده از غشای پایه مدل با افزایش غلظت ACA1 به صورت وابسته به غلظت کاهش یافت به طوری که غلظت بالای ACA1 عبور سلول‌های سرطانی مهاجم را به طور کامل مهار کرد.

نتیجه‌گیری

به طور کلی نتایج این تحقیق نشان دادند که فراورده گیاهی ACA1 خاصیت ضدسرطانی قوی، مؤثر و بی‌خطری داشته و می‌تواند به عنوان یک ترکیب احتمالی ضدسرطان معده و کم‌خطر یا بی‌خطر در مدل‌های موشی سرطانی در شرایط درون‌تنی مورد بررسی قرار گیرد.

فراورده ACA1 سبب مهار شدید و وابسته به غلظت رشد و تکثیر سلول‌های سرطانی معده (AGS) شدند. مهار رشد سلولی توسط کمترین غلظت 0.6 ± 43 درصد بود و به 0.4 ± 92 درصد توسط بالاترین غلظت مورد بررسی رسید. در حالی که این میزان سمیت بر سلول‌های فیبروبلاستی طبیعی انسانی (HGF) 0.7 ± 9 و 0.6 ± 42 درصد بود. این نتایج نشان دادند که فراورده گیاهی ACA1 تأثیر کشندگی قابل توجهی بر سلول‌های سرطانی معده داشت. همچنین ACA1 سلول‌های سرطانی معده را به طور انتخابی نسبت به سلول‌های طبیعی HGF از بین برد و میزان سمیت آن بر سلول‌های طبیعی قابل قبول و بسیار کمتر از سلول‌های سرطانی بود. بنابراین مطابق با بررسی قبلی که در آن تأثیر سیتوتوکسیسیته ACA1 بر سلول‌های ملانومایی SK-MEL و نیز سلول‌های نرمال L929 بررسی شده بود [۲۲]، در این تحقیق نیز ACA1 سلول‌های سرطانی AGS را به طور انتخابی نسبت به سلول‌های طبیعی HGF از بین برد ولی درصد مهار تکثیر (میزان سیتوتوکسیسیته) سلول‌های ملانومایی SK-MEL بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون با غلظت ۵۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر ACA1 تنها ۷ درصد بود که این میزان بسیار کمتر از تأثیر کشندگی ACA1 بر سلول‌های سرطانی معده (AGS) بود. ولی در بررسی قبلی مکانیسم تأثیر کشندگی ACA1 در سلول‌های سرطانی مشخص نشده بود.

ترکیبات بسیاری شناسایی شده‌اند که تأثیر کشنده‌ای بر سلول‌های سرطانی دارند ولی کاربرد آنها به عنوان ترکیب ضدسرطانی مفید به توانایی آنها در فعالسازی مسیرهای آپوپتوتیک در سلول‌های سرطانی بستگی دارد [۲۷]. بنابراین، در این مطالعه نوع مرگ سلولی القا شده (آپوپتوز یا نکروز) در سلول‌های آدنوکارسینومای معده انسانی (AGS) تیمار شده با ACA1 توسط تکنیک فلوسایتومتری بررسی شد. تمامی غلظت‌های مورد بررسی ACA1 سبب القای آپوپتوز اولیه، آپوپتوز ثانویه و نکروز در سلول‌های سرطانی معده شدند ولی میزان القای آپوپتوز اولیه بسیار بیشتر بود. ترکیب ACA1 در غلظت‌های کمتر از ۲۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر رشد و تکثیر



1. Newman DJ, Cragg GM, Sanders KM J. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *Nat. Prod.* 2003; 66: 1022 - 37.
2. Srivastava V, Negi AS, Gupta MM, Khanuja SPS. Plant-based anticancer molecules: A chemical and biological profile of some important leads. *Bioorg. Med. Chem.* 2005; 13 (21): 5892 - 908.
3. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer.* 1972; 26: 239 - 57.
4. Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science.* 1995; 267: 1456 - 62.
5. Bold RJ, Termuhlen PM, McConkey DJ. Apoptosis, cancer and cancer therapy. *Surg. Oncol.* 1997; 6: 133 - 42.
6. Kamesaki H. Mechanisms involved in chemotherapy-induced apoptosis and their implications in cancer chemotherapy. *Int. J. Hematol.* 1998; 68: 29 - 43.
7. Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science.* 1995; 267: 1456 - 62.
8. Schierie GS, Hansson O, Leist M, Nicotera P, Widner H, Brundin P. Caspase inhibition reduces apoptosis and increases survival of nigral transplants. *Nat. Med.* 1999; 5: 97 - 100.
9. Miura M, Zhu H, Rotello R, Hartwig EA, Yuan J. Induction of apoptosis in fibroblasts by IL-1 beta-converting enzyme, a mammalian homolog of the *C. elegans* cell death gene *ced-3*. *Cell.* 1993; 75: 653 - 60.
10. Kamesaki H. Mechanisms involved in chemotherapy-induced apoptosis and their implications in cancer chemotherapy. *Int. J. Hematol.* 1998; 68: 29 - 43.
11. Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science.* 1995; 267: 1456 - 62.
12. Clement MV, Hirpara JL, Chadhury SH, Parviz S. Chemopreventive agent resveratrol, a natural product derived from grapes, triggers CD95 signaling-dependent apoptosis in human cells. *Blood.* 1998; 2: 999 - 1002.
13. Yang GY, Liao J, Kim K, Yurkow EJ, Yang CS. Inhibition of growth and induction of apoptosis in human cancer cell lines by polyphenols. *Carcinogenesis* 1998; 19: 611 - 6.
14. Folkman J, Klagsbrun M. Angiogenic factors. *Sci.* 1987; 235: 442 - 7.
15. Harris AL. Are angiostatin and endostatin cures for cancer? *Lancet* 1998; 351: 1598 - 9.
16. O'Reilly MS. Angiostatin induces and sustains dormancy of human primary tumors in mice. *Nat. Med.* 1996; 2: 689 - 92.
17. O'Reilly MS. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* 1997; 88: 277 - 85.
18. Tai-Ping F, Ju-Ching Y, Kar L, Patrick YK, Ricky NS. Angiogenesis: from plants to blood vessels. *Trends. Pharmacol. Sci.* 2006; 27: 297 - 309.
19. Khorasani A. Makhzan al advieh, 11th century. Islamic Republic Press. Tehran. 1355.
20. Moemen MH, Moemen TH. Mahmoudi Press. Tehran. 1376.
21. Bu-Ali Sina SR. Qanon Fi Teb 4th Century In: Sharafkandi AR. Soroush Press. Tehran. 1370.
22. Ghazanfari T, Shahrokhi S, Naseri M, Jalali Nodoushan MR, Yaraie R, Kardar M. The cytotoxic effects a of ACA1 on human melanoma cell line. *J. Mazandaran University of Medical Sci.* 1385; 55: 42 - 9.



23. Debatin KM. Activation of apoptosis pathways by anti-cancer treatment. *Toxicol. Lett.* 2000; 112: 41 - 8.
24. Mosmann T. Rapid colometric assay for cellular growth and survival: application to proliferation cytotoxicity assay. *J. Immunol. Methods* 1983; 65: 55 - 63.
25. Albin A, Iwamoto Y, Kleinman HK, Martin GR, Aaronson GR, Kowzlowski JM, McEwan RN. A rapid in vitro assay for quantitiating the invasive potential of tumor cells. *Cancer. Res.* 1987; 47: 3239 - 45.
26. Repesh LA. A new in vitro assay for quantitating tumor cell invasion. *Invasion. Metastases* 1989; 9: 192 - 208.
27. Tian Z, Chen S, Zhang Y, Huang M, Shi L, Huang F, Fong C, Yang M, Xiao P. The cytotoxicity of naturally occurring styryl lactones. *Phytomedicine* 2006; 13: 181 – 6.