مطالعه اثر آنتی اکسیدانی عصاره تام و فلاونوییدی گیاه سس (Cuscuta lehmanniana Bunge) بر سلول های PC۱۲ مدل دیابتیک

دکتر مونا فرهادی: استادیارجنین شناسی، گروه زیست شناسی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساوه ، ساوه، ایران monafarhadi@yahoo.com

***دکتر سید بهنام الدین جامعی:** دانشیار آناتومی و علوم اعصاب، دپارتمان علوم پایه، دانشکده پیراپزشکی و گروه آناتومی دانشکده پزشکی ، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران. (*نویسنده مسئول). behnamjameie@tums.ac.ir

پریسا حیات: کارشناس آزمایشگاه، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی تهران (پردیس همت)، تهران، ایران. parisa_h56@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۰/۶/۲۱ تاریخ پذیرش: ۹۰/۸/۱۵

چکیده

زمینه و هدف : نوروپاتی های محیطی و مرکزی یکی از مهمترین عوارض ابتلا به دیابت شیرین می باشد، تاکنون مکانیسم های دقیق سلولی و مولکولی نوروتوکسیسیتی ناشی از افزایش گلوکز مشخص نگردیده است. در تحقیقات سال های اخیر به نقش رادیکال های آزاد به عنوان یکی از دلایل نوروپاتی های دیابتیک توجه شده است. بر این مبنا استفاده از آنتی اکسیدان ها یکی از گزینه های درمانی برای جلوگیری از آسیب های ناشی از عوامل استرس اکسیداتیو مانند افزایش گلوکز می باشد. در تحقیق حاضر اثرآنتی اکسیدانی عصاره تام و فلاو نوییدی گیاه سس با نام علمی Cuscuta lehmanniana Bunge، که گیاه انگلی بومی ایران می باشد، برسلول‌های PC ۱۲ تحت تیمار با افزایش گلوکز به عنوان مدل سلولی نوروپاتی دیابتیک استفاده گردید.

روش کار: در تحقیق حاضر از سلول های رده PC۱۲ در محیط کشت با افزایش گلوکز به عنوان القا مدل سلولی نوروپاتی دیابتیک استفاده گردیده است.از گیاه سس، پس از جمع آوری عصاره تام و فلاونوییدی تهیه گردید. فعالیت به دام اندازی رادیکال های آزاد عصاره های گیاه به روش (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) DPPH و سپس اثر عصاره تام و فلاو نوییدی بر روی سلول های PC ۱۲ تحت افزایش گلوکز با استفاده از تست MTT، رنگ آمیزی هسته ای PI-Annexin و وسترن بلاتینگ (Western blot) برای پروتئین پروآپوپتوتیک Bax مورد مطالعه قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج DPPH نشان داد که عصاره تام و فلاو نوییدی گیاه سس دارای خاصیت به دام اندازی رادیکال های آزاد می باشند. پس از به کار بردن عصاره فلاو نوییدی با غلظت ۵۰µg/ml رادیکال های آزاد نسبت به گروه کنترل، ۷۰/۴۵٪ کاهش نشان داده اند . نتایج تست MTT هم چنین نشان داد که عصاره تام گیاه در غلظت 100µg/ml و عصاره فلاو نوییدی با غلظت 50µg/ml توان حیاتی سلول ها را به ترتیب ۷۰ و ۸۳٪ افزایش داده است. رنگ آمیزی Annexin نشان داد که تعداد سلول های آپوپتوتیک در مقایسه با گروه کنترل از ۳۸/۲٪ به ۱۵/۸٪ کاهش یافته است، سنجش وسترن بلاتینگ هم چنین نشان دهنده کاهش معنی دار بیان پروتئین پروآپوپتوتیک Bax متعاقب استفاده از عصاره تام و فلاونوییدی می‌باشد.

نتیجه گیری: بر اساس یافته های این تحقیق عصاره تام و فلاونوییدی گیاه سس دارای خاصیت نوروپروتکتیو در برابر افزایش گلوکز در محیط کشت می‌باشند، به نظر می رسد خواص درمانی این گیاه بتواند در کنترل و یا کاهش نوروپاتی های دیابتیک موثر واقع گردد.

کلیدواژه‌ها: گیاه سس، نوروپاتی دیابتیک، سلول های PC۱۲ .

مقدمه

دیابت ملیتوس شایع ترین بیماری غدد درون ریز با شیوع ۱-۲٪ است. این بیماری با اختلالات متابولیک، رتینوپاتی(Retinopathy)، نوروپاتی(Neuropathy)، واسکولوپاتی (Vasculopathy) و ضایعاتی درغشاء پایه مشخص می‌گردد (۱). علت اصلی این بیماری بالا بودن طولانی مدت غلظت گلوکز پلاسما می باشد. هایپرگلیسمی ناشی از دیابت به عنوان یک استرس اکسیداتیو(Oxidative stress) موجب مشکلاتی مانند نوروپاتی می‌گردد. نوروپاتی دیابتیک می تواند تمام قسمت‌های سیستم عصبی را گرفتار کند. روند مرگ سلولی از طریق القا اپیتوز در نورون‌های نواحی مختلف سیستم عصبی مانند ناحیه هیپوکامپ گزارش شده است (۲). مطالعات زیادی پیرامون مواد آنتی‌اکسیدان گیاهی صورت گرفته و خواص و ترکیبات موثره آن‌ها مورد بررسی قرار گرفته است. سس گیاهی انگلی است که به دور گیاهان دیگر می پیچد و در طب سنتی چین و ایران استفاده های فراوانی داشته و اثرات درمانی بارزی در کبد، کلیه و طحال دارد (۳). این گیاه هم‌چنین دارای اثرات ضد پیری و محافظتی می باشد. نشان داده شده است که فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره اتانولی سس، بر سلول های کبدی از سمیت کبدی ناشی از استامینوفن

در موش ها جلوگیری می‌کند (۴). عصاره گلیکوزیدی این گیاه موجب القای تمایز سلولی در رده سلول‌های PC۱۲ شده است و عملکردی مشابه فاکتور های نوروتروفیک را نشان داده است (۴، ۵). ترکیبات فعال بذر سس اساسا شامل فلاونوییدهایی مانند کویرستین، کامپفرول، کوسکوتین، آستراگالین و گلیکوزیدهای آن‌ها می‌باشد (۶). فلاونوییدها یکی از بزرگترین گروه‌های فنلی طبیعی هستند. این ترکیبات در گیاهان سبز و اغلب عصاره های گیاهی وجود دارند (۷). فعالیت آنتی‌اکسیدانی این ترکیبات در بسیاری از مطالعات آمده است، عصاره تام این گیاه اثر محافظتی روی بسیاری از سلول‌ها داشته است و اثرات فلاو نوییدی آن در محافظت از سلول‌ها و درمان سرطان به دامنه وسیعی از مکانیسم هایی شامل خواص به دام اندازی رادیکال های آزاد، تعدیل آنزیم‌هایی که کارسینوژن ها را فعال می کنند و جلوگیری از القای فاکتور رونویسی فعال کننده پروتئین ۱ (AP-1) نسبت داده می شود (۸ و۹). با توجه به سابقه بسیار طولانی استفاده از گیاهان دارویی در مناطق مختلف و هم چنین فلور طبیعی گیاهی اقلیمی ایران و بومی گیاه سس و اثرات متفاوت آن در رده های سلولی مختلف در تحقیق حاضر اثر آنتی اکسیدانی آن روی سلول های عصبی تحت تیمار با افزایش گلوکز به عنوان یک مدل برای نوروپاتی دیابتی مورد ارزیابی قرار گرفت.

روش کار

عصاره گیری: برای عصاره گیری تام از روش پرکولاسیون(Percolation) استفاده گردید. به این منظور۲۲۰ گرم پودر و ۱۲۰۰ سی سی حلال هیدروالکلی استفاده گردید. عمل عصاره گیری در سه مرحله انجام پذیرفت و ۸۰۰ سی سی عصاره تام حاصل گردید. برای تهیه عصاره فلاو نوییدی ۴۰۰ سی سی از عصاره تام حاصل از نوبت اول با ۲۰۰ سی سی اتر دوپترول دو مرحله دیگر هر مرتبه با ۱۵۰ میلی‌لیتر اتردوپترول و با استفاده از قیف جدا کننده(Decanter) شستشو داده شد. ترکیبات فلاو نوییدی در فاز مایع باقی مانده و ناخالصی ها وارد فاز اتردوپترولی گردیدند. فاز مایع نگهداری و فاز اتردوپترولی جدا گردیدند. فاز مایع حاوی فلاونوییدها توسط دستگاه روتاری(Rotary) تغلیظ گردید و بصورت عصاره فلاو نوییدی آماده سازی شد.

گروه های آزمایش

گروه کنترل: سلول های کشت داده شده در محیط کشت معمولی DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) قرار گرفتند، با mg/ml ۴/۵ گلوکز که بر طبق دستورالعمل استفاده جهت کشت سلول‌های PC۱۲ بسیار مناسب است و هم چنین سلول های کشت شده در ۶ برابر غلظت گلوکز نیز به عنوان گروه های کنترل در نظر گرفته شدند.

گروه تجربی: شامل سلول های کشت داده شده در محیط با ۶ برابرغلظت طبیعی گلوکزمی باشند که تحت تیمار با غلظت های μg/ml ۲۵و۵۰ و ۱۰۰ عصاره تام و عصاره فلاو نوییدی در زمان های ۴۸ و ۷۲ و ۹۶ قرار گرفتند.

کشت سلول های PC۱۲: سلول های PC۱۲ از انستیتو پاستور تهیه شد. سلول ها در دمای ۳۷ درجه و رطوبت ۹۰٪ و ۵٪ ,۲ CO و محیط DMEM به علاوه ۵٪ سرم جنین گاوی Fetal Bovine Serum (FBS)، ۱۰٪ سرم اسب Horse Serum (HS) و Streptomycin،50 IU/ml Penicillin ۵۰μg/ml رشد داده شدند.

سنجش فعالیت آنتی اکسیدانی گیاه سس با DPPH : ۱ گرم از عصاره تام و فلاو نوییدی در ۱ میلی‌لیتر از اتانول ۹۰٪ حل شد و سپس از محلول mg/ml ۱۰۰۰ به دست آمده، غلظت های مختلف شامل: μg/ml ۲۵، ۵۰، ۱۰۰و ۲۰۰ تهیه شد. μM ۲۰۰ از DPPH را در اتانول به صورت محلول در آورده، به هر غلظت هم حجم خودش محلول DPPH اضافه گردید. پس از مخلوط کردن به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی انکوبه شده و جذب آن در طول موج ۵۱۷ نانومتر خوانده شد و از اسید آسکوربیکμg/ml ۲۰به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید و فعالیت به دام اندازی رادیکال‌های آزاد با فرمول زیر محاسبه شد. آزمایش سه بار تکرار شد.

٪= به دام اندازی رادیکال های آزاد

$$\frac{\text{جذب کنترل} - \text{جذب گروه ها آزمایش} \times ۱۰۰}{\text{جذب کنترل}}$$

سنجش توان حیاتی (MTT): پس از دو پاساژ سلولی(Cell passaging) جهت سنجش MTT سلول‌های PC۱۲ به میزان ۵۰۰۰ سلول در هر خانه در

ظرف ۹۶ خانه کشت داده شد. توان حیاتی سلول‌ها با استفاده از 3-(4, 5- dimethylthiazol – 2)-2, 5 diphenyl tetrazolium (MTT assay) ارزیابی شد. به این ترتیب که ۱۰– ۲۰ میکرولیتر محلول MTT به غلظت ۵mg/ml به هر کدام از خانه های ۹۶ تایی اضافه شد و سلول‌ها برای یک ساعت در انکوباتور در حرارت ۳۷ درجه انکوبه شدند. پس از این که محیط سلول ها دور nm در دستگاه ELIZA reader بررسی شد.

اندازه گیری سیتوتوکسیسیتی و آپوپتوز: به منظور بررسی آپوپتوز از رنگ آمیزی PI-Annexin و ارزیابی با فلوسیتومتر(Flowcytometer) انجام گرفت. به این منظور در ظروف ۹۶ خانه در هر خانه حدود $۱۰^{۶}$ سلول ریخته شد و پلیت به مدت ۱ شب در انکوباتور قرار گرفت و سپس غلظت های مورد نظر عصاره ها اضافه شد و حجم نهایی هر خانه با محیط به 3ml رسانده شد. پلیت ها تا زمان مورد نظر در انکوباتور قرار گرفتند و ۲۰ مایکرولیتر از معرف نشان دار Annexin-v را در ۱ ml بافر رقیق کرده و ۲۰ µl از محلول PI به آن اضافه گردید. هم چنین از تکنیک Sub-G1 نیز برای تعیین سلول های تحت فازG1 سیکل سلولی استفاده گردید.

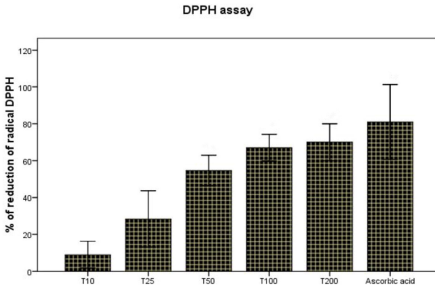
سنجش بیان پروتئین پرواپوتوتیک Bax: جهت آنالیز دو پروتئین Bax وBcl2 از روش وسترن بلاتینگ استفاده گردید. به این منظور پس از استخراج پروتئین‌ها از سلول‌ها طبق روش Bradford، ۴۰ µg/ml پروتئین با ژل ۱۲٪ پلی اکریل آمید و ولتاژ۱۰۰ الکتروفورز شد. پس از انتقال به کاغذ PVDF (Polyvinylidene fluoride) از آنتی بادی Rabit anti rat Bax and Bcl2 و Alkaline phosphates goat anti- rabit IgG استفده شد. سپس باندها پس از انکوبه شدن در سوبسترای(Substrate) BCIP, NBT قابل رویت شدند.

روش های آماری: نتایج با روش آنالیز واریانس یک طرفه با کمک آزمون Bonferones و Mean±SD از نرم افزار SPSS (ver. 14) معنی دار بودن نتایج در سطح احتمال p<۰/۰۵ و سه تکرار برای هر آزمایش محاسبه شد.

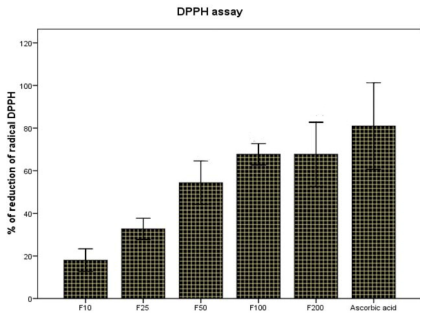
یافته‌ها

نتایج سنجش رادیکال آزاد: عصاره فلاونوییدی گیاه سس در غلظت های µg/ml ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ رادیکال های آزاد را به میزان معنی داری کاهش داد. از اسید اسکوربیک µg/ml ۲۰ که مهار رادیکال های آزاد را به میزان ۹۰/۲۰٪ نشان داد، به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید. در عصاره فلاونوییدی با غلظت ۵۰µg/ml به میزان ۷۰/۴۵٪ رادیکال های آزاد مهار گردید. عصاره های تام (T) در غلظت‌های T200، T100و T50 نسبت به گروه کنترل تفاوت معنی‌دار نشان دادند. هم‌چنین در عصاره های فلاونوییدی در غلظت‌های F200، F100و F50 در مقایسه با گروه کنترل از نظر به دام اندازی رادیکال آزاد در سلول‌ها تفاوت معنی دار مشاهده گردید، ولی بین غلظت‌های مختلف دو عصاره تفاوت معنی داری مشاهده نشد (نمودار۱).

نتایج آزمایش سنجش توان حیاتی سلول: ابتدا مرگ سلولی در غلظت های مختلف گلوکز در زمان‌های ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت بررسی گردید. نتایج حاصل از تست MTT نشان داد که افزایش گلوکز در غلظت ۱۳/۵ mg/ml و ۱۸ در زمان ۴۸ و ۷۲ ساعت کاهش

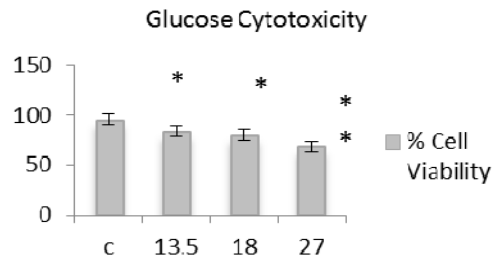


نمودار۱ – الف

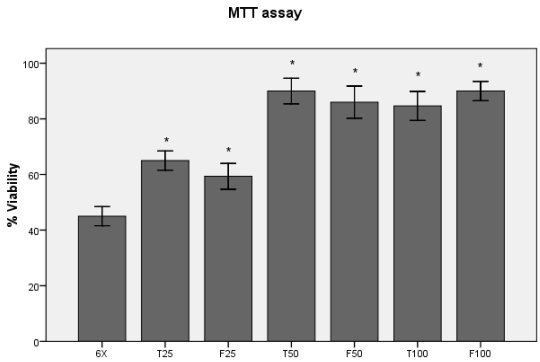


نمودار ۱– ب

نمودار۱: الف– نمایش نتایج به دام اندازی رایکال های آزاد غلظت های مختلف عصاره تام گیاه سس و ب– غلظت های مختلف عصاره فلاو نوییدی گیاه سس و DPPH با غلظت ۱۰۰ µg/ml در طول موج ۵۱۷ نانومتر. درصد کاهش رادیکال های آزاد طبق فرمول در مقایسه با گروه کنترل یا اسید آسکوربیک با غلظت µg/ml۲۰ محاسبه گردید. نتایج براساس means ± SD و سه تکرار می باشد.



نمودار۲- نمودار توان حیاتی سلول های ۱۲ PC تحت تاثیر گلوکز در زمان ۷۲ ساعت. توان حیاتی سلول ها در غلظت های ۱۳/۵ ، ۱۸ و ۲۷ mg/ml در مقابل گروه کنترل C نشان داده شده است. در غلظت ۲۷ mg/ml بیشترین مرگ سلولی نشان داده شد. نتایج بر اساس mean SEM (n=6) می باشد ۰/۰۵>p*.



نمودار۳: نمودار سنجش توان حیاتی سلول ها پس از تاثیر عصاره تام و فلاو نوییدی در زمان ۷۲ ساعت: به ترتیب x ۶ گروه کنترل با ۶ برابر افزایش گلوکز، T ۲۵ گروه تیمار با عصاره تام غلظت µg/ml۲۵ ، ۲۵ Fگروه تیمار با عصاره فلاو نوییدی غلظت µg/ml۲۵، T۵۰ گروه تیمار با عصاره تام غلظت µg/ml۵۰ ، F ۵۰ گروه تیمار با عصاره فلاو نوییدی غلظت µg/ml۵۰ ، T۱۰۰ گروه تیمار با عصاره تام غلظت ۱۰۰ µg/ml، F۱۰۰ گروه تیمار با عصاره فلاو نوییدی غلظت µg/ml۱۰۰ نتایج براساس means ± SD و سه تکرار می باشد. ۰/۰۵>p

معنی‌داری را در توان حیاتی سلول ها ایجاد نمی‌کند، ولی در غلظتmg/ml ۲۷ این کاهش هم در زمان ۷۲ و هم در زمان ۹۶ ساعت معنی دار بود. سنجش MTT برای عصاره های تام و فلاو نوییدی گیاه سس در یک روش وابسته به مقدار و زمان، موجب محافظت از سلول‌های PC۱۲ در برابر افزایش گلوکز به عنوان یک فاکتور سایتوتوکسیک (Cytotoxic) شدند و بیشترین اثر محافظتی مربوط به عصاره های فلاو نوییدی با غلظت µg/ml ۵۰ بود، در حالی که عصاره تام گیاه با غلظت µg/ml ۱۰۰ توان حیاتی معنی داری را برای سلول ها نشان دادند (نمودار۲و۳).

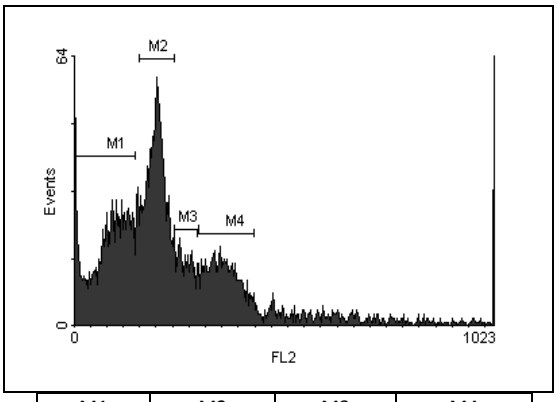
نتایج تست Sub G1: این تست نشان می دهد که سلول ها در چه مرحله ای از چرخه سلولی واقع شده است. همان طور که در نمودار۴- الف نشان داده شده است، در گروه تحت تیمار با افزایش گلوکز ۴۳٪ سلول‌ها اپوپتوز نشان می دهند و درصد سلول‌ها در مرحله S ,G1, G2 به ترتیب ۲۹ و ۸/۵ و ۱۲/۹٪ است. در نمودار۴- ب، گروه تحت تیمار با عصاره تام گیاه میزان اپوپتوز سلول ها به ۱۶/۹٪ کاهش یافته است و سلول ها در مراحل دیگر چرخه سلولی افزایش معنی دار نشان داده‌اند . درنمودار۴ -ج، گروه تحت تیمار با عصاره فلاونوییدی را نشان می‌دهد و در آن میزان آپوپتوربه ۱۱/۵٪ رسیده است که نسبت به گروه 6X تفاوت معنی‌داری را نشان می دهد. هردو گروه عصاره تام و فلاونوییدی نسبت به گروه کنترل تفاوت معنی‌دار داشتند ولی عصاره فلاونوییدی تفاوت معنی داری با عصاره تام از نظر کاهش میزان آپوپتوز نشان ندادند (نمودار ۴ و۵).

نتایج سنجش آپوپتوز (تست Annexin): در این سنجش نوع مرگ سلول ها (اپوپتوز و نکروز) و میزان سلول های اپوپتوز شده و نکروزه تعیین گردید. نتایج حاصل از فلوسایتومتری نشان داد که در سلول‌های ۱۲ تحت تیمار با عصاره تام T100 µg/ml و فلاونوییدی گیاه سسF 50µg/ml درصد سلول های زنده بعد از ۷۲ ساعت به ترتیب ۸۰/۷٪ و ۸۵/۹٪ بود و تعداد سلول‌های اپوپتوز شده به ترتیب به ۱۵/۸٪ و ۱۱/۳٪ کاهش یافت و سلول های نکروزه ۱/۰۵٪ و ۰/۷٪ بودند. نتایج به دست آمده از عصاره تام و فلاو نوییدی با گروه کنترل6X تفاوت معنی داری را نشان داد، درحالی که بین عصاره تام و فلاو نوییدی در غلظت های فوق تفاوت معنی داری مشاهده نگردید (نمودار ۶ و ۷).

نتایج سنجش وسترن بلاتینگ: در این تحقیق میزان بیان پروتئینBax ۲۱ KD در گروه تحت تیمار با عصاره تام غلظت µl/ml ۱۰۰ و عصاره فلاونوییدی غلظت µl/ml ۵۰ در زمان ۷۲ ساعت بررسی گردید. همان‌طور که در شکل مشخص می باشد، پروتئین پرواپوپتوتیک Bax نسبت به گروه کنترل کاهش و مقدار بیان پروتئین Bcl2 افزایش نشان می دهد. هم چنین نسبت بین این دو پروتئین نیز نسبت به گروه کنترل افزایش نشان می دهد که بیان‌گر اثر محافظتی عصاره می‌باشد (شکل ۱ و نمودار۸).

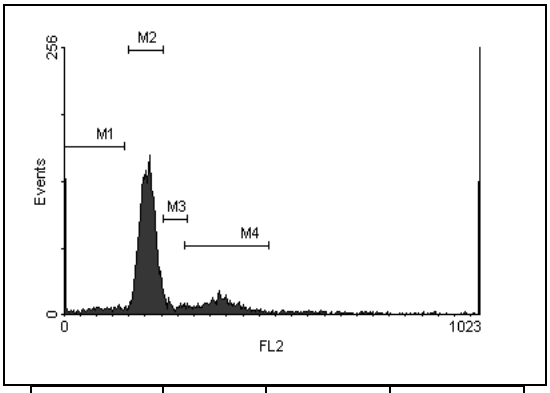
بحث و نتیجه گیری

دیابت شیرین بیماری هتروژنیک (Heterogenic) متابولیکی است که در آن افزایش گلوکز در محیط اطراف سلول موجب سمیت در سلول ها و نهایتاً مرگ آن‌ها می‌گردد. در مطالعات گذشته نشان داده شده است که دیابت غلظت گلوکز را در سلول های عصبی تا چهار برابر افزایش داده و موجب آسیب نورونی می‌گردد (۱۰). افزایش گلوکز هم چنین موجب پیشبرد و آزاد سازی رادیکال های آزاد می گردد. زمانی که تولید واکنش اختصاصی اکسیژن (ROS= Reactive Oxygen Species) از عوامل خنثی کننده آن بیشتر شود، استرس اکسیداتیو به وجود می آید که ممکن است منجر به مرگ سلولی شود (۱۱). شکل های فعال شده اکسیژن در ROS به دلیل هایپرگلیسمی، قادر به تغییر ساختارهای مختلف مولکولی در فرد دیابتی به روش های مختلف مانند پراکسیداسیون لیپید، اتواکسیداسیون گلوکز، و گلیکاسیون غیرآنزیماتیک پروتئین می باشند. افزایش گلوکز موجب گسیختگی زنجیره انتقال الکترون در کمپلکس III میتوکندریایی می گردد و در نتیجه اکسیداسیون، اکسیژن مولکولی بوسیله کوانزیم Q تبدیل به آنیون سوپر اکساید (Superoxide anion) می‌گردد. بنابراین بازده نرمال گلوکز در مواقع استرسی مانند افزایش گلوکز می تواند تولید رادیکال های آزاد باشد. ترکیبات استرس اکسیداتیو در بسیاری از رده های سلولی اپیتوز و نکروز را ایجاد می کنند (۱۲). پراکسیدهیدروژن که به وسیله سوپراکساید دیسموتاز (Superoxide dismutases) تحت افزایش گلوکز در میتوکندری ایجاد می‌گردد، یکی دیگر از مکانیسم های احتمالی استرس اکسیداتیو تحت دیابت است. هایپر گلیسمی در مدل‌های حیوانی و در محیط کشت تعدادی از مسیرهای پیچیده متابولیسمی گلوکز را فعال می کند که در نوروپاتی‌های دیابتی سهیم اند. از آنجا که فلاونوییدها یک دسته وسیع از ترکیبات طبیعی با خواص بیولوژیکی و ساختار آروماتیک هتروسیکل ((Heterocyclic aromatic compound می‌باشند که اثرات آنتی استروژنیک(Antiesterogenic) آن‌ها به عنوان عوامل محافظتی گزارش شده‌اند، تعداد قابل توجهی از انواع داروهای استفاده شده در بالین از منابع طبیعی جداسازی شده و یا با آن‌ها مرتبطند (۱۳). در تحقیق حاضر تاثیر عصاره تام و فلاونوییدِ گیاه C. lehmanniana Bunge، بر سلول‌های PC۱۲ به



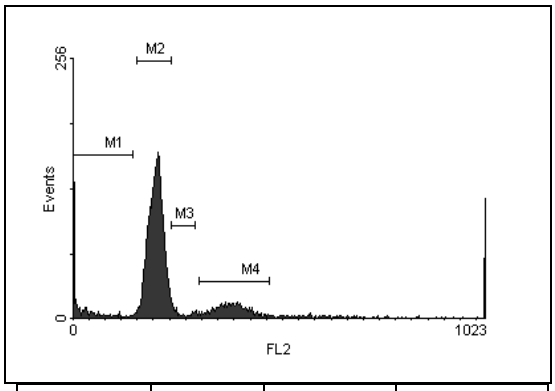
M1	M2	M3	M4
43.9%	29%	8.5%	12.94%

نمودار۴- الف: گروه 6X



M1	M2	M3	M4
16.9%	63%	2.6%	12.7%

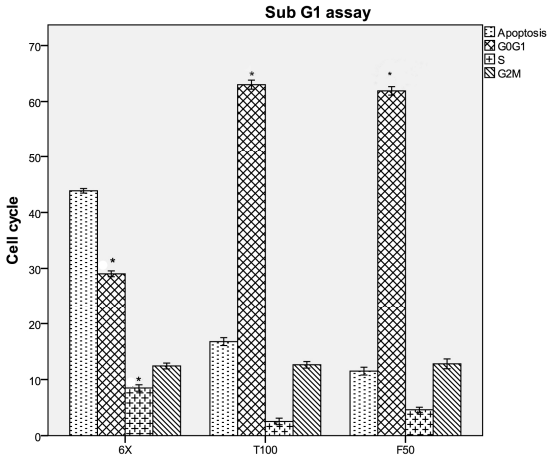
نمودار۴- ب: گروه T 100



M1	M2	M3	M4
11.5%	62%	4.62%	12.9%

نمودار۴- ج: گروه F 50

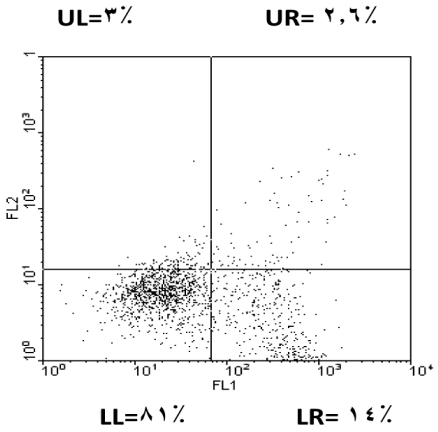
نمودار ۴- نمایش تست Sub G1 در گروه کنترل F50 و T100 در مراحل مختلف چرخه سلولی: M1 مرگ سلولی، M2 فاز G1، M3 فاز S یا سنتز و M4 فاز G2 و تقسیم را نشان می دهد



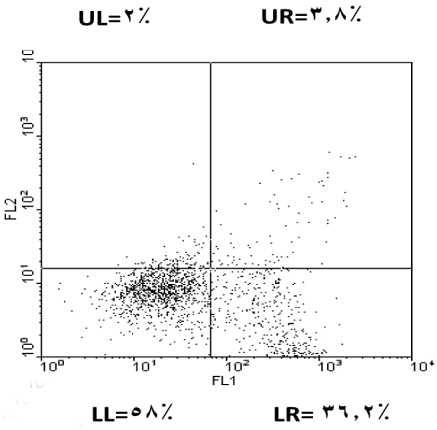
نمودار ۵: نمودار مقایسه گروه X ۶ تیمار با عصاره تام و عصاره فلاو نوییدی در مراحل مختلف چرخه سلولی.

عنوان یک مدل از سلول‌های عصبی ارزیابی شد و نشان داده شد که این عصاره می‌تواند موجب جلوگیری از مرگ سلولی و محافظت آن در برابر افزایش گلوکز و سمیت آن گردد (۵). Cuscuta حدود ۱۷۰-۱۰۰ گونه گیاهان انگل دارد و به عنوان گیاه دارویی در چین از شهرت بالایی برخوردار است. این گیاه خواص دارویی فراوانی دارد دارویی با اثر بخشی بالا محسوب می شود . تا کنون عوارض جانبی برای استفاده از آن ذکر نشده است (۱۴). بذر گیاه Cuscuta chinensis یکی از رایج ترین ترکیبات گیاهی استفاده شده برای بهبود عملکرد کبد و کلیه و دیگر موارد در طب سنتی چین و تایوان می‌باشد (۱۵). ترکیبات شیمیایی سس شامل فلاونول‌هایی مانند کوئرستین، کامپفرول و گلیکوزیدهای است که این ترکیبات مسئول فعالیت‌های بیولوژیکی این گیاه باشند(۱۶و۱۷). در تحقیق حاضر از C. lehmanniana Bunge به عنوان گونه‌ای از گیاه سس بومی ایران (اطراف شهرستان ساوه) در برابر عامل سایتوتوکسیک افزایش گلوکز استفاده گردید.

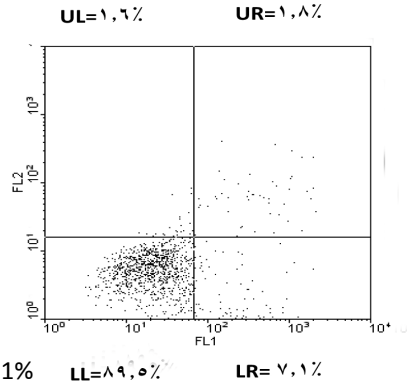
نتایجDPPH در مطالعه حاضر نشان داد که عصاره تام و فلاونوییدی گیاه C. lehmanniana Bunge دارای خاصیت به دام اندازی رادیکال‌های آزاد می باشد. میزان به دام اندازی رادیکال های آزاد در عصاره فلاونوییدی با غلظت ۵۰µg/ml و غلظت های بالاتر و هم چنین میزان رادیکال های آزاد در عصاره تام با غلظت ۱۰۰µg/ml مشابه اسید اسکوربیک بود.



نمودار۶- الف: T۱۰۰

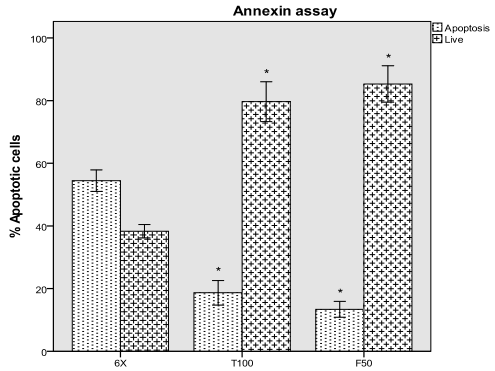


نمودار۶- ب: X ۶

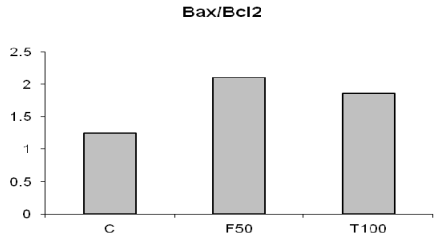


نمودار۶- ج: F50

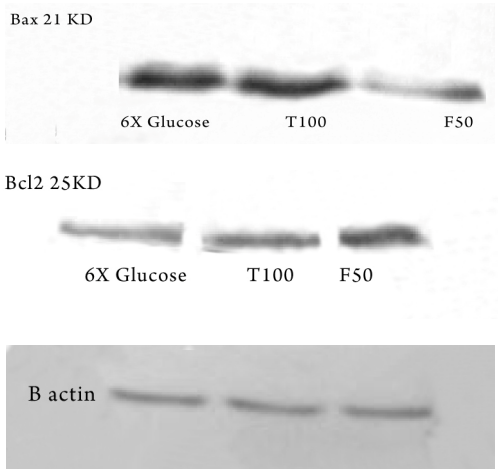
نمودار۶- UL سلول های نکروز، UR سلول های مرحله انتهایی اپوپتوز، LL سلول های زنده و LR سلول های آپوپتوز شده را نشان می دهد. محور افقی : سلولهای آپوپتوز شده (سلولهایی که رنگ Annexin را جذب کرده اند)، محور عمودی : سلولهای نکروزه(سلولهایی که رنگ PI را جذب کرده‌اند)



نمودار۷- مقایسه درصد سلول های اپوپتوز شده به نکروز شده در عصاره فلاو نوییدی و تام گیاه سس



نمودار ۸- نمایش نسبت پروتئین Bax/ Bcl2



شکل۱- نمایش وسترن بلاتینگ بیان پروتئین Bax ,Bcl2, β actin استخراج شده از سلول های گروه کنترل 6X و گروه تیمار شده با عصاره تام Total Extract با غلظت 100 µg/ml و عصاره فلاو نوییدی با غلظت 50µg/ml پس از ۷۲ ساعت باند روشن نشان دهنده کاهش بیان پروتئین Bax گروه های تخت تیمار می باشد. آزمایش سه بار تکرار شد.

این نتایج با نتایج قبلی روی گیاه C. reflexa مطابقت دارد (۱۸). درصد به دام اندازی رادیکال‌های آزاد در غلظتµg/ml ۶۰۰ در تحقیق مذکور در مقایسه با اسید آسکوربیک با غلظتµg/ml ۲۰ ۹۰ ٪ بود (۱۹). درحالی که در تحقیق حاضرعصاره فلاو نوییدی در غلظت µg/ml ۱۰۰ و ۲۰۰، ۸۹٪ کاهش رادیکال های آزاد را در مقایسه با اسید آسکوربیک در غلظتµg/ml ۲۰ نشان داد (نمودار ۴). با توجه به نتایج گیاه C. reflexa به نظر می رسد که فلاونوییداین گیاه در غلظت پایین تری خاصیت به دام اندازی قوی تری دارد. در این مطالعه نیز جهت بررسی اثر محافظتی این گیاه روی سلول های عصبی تحت تیمار با افزایش گلوکز از روش سنجش MTT استفاده شد. در این سنجش عصاره‌های تام و فلاونوییدی گیاه مذکور نشان دادند که در یک روش وابسته بهمقدار و زمان موجب محافظت از سلول های PC۱۲ می گردد و بیشترین اثر محافظتی و جلوگیری از مرگ سلولی مربوط به عصاره های فلاونوییدی با غلظت µg/ml ۱۰۰ به میزان ۸۰٪ بود، در حالی که عصاره تام حاصل از گیاه با غلظت µg/ml ۵۰ توان حیاتی ۷۵٪ را در زمان ۷۲ ساعت نشان داد و بین عصاره تام و فلاونوییدی تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. اثر محافظتی گیاه Hypericum perforatum روی میزان بقا و مرگ سلول های PC12 به ترتیب ۴۸٪ و ۵۲٪ گزارش شد، که در آن از تیمار با H_2O_2 برای ایجاد سمیت در سلول ها استفاده شده بود(۱۸). به نظر می‌رسد فلاونوییدهای گیاه lehmanniana C. Bunge نسبت به Hypericum perforatum دارای اثر محافظتی بیشتری می باشد. عصاره های بذر گیاه سس C. chinensis دارای فعالیت های آنتی اکسیدانی هستند و در سلول های محیط کشت و در موجود زنده منجر به القای خاصیت آنتی اکسیدانی و خاصیت ضد پراکسیداسیون لیپید می شوند. بندنیدر سال ۲۰۰۴ نشان داد که فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی بذر سس به میزان زیادی متناسب با مقادیر ترکیبات فعال فلاونولی یعنی کویرستین و کامپفرول می باشد، که این ممکن است به دلیل بیشتر بودن میزان کویرستین موجود در عصاره فلاونوییدی نسبت به عصاره تام باشد (۲۰). در سال‌های اخیر تلاش برای تشخیص پتانسیل درمانی فلاونوییدها، روی فلاونوییدکویرستین متمرکز شده است، که به میزان زیادی در رژیم غذایی انسانی وجود دارد و به طور کلی فلاو نوییدی با بالاترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی می باشد. به نظر می رسد که میزان کویرستین این گیاه نسبت به Hypericum perforatum و C. reflexa بیشتر باشد (۲۱). نتایج حاصل از رنگ آمیزی annexin با استفاده از

فلوسایتومتری نشان داد که در غلظت T،۱۰۰μg/ml درصد سلول‌هایی که در مرحله نهایی و ابتدایی اپوپتوز هستند، تفاوت معنی داری با گروه کنترل دارد. عصاره فلاو نوییدی در غلظت F۵۰μg/ml نیز نسبت به گروه کنترل معنی دار بود. ولی بین عصاره تام و فلاو نوییدی تفاوت معنی داری در سلول های آپوپتوزی و زنده مشاهده نشد. عملکرد میتوکندری در مرگ سلولی آپپتوزی نیازمند آزاد شدن فاکتور آپپتوژنیک میتوکندریایی از غشاء خارجی می باشد. نفوذ پذیری غشاء خارجی میتوکندری بوسیله اعضای خانواده Bcl 2 تنظیم می شود. در پستانداران خانواده Bcl_2 شامل تنظیم کننده های آنتی آپپتوتیک و پرو آپپتوتیک می‌باشند. Bcl_2 پروتئین ۲۵-۲۶ کیلو دالتونی است و محل اصلی عمل آن در میتوکندری قرار دارد که آزاد شدن فاکتورهای اپپتوژنیک را تنظیم می‌نمایند (۲۲) Bax پروتئینی۲۱ کیلودالتونی و سیتوزولی است. در هنگام القای آپوپتوز این پروتئین مجددا در میتوکندری قرار می‌گیرد. قرار گیری مجدد Bax در میتوکندری به هردو بخش پایانه C وN آن بستگی دارد. نسبت بیان پروتئین Bax و Bcl2 تعیین کننده سرنوشت سلول و هدایت‌کننده آن‌ها به سمت مرگ می باشد. به همین دلیل مطالعات زیادی پیرامون تغییرات این دو پروتئین در سلول ها با تیمار های مختلف تا کنون انجام شده است (۲۳). در تحقیق حاضر به روش وسترن بلات پروتئین Bax، نقش آن در اپوپتوز سلول های PC۱۲ و هم چنین اثر عصاره بر روی میزان بیان آن، نشان داده شد که این پروتئین پس از تاثیر عصاره کاهش معنی داری داشته است که نماینده جلوگیری از مرگ سلولی با دخالت میتوکندری با واسطه پروتئین Bax و از طریق مسیر داخلی می باشد. به این ترتیب در این مطالعه معلوم شد که عصاره گیاه C. lehmanniana Bunge می‌تواند رادیکال‌های آزاد را با غلظت پایین تر ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به میزان بیشتری(۸۹٪) نسبت به عصاره های گیاهی دیگر ذکر شده مهار نماید , هم چنین به دام اندازی بیشتر رادیکال های آزاد و اثر محافظتی عصاره با سنجش Annexine تایید شد و نشان داده شد که درصد جلوگیری از مرگ سلولی آپوپتوزی آن نیز معنی دار است. سنجش وسترن بلاتینگ نشان داد که با مهار بیان پروتئین Bax و نسبت بین بیان Bax/Bcl2 این عصاره می تواند از طریق مسیر داخلی آپوپتوزی یا همان اپوپتوز میتوکندریایی موجب جلوگیری مرگ سلولی گردد. البته از آن جایی که اپوپتوز دارای دو مسیر داخلی و خارجی است، پیشنهاد می‌گردد که پروتئین P۵۳ و میزان گلوتاتیون نیز ارزیابی گردد.

با توجه به عوارض جانبی داروهای شیمیایی نسبت به داروهای گیاهی و هم چنین فلور طبیعی گیاهی ایران به نظر می رسد که استفاده از گیاهان دارویی می تواند اثرات درمانی قابل توجهی را ایجاد نماید.

تقدیر و تشکر

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی تحت عنوان بررسی اثر عصاره فلاونوییدی گیاه سس بر القای آپوپتوز در سلول های PC۱۲ تحت تیمار با گلوکزمصوب دانشگاه آزاد اسلامی ساوه به کد۱-۹۶۲ می‌باشد، که با حمایت دانشگاه آزاد اسلامی ساوه اجرا شده است.

منابع

1 . Shepered PR, Kan BB. Glucose transporters and insulin action implication for insulin resistance and diabetes mellitus. N Engl J Med. 1999; 341:248–257.

2. Vinik AI, Ziegler D. Diabetic cardiovascular autonomic neuropathy. Circulation. 2007 Jan 23; 115(3):387-97.

3. Bao X,Wang Z, Fang J, LiX. Structural features of an immunostimulating and antioxidant acidic polysaccharide from the seeds of Cuscuta chinensis. Planta Medica. 2002; 68:237–243.

4.Yen FL, Wu TH, Lin LT, Lin CC. Hepatoprotective antioxidant effects of Cuscuta chinensis against hepatotoxicity in rats. J Ethnopharmacol. 2007; 123- 128.

5. Liu J H, Jiang B, Bao Y M, An L J. Effect of Cuscuta chinensis glycoside on the neuronal differentiation of rat pheochromocytoma PC12 cells. Int J Dev Neurosci. 2003; 21: 277–281.

6. Ye M, Yan Y.N., Qiao L. , Ni X.M..Studies on chemical constituents of Cuscuta chinensis.China J Chinese Materia Medica. 2002; 27: 115–117.

7. Choi JA, Kim JY, Lee JY, Kang CM, Kwon HJ, Yoo YD,et al. Induction of cell cycle arrest and apoptosis in human breast cancer cells by quercetin. Int J Oncol 2001; 19: 837-844.

8. Su SJ, Chow NH, Kung ML, Hung TC, Chang KL. Effects of soy isoflavones on apoptosis induction and G2-M arrest in human hepatoma cells involvement of caspase-3 activation, Bcl-2 and Bcl-XL downregulation, and Cdc2 kinase activity. Nutr. Cancer .2003; 45: 113-123.

9. Canivenc-LavierMF, Vernevaut M, Totis MH,

Siess J, Magdalou , Suschetet M.Comparative effects of flavonoids and model inducers on drug-metabolizing enzymes in rat liver. Toxicology 1996;114:19–27.

10. Tomlinson DR, Gardiner NJ .Glucose neurotoxicocity. Nat Rev. 2008; 25:612-628.

11. Ghsh S, An D, Pulinikunnil T, Qi D, Lau HC, Abrahani A, et al. Role of dietary fatty acids and acute hyperglycemia in modulating cardiac cell death. Nutrition. 2004; 20:916-23.

12. Schulz JB, Matthews RT, Beal MF. Role of nitric oxide in neurodegenerative diseases. Curr Opin Neurol. 1995; 8: 480–486.

13- Kumar N, K. Allen, D. Riccardi, A. Kazi , J. Heine. Isoflavones in breast cancer chemoprevention: where do we go from here? Front Biosci. 2004; 9: 2927–2934.

14-Guo C, Zhang Z, Zheng H, Shu Z, Li C. Studies of the herbal and botanical origins of semen Cuscutae. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi .1990; 15: 138-40.

15-Cragg GM, Newman DJ. Antineoplastic agents from natural sources: achievements and future directions. Expert Opinion on Investigational Drugs.2000; 9: 151-159.

16- Zheng H Z, Dong Z H, She J. Tusizi .Modern study of traditional Chinese medicine. Beijing: Beijing Xue Yuan Press of the People's Republic of China. 1st Ed. 1998; pp. 4110–4120.

17- Williamson G, Barron D, Shimoi K, Terao J . In vitro biological properties of flavonoid conjugates found in vivo. Free Radical Res .2005; 39: 457–469.

18- Amol P, Vikas P, Kundan C, Vijay P. Invitro free radicals scavenging activity of stems of cuscuta reflexa. J Pharmacy Res 2009; 2: 58-62.

19- Benedi J, Arroyo R, Romero C, Martin S, Villar A M. Antioxidant properties and protective effects of standardized extract of Hypericum perforatum on hydrogen peroxide- induced oxidative damage in PC12 cells. Life Sci. 2004; 75:1263-1276

20- Feng-LinYen, Tzu-Hui Wu, Liang-Tzung Lin, Thau –Ming Cham, Chun- Ching Lin. Nanoparticles formulation of Cuscuta chinensis prevents acetaminophen-induced hepatotoxicity in rats. Food and Chemical toxicol. 2008; 46: 1771–1777.

21- Rice-Evans C A, Miller N J, Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids . Free Radical Biol. Med.1996; 20: 933–956.

22- Oltvai ZN, Millman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax that accelerates programmed cell death .Cell. 1993; 74:609-619.

23- Shimizu S, Narita M, Tsujimoto Y. Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. Nature. 1999; 399:483–487.

Original Article

Study of the antioxidant effects of total and flavonoiods extracts of Cuscuta lehmanniana Bunge against on PC12 cells in vitro diabetic model

Mona Farhadi, PhD. Assistant Professor of Embryology, Biology group, Agriculture Faculty, Azad Islamic University of Saveh, Saveh, Iran. monafarhadi@yahoo.com
***Seyed Behnamaddin Jameie, PhD**. Associate Professor of Anatomy and Neuroscience, Basic Sciences Department, Faculty of Allied Medicine & Anatomy Department, Faculty of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran. (*Corresponding author). behnamjameie@tums.ac.ir
Parisa Hayat, BSc. Medical laboratory technician, Cellular and Molecular Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran. parisa_h56@yahoo.com

Abstract

Background: Central and peripheral neuropathies are the most common side effects of Diabetes Mellitus (DM). The exact mechanisms of diabetic neurotoxicity are still unknown. Recently oxidative stress is introduced as one of the factors for diabetics' neuropathies. Antioxidants also used as therapeutic agents to reduce the side effects of diabetes. In the present research the antioxidant effects of total and flavonoid extracts of Cusseta lehmaniana Bunge on high glucose inducted Pc12 were studied.

Methods: PC12 cell line treated with high glucose was used. Total and flavonoid extract of C. lehmaniana Bungs were prepared. PC12 cells treated with 6X fold high glucose concentration exposed to extracts. Antioxidant activity of extracts, cell viability and apoptosis were studied by DPPH, MTT, Annexin staining and Western Blotting respectively.

Results: The MTT result showed 50µg/ml of flavonoid extract and 100µg/ml of total C. lehmaniana Bungs extract increased cell viability after 3 hours pretreatment. DPPH assay demonstrated 50 µg/ml flavonoid extract can increased radical scavenging inhibits compare with ascorbic acid. Several assays were used for evaluated of anti apoptotic effect such as: Annexin, SubG1and Western blotting for expression of Bax protein.

Conclusion: Based on our findings, it is concluded that both total and flavonoid extract of C. lehmaniana Bungs have the potential to protect PC12 cells against glucose neurotoxicity by reducing apoptosis via increased Bax expression protein.

Keywords: PC12 cells, Diabetic neuropathy, C. lehmaniana Bunge.