

تأثیر سایتوتوکسیک ۴- هیدروکسی ایزولوسین بر رده سلول سرطانی کبد

معصومه بابایی^۱، محمدرضا حائری^{۲*}، سیده زهرا موسوی^۳، محمد خازنی^۴

چکیده

زمینه و هدف: ۴- هیدروکسی ایزولوسین یک اسیدآمینو موجود در شبلیله است که دارای خواص ضددیابتی است. احتمالاً این اثر با فعال کردن PI3K صورت می گیرد. در این مطالعه اثر سایتوتوکسیک ۴- هیدروکسی ایزولوسین بر رده سلول سرطانی کبد مورد بررسی قرار گرفت. **روش بررسی:** در این مطالعه تجربی، سلول‌های Huh-7 و HepG2 در پلیت ۹۶ خانه‌ای کشت داده شدند و پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون، سلول‌ها در معرض غلظت‌های مختلف ۴- هیدروکسی ایزولوسین (دوز ۰/۵-۶۴ میلی‌مولار) قرار گرفتند. برای تعیین درصد سلول‌های زنده بعد از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت انکوباسیون، از تست MTT استفاده شد. نتایج با استفاده از آزمون آماری واریانس یک‌طرفه و توکی تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: درصد مرگ سلولی تحت تأثیر ۴- هیدروکسی ایزولوسین، وابسته به غلظت و زمان است. در این مطالعه این تفاوت از نظر آماری نسبت به گروه کنترل معنی‌دار بود ($p < 0/05$)، به‌طوری‌که در بالاترین غلظت (دوز ۶۴ میلی‌مولار) و پس از ۷۲ ساعت، ۶۵ و ۶۱٪ مرگ سلولی به ترتیب در سلول‌های Huh-7 و HepG2 مشاهده گردید. IC_{50} بعد از ۷۲ ساعت انکوباسیون (در غلظت ۲۴ و ۲۳ میلی‌مولار) به ترتیب برای سلول‌های Huh-7 و HepG2 محاسبه شد. **نتیجه‌گیری:** نتایج این مطالعه نشان داد ۴- هیدروکسی ایزولوسین نه تنها باعث افزایش رشد سلول‌های سرطانی نمی‌شود؛ بلکه دارای اثرات سایتوتوکسیک روی رده سلول‌های هپاتوما نیز می‌باشد. با توجه به اثرات ضددیابتی ۴- هیدروکسی ایزولوسین این ترکیب می‌تواند کاندیدای مناسبی به‌عنوان داروی ضددیابت باشد.

کلید واژه‌ها: ۴- هیدروکسی ایزولوسین؛ شبلیله؛ سمیت سلولی؛ سرطان؛ دیابت ملیتوس.

^۱کارشناس ارشد سم‌شناسی، واحد علوم دارویی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

^۲استادیار بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی قم، قم، ایران.

^۳استادیار سم‌شناسی، دانشکده داروسازی، واحد علوم دارویی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

^۴دستیار ویروس‌شناسی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

*نویسنده مسئول مکاتبات:

محمدرضا حائری، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی قم، قم، ایران؛

آدرس پست الکترونیکی:

haeri@muq.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۲/۱۲/۲۰

تاریخ پذیرش: ۹۳/۳/۴

لطفاً به این مقاله به‌صورت زیر استناد نمایید:

Babaei M, Haeri MR, Mousavi SZ, Khazeni M. Cytotoxic effect of 4-hydroxyisoleucine on liver cancer cell line. Qom Univ Med Sci J 2015;9(1-2):1-6. [Full Text in Persian]

مقدمه

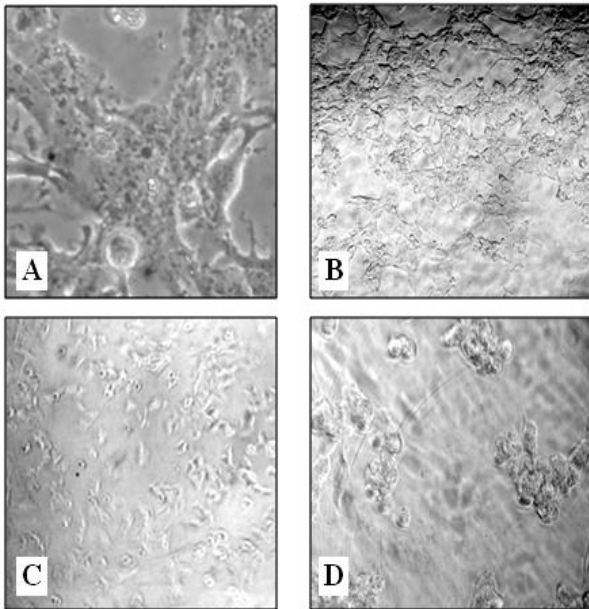
گیاهان دارویی از منابع مهم موادی هستند که دارای فعالیت بیولوژیک بوده و در صورت توجه لازم، کاربردهای مناسبی در زمینه‌های دارویی، غذایی و آرایشی دارند. در سراسر دنیا تعداد بی‌شماری از بیماران به‌منظور حفظ سلامتی از گیاهان دارویی استفاده می‌کنند. بنابراین، دانشمندان نگاه عمیقی بر خواص بیولوژیک، قدرت درمانی و سلامت این محصولات دارند (۱). در فرهنگ دارویی قدیم، گیاه شنبلیله به‌عنوان یک داروی مفید برای بسیاری از بیماری‌ها شهرت یافته بود. در داروشناسی باستانی نیز دانه شنبلیله برای خاصیت کاهندگی قند خون و درمان مشکلات دیابت مورد استفاده قرار می‌گرفت (۲،۳)، اما برای سالیان متمادی مشخص نشده بود کدامیک از ترکیبات موجود در این گیاه دارای چنین خاصیتی می‌باشد. برای اولین بار Fowden و همکاران یک اسیدآمین غیرطبیعی به نام ۴-هیدروکسی ایزولوسین (4-HILE) را شناسایی کردند (۴)، سپس Alcock و همکاران ساختمان فضایی این ترکیب را معلوم کردند (۵). در مطالعات مختلف نشان داده شده است عصاره شنبلیله غنی از ترکیب ۴-هیدروکسی ایزولوسین (حاوی اثرات کاهش چربی و قند خون در جوندگان و انسان) می‌باشد. بنابراین به‌نظر می‌رسد تأثیر گیاه شنبلیله در کاهش قند خون به‌علت وجود ترکیب 4-HILE در این گیاه است (۸-۶). 4-HILE با تأثیر بر سلول‌های بتا پانکراس، علاوه بر تحریک ترشح انسولین، مقاومت انسولین را در عضله کاهش می‌دهد که این فرآیند با فعال‌سازی گیرنده سوبسترای انسولین (IRS) وابسته به فعالیت آنزیم فسفاتیدیل اینوزیتول تری‌کیناز (PI3K) انجام می‌شود (۹،۱۰). از آنجا که فعال‌شدن آنزیم PI3K در ارتباط با رشد سلولی است. بنابراین، احتمالاً ۴-هیدروکسی ایزولوسین بر چرخه سلولی مؤثر می‌باشد. لذا با توجه به این موضوع این سؤال مطرح است که آیا در صورت استفاده از 4-HILE برای درمان دیابت، فعال‌کردن PI3K موجب بروز سرطان در افراد دیابتی می‌شود؟ از آنجا که تاکنون مطالعه‌ای در مورد سمیت سلولی ۴-هیدروکسی ایزولوسین انجام نشده است، همچنین با توجه به اثرات ضددیابتی ۴-هیدروکسی ایزولوسین، در مطالعه حاضر اثرات سایتوتوکسیک این ترکیب بر رده‌های سلول سرطانی کبد (Huh-7 و HepG2) مورد بررسی قرار گرفت.

روش بررسی

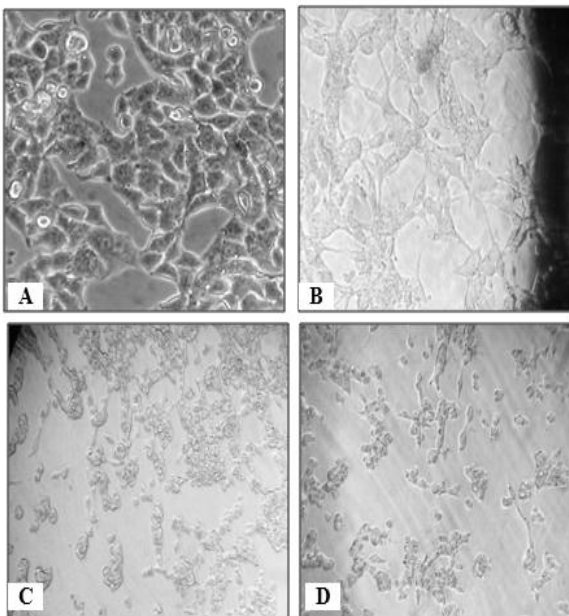
در این مطالعه تجربی ابتدا ۴-هیدروکسی ایزولوسین استخراج‌شده از دانه شنبلیله (شرکت NINGBO PANGS)، تریپان بلو و (3-4,5-dimethylthiazol-2-yl-2,5-diphenyl MTT Tetrazolium Bromide) (از شرکت سیگما)، محیط کشت DMEM (Dulbcco's Modified of Eagles Medium)، RPMI1640 (Rasewell Park Memorial Institute) و سرم جنین گاو (FBS از شرکت PAA) خریداری شد. رده‌های سلولی سرطانی کبد HepG2 و Huh-7 از بانک سلول انستیتو پاستور (تهران، ایران) تهیه گردید.

رده سلولی HepG2 برای رشد در محیط کشت RPMI1640 و رده سلولی Huh-7 در محیط کشت DEME، سازگار شده بودند. بنابراین، در این پژوهش از این دو محیط جهت کشت سلول‌ها استفاده شد. قبل از هر بار مصرف، دمای محیط کشت و بافر به ۳۷ درجه سانتیگراد رسانیده شد. بافر PBS به‌عنوان محلول شستشو قبل از جداسازی سلول‌ها، همچنین به‌عنوان رقیق‌کننده تریپسین مورد استفاده قرار گرفت. سلول‌ها در این دو محیط کشت به همراه ۱۰٪ سرم در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد در انکوباتور حاوی ۵ درصد CO₂، کشت و تکثیر داده شدند. MTT، نمک تترازولیوم محلول در آب است که تحت تأثیر آنزیم‌های دهیدروژناز موجود در میتوکندری سلول‌های زنده احیا و به فورمازان نامحلول بنفش‌رنگ تبدیل می‌شود. جذب این ترکیب در دی‌متیل سولفاکساید در طول موج ۶۰۰-۵۵۰ نانومتر قابل اندازه‌گیری است (۱۱).

در این مطالعه تست MTT برای هر دو رده سلولی در پلیت ۹۶ خانه‌ای و برای هر غلظت به‌صورت سه‌تایی انجام شد. بدین منظور سوسپانسیون سلولی از هر دو رده سلولی تهیه و ۲۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون شامل ۵۰۰۰ سلول به هر چاهک اضافه گردید. سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور حاوی ۵ درصد CO₂ و دمای ۳۷ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. پس از پایان انکوباسیون، مایع رویی هر چاهک خارج و غلظت‌های مختلفی از 4-HILE (۰/۵، ۱، ۲، ۴، ۸، ۱۶، ۳۲، ۶۴ میلی‌مولار) در محیط کشت به سلول‌ها اضافه گردید. ۶ چاهک نیز به‌عنوان کنترل رشد بدون ترکیب، در نظر گرفته شد. سلول‌ها در زمانهای ۲۴، ۴۸ و



شکل شماره ۱: تصویر میکروسکوپی سلول HepG2 در مجاورت
۴-هیدروکسی ایزولوسین
A: کنترل رشد؛ B: بعد از ۲۴ ساعت مجاورت؛ C: ۴۸ ساعت؛
D: ۷۲ ساعت.



شکل شماره ۲: تصویر میکروسکوپی سلول Huh-7 در مجاورت
۴-هیدروکسی ایزولوسین
A: کنترل رشد؛ B: بعد از ۲۴ ساعت مجاورت؛ C: ۴۸ ساعت؛
D: ۷۲ ساعت.

۷۲ ساعت انکوبه شدند. پس از پایان انکوباسیون، آزمون MTT انجام گرفت. برای انجام این آزمایش، رنگ MTT با غلظت ۵ میلی گرم بر میلی لیتر در بافر تهیه و ۲۰ میکرولیتر از آن به هر چاهک اضافه گردید، سپس به مدت ۴ ساعت انکوبه شد. پس از ۴ ساعت، مایع رویی هر چاهک خارج و پس از اضافه کردن ۱۵۰ میکرولیتر دی متیل سولفاکساید، به مدت ۱۰ دقیقه در دمای محیط نگهداری شد. در نهایت، جذب نوری در طول موج ۵۷۰ نانومتر با دستگاه الایزا ریدر اندازه گیری شد. میانگین جذب نوری به دست آمده از سلول های تحت تأثیر ترکیب حاصل از سه بار آزمایش مورد محاسبه قرار گرفت و با میانگین جذب نوری سلول هایی که تحت تیمار نبودند (کنترل رشد) مقایسه گردید و درصد مرگ سلولی پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت محاسبه شد. درصد مرگ سلولی تحت تأثیر 4-HILe نسبت به سلول های کنترل رشد با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید (۱۲).

$$\text{درصد مرگ سلولی} = \frac{\text{جذب نمونه}}{\text{جذب کنترل}} \times 100$$

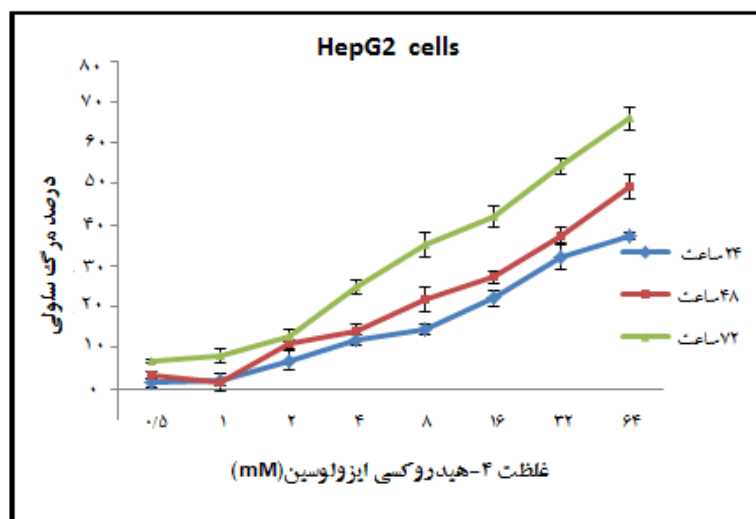
نتایج با استفاده از نرم افزار SPSS و آزمون آماری واریانس یک طرفه و توکی تجزیه و تحلیل شدند.

یافته ها

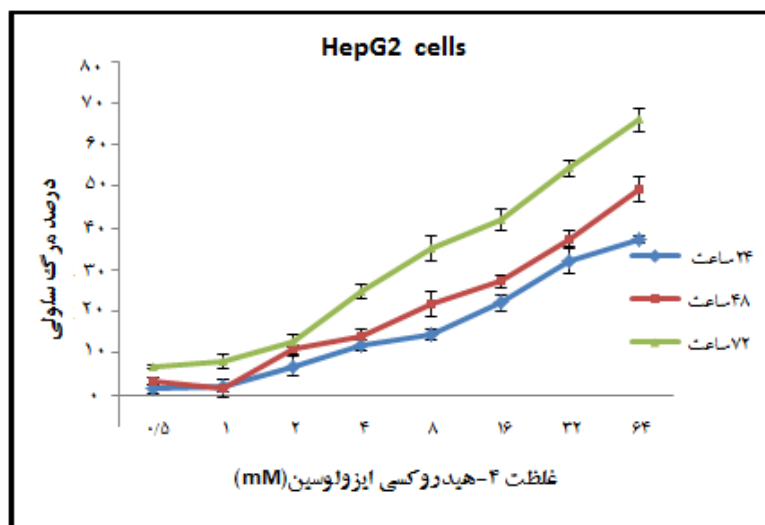
در این مطالعه، هر دو رده سلولی تحت تأثیر 4-HILe قرار گرفتند که تغییرات مرفولوژیکی مشخصی نسبت به سلول های کنترل در آنها مشاهده شد (شکل شماره ۱ و ۲). این تغییرات وابسته به زمانهای مختلف و غلظت 4-HILe بود، به طوری که با افزایش زمان در غلظت های بالاتر، تغییر شکل سلولی واضح تر بود. مهار رشد سلولی به طور دسته جمعی یا منفرد به صورت سلول های ستاره ای شکل و تحلیل رفته مشخص گردید.

نسبت به زمان افزایش معنی‌داری داشت. میزان مرگ سلولی برای غلظت ۶۴ میلی‌مولار در سلول‌های Huh-7 و HepG2 برای ۴۸ ساعت به ترتیب ۵۲ و ۴۹٪ بود (نمودار شماره ۱ و ۲). روند افزایش مرگ سلولی با افزایش زمان انکوباسیون تا ۷۲ ساعت ادامه یافت که بیشترین مرگ سلولی در این مدت دیده شد، به گونه‌ای که مقدار مرگ سلولی نسبت به کنترل رشد به‌طور معنی‌داری بیشتر بود ($p < 0.05$). میزان کشندگی برای غلظت ۶۴ میلی‌مولار در مدت ۷۲ ساعت انکوباسیون در سلول‌های Huh-7 و HepG2 به ترتیب ۶۱ و ۶۵٪ گزارش شد.

نتایج مجاورت سلول‌های Huh-7 با 4-HILe به‌روش MTT در نمودار شماره ۱ و سلول‌های HepG2 در نمودار شماره ۲ ارائه شده است. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون با 4-HILe، در غلظت‌های پایین‌تر از ۸ میلی‌مولار در هر دو سلول، سمیت سلولی قابل توجهی دیده نشد، اما با افزایش غلظت 4-HILe درصد مرگ سلولی افزایش یافت، به‌طوری‌که بیشترین میزان مرگ سلولی در غلظت ۶۴ میلی‌مولار مشاهده گردید. میزان کشندگی برای این غلظت در سلول‌های Huh-7 و HepG2 به ترتیب ۳۶/۵ و ۳۲/۷٪ بود (نمودار شماره ۱ برای سلول‌های Huh-7 و نمودار شماره ۲ برای سلول‌های HepG2)، اما پس از ۴۸ ساعت، مرگ سلولی



نمودار شماره ۱: درصد مرگ سلولی سلول Huh-7 در مجاورت غلظت‌های مختلف ۴-هیدروکسی ایزولوسین در ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به روش MTT



نمودار شماره ۲: درصد مرگ سلولی سلول HepG2 در مجاورت غلظت‌های مختلف ۴-هیدروکسی ایزولوسین در ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به روش MTT

بحث

امروزه، به دلیل عوارض ناشی از داروهای شیمیایی بر سلامت انسان، گرایش به طب سنتی و استفاده از داروهای گیاهی افزایش یافته است. با توجه به مطالعات انجام شده و با شواهد متقاعدکننده، مواد مؤثره گیاهان دارویی می‌توانند به عنوان منبع تولید دارو به کار روند. با این وجود، همواره این خطر وجود دارد که مواد مؤثره گیاهان در مقادیر درمانی دارای عوارض جانبی از جمله سمیت باشند. از این رو یکی از مهم‌ترین فازهای معرفی یک داروی جدید، آزمایشهای توکسیکولوژیک برای اطمینان از سالم بودن مصرف آن است (۱۳). مطالعات متعددی بر روی اثرات آنتی‌دیابتیک و هیپولیپدیک 4-HILe صورت گرفته است (۱۴،۷،۶،۲) اما تاکنون اثرات سایتوتوکسیک آن گزارش نشده است. Broca و همکاران با مطالعه بر موش صحرایی (سال ۲۰۰۴) نشان دادند 4-HILe توانایی تحریک PI3K در عضله و کبد موش صحرایی نرمال و دیابتی نوع ۲ را دارا می‌باشد که این اثر در عضله بیشتر از کبد بوده است (۱۰). مطالعه حاضر برای اولین بار بر این اساس انجام گرفت که اگر ترکیب 4-HILe اثرات خود را با فعال کردن آنزیم PI3K برجای می‌گذارد (۱۰) و با توجه به اینکه همزمان با تحریک PI3K احتمال فعال شدن مسیرهای تکثیر سلولی نیز وجود دارد (۱۶،۱۵)، آیا در صورت مصرف باعث افزایش تکثیر سلول‌های سرطانی نمی‌شود. این نگرانی مهم‌ترین سؤالی است که قبل از معرفی دارو باید به آن پاسخ داده شود. نتایج مطالعه حاضر (نمودارهای شماره ۱ و ۲) نشان داد در غلظت‌های پایین و در زمانهای ۲۴ و ۴۸ ساعت، درصد مرگ سلولی حدود ۳۰ و ۵۰٪ است و در کمترین غلظت (دوز ۰/۵ میلی‌مولار) در سلول‌های Huh-7 و HepG2 به ترتیب ۶ و ۱٪ می‌باشد. در این مطالعه، بیشترین اثر سمیت سلولی 4-HILe در هر دو رده سلولی در غلظت ۶۴ میلی‌مولار و پس از گذشت ۷۲ ساعت، حدود ۶۰٪ بود که این مقدار از مرگ سلولی در حد متوسط ارزیابی شد. نتایج این مطالعه مشابه پژوهشی است که در مورد سلنیوم انجام گرفته است. سلنیوم با تأثیر بر PI3K همانند 4-HILe دارای اثرات

ضددیابتی است (۱۷)، با وجود این، اثرات سایتوتوکسیک سلنیوم بر سلول سرطانی کلون و پروستات نیز مشاهده شده است (۱۹،۱۸)، که نشان‌دهنده تشابه با پژوهش حاضر می‌باشد. به علاوه، اثر سایتوتوکسیک 4-HILe در هر دو رده سلولی مشابه بوده و تفاوت دیده شده بین دو سلول در غلظت ۶۴ میلی‌مولار در ۷۲ ساعت (۶۱٪ در مقابل ۶۵٪) و تفاوت جزئی در درصد مرگ سلولی بین رده سلولی Huh-7 بیشتر از HepG2، از نظر آماری چشمگیر نبوده است. همین مطلب نشان‌دهنده نرمال بودن نتایج حاصله می‌باشد. هدف از این مطالعه معرفی 4-HILe به عنوان یک ترکیب ضدسرطان نبود؛ بلکه در پی پاسخ به این پرسش بود که آیا 4-HILe سرطان‌زا هست یا خیر؟

نتایج به خوبی نشان می‌دهد این ماده نه تنها سرطان‌زا نیست؛ بلکه دارای قدرت متوسطی در از بین بردن سلول‌های سرطانی می‌باشد. بنابراین، با توجه به مطالعات انجام شده در خصوص اثر ضددیابتیک این ترکیب، احتمال آنکه با اطمینان بیشتری بتوان آن را به عنوان داروی ضددیابت معرفی نمود بالا می‌باشد.

نتیجه گیری

نتایج این مطالعه نشان داد ۴-هیدروکسی ایزولوسین نه تنها دارای خاصیت رشد سرطانی نیست؛ بلکه دارای اثر کشندگی وابسته به غلظت و زمان بر دو رده سلولی هپاتوما می‌باشد. پژوهش انجام شده تنها مطالعه‌ای است که اثر سایتوتوکسیک 4-HILe را بررسی نموده است. بنابراین، اطلاعات چندانی در دسترس نمی‌باشد. لذا با توجه به احتمال کاربرد درمانی آن، انجام تحقیقات بیشتر اعم از تعیین LD50 و بررسی اثرات سایتوتوکسیک این ترکیب با استفاده از رده‌های سلولی سرطانی بتا پانکراس و سلول نرمال ضروری به نظر می‌رسد.

تشکر و قدردانی

این تحقیق در بخش تحقیقات آزمایشگاه بوعلی قم انجام شد بدین وسیله از همکاری آن مرکز تشکر می‌شود.

References:

1. Gruenwald J, Brendler T, Jaenicke C, Fleming T, Deutsch M, Hamid M. PDR for herbal medicines. Montvale, NJ, editor. New York: Medical Economics Company Inc; 1998.
2. Haeri MR, Limaki HK, White CJ, White KN. Non-insulin dependent anti-diabetic activity of (2S, 3R, 4S) 4-hydroxyisoleucine of fenugreek (*Trigonella foenum graecum*) in streptozotocin-induced type I diabetic rats. *Phytomedicine* 2012;19(7):571-4.
3. Gad MZ, El-Sawalhi MM, Ismail MF, El-Tanbouly ND. Biochemical study of the anti-diabetic action of the Egyptian plants Fenugreek and Balanites. *Mol Cell Biochem* 2006;281(1-2):173-83.
4. Fowden L, Pratt HM, Smith A. 4-Hydroxyisoleucine from seed of *Trigonella foenum-graecum*. *Phytochemistry* 1973;12(7):1707-11.
5. Alcock NW, Crout DH, Gregorio MV, Lee E, Pike G, Samuel CJ. Stereochemistry of the 4-hydroxyisoleucine from *Trigonella foenum-graecum*. *Phytochemistry* 1989;28(7):1835-41.
6. Sauvaire Y, Petit P, Broca C, Manteghetti M, Baissac Y, Fernandez-Alvarez J, et al. 4-Hydroxyisoleucine: A novel amino acid potentiator of insulin secretion. *Diabetes* 1998;47(2):206-10.
7. Narender T, Puri A, Shweta, Khaliq T, Saxena R, Bhatia G, et al. 4-Hydroxyisoleucine an unusual amino acid as antidyslipidemic and antihyperglycemic agent. *Bioorg Med Chem Lett* 2006;16(2):293-6.
8. Gupta A, Gupta R, Lal B. Effect of *Trigonella foenum-graecum* (fenugreek) seeds on glycaemic control and insulin resistance in type 2 diabetes mellitus: A double blind placebo controlled study. *J Assoc Physicians India* 2001;49:1057-61.
9. Jetté L, Harvey L, Eugeni K, Levens N. 4-hydroxyisoleucine: A plant-derived treatment for metabolic syndrome. *Curr Opin Investig Drugs* 2009;10(4):353-8.
10. Broca C, Breil V, Cruciani-Guglielmacci C, Manteghetti M, Rouault C, Derouet M, et al. Insulinotropic agent ID-1101 (4-hydroxyisoleucine) activates insulin signaling in rat. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004;287(3):E463-71.
11. Machana S, Weerapreeyakul N, Barusux S, Nonpunya A, Sripanidkulchai B, Thitimetharoch T. Cytotoxic and apoptotic effects of six herbal plants against the human hepatocarcinoma (HepG2) cell line. *Chin Med* 2011;6(1):39.
12. Carmichael J, DeGraff WG, Gazdar AF, Minna JD, Mitchell JB. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: Assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res* 1987;47(4):936-42.
13. Hanskell CM. *Cancer Treatment*. 4th ed. New York: W B Saunders Company; 1995. p. 31-57.
14. Broca C, Gross R, Petit P, Sauvaire Y, Manteghetti M, Tournier M, et al. 4-hydroxyisoleucine: Experimental evidence of its insulinotropic and antidiabetic properties. *Am J Physiol* 1999;277(4 Pt 1):E617-23.
15. Slivka D, Cuddy J, Hailes W, Harger S, Ruby B. Glycogen resynthesis and exercise performance with the addition of fenugreek extract (4-hydroxyisoleucine) to post-exercise carbohydrate feeding. *Amino Acids* 2008;35(2):439-44.
16. Cantrell DA. Phosphoinositide 3-kinase signalling pathways. *J Cell Sci* 2001;114(Pt 8):1439-45.
17. Heart E, Sung CK. Insulin-like and non-insulin-like selenium actions in 3T3-L1 adipocytes. *J Cell Biochem* 2003;88(4):719-31.
18. Zeng H, Combs GF Jr. Selenium as an anticancer nutrient: Roles in cell proliferation and tumour cell invasion. *J Nutr Biochem* 2008;19(1):1-7.
19. Stapleton SR. Selenium: An insulin-mimetic. *Cell Mol Life Sci* 2000;57(13-14):1874-9.