

بررسی اثر آنتی پرولیفراتیو و آپوپتوتیک رسوراترول در رده سلولی AGS آدنوکارسینوما معده

رامین عطایی*^۱، محمد شکرزاده^۲، روح‌الله عسگری^۳، رکسانا حسن‌زاده^۴، سعید عابدیان کناری^۵، دکتر حسین عسگریان عمران^۶

تاریخ دریافت ۱۳۹۵/۰۳/۰۳ تاریخ پذیرش ۱۳۹۵/۰۵/۱۵

چکیده

پیش‌زمینه و هدف: رسوراترول (۳، ۴، ۵ تری هیدروکسی- ترانس استیل بن، یک استیل بنوئید)، نوعی ترکیب فنول طبیعی است. این ترکیب در پوست انگور قرمز، همچنن در ریشه knotweed ژاپنی (*Polygonum cuspidatum*) گیاه هفت بند) نیز وجود دارد. رسوراترول همچنن در گیاه *Gnetum cleistostachyum* (از تیره گیاه ریش بز) نیز وجود دارد. در سال‌های اخیر مطالعاتی در خصوص خواص ضدالتهابی و ضد کانسری این ترکیب بخصوص در کانسره‌های گوارشی به‌ویژه کانسر کولون و مری وجود داشته اما در رابطه با آدنوکارسینوما معده مطالعات بسیار محدودی وجود داشته در این مطالعه به بررسی اثر رسوراترول در مدل سلولی (In vitro) آدنوکارسینوما معده پرداخته می‌شود.

مواد و روش کار: برای بررسی اثرات آنتی پرولیفراتیو رسوراترول در مدل سلولی از روش MTT Assay و برای بررسی آپوپتوزیس از روش فلوسایتومتری *Annexin-propidium Iodide* استفاده شد. برای بررسی سلولی از سلول‌های آدنوکارسینوما معده AGS استفاده شد که پس از انکوباسیون ۲۴ و ۴۸ ساعته با غلظت‌های مختلف رسوراترول در دمای ۳۷° و ۵٪ CO₂ میزان IC₅₀ تعیین و با کنترل مقایسه شد و همچنن برای کنترل مثبت از داروی *Cisplatin* استفاده شد.

یافته‌ها: رسوراترول در غلظت IC₅₀ باعث کاهش پرولیفراسیون و تحریک آپوپتوز و نکروز در سلول‌های AGS به‌طور معنی‌دار گردید ($P < 0.05$) که تأثیر آن پس از انکوباسیون ۴۸ ساعته بیشتر از ۲۴ ساعته بود.

بحث و نتیجه‌گیری: بر اساس نتایج به‌دست‌آمده مشخص شده که رسوراترول می‌تواند در مدل *In Vivo* در یک روند وابسته به دوز باعث کاهش *Cell viability* در سلول‌های آدنوکارسینوما معده گردد که این موضوع با مطالعات در کانسر پستان و کولون و مری همخوانی دارد و می‌توان رسوراترول را به‌عنوان یک عامل فیزیولوژیک و فارماکولوژیک در کنترل رشد سلول‌های معدی معرفی کرد.

کلیدواژه‌ها: سرطان معده، رسوراترول، پرولیفراسیون، MTT Assay، *Annexin propidium Iodide apoptosis assay*، فلوسایتومتری

مجله پزشکی ارومیه، دوره بیست و هفتم، شماره هشتم، ص ۶۷۱-۶۶۱، آبان ۱۳۹۵

آدرس مکاتبه: ساری، کیلومتر ۱۸ جاده خزرآباد، مجتمع علوم پزشکی پیامبر اعظم (ص)، دانشکده داروسازی، مرکز تحقیقات علوم دارویی، تلفن: ۰۹۱۱۳۲۲۲۸۰۴

Email: raminataee1349@gmail.com

مقدمه

۱-۱۴،۳ میلی‌گرم بر لیتر رسوراترول است (۱). رسوراترول همچنن در گیاه *Gnetum cleistostachyum* (از تیره گیاه ریش بز) نیز وجود دارد (۲). قارچ پاتوژن *Botrytis cinerea* می‌تواند رسوراترول را به ترکیباتی اکسید کند که خاصیت ضد قارچ داشته باشد (۳).

رسوراترول، (۳، ۴، ۵ تری هیدروکسی- ترانس استیل بن، یک استیل بنوئید)، نوعی ترکیب فنول طبیعی است. این ترکیب در پوست انگور قرمز، همچنن در ریشه knotweed ژاپنی (گیاه هفت بند) (*Polygonum cuspidatum*) نیز وجود دارد. انگور قرمز حاوی

^۱ استادیار فارماکولوژی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران (نویسنده مسئول)

^۲ دانشیار توکسیکولوژی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران

^۳ دانشجوی دکتری عمومی داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران

^۴ دانشجوی دکتری عمومی داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران

^۵ دانشیار ایمونولوژی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران

^۶ استادیار ایمونولوژی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران

و اثرات آنتی دیابتیک رزوراترول و پیشگیری از آلزایمر وجود دارد که گهگاه با اثرات آپوپتوتیک رسوراترول متناقض است (۲۴-۲۰).
با توجه نظرات مختلفی که در خصوص نقش آپوپتوتیک رسوراترول در کانسر و اثرات محافظتی و آنتی اکسیدانتی آن در بیماری‌های متابولیک و نورودژنراتیو وجود دارد و با توجه به اینکه مطالعات در خصوص اثرات سیتوتوکسیسیته این ماده در کانسر به‌ویژه کانسر معده مطالعاتی جدید است، این مطالعه باهدف بررسی نقش این ماده دارویی در مدل سلولی کانسر معده با بررسی پرولیفراسیون و آپوپتوزیس سلولی در رده سلولی AGS انجام پذیرفته است.

مواد و روش کار

این طرح یک مطالعه مداخله‌ای تجربی با حمایت معاونت تحقیقات و فن‌آوری دانشگاه علوم پزشکی مازندران با کد طرح و کد اخلاق ۷-۹۱ انجام پذیرفته است. رده سلول سرطانی AGS از انستیتو پاستور تهران به‌صورت سلول فریز تهیه شد و هر یک پس از انجام کنترل‌های لازم حفظ، نگهداری، تکثیر، ذخیره و برای تست‌ها استفاده شد.

سایر مواد استفاده شده از قرار زیر است:

Trans-Resveratrol(Sigma),RPMI 1640 (PAA Laboratories Gmb,Pasching,Austria),Ethanol %96 reinst (MERCK),Fresh(Fetal) Bovine Serum (FBS) (Sigma-Aldrich),FCS تهیه‌شده از شرکت Roach ساخت آلمان

آنتی‌بیوتیک مخصوص کشت سلولی (پنی‌سیلین / استرپتومایسین) PAA Laboratories Gmb (Pasching,Austria)، داروی سیس پلاتین از شرکت Sigma، رسوراترول تهیه‌شده از شرکت Sigma-Aldrich، L-Glutamine، تهیه شده از شرکت Gybco آلمان، آب دیونیزه و آب مقطر استریل (آزمایشگاه سم‌شناسی)، الکل طبی با درجه الکلی ۹۶ (ساخت اتحادیه، تهران، ایران)، نمک MTT (2-(4, 5-dimethyl-2-thiazolyl)-2, 5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide شرکت Sigma-aldrich (st.louis,missouri,usa)، فلاسک ۵۰ میلی‌لیتری کشت سلولی (Brand product ساخت دانمارک، کیت شناسایی سیتوتوکسیک Annexin V-FITC برای آزمایش آپوپتوزیس از شرکت Sigma، محلول فرمالدئید-ساخت مجتمع صنایع شیمیایی و دارویی کیان کاوه ایران).

کشت سلولی:

این ترکیب همچنین به روش سنتز شیمیایی و همچنین روش‌های بیوتکنولوژی نیز قابل‌تولید است (۴، ۵). این ترکیب به‌صورت مکمل غذایی به فروش می‌رسد.

در اولین مطالعات سال ۱۹۹۷، نشان داده شد که مصرف موضعی رسوراترول می‌تواند منجر به جلوگیری از پیشرفت سرطان پوست در موش‌های دریافت‌کننده کارسینوژن شود (۶). در مطالعات بعدی مشخص شد که رسوراترول می‌تواند منجر به کاهش تعداد و اندازه تومورهای مری در موش‌های دریافت‌کننده کارسینوژن شود (۷) همچنین دوزهای پایین رسوراترول، به‌صورت پروفیلاکسی، می‌تواند پیشرفت سرطان‌های کولون و روده در رت‌های دریافت‌کننده کارسینوژن‌های مختلف را مهار کند. همچنین، به روشی مشابه، دریافت پروفیلاکسی فرم موضعی رسوراترول، قبل از برخورد با UVB، منجر به جلوگیری از آسیب و کاهش میزان بروز سرطان‌های پوست در موش‌هایی که در آن‌ها سلول‌های ملانوما القا شده است، می‌شود (۸، ۷).

همچنین به نظر می‌رسد درمان با رسوراترول جلوی گسترش تومورهای پستانی را در موش‌ها می‌گیرد ولی روی میزان رشد سلول‌های توموری شده تأثیری ندارد؛ اما به‌صورت متناقض، در مطالعاتی، دوزهای بالای رسوراترول منجر به افزایش تولید سلول‌های سرطانی شده است. همچنین تزریق دوزهای بالای رسوراترول منجر به تشکیل نوروبلاستوما می‌شود (۹).

مطالعات روی تأثیر این ترکیب روی موش‌های دارای ریسک فاکتورهای سرطانی نشان داده است که این مکمل تأثیر قابل‌ملاحظه‌ای بر روی مرزهای تومور یا سرعت مرگ ناشی از سرطان نداشته است (۱۰-۱۲).

در مطالعاتی در خصوص نقش رسوراترول در سیستم گوارشی، مشخص شده که باعث پیشگیری از گاستریت ناشی از هلیکوباکتر پیلوری و مبارزه با استرس اکسیداتیو می‌گردد (۱۳) و در مطالعاتی باعث مهار رشد سلول‌های سرطانی معده از طریق تنظیم مسیرهای سیگنالینگ PI3K/Akt گردیده است و همچنین مطالعاتی در خصوص تأثیر پیشگیری رزوراترول در گسترش و متاستاز در کانسر معده وجود دارد (۱۴-۱۶). در مطالعاتی نقش این ماده در مهار بیان پروتئین survivin و تحریک آپوپتوزیس و یا مهار سیکل سلولی در فاز G1 و تحریک پیری سلولی از مسیر Sirt1 و یا تحریک آپوپتوز از طریق افزایش ROS^۱ در سلول‌های کانسری معده وجود دارد (۱۷-۱۹).

همچنین در مطالعاتی از اثرات محافظتی و آنتی اکسیدانتی رسوراترول در عروق و سیستم قلبی و تحریک آزادسازی NO عروقی

¹ Reactive oxygen species

سوکسینات تترازولیوم ردوکتاز شکافته می‌شود که متعلق به زنجیره تنفسی میتوکندریایی است و تنها در سلول‌های زنده فعال است. واکنش احیای سلولی با واسطه فاکتورهای NADH و NADPH انجام می‌شود و کریستال‌های فورامازان ساخته شده به کمک حلال DMSO به فرم محلول در آمده و محلول ارغوانی رنگ ایجاد شده به وسیله اسپکتروفتومتری در طول موج ۵۴۵ نانومتر به صورت کمی اندازه‌گیری می‌شود. این آزمایش برای سنجش کمی رشد و بقای سلولی با استفاده از اسپکتروفتومتری و بدون استفاده از ایزوتوپ‌های رادیواکتیو طراحی شده است.

روش انجام تست:

پس از شمارش سلولی و تهیه سوسپانسیون با غلظت مناسب، به هر چاهک پلیت ۹۶ خانه، ۹۰ میکرولیتر محیط کشت حاوی 10^4 عدد سلول از رده سلولی مورد نظر اضافه شد (برای هر غلظت از نمونه‌ها سه چاهک در نظر گرفته شد) پلیت‌های ۹۶ خانه حاوی سلول‌های کاشته شده برای مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور قرار گرفت تا سلول‌ها به مرحله رشد لگاریتمی خود رسیده و به کف پلیت بچسبند؛ طی زمان انکوباسیون، سلول‌ها مورد بررسی قرار گرفته و از چگونگی رشد سلول‌ها و عدم آلودگی آن‌ها، اطمینان حاصل شد.

رسوراترول در رقت‌های (200, 100, 50, 25, 12.5 μM) در حجم نهائی (چاهک / $100 \mu\text{L}$) به سلول‌ها اضافه شدند هر غلظت در هر میکروپلیت سه بار (TriPLICATE) تکرار شد. همچنین داروی سیس پلاتین با همان غلظت‌های داروهای تست به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد. سلول‌هایی که تنها با محیط کشت در تماس بودند به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شدند.

پس از افزودن غلظت‌های مورد نظر از داروهای مورد آزمایش به سلول‌های کاشته شده در هر چاهک، پلیت‌های ۹۶ خانه برای مدت ۴۸ ساعت دیگر در انکوباتور قرار داده شد تا سلول‌ها به مدت کافی در تماس با داروهای مورد آزمایش قرار گیرند؛ سپس پلیت‌های ۹۶ خانه از انکوباتور خارج شده و به هر چاهک $10 \mu\text{L}$ محلول MTT اضافه شد و پلیت‌های ۹۶ خانه با فویل پوشانده و به مدت ۴ ساعت در انکوباتور قرار گرفت؛ پس از طی شدن زمان لازم، محلول MTT درون چاهک‌ها با دقت کامل و به طوری که کریستال‌های متصل به کف جدا نشود؛ خارج شده و $50 \mu\text{L}$ از DMSO به هر چاهک افزوده شد. در این مرحله مدت ۱۵ دقیقه صبر شد تا کریستال‌های فورامازان ایجاد شده حل شود؛ پس از ۱۵ دقیقه، جذب کلونی‌های سلولی رنگ گرفته در هر چاهک با دستگاه ELISA reader در ۲ طول موج ۵۷۰ و ۶۹۰ نانومتر مورد بررسی قرار گرفت.

محاسبه IC_{50} :

رده سلول سرطانی AGS از انستیتو پاستور تهران به صورت سلول فریز تهیه شد و هر یک پس از انجام کنترل‌های لازم حفظ، نگهداری، تکثیر، ذخیره و برای تست‌ها استفاده شد. این رده سلولی در سایت ATCC به شماره CRL-1739 و کد NCBI^۱ به شماره C131 موجود بوده و از آدنوکارسینومای معده زن ۵۴ ساله جدا شده است. سلول‌ها در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد، ۵٪ CO_2 و محیط RPMI 1640 که حاوی درصد ۱۰ سرم گوساله جنینی (FBS) به همراه پنی‌سیلین، استرپتومایسین و جنتامایسین ۱ درصد کشت داده شد و به خوبی رشد کردند. سلول‌های مورد استفاده در پلیت‌های^۲ درب‌دار، فلاسک‌های ۲۵ و یا فلاسک‌های ۷۵ میلی‌لیتری، با توجه به حجم کار و نیاز به آن‌ها نگهداری می‌شدند. تعویض محیط کشت پلیت یا فلاسک‌ها با توجه به میزان سلول موجود و شرایط رشد تنظیم شد. به طور متوسط سه نوبت در هفته محیط سلول‌ها تعویض گشت.

تهیه رقت‌های مختلف از رسوراترول:

برای تهیه غلظت‌های مورد نیاز از دارو، ابتدا میزان مورد نیاز از ماده مورد نظر در شرایط دور از آلودگی به دقت توزین شد؛ و پس از انحلال در مقدار جزئی اتانول ۹۶ درجه (حداکثر ۰٫۵ میلی‌لیتر)، با افزودن محیط کشت کامل استریل در لوله فالکون ۱۵ اختلاط صورت گرفت (محلول استوک). سپس رقت‌های کمتر، با به حجم رساندن میزان مورد نیاز از محلول استوک با محیط کشت آماده در لوله‌های فالکون ۱۵ میلی‌لیتری تهیه شد.

روش بررسی پرولیفراسیون سلولی (MTT Assay):

محلول MTT با انحلال پودر زرد رنگ MTT در PBS تهیه شد. برای این کار میزان مناسب برای رسیدن به غلظت ۵ میلی‌گرم در هر میلی‌لیتر توزین و به حجم مناسب رسانده شد. به دلیل حساسیت این محلول به نور، حتی‌المقدور مراحل کار به دور از نور و به سرعت انجام شد. از هم‌زدن شدید در هنگام انحلال نیز خودداری گشت. سپس محلول آماده شده در لوله‌های کوچک ریخته و در ظرف مقاوم نسبت به عبور نور یا فویل پیچیده شده در یخچال نگهداری شد.

یکی از جنبه‌های کلیدی بیولوژی سلول تعیین میزان تکثیر و بقای سلولی (Viability) است. تست MTT بر پایه تبدیل سوبسترای زرد رنگ نمک تترازولیوم بروماید با فرمول مولکولی MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] به کریستال‌های ارغوانی فورامازان به وسیله سلول‌هایی که از نظر متابولیک فعال هستند در طی مدت تقریبی ۴ ساعت استوار است. MTT به وسیله آنزیم

³ Inhibitory Concentration 50

¹ National Cell Bank of Iran

² Cell Culture Plate

لوله‌ها در دمای اتاق و دور از نور محیط به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه شدند. سپس نمونه‌ها مستقیماً توسط دستگاه فلوسایتومتر مورد آنالیز قرار گرفتند؛ و میزان آپوپتوز و نکروز بر اساس مهاجرت سلولی و جذب رنگ پروپیدیوم آیوداید مورد بررسی قرار گرفته و گراف‌های مربوطه ثبت گردید.

محاسبه آماری:

محاسبات آماری برای مقایسه میانگین \pm انحراف معیار ناشی از ۵ غلظت مختلف (۵، ۱۲، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰) و سه بار تکرار در دو تست ۲۴ و ۴۸ ساعت گزارش شده و IC_{50} با استفاده از نرم افزار آماری SPSS Ver 20 و مقایسه داده‌ها با روش آنالیز واریانس یک طرفه one-way ANOVA test با پست تست Tukey انجام شد. حد معناداری $P < 0.05$ تعریف شد.

یافته‌ها

بر اساس نتایج مطالعات پرولیفراسیون رسوراترول باعث کاهش پرولیفراسیون سلولی هم در انکوباسیون ۲۴ ساعته و هم ۴۸ ساعته گردید که این تأثیر در انکوباسیون ۴۸ ساعته محرزتر است و اگر چه IC_{50} رسوراترول بسیار بیشتر از cisplatin (به‌عنوان کنترل مثبت بوده اما این تفاوت نسبت به نمونه کنترل منفی (سلول‌های بدون انکوباسیون دارویی) معنی‌دار بوده است (شکل ۲، و جدول ۱). همچنین در بررسی آپوپتوز و نکروز سلولی پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون، ۷۹،۰ درصد آپوپتوزیس و ۳۳،۳۶ درصد نکروز در سلول‌های کنترل منفی AGS مشاهده شد که در سلول‌های تحت تأثیر رسوراترول میزان آپوپتوزیس به ۶۷،۷۵ درصد و نکروز به ۱۰/۸۸ درصد افزایش یافت که نسبت به کنترل منفی این افزایش معنی‌دار بوده است (شکل ۳ و ۴).

IC_{50} میزان غلظت موردنیاز برای مهار ۵۰ درصدی رشد و تکثیر می‌باشد و به‌عنوان شاخص سمیت سلولی در نظر گرفته می‌شود. برای محاسبه IC_{50} ابتدا Cell Viability یا میزان بقای سلولی در غلظت‌های مختلف هر دارو طبق معادله زیر محاسبه شده و پس از رسم نمودار خطی بقای سلولی برای غلظت‌های مختلف دارو میزان غلظت دارو در Cell viability ۵۰ درصد از روی نمودار تعیین می‌گردد:

آزمایش آپوپتوزیس^۱ (مرگ سلولی):

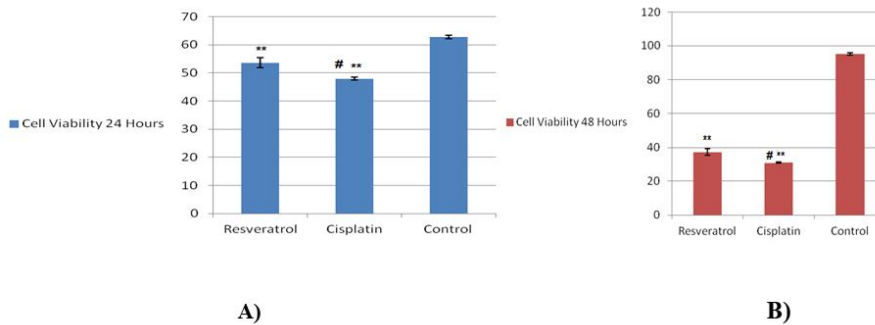
$$X 100 = \frac{\text{میزان جذب نمونه}}{\text{میزان جذب کنترل}} = \text{میزان بقای سلولی}$$

سلول‌ها در پلیت‌های ۶ خانه که در هر well با میزان 10^6 سلول کشت داده شده و به مدت ۲۴ ساعت در شرایط دمای ۳۷ درجه و ۵ درصد CO_2 انکوباسیون شدند. سپس توسط Trypsin-EDTA سلول‌ها از کف پلیت جدا؛ و ۲ بار با PBS شسته و پس از سانتریفوژ به میزان 10^6 cells/ml در لوله فالکان ۱۵ میلی‌لیتری جمع‌آوری شدند. سپس سلول‌های حاصل از سانتریفوژ توسط سمپلر در Binding buffer مجدداً معلق (resuspend) شدند. بعد از این مرحله سلول‌ها در فلاسک یخ خشک جهت ادامه آزمون به بخش فلوسایتومتری بخش ایمونولوژی بیمارستان امام خمینی ساری منتقل شدند. قبل از فلوسایتومتری به هر یک از لوله‌ها مقادیر ۱ μ l از واکنشگر Annexin-V و ۱ μ l Propidium Iodide اضافه شد.

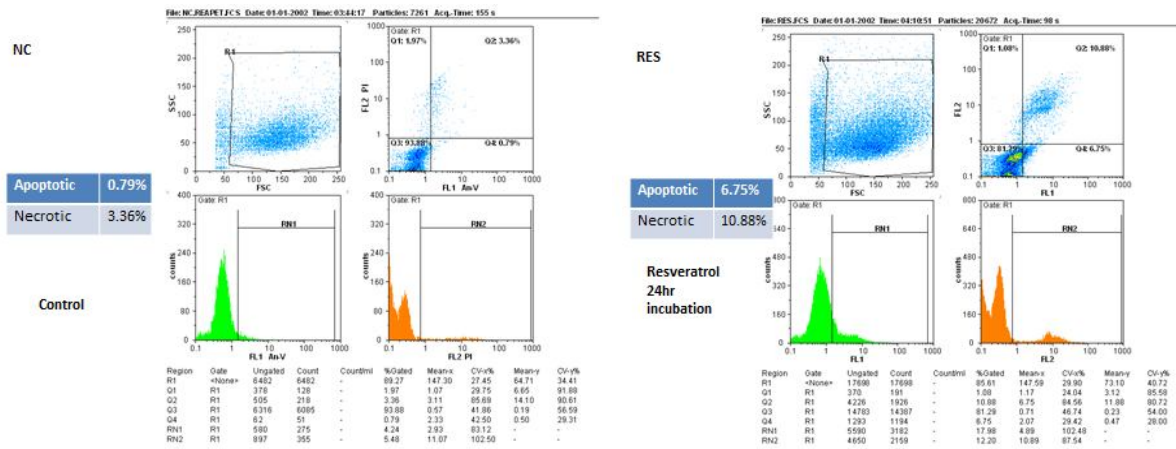
جدول (۱): میزان IC_{50} رسوراترول و سیس پلاتین پس از انکوباسیون ۲۴

و ۴۸ ساعته در محیط کشت سلولی AGS		
48hr	24hr	IC_{50}/Drugs
98/077	40/608	Resveratrol
19/12	9/5	Cisplatin

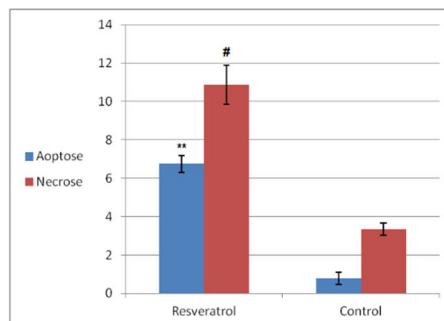
¹ Apoptosis



شکل (۲): بررسی پروليفراسيون رده سلولی AGS تحت تأثیر داروهای سيس پلاتين و رزوراترول در غلظت IC50 در انکوباسيون ۲۴ ساعته (A) و ۴۸ ساعته (B). **: Significant compared with control P<0.05. #: Significant compared with resveratrol P<0.05



شکل (۳): ۲۴ ساعته در غلظت IC50 رزوراترول (A) گراف آپوپتوزيس و نکروز برای نمونه کنترل (B) گراف آپوپتوزيس و نکروز برای نمونه NC: Normal Control RES: Resveratrol تحت تأثیر رزوراترول AGS



شکل (۴): مقایسه آپوپتوزيس و نکروزيس در رده سلولی AGS تحت تأثیر رسوراترول در غلظت IC50 با نمونه سلولی کنترل منفی (بدون انکوباسيون دارویی) به روش فلوسایتمتری با معرف Annexin-Propium Iodied پس از انکوباسيون 24 ساعته **: Significant apoptosis #: Significant necrosis compared with control P<0.05 compared with control P<0.05

بحث و نتیجه گیری

بر اساس نتایج به دست آمده از تحقیق اخیر مشخص شده که رسوراترول می‌تواند در یک روش شیوه وابسته به دوز باعث کاهش بقای سلولی (Cell viability) در سلول‌های آدنوکارسینوما معده (AGS) گردد؛ که این موضوع با مطالعات قبلی در دیگر کانسرها همخوانی دارد. IC_{50} رسوراترول بر روی سلول AGS بعد از ۴۸ ساعت بیشتر از IC_{50} بعد از ۲۴ ساعت بوده است؛ که به این معنی است که از اثر آنتی پرولیفراتیو رسوراترول با گذشت کاسته شده است که احتمالاً بدلیل تجمع سلولی و متابولیت‌های آن در محیط کشت است که از اثر رسوراترول کاسته است. اگرچه تفاوت قابل ملاحظه و معنی‌داری بین IC_{50} رسوراترول و سیس پلاتین به‌عنوان یک داروی استاندارد بر علیه آدنوکارسینوما معده وجود دارد اما اثرات معنی‌دار رسوراترول بر سلول‌های AGS نسبت به کنترل می‌تواند آن را به‌عنوان یک درمان ترکیبی (co-treatment) در درمان آدنوکارسینوما معده مطرح کند.

در بررسی آپوپتوز با رسوراترول توسط کیت آنکسین-وی بر سلول‌های AGS مشخص شد که پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون، آپوپتوزیس و نکروز در سلول‌های AGS به طور معنی‌دار افزایش یافته که این آثار سلولی مشابه مطالعات قبلی (در کانسر سینه، پروستات، ریه، لوله گوارش، پوست و ازوفازئال) بوده است.

در مطالعه‌ای انجام شده بر روی اثر رسوراترول بر روی سرطان سینه مشخص شد که اگرچه رزوراترول در شیوع تومور هیچ اثری ندارد اما حضور آن در رژیم غذایی به‌صورت برجسته‌ای در کاهش شیوع بیماری و فراوانی تومورهای القا شده توسط DMBA نقش دارد و به‌صورت هم‌زمان باعث طولانی شدن زمان عادت ماهیانه‌ی موش می‌شود. (۲۵).

رسوراترول در اپیتلیال سلول‌های پستان باعث کاهش پرولیفراسیون و افزایش آپوپتوز می‌شود (۲۶، ۲۵) در این مطالعه مشخص شد که مصرف هم‌زمان رسوراترول با فلاونوئید های سویا، نسبت به رسوراترول به تنهایی دارای اثربخشی بیشتری می‌باشد. (۲۵).

همچنین طی تحقیقاتی دیگری که در این زمینه صورت گرفته، مشخص شد که مصرف هم‌زمان پلی فنول‌های رسوراترول و کورسیتین^۱ و کاتچین^۲ و تجویز آن‌ها به‌صورت گاوآژ، باعث کاهش سرطان‌های اولیه پستان در موش می‌شود (۲۷، ۲۸).

در مطالعه‌ی دیگری که بر روی اثر رسوراترول در سرطان پروستات انجام شد، مشخص شد که با حضور رسوراترول در رژیم

غذایی، نشانه‌هایی از کاهش شیوع آدنوکارسینوما پروستات ظاهر می‌شود. (۲۸). رسوراترول در آب آشامیدنی با القای آپوپتوز، باعث مهار سرطان پروستات در موش صحرایی ترنس ژنیک می‌شود، علاوه بر این رسوراترول نه تنها باعث Down Regulation رسپتور های آندروژن می‌شود بلکه باعث مهار پاسخ آندروژن های غده‌ی کالیکرئین^۳ در سطح mRNA می‌شود (۲۸).

در تحقیقات دیگر که بر روی گونه‌ای از موش‌ها انجام شد، نشان داده شده که رسوراترول در رژیم غذایی بعد از تومور ریه، در فاز آغازین هیچ اثری روی فراوانی تومور ریه نداشته است (۲۶). همچنین در تحقیقاتی که kimura و okuda (۲۹). انجام دادند، نشانه‌هایی از اثر رسوراترول در کاهش حجم و وزن تومور و متاستاز در موش‌هایی که مبتلا به کارسینوما متاستاتیک ریه بودند، مشاهده شد. همچنین رسوراترول باعث مهار سنتز DNA، افزایش آپوپتوز و مهار رگ زایی تومور شده است (۲۱).

در مطالعه‌ای دیگر بر روی موش‌هایی که سرطان ریه در آن‌ها القا شده بود، صورت گرفت، مشاهده شد رسوراترول هیچ اثری بر روی رشد کارسینوما ی ریه لوئیس نداشت؛ اما باعث کاهش تعدد متاستاز سرطان ریه شده است (۳۰) با وجود این رسوراترول باعث کاهش رشد تومور در موش‌ها با کارسینوما ی ریه لوئیس شده بود (۲۱).

اولین مطالعه حیوانی در سال ۱۹۹۰ توسط Jang و همکاران درباره اثر محافظت شیمیایی رسوراترول روی مدل سرطان زایی پوست موش رسوراترول در مصرف موضعی کاهش معنی‌داری در پیشرفت تومورهای پوستی در موش نشان داد (۲۸).

در مطالعه دیگری که توسط Solaes و همکاران انجام شد مشخص گردید که رسوراترول اثر نسبی در مهار سرعت تشکیل تومور و کاهش تعداد تومورهای پوستی که توسط DMBA القا شده، دارد. در این مطالعه رسوراترول بوسیله القای آپوپتوز از توسعه تومورهای پوستی که توسط DMBA ایجاد شده‌اند، به‌صورت موثری جلوگیری کرد. (۳۱). همچنین تزریق داخل صفاقی رسوراترول سبب مهار وسیع سلول‌های ملانوما متاستاتیک B16-BL6 در موش شد (۳۲)

در مطالعاتی که بر روی اثر رسوراترول بر روی کانسر دستگاه گوارش انجام شد مشخص شد رسوراترول به‌صورت خوراکی باعث کاهش اثر کارسینوژنیک Azoxymethane در کولون رت می‌شود. این اثرات مربوط به مکانیسم‌های دخیل در تغییر بیان یکسری از ژن‌ها می‌باشد. (۳۳) همچنین در مطالعه‌ای دیگر با افزودن

³ Kallikrein

¹ Quercetin

² Catechin

کانسر پانکراس داشته باشد؛ اما در دیگر کانسره‌های گوارشی اثر رسوراترول کاملاً مشهود است.

احتمالاً مکانیسم رسوراترول را بر طبق مطالعات قبلی و مطالعه آپوپتوز یس اخیر می‌توان در تحریک آپوپتوز از مسیر کاهش بیان پروتئین‌های مهارى مانند Bcl2 و یا افزایش پروتئین‌های تحریکی مانند Bax و کاهش بیان پروتئین‌های التهایبى مانند سیکلواکسیژناز (COX) و یا مهار فاکتورهای دخیل در آنژیوژنز باید دانست (۱۶،۱۷).

اگرچه برخی از مکانیسم‌های احتمالی در خصوص اثرات آن‌تی کانسر رسوراترول مشخص شده است اما نیاز به مطالعات بیشتر در خصوص مسیرهای پیام‌رسانی داخل سلولی وجود دارد. ضمناً از آنجایی که یکی از منابع اصلی رسوراترول شراب قرمز می‌باشد که بدلیل مسائل شرعی و مضرات دیگر امکان مصرف آن عملاً در کشورهای اسلامی وجود ندارد. لازم است تحقیقات عملی جهت خلص سازی این ترکیب از شراب و یا آب انگور جهت تهیه فرآورده دارویی قابل مصرف صورت گیرد.

پیشنهادات

پیشنهاد می‌شود که رسوراترول در مدل حیوانی (nude mice) مورد بررسی قرار گرفته و رشد تومور در شرایط *in vivo* و فاکتورهای آنژیوژنز مورد بررسی قرار گیرد همچنین اثرات هم‌افزایی آن با داروهای ضد کانسر گوارشی بررسی شود.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل نتایج پایان‌نامه‌های داروسازی آقای روح‌الله عسگری و خانم رکسانا بوده که با حمایت‌های مالی معاونت تحقیقات و فن‌آوری دانشگاه علوم پزشکی مازندران انجام شده که از همکاری‌های صمیمانه آن معاونت کمال سپاس و امتنان را دارد.

References:

1. Yao CS, Lin M, Liu X, Wang YH "Stilbene derivatives from *Gnetum cleistostachyum*" 2005. *J Asian Nat Prod Res* 7 (2): 131-7.
2. Roy H, Lundy S. Resveratrol. *Pennington Nutrition Series* 2005;7:1-4.
3. Trantas E, Panopoulos N, Ververidis F. Metabolic engineering of the complete pathway leading to heterologous biosynthesis of various flavonoids

رسوراترول در آب آشامیدنی یک گونه از موش مشخص شد، رسوراترول می‌تواند باعث جلوگیری از تشکیل تومورهای کولون و روده کوچک از طریق Down-Regulation ژن‌هایی که مستقیماً در فرآیند چرخه سلولی یا پرولیفراسیون سلولی دخیل هستند، گردد. (۳۳).

در تحقیقاتی بر روی رسوراترول و آنالوگ سنتزی آن (DMU-212^۴)، در گونه‌ای از موش ترانسژنیک (Apc)، میزان Load بافت آدنوماتوز کاهش یافت که رسوراترول قدرت بیشتری نسبت به آنالوگ سنتزی نشان داد (۳۴). برعکس ترکیب سنتزی رسوراترول با رژیم غذایی اثری روی تومور زایی روده‌ای یا بیان COX-2 در همان گونه موش نشان نداد. (۳۵).

در ازوفازبال^۵ کانسر، مصرف خوراکی یا داخل صفاقی رسوراترول سبب کاهش تعداد و اندازه تومورهای القا شده با N-nitrosomethylbenzylamine در رت‌ها گردید (۷). همچنین رسوراترول سبب القای آپوپتوز در تومورهای القا شده با N-nitrosomethylbenzylamine توسط Down-Regulation بیان ژن Bcl-2 و Up-Regulation در بیان ژن Bax شده است (۷).

همچنین رسوراترول خوراکی اثر ضد سرطان زایی در برابر سرطان القا شده با N-nitrosobios(2-oxopropyl)amine در کارسینوژنز پانکراس همستر نشان نداد (۳۶).

مطالعه ما در مدل *in vitro* آدنوکارسینوما معده نشان داده که رسوراترول می‌تواند پرولیفراسیون سلولی را مهار و آپوپتوز را تشدید کند که این بررسی با مطالعات اثر ضد کانسر در کولون کانسر و ازوفازبال کانسر مطابقت داشته و از آنجائیکه مطالعات در رابطه اثر این دارو در آدنوکارسینوما معده جدید می‌باشد می‌توان این تحقیق را در راستای تأثیر مفید رسوراترول در کانسره‌های گوارشی دانست، اگرچه با توجه به مطالعات قبلی رسوراترول نتوانسته تأثیر مثبتی در

and stilbenoids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Metab Eng* 2009 11(6): 355-66.

4. Wang H, Liu L, Guo YX, Dong YS, Zhang DJ, Xiu ZL. Biotransformation of piceid in *Polygonum cuspidatum* to resveratrol by *Aspergillus oryzae*. *Appl Microbiol Biotechnol* 2007; 75 (4): 763-68.
5. Radák Z. Free radicals in exercise and aging. Champaign, IL: Human Kinetics; 2000. p. 39.

⁵ carcinogenesis

⁴ esophageal

6. Gliemann L, Schmidt JF, Olesen J, Biensø RS, Peronard SL, Grandjean SU, et al. Resveratrol Blunts the Positive Effects of Exercise Training on Cardiovascular Health in Aged Men. *J. Physiol (Lond.)* 2013; 591 (20): 5047-59.
7. Li ZG, Hong T, Shimada Y, Komoto I, Kawabe A, Ding Y, et al. Suppression of N-nitrosomethylbenzylamine (NMBA)-induced esophageal tumorigenesis in F344 rats by resveratrol. *Carcinogenesis* 2002;23 (9): 1531-6.
8. Yang I, Kim E, Kang J, Han H, Sul S, Park SB, et al. Photochemical generation of a new, highly fluorescent compound from non-fluorescent resveratrol. *Chem Commun (Camb)* 2012;48(32):3839-41.
9. Kopp P. Resveratrol, a phytoestrogen found in red wine. A possible explanation for the conundrum of the 'French paradox'. *Eur J Endocrinol* 1998; 138 (6): 619-20.
10. Barger JL, Kayo T, Vann JM, Arias EB, Wang J, Hacker TA, et al. A low dose of dietary resveratrol partially mimics caloric restriction and retards aging parameters in mice. In Tomé, Daniel. *PLoS ONE* 2008;3 (6): e2264.
11. Pearson KJ, Baur JA, Lewis KN, Peshkin L, Price NL, Labinskyy N, Swindell WR, et al. Resveratrol delays age-related deterioration and mimics transcriptional aspects of dietary restriction without extending life span. *Cell Metab* 2008; 8 (2): 157-68.
12. Miller RA, Harrison DE, Astle CM, Baur JA, Boyd AR, de Cabo R, et al. Rapamycin, but not resveratrol or simvastatin, extends life span of genetically heterogeneous mice. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2011; 66 (2): 191-201.
13. Zhang X, Jiang A, Qi B, Ma Z, Xiong Y, Dou J, et al. Resveratrol Protects against Helicobacter pylori-Associated Gastritis by Combating Oxidative Stress. *Int J Mol Sci* 2015;16(11):27757-69.
14. Jing X, Cheng W, Wang S, Li P, He L. Resveratrol induces cell cycle arrest in human gastric cancer MGC803 cells via the PTEN-regulated PI3K/Akt signaling pathway. *Oncol Rep* 2016;35(1):472-8.
15. Zulueta A, Caretti A, Signorelli P, Ghidoni R. Resveratrol: A potential challenger against gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2015;21(37):10636-43.
16. Gao Q, Yuan Y, Gan H-Z, Peng Q. Resveratrol inhibits the hedgehog signaling pathway and epithelial-mesenchymal transition and suppresses gastric cancer invasion and metastasis. *Oncol Lett* 2015;9(5):2381-7.
17. Liu ML, Zhang SJ. Effects of resveratrol on the protein expression of survivin and cell apoptosis in human gastric cancer cells. *J BUON* 2014;19(3):713-7.
18. Yang Q, Wang B, Zang W, Wang X, Liu Z, Li W, et al. Resveratrol inhibits the growth of gastric cancer by inducing G1 phase arrest and senescence in a Sirt1-dependent manner. *PLoS ONE* 2013;8(11):e70627.
19. Wang Z, Li W, Meng X, Jia B. Resveratrol induces gastric cancer cell apoptosis via reactive oxygen species, but independent of sirtuin1. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2012;39(3):227-32.
20. Wang Z, Chen Y, Labinskyy N, Hsieh T, Ungvari Z, Wu JM. Regulation of proliferation and gene expression in cultured human aortic smooth muscle cells by resveratrol and standardized grape extracts. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;346(1):367-76.
21. Poussier B, Cordova AC, Becquemin J-P, Sumpio BE. Resveratrol inhibits vascular smooth muscle cell proliferation and induces apoptosis. *J Vasc Surg* 2005;42(6):1190-7.

22. Kurin E, Atanasov AG, Donath O, Heiss EH, Dirsch VM, Nagy M. Synergy study of the inhibitory potential of red wine polyphenols on vascular smooth muscle cell proliferation. *Planta Med* 2012;78(8): 772-8.
23. Duffy SJ, Vita JA. Effects of phenolics on vascular endothelial function. *Curr Opin Lipidol* 2003; 14 (1): 21-7.
24. Wallerath T, Deckert G, Ternes T, Anderson H, Li H, Witte K, et al. Resveratrol, a polyphenolic phytoalexin present in red wine, enhances expression and activity of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* 2002;106 (13): 1652-58.
25. Yoshino J, Conte C, Fontana L, Mittendorfer B, Imai S, Schechtman KB, et al. Resveratrol supplementation does not improve metabolic function in nonobese women with normal glucose tolerance. *Cell Metab* 2012;16 (5): 658-64.
26. Haider UG, Roos TU, Kontaridis MI, Neel BG, Sorescu D, Griendling KK, et al. Resveratrol inhibits angiotensin II- and epidermal growth factor-mediated Akt activation: role of Gab1 and Shp2. *Mol Pharmacol* 2005; 68 (1): 41-8.
27. Prokop J, Abrman P, Seligson AL, Sovak M. Resveratrol and its glycon piceid are stable polyphenols. *J Med Food* (2006); 9 (1): 11-5.
28. Baur JA, Sinclair DA. Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. *Nat Rev Drug Discov* 2006; 5 (6): 493-506.
29. Kimura Y, Okuda H. Resveratrol isolated from *Polygonum cuspidatum* root prevents tumor growth and metastasis to lung and tumor-induced neovascularization in Lewis lung carcinoma-bearing mice. *J Nutr* 2001;131(6): 1844-9.
30. Savio M, Ferraro D, Maccario C, Vaccarone R, Jensen LD, Corana F, et al. Resveratrol analogue 4,4'-dihydroxy-trans-stilbene potently inhibits cancer invasion and metastasis. *Sci Rep* 2016;6:19973.
31. Freshney RI. Culture of animal cells. 4th ed. USA: Willy- Liss; 2000. Chapters: 8- 10. P.12- 15.
32. Carletto B, Berton J, Ferreira TN, Dalmolin LF, Paludo KS, Mainardes RM, et al. Resveratrol-loaded nanocapsules inhibit murine melanoma tumor growth. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2016;144:65-72.
33. Corpet DE, Pierre F. Point: From animal models to prevention of colon cancer. Systematic review of chemoprevention in min mice and choice of the model system. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2003;12(5): 391-400.
34. Piotrowska H, Myszkowski K, Amarowicz R, Murias M, Kulcenty K, Wierchowski M, et al. Different susceptibility of colon cancer DLD-1 and LOVO cell lines to apoptosis induced by DMU-212, a synthetic resveratrol analogue. *Toxicol Vitro* 2013;27(8):2127-34.
35. Sale S, Tunstall RG, Ruparelia KC, Potter GA, Steward WP, Gescher AJ. Comparison of the effects of the chemopreventive agent resveratrol and its synthetic analog trans 3,4,5,4'-tetramethoxystilbene (DMU-212) on adenoma development in the Apc(Min+) mouse and cyclooxygenase-2 in human-derived colon cancer cells. *Int J Cancer* 2005;10;115(2): 194-201.
36. Kuroiwa Y, Nishikawa A, Kitamura Y, Kanki K, Ishii Y, Umemura T, et al. Protective effects of benzyl isothiocyanate and sulforaphane but not resveratrol against initiation of pancreatic carcinogenesis in hamsters. *Cancer Lett* 2006; 241(2): 275-80.

EVALUATION OF ANTI-PROLIFERATIVE AND APOPTOTIC EFFECT OF RESVERATROL ON AGS CELL LINE OF GASTRIC ADENOCARCINOMA

Ramin Ataee^{1*}, Mohammad Shokrzadeh², Rouhollah Asgari³, Roxana Hasanzadeh⁴,
Saeid Abediankenari⁵, Hossein Asgarian Emran⁶

Received: 24 May, 2016; Accepted: 6 Aug, 2016

Abstract

Background & Aims: Resveratrol (3,4,5 tri-hydroxy-trans-acetylben-1acetyl benoid) is a phenolic natural product which is found in red grapes also in Japanese knotweed root (*Polygonum cuspidatum*). Resveratrol is also found in *Gnetum cleistostachyum*. In recent years, many researches were about anti-inflammatory and anti carcinogenic effect of resveratrol especially in breast, colon and esophageal cancer, but a few researches were about its role in gastric adenocarcinoma. This research has been done about the role of resveratrol in an in vitro model.

Materials & Methods: For proliferation study, we used MTT assay procedure and for apoptosis, annexin-propidium iodide flowcytometry method has been done. Also we have used AGS cell line cultured in RPMI medium in 5% CO₂ 37°C in 96 wells culture plate, the cells incubated with resveratrol and cisplatin (as positive control) for 24 and 48 hr. in different concentrations, IC₅₀ has been determined and compared with control.

Results: Our results showed that resveratrol in IC₅₀ concentration (40.6 µM) has significant antiproliferative effect in AGS cells compared with control which was in parallel with cisplatin. Also at IC₅₀ concentration 6.75% apoptosis and 10.8% necrosis has been observed after 24 hr. incubation

Conclusion: According to our results resveratrol has significant antiproliferative and apoptotic effect as in vitro model of gastric adenocarcinoma and can be suggested for co-treatment in future chemotherapy of gastric malignancies

Keywords: Resveratrol, Gastric adenocarcinoma, Proliferation, MTT assay, Cisplatin, Apoptosis, Flowcytometry

Address: Pharmaceutical Sciences Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

Tel: +9811 33543083-4

Email: raminataee1349@gmail.com

SOURCE: URMIA MED J 2016; 27(8): 671 ISSN: 1027-3727

¹ Assistant Professor, Pharmaceutical Sciences Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran (Corresponding Author)

² Associate Professor, Pharmaceutical Sciences Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

³ Student of Pharmacy, Pharmaceutical Sciences Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁴ Student of Pharmacy, Pharmaceutical Sciences Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁵ Associate Professor, Immunology Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁶ Assistant Professor, Immunology Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran