فصلنامه

شناخت و کاربرد گیاهان دارویی

سال دوم، شماره ۲، پاییز ۸۸ صفحات ۱۵-۱

اثر القایی آپوپتوز و توقف در مرحله G1 چرخه سلولی فاز تلخی‌زدایی میوه زیتون رقم زرد (*Olea europaea* L.) بر رده سلولی سرطان روده (SW 480)

فرهادی مونا*[1]، یوسفیان سمیرا[1]، امین غلامرضا[2]، حیات پریسا[3]

[1] گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، ایران

[2] گروه فارماکوگنوزی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات درمانی تهران، تهران، ایران

[3] مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

محل انجام پژوهش:

تاریخ دریافت: **تاریخ پذیرش:**

چکیده

در برگ و میوه زیتون چندین پلی‌فنل یافت می‌شود که از نظر بیولوژیکی فعال می‌باشند، مهم‌ترین آنها ماده‌ای به نام اولئوروپین است که عامل اصلی خاصیت درمانی گیاه می‌باشد. از آنجا که سرطان کولون در کشور ایران سومین سرطان شایع است و اولئوروپین که در میوه زیتون موجود است به عنوان ترکیبی آنتی‌اکسیدان می‌باشد، لذا در تحقیق حاضر سعی بر آن شد تا از اولئوروپین حاصل از پساب رقم زیتون بومی ایران (رقم زرد رودبار و کرمانشاه) که اغلب به دلیل تلخی زیاد دور ریخته و خواص درمانی آن نادیده گرفته می‌شود، جهت کاربرد درمانی استفاده گردد. بدین منظور ابتدا پساب سود و نمک دوگونه فوق تهیه شد و غلظت اولئوروپین موجود در پسآب هر دو گونه توسط دستگاه HPLC مورد سنجش قرار گرفت. سلول‌های سرطانی روده کشت داده شد و بوسیله روش MTT و فلوسایتومتری میزان تاثیر الئوروپین بدست آمده بر توان حیاتی سلول‌ها بررسی گردید. نتایج تحقیق حاضر نشان داد که به ترتیب پساب سود زیتون رودبار دارای حداکثر میزان اولئوروپین (۰/۰۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) و پساب نمک زیتون کرمانشاه دارای حداقل میزان اولئوروپین (۰/۰۰۰۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) می‌باشد. نتایج حاصل از MTT نشان داد که پسآب سود کرمانشاه دارای حداکثر کاهش معنی‌دار ۷۰٪ در توان حیاتی سلول‌های سرطانی روده بوده و بیشترین اثر را در مرگ سلولی سلول‌های سرطانی تحت تیمار با پسآب مذکور داشته است. هم‌چنین پسآب نمک کرمانشاه دارای حداقل کاهش معنی‌دار ۲۹٪ در توان حیاتی سلول‌های سرطانی روده است. رنگ آمیزی Annexin نشان داد که تعداد سلول‌های اپوپتوتیک در گروه پساب سود و نمک کرمانشاه به ترتیب ۶۸/۷٪ و ۲۳/۴٪ بوده است. بطور کلی نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که میزان الئوروپین موجود در پساب موجب القاء اپوپتوز در این سلول‌ها می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: آپوپتوز، رده سلولی سرطان روده، رقم زرد، پسآب زیتون

مقدمه

جنس زیتون *Olea* از خانواده Oleaceae دارای ۳۵ الی ۴۰ گونه است. معروفترین گونه آن زیتون معمولی یا زیتون خوراکی با نام علمی *Olea europaea* L. است که در ایران و بیشتر نقاط دنیا کاشت می‌شود (۱). ترکیبات

* مسئول مکاتبات: monafarhadi@yahoo.com

آنتی‌اکسیدان باعث کاهش پراکسیداسیون چربی‌ها در بدن و به دنبال آن کاهش استرس اکسیداتیو می‌شوند (۲)، در نتیجه بدن را از صدمه رادیکال‌های آزاد حفظ می‌کند و بدین طریق باعث کاهش ابتلا به سرطان می‌شود. اولئوروپین از مهم‌ترین ترکیبات آنتی‌اکسیدان می‌باشد که میزان آن در گونه‌های مختلف زیتون متفاوت است (۳). ترکیب اولئوروپین دارای خواص بیولوژیک متعددی است. مطالعات متعددی برای تعیین مسمومیت اولئوروپین و دو محصول حاصل از سوخت و ساز اصلی آن (هیدروکسی تایروسول و اسید النولیک) صورت گرفته است و مشخص شد که این ترکیبات کاملا غیرسمی هستند و زمانی که اولئوروپین به موش‌ها تزریق شد، هیچ مرگ و میر یا تاثیرات نامطلوبی مشاهده نشد (۵-۳). در راستای تحقیقات زیتون نشان داده شد که 3-4-DHPEA (3,4-dihydroxyphenyl ethanol)در روغن زیتون بکر موجود است و همچنین روغن مذکور دارای چندین ترکیب فنلی و برخی ترکیبات تصفیه شده دیگر نظیر P-HPEA (P-hydroxyphenyl ethanol) می‌باشد که توانایی القای اپوپتوزی مرگ سلولی در رده سلول‌های توموری متفاوت را دارند (۱۰).

در مطالعات گوناگون نشان داده شده است که مصرف روغن زیتون موجب کاهش سرطان کولون (روده) می‌گردد (۶،۵). هم‌چنین مصرف زیتون موجب کاهش بیماری‌های قلبی می‌شود (۱۱). اولئوروپین احتمالا از طریق ایجاد توقف سلولی در فاز G2/M می‌تواند منجر به برگشت تومور و بازدارندگی تکثیر در سلول‌های سرطانی روده شود. هم‌چنین پلی‌فنل‌های روغن زیتون از جمله اولئوروپین موجب افزایش سطح آپوپتوزیس در سلول‌های سرطان روده می‌شود (۱۰). در سال‌های اخیر مطالعات زیادی روی اثرات درمانی روغن زیتون صورت پذیرفته است لیکن اولئوروپین معمولا به سبب تلخی زیاد در فرآیند تلخی زدایی خارج شده و مورد استفاده قرار نمی‌گیرد. لذا با توجه به گرایش جوامع امروزی به داروهای گیاهی در این تحقیق بر آن شدیم تا با استخراج ماده با ارزش الئوروپین از پساب میوه زیتون که هدف اصلی تحقیق حاضر بوده و از نظر ساخت و تولید با محدودیت روبروست راهکاری جدید برای بهره‌وری از مواد موثره گیاهی بیابیم به این منظور رقم زرد را از شهرستان رودبار و کرمانشاه (سر پل ذهاب) که بومی ایران بوده جمع‌آوری شد و مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

به منظور تلخی‌زدایی در تحقیق حاضر از محلول سود ۲ درصد و نمک ۸ درصداستفاده گردید و زمان ماندگاری ۱۵ ساعت در نظر گرفته شد. میوه زیتون رقم زرد شهرستان رودبار و شهرستان کرمانشاه جمع‌آوری و توسط جهاد کشاورزی شهرستان‌های مذکور شناسایی شد و بعد از تلخی‌زدایی پساب آن برای تزریق به دستگاه HPLC آماده شد (۲). برای عصاره‌گیری از برگ، برگ زیتون رودبار و کرمانشاه جمع آوری شد. ۱گرم برگ زیتون از نمونه مد نظر با آسیاب پودر شده و با ۳۰ میلی‌لیتر حلال اتانول به مدت ۳۰ دقیقه در دستگاه بن ماری حرارت داده شد. سپس محلول صاف شده را به حجم ۳۰ میلی لیتر رسانده تا نمونه برای تزریق به دستگاه HPLC آماده شود (۳). جهت HPLC دستگاه مورد استفاده در ۲۷۸ نانومتر تنظیم گردید. به عنوان فاز متحرک از اتانول-آب و اسید استیک (۸۰: ۱۸: ۲) با شدت جریان یک میلی‌لیتر در دقیقه استفاده شد. مقدار نمونه تزریق شده ۲۰ میکرولیتر بود. سلول‌های سرطان روده SW480 از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه شد و در شرایط مناسب کشت داده شدند و سلول‌ها پس از ۳ الی ۴ پاساژ برای آزمایشات بعدی مورد استفاده قرار گرفتند.

سنجش توان حیاتی سلول

محلول MTT (شرکت سیگما) به غلظت ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تهیه شد. جهت سنجش از پلیت ۹۶ خانه استفاده شد و در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، ۱۰ میکرولیتر MTT اضافه و ۲ ساعت انکوبه گردید. در نهایت در طول موج‌های ۵۷۰ و ۶۳۰ نانومتر توسط دستگاه Elisa reader بررسی و جذب نوری محاسبه شد. جهت سنجش آپوپتوز به وسیله Annexin ۲۰ میکرولیتر(لاندا) از معرف نشاندار Annexin-v را در یک میلی‌لیتر بافر انکوباسیون رقیق کرده و ۲۰ لاندا از محلول PI به آن اضافه گردید (۱۲)، سپس پلیت به مدت ۷۲ ساعت در انکوباتور قرار گرفت. ۱۰۰ میکرولیتر از محلول نشاندار Annexin-v اضافه شد و جهت تعیین درصد آپوپتوز

سلولی از دستگاه فلوسایتومتر استفاده گردید و آپوپتوزیس بررسی شد. پس از تیمار با پساب‌ها جهت مشاهده فاز چرخه سلولی از سنجش Sub G1 استفاده شد و به وسیله دستگاه فلوسایتومتر سلول‌ها بررسی شدند.

داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار ارائه شده و با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS، آزمون آماری ANOVA و Bonferronis تحلیل گردید.

نتایج

نتایج HPLC

پساب سود زیتون زرد رودبار دارای حداکثر میزان اولئوروپین (۰/۰۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) و پساب نمک زیتون زرد کرمانشاه دارای حداقل میزان اولئوروپین (۰/۰۰۰۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) بوده است. میزان ترکیب اولئوروپین در هر یک از پساب‌های زیتون کرمانشاه و رودبار رقم زرد در مقایسه با میزان الئوروپین برگ با استفاده از دستگاه HPLC در نمودار ۱ نشان داده شده است.

نتایج سنجش MTT

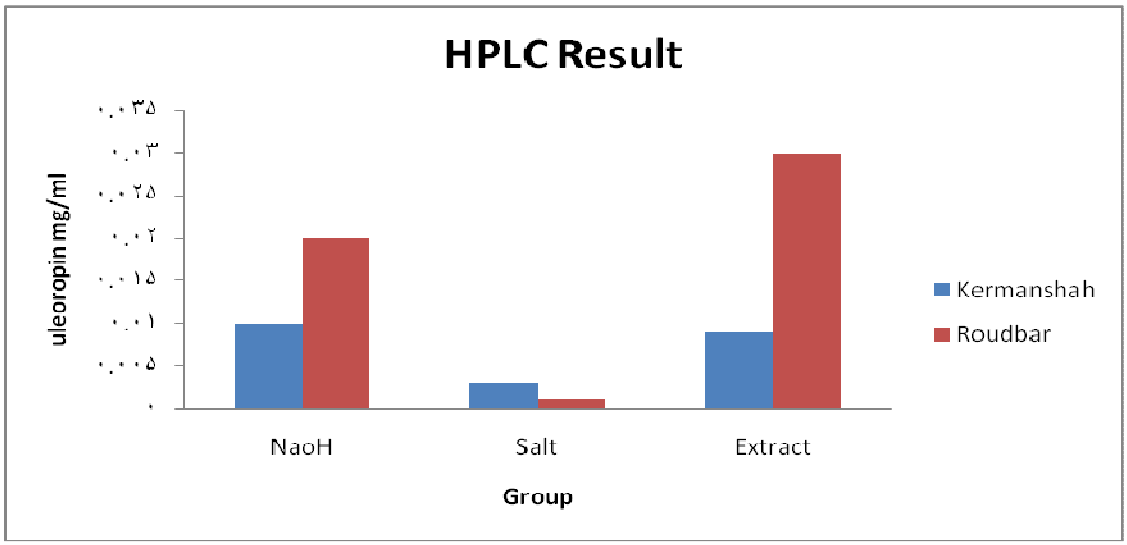
نتایج حاصل از این سنجش نشان داد که الئوروپین موجود در پساب در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت کاهش معنی‌داری در توان حیاتی‌ها ایجاد نکردند و این تفاوت فقط در ۷۲ ساعت معنی‌دار بود و در این زمان پساب سود زیتون کرمانشاه حداکثر کاهش معنی‌دار ۷۰٪ (P<0.001)در توان حیاتی سلول‌های سرطانی روده و هم‌چنین پساب نمک زیتون کرمانشاه حداقل کاهش معنی‌دار ۲۹٪ در توان حیاتی سلول های مذکور را نشان دادند. به این ترتیب جهت آزمایشات بعدی از این زمان برای در معرض‌گذاری پساب استفاده گردید (نمودار ۲).

نتایج سنجش Annexin & PI

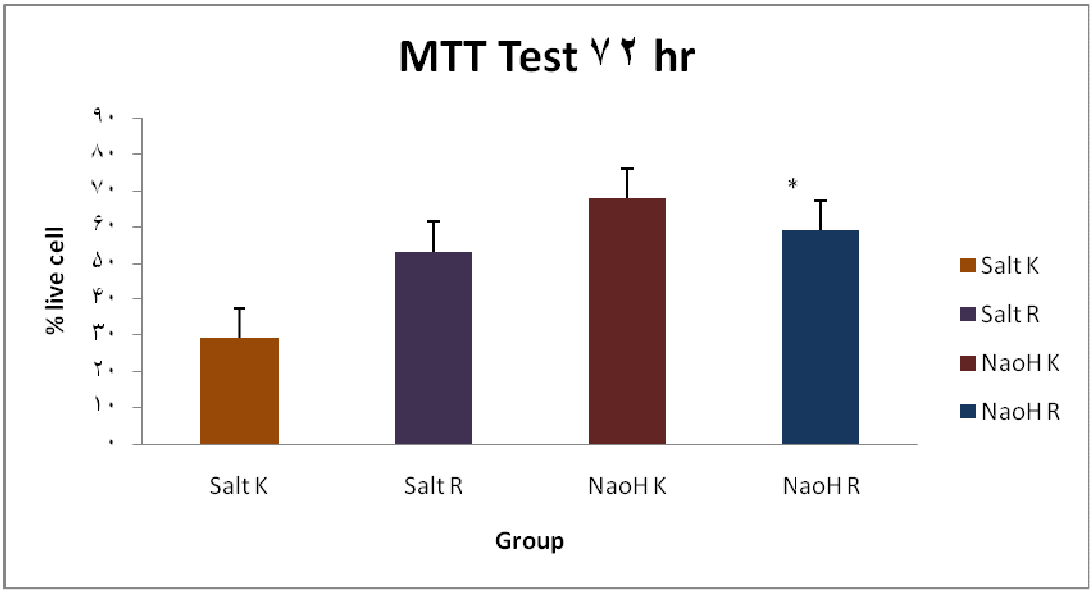
تعداد سلول‌های اپوپتوتیک در گروه پساب سود و نمک زیتون کرمانشاه به ترتیب ۶۸/۷٪، ۲۳/۴٪ بوده است. نتایج نشان داد که میزان الئوروپین موجود در پساب موجب مرگ اپوپتوزی سلول‌ها شده است (نمودار ۳).

نتایج سنجش Sub G1

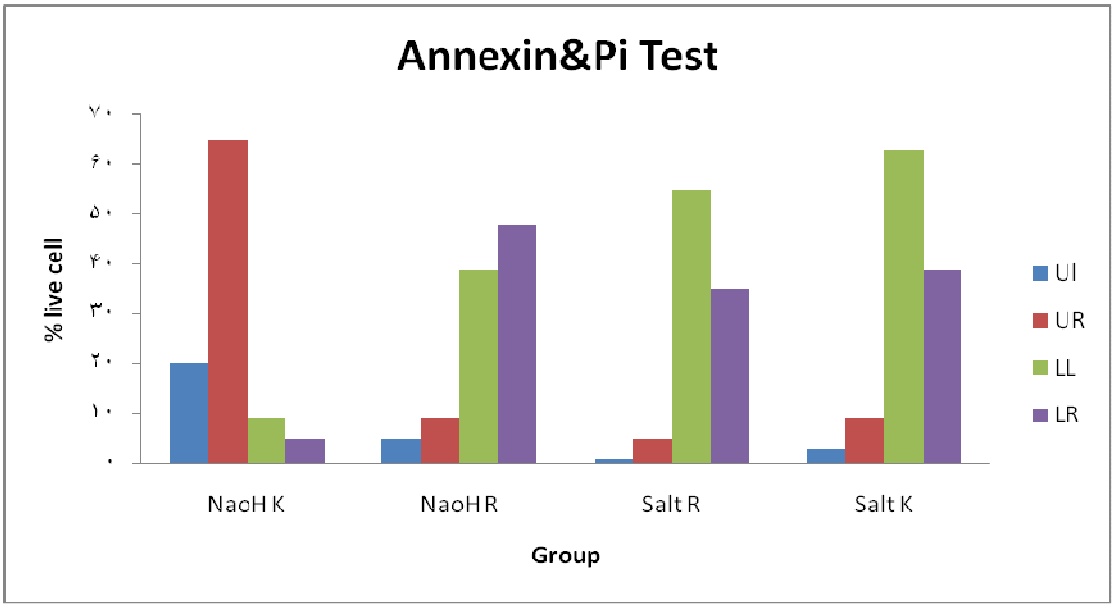
سلول‌های تیمار شده با پساب سود رقم زرد کرمانشاه دارای حداکثر تعداد در فاز آپوپتوزیس بودند و بیشترین میزان سلول در فاز G0 و G1 مربوط به پساب نمک کرمانشاه بوده است. بیشترین میزان سلول در فاز S مربوط به پساب نمک کرمانشاه بوده است (p< 0.001). بیشترین میزان سلول در فاز G2 وM مربوط به پساب نمک زیتون کرمانشاه بود (نمودار ۴).



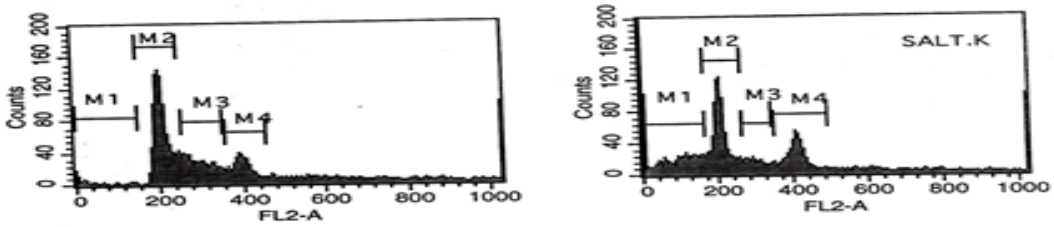
نمودار ۱. نمودار مقایسه میزان اولئوروپین در زیتون کرمانشاه ورودبار. پساب سود زیتون زرد رودبار دارای حداکثر میزان اولئوروپین (۰/۰۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) و پساب نمک زیتون زرد کرمانشاه دارای حداقل میزان اولئوروپین (۰/۰۰۰۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) است.



نمودار ۲. نمودار توان حیاتی سلول‌ها در سنجش MTT در زمان ۷۲ ساعت در این زمان پسآب سود زیتون کرمانشاه حداکثر کاهش معنی دار ۷۰٪ (P<0.001) در توان حیاتی سلول‌های سرطانی روده و همچنین پسآب نمک زیتون کرمانشاه حداقل کاهش معنی‌دار ۲۹٪ در توان حیاتی سلول های مذکور را نشان دادند.



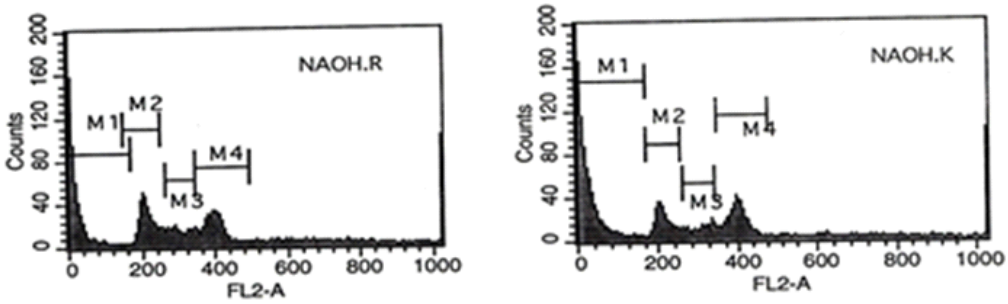
نمودار ۳. نتایج سنجش Annexin PI: UL (مرگ سلولی نکروز)، UR (آپوپتوز نهایی)، LL (تعداد سلول‌های زنده)، LR (آپوپتوز اولیه) را نشان می‌دهد.



Marker	% Gated
All	100.00
M1	1.02
M2	40.75
M3	19.87
M4	14.67

Marker	% Total
All	100.00
M1	23.45
M2	34.66
M3	10.23
M4	20.33

الف



Marker	% Total
All	100.00
M1	45.50
M2	15.37
M3	9.60
M4	15.88

Marker	% Total
All	100.00
M1	59.68
M2	10.54
M3	5.92
M4	14.60

ب

نمودار۴) نتایج سنجش SubG1 الف: نمایش درصد سلول ها در فازهای مختلف چرخه سلولی تیمار با نمک رقم رودبار و کرمانشاه – ب: نمایش درصد سلول ها در فازهای مختلف چرخه سلولی تیمار با سود رودبار و کرمانشاه
M1 (آپوپتوز)-) M2 (مرحله G0 و G1)-) M3 مرحله S) -) M4 مرحله G2 و M)

بحث

با توجه به این که تحقیق حاضر روی رقم زیتون بومی ایران که در کرمانشاه و رودبار کشت می‌شوند انجام گرفته و دارای ویژگی‌های منحصر به فردی است، لذا انتظار می‌رود میزان مواد فیتوشیمیایی و پلی‌فنل‌های آن نیز با توجه به رویشگاه‌های متفاوتشان با یکدیگر متفاوت باشند.

نتایج HPLC در تحقیق حاضرنشان داد که بیشترین میزان اولئوروپین در پساب سود زیتون رودبار (۰/۰۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) وکمترین میزان آن در پساب نمک زیتون کرمانشاه (۰/۰۰۰۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) بود. جایمند و همکاران (۱۳۸۴) در تحقیق در زمینه میزان ترکیب اولئوروپین در پساب حاصل از تلخی‌زدایی زیتون طارم از توابع زنجان نشان دادند که میزان اولئوروپین در پساب سود = ۰/۰۰۱۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و در مورد پساب نمک = ۰/۰۰۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر می‌باشد که با نتایج حاضر متفاوت بوده است. از آنجایی که نمونه‌های جایمند و همکارانش در مهر ماه جمع‌آوری و نمونه‌های پژوهش حاضر در آبان ماه جمع‌آوری شده‌اند، به نظر می‌رسد زمان جمع‌آوری و درجه ماندگاری میوه زیتون می‌تواند بر میزان اولئوروپین حاصل از پساب آن موثر باشد.

پژوهش Poolman و همکارانش (۱۹۹۸) روی سلول‌های سرطانی روده نشان داد که در تیمار با عصاره اولئوروپین ۱۵/۱٪ از سلول‌ها در فاز G2/M، ۸۲/۸٪ از سلول‌ها در فاز G0/G1، ۱/۹٪ از سلول‌ها در فاز S قرار دارند (۹-۷). در صورتی که در تحقیق حاضر بر طبق نتایج حاصل از تست Sub G1 نشان داده شد که تعداد سلول‌ها در فاز G2/M ۲۰/۳۳٪، در فاز G0/G1 ۳۴/۶۶٪ و در فاز S ۱۰/۳۳٪ بوده است. که با پژوهشات تحقیق حاضر تناقض دارد و احتمال می‌رود که این تفاوت به دلیل استفاده از اولئوروپین حاصل از پساب زیتون در تحقیق حاضر در مقایسه با عصاره اولئوروپین در پژوهش Poolman و همکارانش می‌باشد.

Omar در سال ۲۰۱۰ نشان داد که اولئوروپین ترکیبی ضد سرطان بوده و احتمالا از طریق انسداد سلولی در فاز G2/M باعث برگشت تومور و بازدارندگی تکثیر در سلول‌های سرطانی روده می‌شود (۶). به علاوه احتمال می‌رود که پلی‌فنل‌های روغن زیتون از جمله اولئوروپین در اثر ایجاد بر هم‌کنش با مسیرهای سیگنال دهنده که عامل رشد سرطان روده هستند سبب بازدارندگی حیاتی سلول‌های مذکور شوند. نتایج حاصل از سنجش توان حیاتی نشان داد که پسآب سود زیتون کرمانشاه دارای حداکثر کاهش معنی‌دار ۷۰٪ در توان حیاتی سلول‌های سرطانی روده و هم‌چنین پسآب نمک زیتون کرمانشاه دارای حداقل کاهش معنی‌دار ۲۹٪ در توان حیاتی سلول‌های مذکور می‌باشد ($p<0.001$)، که مطالعات Omar در سال ۲۰۱۰ را تایید می‌کند. اولئوروپین موجود در پساب موجب افزایش سطح آپوپتوزیس در سلول‌های سرطان روده می شود (۶). بررسی کلی از نتایج تست Annexin & PI نشان داد که پساب سود کرمانشاه در مقایسه با سایر پساب‌ها دارای حداکثر میزان اپوپتوز بوده و پساب نمک کرمانشاه حداقل میزان را داشته است.

نتیجه‌گیری کلی

با توجه به نتایج حاصل از تحقیق حاضر به نظر میرسد که میزان اولئوروپین موجود به خصوص در پساب سود کرمانشاه قدرت القاء اپوپتوز علیه سلول‌های سرطانی روده را دارد و موجب توقف در مرحله اینترفاز می‌گردد و لذا استفاده از آن توصیه می‌گردد.

منابع

۱. صادقی ح، ۱۳۸۱. کاشت، داشت و برداشت زیتون. نشر آموزش کشاورزی، ناشر وزارت جهاد کشاورزی. معاونت امور باغبانی.

2. Bourquelot, E., Vintilesco, J.C.R. 1908, Hebd Seances Acad Sci 147: 533-53.
3. Corona, G.g., Incani, A., Vauzour, D., Dessi, M.P.E., Spencer, J. 2007, Inhibition of p38/CREB phosphorylation and COX-2 expression by olive oil polyphenols underlies their anti-proliferative effects. Biochem Biophys Res Commun 362: 606-11.
4. Hamidi, K., Castellon, R. 2005, Oleuropein, a non-toxic olive iridoid, is an antiagent and cytoskeleton disruptor. Biochem Biophys Res Commun 334: 769-78.
5. Heart, L., Blagosklonny, M.V. 2005, Antiangiogenic therapy and tumor progression. Cancer cell 5: 13-7.
6. Omar, Sh. 2010, Cardioprotective and neuroprotective roles of oleuropein in olive. Saudi Pharm J 18: 111-21.
7. Poolman, R.A., Brooks, G. 1998, Expressions and activities of cell cycle regulatory molecules during the transition from myocyte hyperplasia to hypertrophy. J Mol Cell Cardiol 30: 2121-35.
8. Soler-Rivas, C., Espin, J.C., WichersHJ. 2000, Oleuropein and related compounds. J Sci Food Agric 80: 1013-23.
9. Mohebbi, M., Mahmoodi, M., Wolfe, R., Nourijelyani, K., Mohammad, K., Zeraati, H. 2008, Geographycal spread of gastrointestinal tract cancer incidence in the Caspian sea region of Iran spatial analysis of cancer registry data. BMC Cancer 8: 137. doi:10.1186/1471-2407-**8**-137
10. Fabiani, R., De Bartolomeo, A., Rosignoli, P., Servili, M., Selvaggini, R., Montedoro, G.F., Di Saverio, C., Morozzi, G. 2006, Virgin olive oil phenols inhibit proliferation of human promyelocytic leukemia cells (HL60) by inducing apoptosis and differentiation. J Nutr 136: 614-9.
11. Visioli, F., Galli, C. 1994, Oleuropein protects low density lipoprotein from oxidation. Sci Life 55, 1965-71.
12. Creutz, C.E. 1992,The annexins and exocytosis. Science 258: 924-31.