مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران
سال هشتم، شماره 4، زمستان 1392، صفحات 226-219

اثرات فلاونوئید هسپریدین بر بقای سلولی و آپوپتوز در رده‌ی سلولی NALM-6

رقیه شهبازی[1]، ماکان چراغ پور[1]، رضا همایونفر[2]، جواد نصرالله زاده[3]، سید حسین داودی[4]

1- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد علوم تغذیه، کمیته تحقیقات دانشجویان، انستیتو تحقیقات تغذیه‌ای و صنایع غذایی کشور، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
2- دانش‌آموخته دکترای علوم تغذیه، انستیتو تحقیقات تغذیه‌ای و صنایع غذایی کشور، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
3- استادیار گروه تغذیه بالینی و رژیم درمانی، انستیتو تحقیقات تغذیه‌ای و صنایع غذایی کشور، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
4- نویسنده مسئول: استادیار گروه تغذیه بالینی و رژیم درمانی، انستیتو تحقیقات تغذیه‌ای و صنایع غذایی کشور، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران، پست الکترونیکی: hdavoodi2002@yahoo.com

تاریخ دریافت: 92/10/12 تاریخ پذیرش: 92/11/6

چکیده

سابقه و هدف: هسپریدین به عنوان فراوان‌ترین فلاونوئید موجود در مرکبات، دارای اثرات ضد سرطانی در برخی از سلول‌های سرطانی از طریق تحریک آپوپتوز و مهار پرولیفراسیون می‌باشد. در این مطالعه اثرات هسپریدین در حضور و عدم حضور انسولین بر روی بقا و آپوپتوز سلول‌های Nalm-6، رده‌ای از سلول‌های لوسمی لنفوبلاستیک حاد که در برابر شیمی درمانی مقاوم هستند، بررسی شده است.

مواد و روش‌ها: سلول‌های Nalm-6 در محیط کشت RPMI 1640 غنی شده با 10% سرم جنین گاوی و 1% پنی سیلین-استرپتومایسین کشت داده شدند و سپس اثرات سیتوتوکسیک و آپوپتوتیک هسپریدین در دو غلظت 25 و 50 میکرو مولار در حضور و عدم حضور انسولسن (100 نانو مولار) و نیز اثرات سیتوتوکسیک و آپوپتوتیک Wortmannin (10 نانو مولار) به ترتیب به روش MTT و الایزا با استفاده از Cell Death Detection ELISA Kit بررسی شد.

یافته‌ها: هسپریدین به صورت وابسته به زمان باعث کاهش بقای سلول های Nalm-6 شد؛ به طوری که بعد از 48 ساعت، بقای سلول‌ها در غلظت های 25 و 50 میکرومولار هسپریدین بدون وجود انسولین به ترتیب 7/75±16/57% و 3/6±29/33% و در حضور انسولین به ترتیب 6/81±16/5% و 8/52±28/27% در مقایسه با گروه کنترل کاهش یافت (p<0/05). همچنین هسپریدین باعث افزایش آپوپتوز در غلظت های 25 و 50 میکرومولار به ترتیب به میزان 6 و 2/84 برابر در عدم حضور انسولین و به میزان 5/98 و 2/17 برابر در حضور انسولین نسبت به گروه کنترل شد (p<0/05).

نتیجه‌گیری: نتایج مطالعه حاضر تائید کننده اثرات ضد سرطانی هسپریدین از طریق تحریک آپوپتوز و مهار رشد سلول‌های Nalm-6 در حضور و عدم حضور انسولین می‌باشد. بنابراین می‌توان هسپریدین را به عنوان یک عامل Chemopreventive طبیعی در کنار سایر داروهای شیمی درمانی در درمان سرطان پیشنهاد کرد.

واژگان کلیدی: هسپریدین، سرطان، سلول های Nalm-6، آپوپتوز، بقای سلولی

• مقدمه

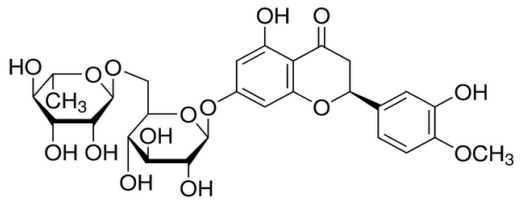
سرطان به عنوان دومین عامل اصلی مرگ و میر بعد از بیماری‌های قلبی عروقی، یک فرایند بلندمدت می‌باشد که در اثر ایجاد تغییرات غیرطبیعی در ژن‌های مختلف و عدم تعادل در مکانیسم‌های تنظیم کننده چرخه سلولی رخ می‌دهد (2، 1).

شیمی درمانی یکی از روش‌های معمول درمان سرطان می‌باشد اما به دلیل عدم سیتوتوکسیسیتی انتخابی، این نوع

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2025-07-08]

درمان با بروز عوارض جانبی متعددی همراه می‌باشد (3). از سوی دیگر بسیاری از سرطان‌ها به درمان‌های متداول سرطان مقاوم هستند (5، 4). بنابراین یافتن استراتژی‌های جدید درمانی با عوارض جانبی کمتر، از اهمیت بسزایی برخوردار است.

از این رو در سال های اخیر نقش ترکیبات طبیعی موجود در رژیم غذایی به ویژه فلاونوئیدها در مهار سرطان زایی و درمان سرطان مورد توجه بسیاری از محققان قرار گرفته است (2). فلاونوئیدها ترکیبات زیست فعالی هستند که حدود 60 درصد از ترکیبات پلی فنولی موجود در گیاهان را شامل شده (6) و به وفور در میوه ها، سبزی ها، دانه ها، مغزها و نوشیدنی‌هایی نظیر چای یافت می شوند (6، 2). این ترکیبات پلی فنولیک بر اساس ساختار مولکولی خود در گروه‌های مختلفی قرار می گیرند که مهم‌ترین آنها عبارتند از: فلاوانول ها، فلاونول ها، فلاوانون ها، فلاون ها، ایزوفلاون‌ها و آنتوسیانیدین‌ها(7، 6). تاکنون بیش از 4000 فلاونوئید شناسایی شده است (7). فلاونوئیدها علاوه بر اثرات آنتی‌اکسیدانی، ضد التهابی، ضد پر فشاری خون و ضد آلرژی دارای خاصیت ضد سرطانی از طریق تداخل در مراحل سه گانه کارسینوژنز می‌باشند (6، 2). از این میان هسپریدین (Hesperetin-7-O-Rutinoside) یک فلاوانون گلیکوزید و فراوان‌ترین فلاونوئید موجود در مرکبات می‌باشد که مصرف آن غیر سمی، غیر آلرژیک و فاقد عوارض جانبی می باشد (8). شکل 1 ساختار شیمیایی هسپریدین را نشان می‌دهد. طی سال های اخیر اثرات بیولوژیک و فارماکولوژیک هسپریدین مورد مطالعه قرار گرفته است. مطالعات بیانگر نقش مؤثر هسپریدین در بهبود عملکرد سیستم قلبی عروقی، کاهش سطوح لیپیدهای خون و کاهش سطوح مارکرهای التهابی می‌باشند. همچنین مطالعات مختلف نقش ضد باکتریایی، ضد قارچی و ضد ویروسی هسپریدین را تأیید کرده‌اند (8). علاوه براین، هسپریدین دارای خواص ضد سرطانی نیز می باشد. مطالعات مختلف سلولی و حیوانی به بررسی اثرات ضد سرطانی هسپریدین پرداخته‌اند. نتایج مطالعات انجام شده حاکی از نقش هسپریدین در مهار کارسینوژنز پوست و مثانه در مدل‌های حیوانی (10، 9) و نیز مهار رشد و تکثیر سلولی و همچنین القای آپوپتور در سلول‌های سرطانی کولون، پستان و پروستات می باشند (12، 11).



شکل 1. ساختار شیمیایی هسپریدین

از سوی دیگر مطالعات نشان داده‌اند انسولین می‌تواند باعث افزایش رشد و تکثیر سلولی در سلول‌های طبیعی و بدخیم شده و موجب رشد تومور گردد (13). همچنین تصور می‌شود هایپرانسولینمی می‌تواند بطور غیر مستقیم از طریق تأثیر بر روی فاکتورهای رشد شبه انسولین در پیشرفت کارسینوژنز نقش داشته باشد (14).

بنابراین با توجه به نقش هایپر انسولینمی در سرطان و با توجه با شیوع بالای دیابت و سرطان، شناسایی ترکیباتی که قادر به آنتاگونیزه کردن اثر هایپرانسولینمی در سرطان باشند و هم خود عاملی مؤثر در پیشگیری از پیشرفت سرطان باشند، حائز اهمیت است. از این رو در این مطالعه اثرات سیتوتوکسیک و آپوپتوتیک فلاونوئید هسپریدین در حضور غلظت بالای انسولین برای ایجاد حالت هایپر انسولینمی در شرایط in vitro و همچنین در فقدان انسولین بر روی رده سلول‌های سرطانی Nalm-6 که رده‌ای از سلول های لوسمی لنفوبلاستیک حاد بوده و مقاوم به ترکیبات شیمی درمانی می‌باشند (16، 15)، مورد بررسی قرار گرفته است. همچنین در این مطالعه اثرات سیتوتوکسیک و آپوپتوتیک هسپریدین در مقایسه با ترکیب Wortmannin به عنوان یک ترکیب ضد سرطان که مهار کننده مسیرهای انتقال پیام مؤثر در بروز و پیشرفت سرطان می باشد (17)، بررسی شده است.

• مواد و روش‌ها

سلول‌های Nalm-6 از بانک سلولی انستیتو پاستور تهران تهیه شدند. محیط کشت RPMI 1640 و سرم جنین گاوی (FBS) و آنتی بیوتیک پنی سیلین-استرپتومایسین از کمپانی Gibco (کشور آمریکا) خریداری شدند. هسپریدین (با خلوص>80، Cat.No: 590-26-3) و MTT [3-(4,5-methylthiazol-2-yl)- 2,5-diphenyltetrazolium bromide] از کمپانی Sigma (کشور آمریکا) خریداری شدند. Wortmannin از کمپانی Santa Cruz (کشور آمریکا) خریداری شد. از انسولین انسانی تولید شده توسط شرکت دارو سازی اکسیر فارما استفاده شد.

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2025-07-08]

کشت سلولی: این مطالعه بر روی سلول‌های Nalm-6 انجام شد. سلول‌ها بعد از تهیه، در محیط کشت مایع آماده RPMI1640 GlutaMax غنی شده با 10 درصد FBS و 1 درصد آنتی بیوتیک ترکیبی پنی سیلین-استرپتومایسین (100 U/mL پنی سیلین و 100 µg استرپتومایسین) کشت داده شدند. سپس سلول‌ها تا رسیدن به شرایط مطلوب، در در شرایط دمایی 37 °C، 5% CO2 و رطوبت 95% در داخل انکوباتور (Memert، آلمان) انکوبه شدند.

تعیین اثر هسپریدین بر روی بقای سلولی به روش MTT assay: اثرات هسپریدین بر روی بقای سلول‌های Nalm-6 توسط رنگ آمیزی با ماده MTT تعیین شد. برای انجام این تست، ابتدا سلول‌هادر محیط کشت RPMI 1640 کشت داده شدند. سپس 200 میکرولیتر محیط کشت حاوی10000 سلول به هر چاهک پلیت کشت سلولی 96 خانه اضافه شدند. پس از 24 ساعت انکوباسیون، سلول‌ها در گروه‌های مختلف تحت تیمار با هسپریدین (دو گروه با دو غلظت متفاوت هسپریدین)، انسولین (یک گروه)، هسپریدین همراه با انسولین (دو گروه با دو غلظت متفاوت هسپریدین و غلظت ثابت انسولین) و Wortmannin (یک گروه) قرار گرفتند. به این ترتیب که ابتدا انسولین (با غلظت 100 نانو مولار) و Wortmannin (با غلظت 10 نانومولار) به چاهک‌های مورد نظر اضافه شدند و به مدت 30 دقیقه در انکوباتور قرار داده شدند. در ادامه، هسپریدین با غلظت‌های 25 و 50 میکرومولار به گروه‌های مورد نظر اضافه شدند. به یک گروه DMSO افزوده شد و یک گروه نیز بدون تیمار به عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شد. تیمار سلول‌ها برای هر گروه به صورت Triplicate در دو زمان 24 و 48 ساعت انجام شد. بعد از طی زمان‌های مورد نظر 20 میکرولیتر محلول آماده MTT (5 میلی گرم MTT در 1 میلی لیتر PBS) به چاهک‌ها اضافه شد و پلیت‌ها به مدت 4 ساعت در دمای 37 °C، 5% CO2 و رطوبت 95% انکوبه شدند. پس از اتمام زمان انکوباسیون محیط رویی چاهک‌ها تخلیه شدند. سپس 200 میکرولیتر DMSO برای حل کردن رسوب‌های فورمازان به هر چاهک اضافه شد و پلیت‌ها به مدت 10 دقیقه به دور از نور انکوبه شدند. در نهایت جذب نوری در طول موج 570 نانومتر با استفاده از دستگاه ELISA Reader (Bio-Tek, VA, USA) خوانده شد.

روش الایزا جهت تعیین میزان آپوپتوز: میزان آپوپتوز در سلول های Nalm-6 به روش الایزا و با استفاده از کیت Cell Death Detection ELISA^{PLUS} (کمپانی Roche، کشور آلمان) طبق پروتوکل کمپانی تولید کننده کیت صورت گرفت. پس از کشت سلول‌ها و رسیدن به شرایط مطلوب، سلول‌ها در 7 گروه شامل گروه‌های تحت تیمار با هسپریدین (در دو غلظت 25 و 50 میکرو مولار)، انسولین (100 نانو مولار)، هسپریدین (در دو غلظت 25 و 50 میکرو مولار) به همراه انسولین (100 نانو مولار)، Wortmannin (10 نانو مولار) و یک گروه بدون تیمار به عنوان گروه کنترل قرار گرفتند. برای هر گروه 200 میکرو لیتر سوسپانسیون سلولی حاوی 10000 سلول به چاهک‌های پلیت 96 خانه ته گرد اضافه شد. بعد از تیمار سلول‌ها، پلیت به مدت 48 ساعت در انکوباتور قرار گرفت. پس از اتمام زمان انکوباسیون پلیت به مدت 10 دقیقه در دور 1200 rpm سانتریفیوژ شد. رسوب سلولی حاصل در هر یک از چاهک‌ها توسط 200 میکرولیتر بافر لیزکننده حل شد و به مدت 30 دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. در ادامه پلیت به مدت 10 دقیقه در دور 1200 rpm سانتریفیوژ شد. سپس از عصاره سلولی هر گروه (حاوی اجسام آپوپتوتیک) به صورت Triplicate به میزان 20 میکرو لیتر به چاهک های میکروپلیت پوشانده شده با استرپتاویدین اضافه شد و به هر ول 80 میکرو لیتر Immunoreagent حاوی آنتی بادی های Anti-histone-biotin و Anti-DNA-proxidase اضافه گردید. پلیت توسط فویل چسبنده پوشانده شد و به مدت 2 ساعت در دمای اتاق انکوبه شد. سپس به هر چاهک 100 میکرولیتر محلول Azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) به عنوان سوبسترای پراکسیداز اضافه شد که منجر به تولید رنگ سبز گردید. در نهایت جذب نوری که ارتباط مستقیم با مقدار نوکلئوزوم متصل با پراکسیداز و در نتیجه میزان آپوپتوز دارد، با استفاده از دستگاه ELISA Reader (Bio-Tek, VA, USA) در طول موج 405 نانومتر اندازه‌گیری شد.

آنالیز آماری داده‌ها: داده‌ها بر حسب مورد با استفاده از آزمون‌های T-test و One-Way ANOVA تجزیه و تحلیل شدند و $p<0/05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

• یافته‌ها

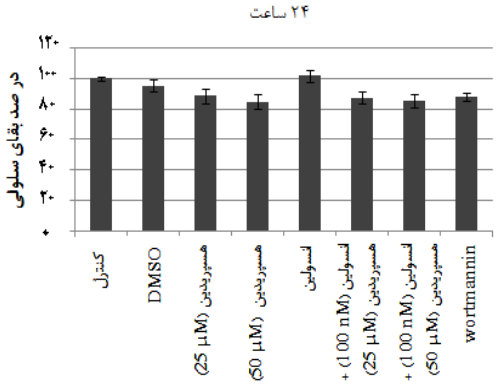
به منظور بررسی اثر هسپریدین در کاهش رشد و بقای سلول‌های Nalm-6 از روش رنگ‌سنجی با MTT استفاده شد. یافته نشان دادند هسپریدین در هر دو غلظت 25 و 50 میکرومولار باعث کاهش غیر معنی‌دار، به ترتیب 11/38±4/65% و 13/28±4/77%، در بقای سلول‌های

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2025-07-08]

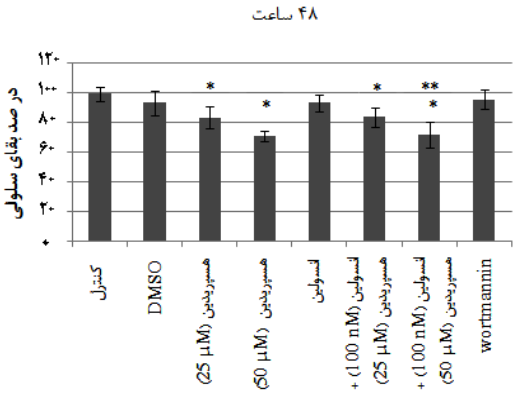
Nalm-6، 24 ساعت بعد از انکوباسیون می‌گردد (p>0/05) (نمودار1). همچنین هسپریدین در همین دو غلظت بعد از 48 ساعت انکوباسیون، توانست بقای سلول‌ها را بطور معنی‌داری به ترتیب به میزان 16/57±7/75% و 29/33±3/6% در مقایسه با گروه کنترل کاهش دهد (p<0/05) (نمودار 2).

از سوی دیگر قرارگیری سلول‌ها در شرایط هایپرانسولینمی باعث افزایش خفیف ولی غیر معنی دار در رشد و بقای سلول‌ها بعد از 24 ساعت در مقایسه با گروه کنترل گردید (82/3±2/8%). اما اثر انسولین در زمان 48 ساعت بعد از تیمار، پایدار نبود. همچنین هسپریدین در غلظت‌های 25 و 50 میکرو مولار در حضور انسولین در شرایط هایپرانسولینمی، بعد از 24 ساعت به ترتیب 12/54±3/98% و 14/45±4/18% و بعد از 48 ساعت به ترتیب 16/5±6/81% و 28/27±8/52%، بقای سلول‌های Nalm-6 را کاهش داد که این اثر مهاری بعد از 48 ساعت انکوباسیون در هر دو غلظت در مقایسه با گروه کنترل معنی دار بود (p<0/05). (نمودار 1 و 2).

علاوه بر این Wortmannin بصورت غیر معنی داری باعث کاهش رشد و تکثیر سلولی در زمان 24 ساعت به میزان 12/2±2/79% و در زمان 48 ساعت به میزان 4/71±6/59% درمقایسه با گروه کنترل گردید (نمودار 1 و 2).



نمودار 1. میزان بقای سلولی (درصد) رده Nalm-6 در مواجهه با ترکیبات مختلف طی زمان انکوباسیون 24 ساعت



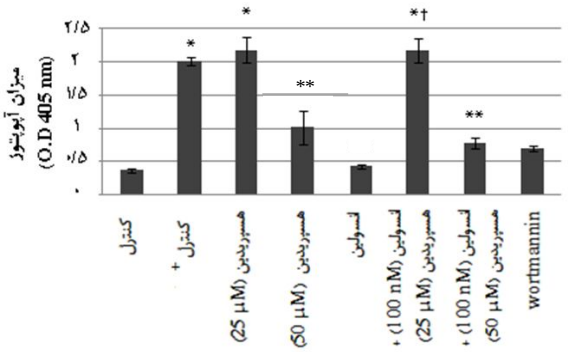
نمودار 2. میزان بقای سلولی (درصد) رده Nalm-6 در مواجهه با ترکیبات مختلف طی زمان انکوباسیون 48 ساعت.

* p<0/05 در مقایسه با گروه کنترل

** p<0/05در مقایسه با گروه انسولین

اثر هسپریدین برروی القای آپوپتوز در حضور و عدم حضور انسولین با روش الایزا و توسط کیت اختصاصی سنجش مرگ سلولی، 48 ساعت پس از تیمار سلول‌ها اندازه‌گیری شد. داده‌های به دست آمده نشان دادند هسپریدین در دو غلظت 25 و 50 میکرو مولار قادر به افزایش آپوپتوز به ترتیب به میزان 6 و 2/84 برابر در سلول‌های Nalm-6، نسبت به گروه کنترل می‌باشد (به ترتیب p<0/001 و p<0/05). اثر هسپریدین در افزایش آپوپتوز در شرایط هایپر انسولینمی نیز پایدار بود بطوری که هسپریدین در غلظت 25 میکرو مولار 5/98 برابر و در غلظت 50 میکرو مولار 2/17 برابر، آپوپتوز را نسبت به گروه کنترل افزایش داد (به ترتیب p<0/001 و p<0/05). در حالی که تیمار سلول‌ها با انسولین به تنهایی، به صورت خفیف و غیر معنی دار (1/16 برابر نسبت به کنترل) مرگ سلولی را افزایش داد. همچنین Wortmannin باعث تشدید آپوپتوز (1/9برابر) در این سلول‌ها گردید که نسبت به گروه کنترل معنی‌دار نبود (نمودار 3).

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2025-07-08]



نمودار 3. میزان نسبی آپوپتوز (OD) در رده Nalm-6 در اثر مواجهه با ترکیبات مختلف طی زمان انکوباسیون 48 ساعت

* p<0/0001 در مقایسه با گروه کنترل

** p< 0/05 در مقایسه با گروه کنترل

†*p<0/0001 در مقایسه با گروه انسولین

• بحث

در مطالعه حاضر، اثرات هسپریدین (در حضور و عدم حضور انسولین)، و نیز اثرات انسولین و Wortmannin بر روی بقای سلولی و آپوپتوز در رده سلولی Naml-6 مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه، مطابق انتظار، هسپریدین در هر دو غلظت 25 و 50 میکرومولار باعث مهار رشد سلولی و تشدید آپوپتوز در سلول‌های Naml-6 گردید. علت انتخاب این غلظت‌ها این بود که مطالعات پیشین نشان داده اند این مقادیر در محدوده IC50 هسپریدین در سلول‌های لنفوبلاستیک انسان می‌باشند (18). اگرچه برخی مطالعات نشان داده‌اند که هسپریدین اثری در مهار رشد و تکثیر سلول‌های سرطانی کولون (Caco-2) (19) و لوسمی (HL-60) (20) ندارد، اما اخیراً دو مطالعه، همسو با نتایج ما، نشان داده‌اند که هسپریدین با مهار فعالیت فاکتور رونویسی کاپا-B، باعث کاهش رشد و توان زیستی سلول‌های بدخیم لنفوبلاستیک شده و آپوپتوز را در این سلول‌ها القا می‌کند (21، 18). همچنین Park و همکاران در سال 2008 بیان کردند که هسپریدین باعث افزایش آپوپتوز و کاهش تکثیر سلول‌های سرطانی کولون، رده سلولی SNU-C4، می‌گردد (11).

از جمله اهداف این مطالعه، بررسی رشد و بقای سلول‌های Naml-6 در حضور انسولین در شرایطی شبیه حالت هیپرانسولینمی و همچنین اثر هسپریدین بر روی این سلول‌ها در همین شرایط بود. به همین منظور، سلول‌های Naml-6 تحت تیمار با غلظت 100 نانومولار انسولین جهت ایجاد غلظتی شبیه حالت هایپرانسولینمی در شرایط in vitro قرار گرفتند (22). مطالعات نشان داده‌اند انسولین در این غلظت سوپرا فیزیولوژیک دارای اثرات میتوژنیک، پرولیفراتیو و آنتی آپوپتوتیک قابل ملاحظه‌ای می‌باشد (25-23). در مطالعه ما اگرچه انسولین بعد از 24 ساعت، به صورت خفیف بقای سلول‌های Naml-6 را افزایش داد، اما بعد از 48ساعت اثری بر روی افزایش رشد و بقا و نیز کاهش آپوپتوز در رده سلولی Nalm-6 نداشت. اثر هسپریدین در همین شرایط بر روی کاهش بقا و افزایش آپوپتوز پایدار بود. این در حالی است که Neely و همکاران در سال 1992 مشاهده کردند انسولین باعث افزایش رشد و تکثیر سلول‌های لوسمیک می‌گردد (26). همچنین اثر انسولین بر روی افزایش رشد سلول‌های سرطانی پستان، رده سلولی MCF-7، مشاهده شده است (27). علاوه بر این، اثر انسولین بر روی مهار آپوپتوز در سلول‌های THP-1 (رده‌ای از سلول‌های لوسمی مونوسیتیک) نشان داده شده‌است (28). در مطالعه ما علت عدم اثر انسولین بر روی بقای سلولی و نیز میزان آپوپتوز در زمان 48 ساعت، می‌تواند به دلیل ناپایداری این ترکیب در محیط کشت در زمان‌های طولانی باشد. به طوری که مشخص شده است میزان انسولین افزوده شده به محیط کشت، بعد از حدود 24 ساعت به کمتر از 30 درصد مقدار اولیه می رسد (29). بنابراین برای بررسی اثر انسولین بر روی مرگ سلولی بهتر بود میزان آپوپتوز در زمان 24 ساعت بعد از انکوباسیون نیز بررسی می شد.

در مطالعه حاضر اگرچه Wortmannin باعث افزایش آپوپتوز و کاهش بقای سلول‌های Nalm-6 گردید اما این اثرات در مقایسه با گروه کنترل معنی‌دار نبود. Wortmannin یک متابولیت استروئیدی مشتق شده از قارچ Penicillium Funiculosum می‌باشد که به عنوان مهار کننده مستقیم و اختصاصی آنزیم phosphatidylinositide 3-kinases شناخته می‌شود (30). بیان و فعالیت بیش از حد این آنزیم در بسیاری از انواع سرطان‌ها دیده شده‌است (32، 31). همسو با مطالعه حاضر، Wang و همکاران در سال 2010 نشان دادند Wortmannin دارای اثرات آنتی پرولیفراتیو و پروآپوپتوتیک در سلول‌های لوسمیک، رده‌ی K562 می باشد (33). یافته‌های مطالعه اخیر نشان داد اثرات ضد سرطانی هسپریدین در هر دو غلظت 25 و50 میکرومولار بیشتر از داروی Wortmannin در غلظت 10 نانومولار (معادل با IC_{50} این دارو طبق پروتوکل کمپانی سازنده) در مقایسه با گروه کنترل می‌باشد.

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2025-07-08]

تـاکنون مطالعـه‌ای بـه بررسـی اثـرات ضـدتکثیـری و پـرو آپوپتوتیک هسپریدین در مقایسه با Wortmannin نپرداخته است. ولی برخی مطالعات نشان داده اند که هسپریدین باعث تشدید اثرات سیتوتوکسیک برخی از داروهای شیمی درمانی از قبیـل دوکسوروبیسـین مـی‌گـردد (18). اگرچـه در ابتـدا مطالعات پره کلینیکی این ترکیـب را بـه عنـوان یـک داروی اثربخش معرفی کردند ولی استفاده کلینیکی از ایـن دارو بـه علت سمیت بالا، پایداری و حلالیت کم با چالش روبـرو شـد (34). این در حالیست که این مطالعه شواهدی را در جهـت اثربخشی بیشتر هسپریدین به عنـوان یـک ترکیـب طبیعـی فاقد عوارض جانبی نسبت بـه Wortmannin در سـلول‌هـای بدخیم هماتولوژیک ارائه می‌دهد که نیاز به انجام مطالعـات دقیق‌تر را نمایان می‌سازد.

در مجمـوع، نتـایج ایـن پـژوهش نشـان مـی‌دهـد کـه هسپریدین در شرایط هایپر انسولینمی و در فقدان انسـولین باعث مهار رشد و القای آپوپتـوز در سـلول هـای پـیش‌سـاز لوسمی لنفوبلاستیک حاد می‌گردد. این داده‌ها ضمن تأییـد یافته‌های قبلی، شواهدی را ارائه می‌دهند کـه مـی‌تـوان بـر اســاس آن، هســپریدین را بــه عنــوان یــک عامــل Chemopreventive اثر بخش در کنار سایر داروهای شـیمی درمانی در درمان سرطان پیشـنهاد کـرد کـه البتـه نیـاز بـه بررسی‌های تکمیلی در سطوح سلولی و مـدل‌هـای حیـوانی جهت یافتن مکانیسم عمـل دقیـق ایـن فلاونوئیـد در ابعـاد مولکولی و نیز انجام مطالعات کارآزمایی بالینی جهت تأییـد اثر بخشی این ترکیب در درمان سرطان می‌باشـد. پیشـنهاد می‌گردد که در مطالعات آینده، اثرات هسـپریدین همـراه بـا سایر دزهای انسولین و در زمان های مختلف مـورد بررسـی قرار گیرد.

سپاسگزاری

این مقاله برگرفته از پایان نامه کارشناسی ارشد است. هزینه اجرای این طرح توسط انستیتو تحقیقات تغذیـه‌ای و صـنایع غذایی کشور تأمین شده‌است. لذا از مسئولان محترم انستیتو تحقیقات تغذیه‌ای و صنایع غذایی کشور قدردانی می‌گردد.

References

1. Hajian K, Firouzjahi AR, Kia MT. Pattern of age distribution of different cancers in Babol in 2001. Pajouhesh Dar Pezeshki. 2003; 27 (3): 239-45 [in Persian].
2. Shahbazi R, Davoodi H, Esmaeili S. The anticancer effects of flavonoids: involvment of PI3K/ Akt signaling pathway. Iran J Nutr Sci Food Technol. 2013; 7 +(4): 1-10 [in Persian].
3. Shokrzadeh M, Parvaresh A, Shahani S, Habibi E, Zalzar Z. Cytotoxic Effects of Lagenaria siceraria Standl. Extract on Cancer Cell Lin. J Mazandaran Univ Med Sci. 2013; 22 (97): 225-30 [in Persian].
4. Blum KA, Lozanski G, Byrd JC. Adult Burkitt leukemia and lymphoma. Blood. 2004; 104 (10): 3009-20.
5. Easton J, Houghton P. mTOR and cancer therapy. Oncogene. 2006; 25 (48): 6436-46.
6. Cancer chemoprevention and chemotherapy: dietary polyphenols and signalling pathways. Mol. Nutr. Food Res. 2008; 52: 507 – 526
7. Middleton E, Jr., Kandaswami C, Theoharides TC. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. Pharmacol Rev. 2000; 52 (4): 673-751.
8. Garg A, Garg S, Zaneveld LJ, Singla AK. Chemistry and pharmacology of the Citrus bioflavonoid hesperidin. Phytother Res. 2001; 15 (8): 655-69.
9. Berkarda B, Koyuncu H, Soybir G, Baykut F. Inhibitory effect of Hesperidin on tumour initiation and promotion in mouse skin. Res Exp Med. 1998; 198 (2): 93-9.
10. Yang M, Tanaka T, Hirose Y, Deguchi T, Mori H, Kawada Y. Chemopreventive effects of diosmin and hesperidin on N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine-induced urinary-bladder carcinogenesis in male ICR mice. Int J Cancer. 1997; 73 (5): 719-24.
11. Park H, Kim MJ, Ha E, Chung JH. Apoptotic effect of hesperidin through caspase3 activation in human colon cancer cells, SNU-C4. Phytomedicine. 2008; 15 (1-2): 147-51.
12. Lee CJ, Wilson L, Jordan MA, Nguyen V, Tang J, Smiyun G. Hesperidin suppressed proliferations of both human breast cancer and androgen-dependent prostate cancer cells. Phytother Res. 2010; 24 suppl 1: S15-9.
13. Straus DS. Effects of insulin on cellular growth and proliferation. Life Sci. 1981; 29 (21): 2131-9.
14. Giovannucci E, Harlan DM, Archer MC, Bergenstal RM, Gapstur SM, Habel LA, et al. Diabetes and cancer: a consensus report. CA Cancer J Clin. 2010; 60 (4): 207-21
15. Thiago LS, Costa ES, Lopes DV, Otazu IB, Nowill AE, Mendes FA, et al. The Wnt signaling pathway regulates Nalm-16 b-cell precursor acute

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2025-07-08]

lymphoblastic leukemic cell line survival and etoposide resistance. Biomed Pharmacother. 2010; 64 (1): 63-72.

16. Uckun FM, Qazi S, Ozer Z, Garner AL, Pitt J, Ma H, et al. Inducing apoptosis in chemotherapy-resistant B-lineage acute lymphoblastic leukaemia cells by targeting HSPA5, a master regulator of the anti-apoptotic unfolded protein response signalling network. Br J Haematol. 2011; 153 (6): 741-52.

17. Sarkaria JN, Tibbetts RS, Busby EC, Kennedy AP, Hill DE, Abraham RT. Inhibition of phosphoinositide 3-kinase related kinases by the radiosensitizing agent wortmannin. Cancer Res. 1998; 58 (19): 4375-82.

18. Nazari M, Ghorbani A, Hekmat-Doost A, Jeddi-Tehrani M, Zand H. Inactivation of nuclear factor-kappaB by citrus flavanone hesperidin contributes to apoptosis and chemo-sensitizing effect in Ramos cells. Eur J Pharm. 2011; 650 (2-3): 526-33.

19. Etcheverry SB, Ferrer EG, Naso L, Rivadeneira J, Salinas V, Williams PA. Antioxidant effects of the VO(IV) hesperidin complex and its role in cancer chemoprevention. J Biol Inorg Chem. 2008; 13 (3): 435-47.

20. Chen YC, Shen SC, Lin HY. Rutinoside at C7 attenuates the apoptosis-inducing activity of flavonoids. Biochem Pharmacol. 2003; 66 (7): 1139-50.

21. Ghorbani A, Nazari M, Jeddi-Tehrani M, Zand H. The citrus flavonoid hesperidin induces p53 and inhibits NF-κB activation in order to trigger apoptosis in NALM-6 cells: involvement of PPARγ-dependent mechanism. Eur J Nutr. 2012; 51 (1): 39-46.

22. Fang X, Palanivel R, Zhou X, Liu Y, Xu A, Wang A, et al. Hyperglycemia- and hyperinsulinemia-induced alteration of adiponectin receptor expression and adiponectin effects in L6 myoblasts. J Mol Endocrinol. 2005; 35, 465–476.

23. Arabkhari M, Bunda S, Wang Y, Wang A, Pshezhetsky AV, Hinek A. Desialylation of insulin receptors and IGF-1 receptors by neuraminidase-1 controls the net proliferative response of L6 myoblasts to insulin. Glycobiology. 2010; 20 (5): 603-16.

24. Tennagels N, Werner U. The metabolic and mitogenic properties of basal insulin analogues. Arch Physiol Biochem. 2013; 119 (1): 1-14.

25. Doron Weinstein, Meital Simon M, E Yehezkel1 E, Laron Z, Werner1 H. Insulin analogues display IGF-I-like mitogenic and anti-apoptotic activities in cultured cancer cells. Diabetes Metab Res Rev. 2009; 25: 41–49.

26. Neely EK, Rosenfeld RG, Illescas A, Smith SD. Mitogenic effects of human recombinant insulin on B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia cells. Leukemia. 1992; 6 (11): 1134-42.

27. Chen H, Zhang ZW, Guo Y, Wang Y, Liu Y, Luo N, et al. The proliferative role of insulin and the mechanism underlying this action in human breast cancer cell line MCF-7. J BUON. 2012;17 (4): 658-62.

28. Iida KT, Suzuki H, Sone H, Shimano H, Toyoshima H, Yatoh S, et al. Insulin inhibits apoptosis of macrophage cell line, THP-1 cells, via phosphatidylinositol-3-kinase-dependent pathway. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2002 Mar 1;22(3):380-6.

29. Teng M H, C. Bartholomew J, J. Bissell M. Insulin effect on the cell cycle: Analysis of the kinetics of growth parameters in confluent chick cells. Proc Natl Acad Sci USA. 1976; 73(9): 3173-3177.

30. Powis G, Bonjouklian R, Berggren MM, Gallegos A, Abraham R, Ashendel C, et al. Wortmannin, a potent and selective inhibitor of phosphatidylinositol-3-kinase. Cancer Res. 1994; 54 (9): 2419-23.

31. Fresno Vara JA, Casado E, de Castro J, Cejas P, Belda-Iniesta C, Gonzalez-Baron M. PI3K/Akt signalling pathway and cancer. Cancer Treat Rev. 2004; 30 (2): 193-204.

32. Osaki M, Oshimura Ma, Ito H. PI3K-Akt pathway: its functions and alterations in human cancer. Apoptosis. 2004; 9 (6): 667-76.

33. Wang X, Wu Q, Zhang L, Wu Y, Shu Y. Wortmannin induced apoptosis of leukemia cells by reducing PI3K/Akt. Chin -Ger J Clin Oncol. 2010; 9 (12): 734-8.

34. Karvea S, E. Wernera M, Sukumar R, D. Cummingsa N, A. Coppa J, C. Wanga E, et al. Revival of the abandoned therapeutic wortmannin by nanoparticle drug delivery. 2012; 109 (21): 8230-35.

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2025-07-08]

Effect of hesperidin on cell survival and apoptosis of Nalm-6 cell line

*Shahbazi R[1], Cheraghpour M[1], Homayounfar R[2], Nasrollahzadeh J[3], Davoodi H[*4]*

1- MSc in Nutition Science, Students' Research Committee, National Nutrition and Food Technology Research Institute, Faculty of Nutrition Sciences and Food Technology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

2- PhD in Nutition Science, National Nutrition and Food Technology Research Institute, Faculty of Nutrition Sciences and Food Technology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

3- Assistant prof, Dept. of Clinical Nutrition & Dietetic, National Nutrition & Food Technology Research Institute, Faculty of Nutrition Sciences and Technology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

*4- *Corresponding author:Assistant prof, Dept. of Clinical Nutrition & Dietetic, National Nutrition & Food Technology Research Institute, Faculty of Nutrition Sciences and Technology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran, E-mail:hdavoodi2002@yahoo.com*

Received 7 Feb, 2014 **Accepted 2 Jan, 2014**

Background and Objectives: Hesperidin is the most common flavonoid in citrus fruit and possesses anticancer proapoptotic and antiproliferative properties for some tumor cells. The present study assayed the effects of hesperidin in the presence and absence of insulin on the survival and apoptosis of Nalm-6 cells, an acute lymphoblastic leukemia cell line that is resistant to chemotherapy.

Material and Methods: Nalm-6 cells were cultured in RPMI 1640 supplemented with 10% FBS and 1% penicillin and streptomycin. The cytotoxic and apoptotic effects of two concentrations of hesperidin (25 and 50 µM) in the presence or absence of insulin (100 nM) and the cytotoxic and apoptotic effects of wortmannin (10 nM) were assayed using MTT assay and the cell death detection ELISA kit, respectively.

Results: Hesperidin decreased the survival rate of Nalm-6 cells in a time dependent manner. After 48 h, cell survival for the 25 and 50 µM concentrations of hesperidin decreased 16.57 ±7.75% and 29.33 ± 3.6%, respectively, in the absence of insulin, and 16.5 ± 6.81% and 28.27 ± 8.52%, respectively, in the presence of insulin in comparison with the control group ($p < 0.05$). Hesperidin also increased apoptotic death in Nalm-6 cells at 25 and 50 µM concentrations 6 and 2.84 fold in the absence of insulin and 5.98 and 2.17 fold in the presence of insulin in comparison to the control group ($p < 0.05$) .

Conclusions: These results indicate the anti-cancer effects of hesperidin by inducing apoptosis and inhibiting cell proliferation in Nalm-6 cells in the presence and absence of insulin. Hesperidin can be suggested as a natural chemo-preventative agent in conjunction with other chemotherapy agents in the treatment of cancer.

Keywords: Hesperidin, Cancer, Nalm-6 cells, Apoptosis, Cell survival

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2025-07-08]