



Anti-inflammatory effect of Shikonin on cultured astrocytes derived from rat brain

Shirin Hosseini¹, Farzaneh Sabouni², Masoud Fereidoni^{1*}, Ali Moghimi¹

1. Dept. Biology, Faculty of Sciences, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

2. National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, Iran

Received: 12 Feb 2012

Accepted: 16 June 2012

Abstract

Introduction: Astrocytes have an important role in many neurodegenerative diseases. Active astrocytes release inflammatory factors such as NO and ILs. Shikonin, a naphthoquinone pigment of *Lithospermum erythrorhizon* roots has anti-inflammatory and antitumoral effects. The present study aims to investigate the anti-inflammatory and toxic effects of Shikonin on cultured astrocytes.

Methods: Two-day-old rat infants' brains were homogenized after removal of the meninges, and cultured in DMEMF12+10% FBS medium. Ten days later, astrocytes were harvested and re-cultivated for more purifications to 95%, using immunocytochemistry method, and then treated by different concentrations of shikonin (0.1, 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 20, 30, 50 and 100 μ M) for one hour, which was followed by LPS exposure. Viability was measured by MTT assay and NO concentrations were assessed by Griess method, to reveal the inflammation process, after 24 and 48 hours.

Results: Shikonin concentrations of 1, 2.5, 5, 10, 20 and 30 μ M had no anti-inflammatory and cell death effects but at 0.1 and 0.5 μ M showed a significant anti-inflammatory effect and ability to reduce NO production by astrocytes ($p<0.001$) and at 100 and 50 μ M showed a significant cell death effect and NO production reduction ($p<0.001$).

Conclusion: Reduction of NO production might be due to inhibition of release and expression of inflammatory and cell signaling factors such as ILs and iNOS under the shikonin anti-inflammatory effects at concentration around 0.1 and 0.5 μ M. However, inhibition of NO production by shikonin at 50 and 100 μ M is probably due to cell death induction.

Key words: Astrocytes, Inflammation, Shikonin, Neurodegenerative disease, NO

* Corresponding author e-mail: Fereidoni@um.ac.ir
Available online at: www.phypha.ir/ppj

تأثیر ضد التهابی شیکونین بر کشت آستروسیتی مغز موش صحرایی

شیرین حسینی^۱، فرزانه صابونی^۲، مسعود فریدونی^{۱*}، علی مقیمی^۱
۱. گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد
۲. پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران

پذیرش: ۲۷ خرداد ۹۱

دریافت: ۲۳ بهمن ۹۰

چکیده

مقدمه: آستروسیت‌ها در گستره‌ای از بیماری‌های نورودژنراتیو نقش دارند. آستروسیت فعال عوامل التهابی همچون نیتریک اکساید (NO) و اینترلوکین‌ها (ILs) را آزاد می‌کند. شیکونین، رنگبزه نفتوکوئینونی ریشه گیاه سنگدانه (*Lithospermum erythrorhizon*) اثرات ضد التهابی و ضد سرطانی دارد. این مطالعه اثرات ضد التهابی و یا سمی شیکونین بر آستروسیت‌های کشت شده را می‌کاود.

روش‌ها: مغز نوزاد ۲ روزه موش صحرایی بعد از جداسازی مننژ، هموژنیزه و در محیط DMEMF12 + 10% FBS کشت شد. بعد از ۱۰ روز آستروسیت‌ها جدا سازی، کشت و با خلوص بیش از ۹۵٪ (به روش ایمونوسیتوشیمی) با غلظت‌های $100, 50, 30, 20, 10, 5, 2, 1, 0.5, 0.1$ μM شیکونین برای یک ساعت تیمار و سپس در معرض LPS قرار گرفتند. واکنش MTT برای بررسی حیات سلول‌ها و سنجش میزان NO (آزمون گریس، برای ارزیابی روند التهاب) پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت انجام شد.

یافته‌ها: غلظت‌های $30, 20, 10, 5, 2, 1, 0.5, 0.1$ μM شیکونین فاقد اثر ضد التهابی و مرگ سلولی بود، اما در غلظت‌های 0.5 و 0.1 μM منجر به کاهش تولید NO و القاء اثرات ضد التهابی شد ($p < 0.001$)، در غلظت‌های 100 و 50 μM منجر به کاهش تولید NO و مرگ سلولی شد ($p < 0.001$).

نتیجه گیری: شاید کاهش تولید NO توسط آستروسیت، ناشی از مهار رهایش و بیان عوامل التهابی و سیگنالینگ سلولی همچون ILs و iNOS تحت اثر ضد التهابی شیکونین در محدوده غلظتی 0.5 و 0.1 بوده باشد اما کاهش تولید NO در غلظت‌های 100 و 50 μM شیکونین احتمالاً به دلیل افزایش مرگ سلولی است که نتایج مؤید این نیز بود.

واژه‌های کلیدی: آستروسیت، التهاب، شیکونین، نورودژنراتیو، نیتریک اکساید

مقدمه

در تقریباً تمامی این فرمهای پاتولوژیکی مغز به شمار می‌رود [۱۸]. در CNS، فراوان‌ترین نوع سلول‌های گلیا، آستروسیت‌های ستاره‌ای شکل می‌باشند و به عنوان مجموعه‌ای به نام آستروگلیا شناخته می‌شوند [۲۷]. این سلول‌ها دارای فیلامنت‌های حد واسطی از پروتئین اسیدی رشته‌ای گلیال Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) هستند که باعث تقویت ساختمان آنها شده و مارکر شناسایی آستروسیت‌ها به شمار می‌روند. آستروسیت‌ها مانند آجرهای پیوسته‌ای در سرتاسر CNS قرار گرفته‌اند که رویهم افتادگی ندارند و از طریق اتصالات منفذ دار (Gap junction)، یک سن سیتیوم الکتریکی را ایجاد

امروزه بیماری‌های نورودژنراتیو یکی از مهم‌ترین دغدغه‌های بشر می‌باشند، این بیماری‌ها مانند آلزایمر، پارکینسون، MS، اسکروزیمز آمیوتروفیک جانبی، جنون ناشی از AIDS و ... از نقص‌های پاتولوژیک سیستم عصبی مرکزی Central Nervous System (CNS) هستند. فعال شدن سلول‌های گلیا به عنوان مشخصه اصلی

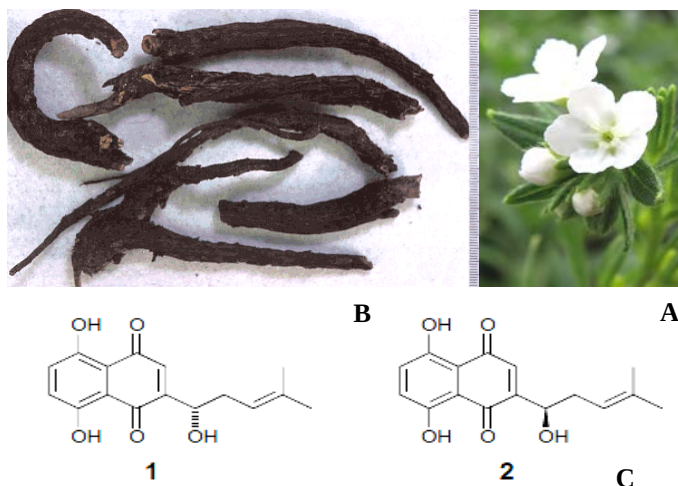
Fereidoni@um.ac.ir
www.phypha.ir/ppj

* نویسنده مسئول مکاتبات:
وبگاه مجله:

کرده اند [۳۷، ۳۲]. آنها، نورون ها را به مویرگ های خونی متصل می نمایند و از نظر تکاملی جزء ماکروگلیاها بوده و منشأ عصبی دارند و سلولهای بسیار مهمی در CNS هستند که تا چندین سال گذشته دانشمندان نسبت به آنها بی توجه بودند اما اخیراً مورد بررسی و توجه بسیار زیادی قرار گرفته اند [۲۹]. آستروسیت ها از سلول های تنظیم گر ایمنی مغزی بوده و در مواجهه با شرایط پاتولوژیکی، فعال شده و تغییر شکل می دهند. تغییرات مورفولوژیکی آستروسیت ها بدین صورت است که در سیتوپلاسم آنها انکلوژیون های غیرطبیعی از GFAP به صورت مجتمع دیده می شود. همچنین فعال شدن آنها علاوه بر تغییرات مورفولوژیکی همراه با بیان و آزاد شدن فاکتورها و مولکول های مرتبط با ایمنی و بالقوه سیتوتوکسیک همچون نیتریک اکساید (NO)، پروستاگلاندین ها (PGs)، اینترلوکین ها (ILs) و TNF- α می باشد و در التهاب حاد و مزمن نقش اساسی را ایفا می کنند [۱، ۱۰، ۱۷]. آستروسیت های فعال شده در طیف وسیعی از بیماری های مغزی شامل جراحی مغزی مستقیم و غیرمستقیم، ایسکمی، بیماری های عفونی، خود ایمنی و مخرب عصبی نشان داده شده اند [۱۸].

LPS، گلیکولیپیدی مشتق شده از سطح غشاء باکتری گرم منفی و قادر به ایجاد واکنش های التهابی در CNS می باشد [۱۵]. با استفاده از مشاهدات برون تنی بر روی کشت های آستروسیتی، LPS قادر به فعال کردن آستروسیت ها و ایجاد تغییرات وسیعی بر عملکرد سلولی آنها و همچنین القاء تولید انواع سیتوکین های پیش برنده التهاب، کموکین ها و پروستاگلاندین ها می باشد. به علاوه LPS قادر به القاء سنتز آنزیم iNOS (آنزیم مخصوص سنتز NO در CNS) و تولید NO می باشد [۱۷، ۲۵]. تغییر سطح NO می تواند در رابطه با عواملی چون عفونت ها و مسمومیت های خونی، التهابات مغزی، افزایش فشار خون، هیجان، دیابت نوع ۲، هیپوکسی و سرطان باشد. تولید و آزادسازی این فاکتور که قسمتی از ایمنی ذاتی بدن را تشکیل می دهد میزبان را قادر به از بین بردن پاتوژن های هجوم آورنده می کند، اما تولید بسیار و تجمع این فاکتورها برای نورون ها بسیار زیان آور و توكسیك می باشد [۲، ۲۰]. رنگیزه نفتوکوتینونی شیکونین اولین بار در گیاه درمانی چین از

ریشه گیاه سنگدانه *Lithospermum erythrorhizon* از خانواده گل گاو زبان *Boraginaceae*، استخراج شد (شکل ۱). بررسی های تاریخی نشان دادند که Zicao (از ریشه این گیاهان بدست آمد و در ژاپن به عنوان شیکونین نامگذاری شد) برای درمان جوش های نقطه ای، سرخک، گلودرد، دمل های بزرگ و سوختگی ها مورد استفاده قرار گرفته است [۶]. همچنین فعالیت های دارویی متنوعی مانند اثرات ضد التهابی، ضد گوناوتروپیک، ضد سرطانی و ضدفعالیت HIV-1 به شیکونین نسبت داده شده است [۲۲]. شیکونین همچنین در التیام زخم ها، افزایش تشکیل گرانولوما، جلوگیری از واکنش های التهاب موضعی، جلوگیری از رگ زایی، جلوگیری از فعالیت DNA توپوایزومراز، جلوگیری از فعالیت پلاکت ها و اثرات ضد میکروبی نقش دارد و گرما را از خون دور کرده و اثر سم زدایی دارد [۶، ۲۲]. مطالعات نشان دادند که آستروسیت های فعال شده در CNS، قادر به آزاد سازی انواعی از سیتوکاین ها، کموکاین ها، NO و ...، برای ارتباط بین نورون ها و حمایت از آنها و ایمنی CNS می باشند. هنگامی که فعالیت آستروسیت ها به دلیل به هم خوردن تعادل پاتولوژیکی افزایش می یابد، می تواند موجب ایجاد بیماری های نورودژنراتیو و التهابی و باعث افزایش سطح تولید NO شود. مطالعات نشان دادند شیکونین باعث مهار ویژه ای در تولید NO و آپوپتوز سلول های تیمار شده و میکروگلیاها می گردد [۲۱، ۲۴، ۲۹]. با توجه به مطالعات گذشته که در بیماری های نورودژنراتیو مانند آلزایمر، پارکینسون و ... فعال شدن سلول های گلیا بالاخص میکروگلیاها و آستروسیت ها به وفور مشاهده می گردد [۱۸] و شیکونین با القاء اثرات ضد التهابی خود توانسته است با کاهش میزان تولید NO فعالیت میکروگلیاها را به عنوان گامی مؤثر در درمان این نقص های پاتولوژیک CNS کاهش دهد [۷]. در این پژوهش این فرضیه مورد بررسی قرار می گیرد که آیا شیکونین در غلظت های مختلف با اثر بر آستروسیت ها می تواند به عنوان دارویی در درمان بیماری های نورودژنراتیو و التهابی استفاده شود. بدین منظور روش مطالعه بر مبنای تهیه کشت سلولی آستروسیتی با خلوص بالا، تحریک برای ایجاد فعالیت های التهابی و تأثیر پیش درمانی غلظت های مختلف شیکونین بر آستروسیت های

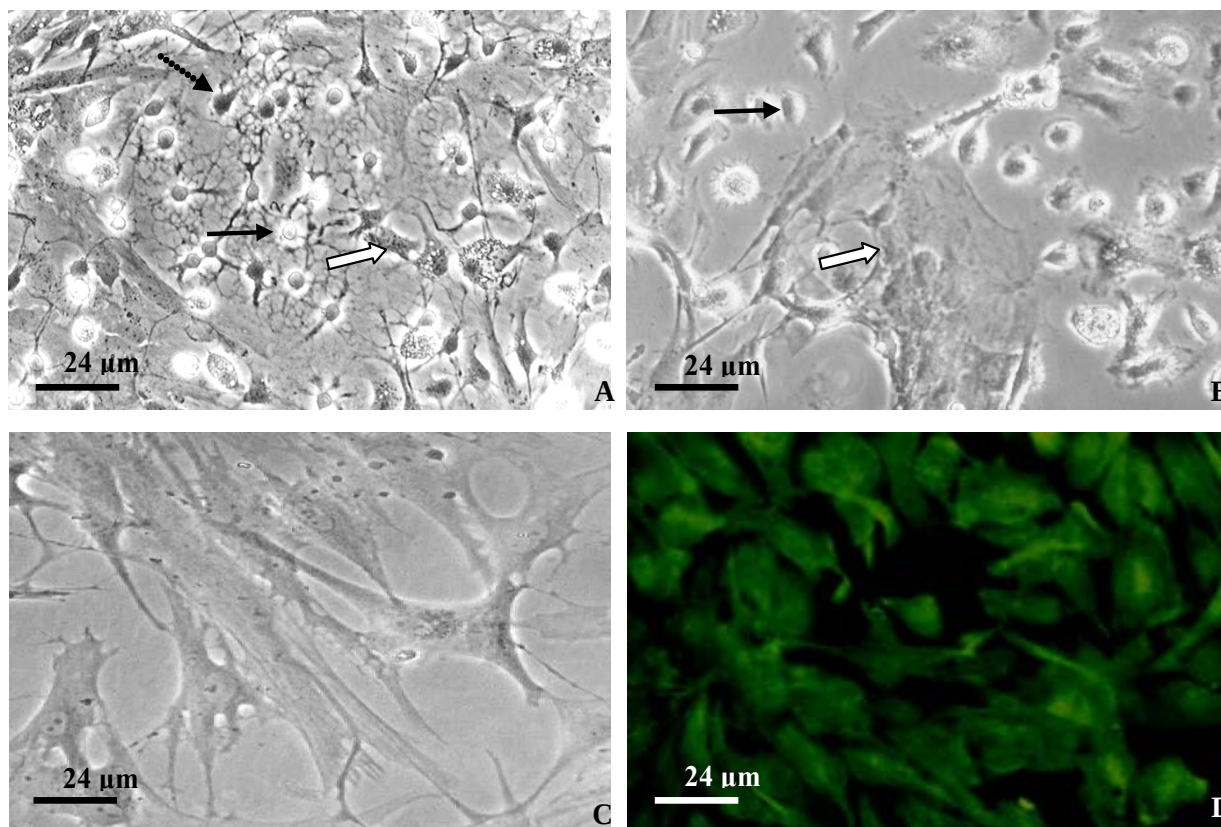


فعال شده در محیط کشت و اندازه گیری میزان نیتریک اکساید و میزان حیات سلولی می باشد. هدف از این مطالعه، بررسی اثر شیکونین در راستای شناسایی کاهش التهاب آستروسیت ها می باشد، چنان چه این اثرات به اثبات برسد با توجه به استراتژی استفاده از داروهای گیاهی با عوارض و هزینه کمتر، این طرح اهمیت بالایی خواهد داشت.

مواد و روش ها

در این تحقیق از نوزادان ۱ تا ۲ روزه موش های صحرایی نژاد Wistar تکثیر شده در حیوانخانه پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری تهران استفاده گردید. حیوانات در شرایط تاریکی/روشنایی ۱۲ ساعته با دمای کنترل شده ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) و بدون محدودیت دسترسی به آب و غذا نگهداری شدند. کلیه آزمایشات روی حیوانات با رعایت اصول اخلاقی و ثبت شده بین المللی کار با حیوانات آزمایشگاهی انجام شد [۳۸]. کشت اولیه مخلوط سلولی (Primary Mix Culture) از مغز نوزاد ۱ تا ۲ روزه موش صحرایی بر مبنای روش McCarthy & Vellis تهیه گردید [۱۹]، بدین صورت که سر حیوان به سرعت جدا شده و مغز خارج شده و پرده مننژ از سطح کورتکس جدا شد و سلول ها بوسیله پیپتاژ کردن بطور مکانیکی جدا گردیدند، سپس سوسپانسیون سلولی در محیط کشت DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) حاوی ۱۰٪ FBS (Fetal Bovine Serum) در فلاسک های T75 کشت

داده شد. فلاسک ها در انکوباتور مخصوص کشت سلول که دارای ۵٪ CO_2 ، دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و رطوبت کافی بود قرار گرفتند و هر دو روز یکبار محیط کشت فلاسک ها به صورت کامل تعویض گردید، بعد از ۷ تا ۱۰ روز کشت اولیه مخلوط سلول های عصبی آماده شد (شکل ۲A). جهت خالص سازی کشت آستروسیتی براساس میزان قدرت چسبندگی سلول ها به سطح بستر، فلاسک های حاوی کشت اولیه مخلوط سلولی، ۱۰ دقیقه بصورت آرام تکان داده شدند تا سلول های میکروگلیا و الیگودندروسیت روی سطح، از لایه سلولی آستروسیتی چسبیده به بستر (کف فلاسک) جدا و خارج شوند. سپس فلاسک ها به مدت ۵ دقیقه با Trypsin-EDTA انکوبه شدند. با توجه به اینکه گروهی از سلول های میکروگلیا که چسبیده به کف فلاسک هستند در مواجهه با تریپسین مقاومت بیشتری از خود نشان می دهند، لایه سلولی آستروسیتی ابتدا جدا شده (شکل ۲B) و میکروگلیاها همچنان به کف فلاسک چسبیده باقی می مانند، آستروسیت ها جمع آوری شده و در پلیت ۲۴ حفره ای بصورتیکه در هر حفره 10^5 سلول وجود داشته باشد در $500 \mu\text{l}$ محیط کشت DMEM حاوی ۱۰٪ FBS کشت شدند و پلیت ها قبل از تیمار به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شده تا سلول ها ۸۰٪ کف هر حفره پلیت را پر کنند (شکل ۲C) [۳۰]. سپس به منظور تعیین خلوص آستروسیت ها رنگ آمیزی اختصاصی ایمونوسیتوشیمیایی آنها به وسیله آنتی بادی GFAP (Santa Cruz Biotechnology) بعنوان مارکر آستروسیتی انجام شد. برای این کار سلول های آستروسیتی جدا و خالص سازی شده در پلیت ۲۴ حفره ای



شکل ۲- (A) کشت اولیه مخلوط سلول‌های عصبی بعد از ۱۰ روز، در این شکل فلش توپر سیاه نشان دهنده سلول‌های میکروگلیا، فلش توپر سفید نشان دهنده آستروسیت و فلش نقطه چین نشان دهنده الیگودندروسیت می‌باشد (میکروسکوپ فاز کنتراست 32X). **(B)** کشت سلولی بعد از انکوبه شدن با تریپسین، فلش توپر سفید نشان دهنده لایه آستروسیت‌های جدا شده و فلش توپر سیاه نشان دهنده میکروگلیاهای چسبیده به کف فلاسک می‌باشد. **(C)** آستروسیت‌های جدا شده و کشت شده در پلیت ۲۴ حفره‌ای بعد از ۲۴ ساعت انکوبه شدن (میکروسکوپ فاز کنتراست 32X). **(D)** رنگ آمیزی اختصاصی کشت خالص آستروسیتی با آنتی‌بادی GFAP (میکروسکوپ فلورسانس 32X).

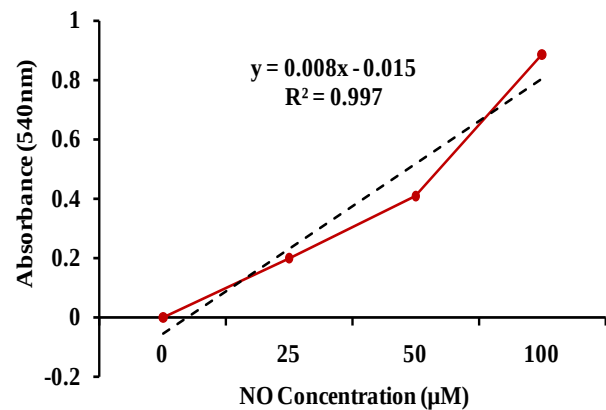
قبل از تیمار سلول‌ها، ابتدا محیط روی سلول‌های کشت شده در پلیت ۲۴ حفره‌ای خارج شد و با محیط کشت DMEM/F12 حاوی ۲٪ FBS جایگزین گردید. سپس حفره‌ها با غلظت‌های مختلف شیکونین (Calbiochem, Cat. No. 565850) در محدوده ۰/۱ تا ۱۰۰ میکرومولار تیمار شدند. در تهیه غلظت‌های مختلف شیکونین با استفاده از اتانل بعنوان حلال نباید حجم نهایی اتانل در محیط کشت از ۰/۲٪ بیشتر شود. یک ساعت پس از تیمار آستروسیت‌ها با شیکونین، آنها در معرض LPS با غلظت ۱۰ μg/ml قرار گرفتند. بعد از تیمار سلول‌ها با غلظت‌های مختلف شیکونین در مدت زمانهای ۲۴ و ۴۸ ساعت، میزان نیتریک اکساید بوسیله اندازه‌گیری محصول نهایی نیتريت با استفاده از روشی بر پایه واکنش گریس تعیین می‌گردد. گریس یک واکنش رنگ سنجی می‌باشد که برای اندازه‌گیری سطح نیتريت NO₂⁻ در محلول‌های آبی استفاده می‌شود. این سنجش

مذکور، بعد از ۲۴ ساعت انکوبه شدن با متانل به مدت ۱۰ دقیقه فیکس شدند و سپس به هر حفره به مدت ۵ دقیقه محلول نفوذ پذیر کننده ۲٪ Triton X100 اضافه گردید، پس از دو بار شستشو با محلول PBS به مدت ۵ دقیقه، محلول بلوکه کننده ۵٪ BSA (Bovine Serum Albumin) اضافه شد و پلیت ۴۵ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفت. سپس بعد از تخلیه محلول بلوکه کننده، آنتی بادی اولیه GFAP با رقت ۱/۲۰۰ اضافه شد و پلیت به مدت ۲۴ ساعت روی شیکر در دمای ۴ درجه سانتیگراد قرار گرفت. پس از تخلیه آنتی بادی اولیه و شستشوی سلول‌ها با PBS آنتی بادی ثانویه Polyclonal Rabbit anti mouse IgG/FITC با رقت ۱/۵۰ اضافه گردید و پلیت به مدت ۲ ساعت روی شیکر در دمای اتاق و تاریکی قرار گرفت. در پایان پس از تخلیه آنتی بادی ثانویه و شستشوی سلول‌ها با PBS، سلول‌ها توسط میکروسکوپ فلورسانس مشاهده گردیدند (شکل ۲D) [۳۷].

کریستال‌ها در حلال آلی قابل حل می‌باشند [۸]. در این روش بعد از سپری شدن ۴۸ ساعت از تیمار سلول‌ها با شیکونین، به هر حفره ۱۰۰ μl از محلول MTT با غلظت ۵ mg/ml اضافه شده و سپس سلول‌ها به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و ۵٪ CO₂ انکوبه گردیدند. سپس محیط روی سلول‌ها حذف شده و به هر حفره ۲۰۰ μl DMSO (Dimethylsulfoxid) (Merck) اضافه شده و میزان جذب در طول موج ۵۸۰ nm توسط دستگاه الیزا ریدر اندازه‌گیری گردید. پس از آن برای پاسخ به این سؤال که آیا شیکونین به تنهایی و بدون حضور LPS خود می‌تواند به عنوان یک فاکتور فعال کننده و مرگ سلولی عمل کند یا خیر، آزمایش دیگری انجام شد و در این آزمایش سلول‌ها فقط با غلظت‌های مختلف شیکونین (۱۰۰ μM تا ۰/۱) بدون حضور LPS تیمار شدند و میزان نیتریک اکساید حاصله توسط آزمون گریس و بقای سلول‌ها توسط سنجش MTT اندازه‌گیری شد. میانگین داده‌های حاصل از آزمایشات به صورت Mean ± SEM ارائه شده‌اند. معنی‌داری اثر غلظت‌های مختلف تیمارها با آزمون ANOVA یک طرفه و با استفاده از نرم افزار آماری Graphpad Prism 5 و به دنبال آن معنی‌داری تفاوت بین میانگین‌ها نیز با Post test T_{tukey} و با حداقل سطح معنی‌داری p < 0.05 برآورد شدند.

یافته‌ها

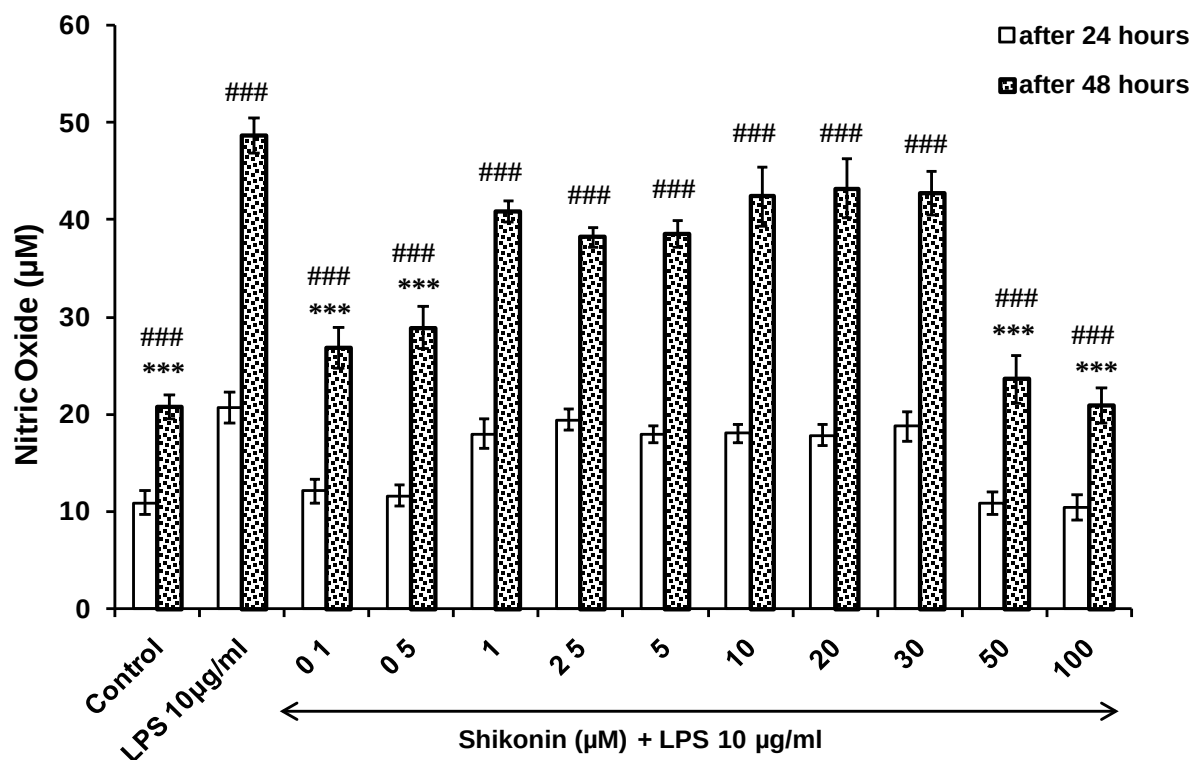
نتایج حاصل از رنگ‌آمیزی اختصاصی ایمونوسیتوشیمی آستروسیت‌های جداسازی شده از مغز نوزاد موش صحرایی نشانگر خلوص بیش از ۹۵٪ آستروسیت‌های جداسازی شده می‌باشد. با توجه به شکل ۴، در گروه کنترل (سلول‌های بدون دریافت تیمار) بعد از سپری شدن ۲۴ و ۴۸ ساعت میزان NO در حداقل مقدار خود قرار دارد و بیشترین میزان NO در حضور LPS با غلظت ۱۰ μg/ml مشاهده شد (p < 0.001). بعد از پیش درمانی سلول‌ها با شیکونین به مدت یک ساعت و سپس تیمار آنها با LPS، در ۲۴ ساعت، در غلظت‌های پائین شیکونین (۰/۱ μM و ۰/۵ μM) میزان NO نسبت به گروه تیمار شده فقط با LPS کاهش یافته است (p < 0.001) و پس از آن در محدوده غلظت‌های شیکونین (۱ μM تا ۳۰ μM)



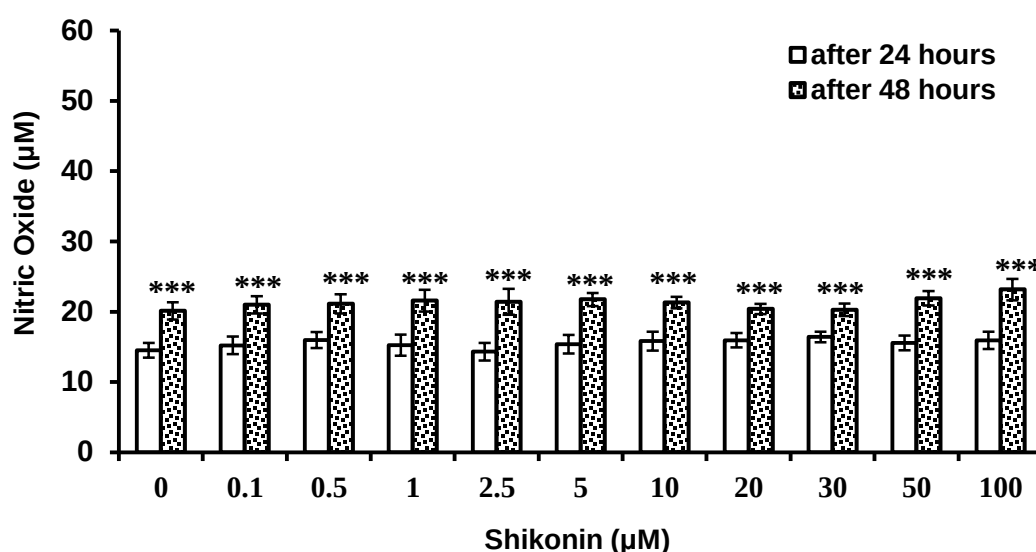
شکل ۳- منحنی استاندارد نیتريت سدیم، میزان جذب را در غلظت‌های تعیین شده ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار نیتريت سدیم نشان می‌دهد. با توجه به نمودار و معادله خط مماس بر نمودار ($y = 0.008x - 0.015$) میزان نیتريت اکساید برحسب میکرومولار محاسبه می‌گردد. میزان OD بدست آمده از هر نمونه را به جای y در معادله خط گذاشته و با محاسبه x میزان نیتريت اکساید بر حسب میکرومولار برآورد می‌شود.

بر پایه واکنش دیازوتیزاسیون بوده که اولین بار توسط Griess در سال ۱۸۷۹ ارائه گردید. در این واکنش عامل شیمیایی Sulfanilamide معرف گریس با نیتريت محلول در مایع واکنش داده و ترکیب Azo را تولید کرده که توسط جذب در طول موج ۵۴۰ nm آشکار می‌گردد [۱۲]. به این منظور ۱۰۰ μl از محیط کشت روی سلول‌ها برداشته در ۱۰۰۰ rpm سانتریفوژ شده، در پلیت ۹۶ حفره‌ای ریخته و با ۱۰۰ μl معرف گریس مخلوط و ۲۰ دقیقه در محیط تاریک و دمای اتاق نگهداری شده، سپس مقدار جذب در طول موج ۵۴۰ nm با استفاده از دستگاه الیزا ریدر (Microplate reader Labsystems Multiscan) اندازه‌گیری گردید. برای بدست آوردن میزان NO تولید شده توسط سلول‌های تیمار شده از منحنی استاندارد نیتريت سدیم استفاده شده و محیط کشت نیز به عنوان blank استفاده گردید (شکل ۳).

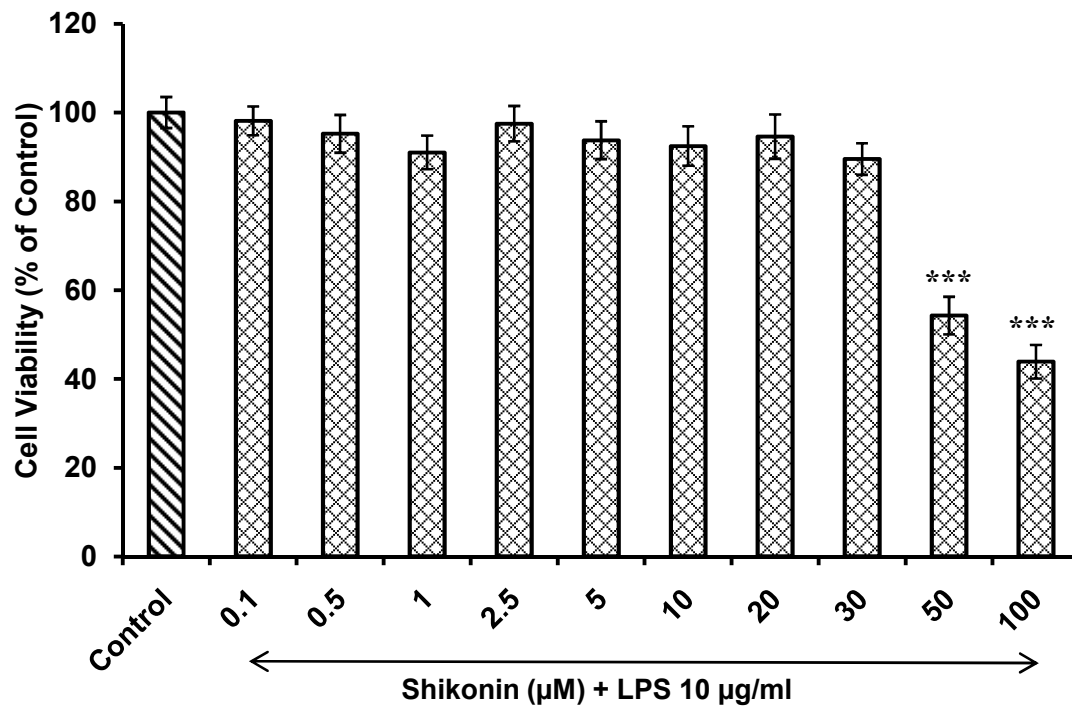
در سنجش 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium bromide (MTT) که یک واکنش رنگ سنجی می‌باشد و میزان احیای ۳-(۴-دی متیل تiazول-۲-یل)-۵-دی فیل تترازولیوم بروماید (MTT) بوسیله سوکسینات دهیدروژناز میتوکندریایی را اندازه می‌گیرد، نمک زرد رنگ تترازولیوم MTT وارد سلول‌های زنده می‌شود و در میتوکندری‌ها به کریستال‌های فورمازان غیر محلول بنفش رنگ تبدیل می‌گردد که این



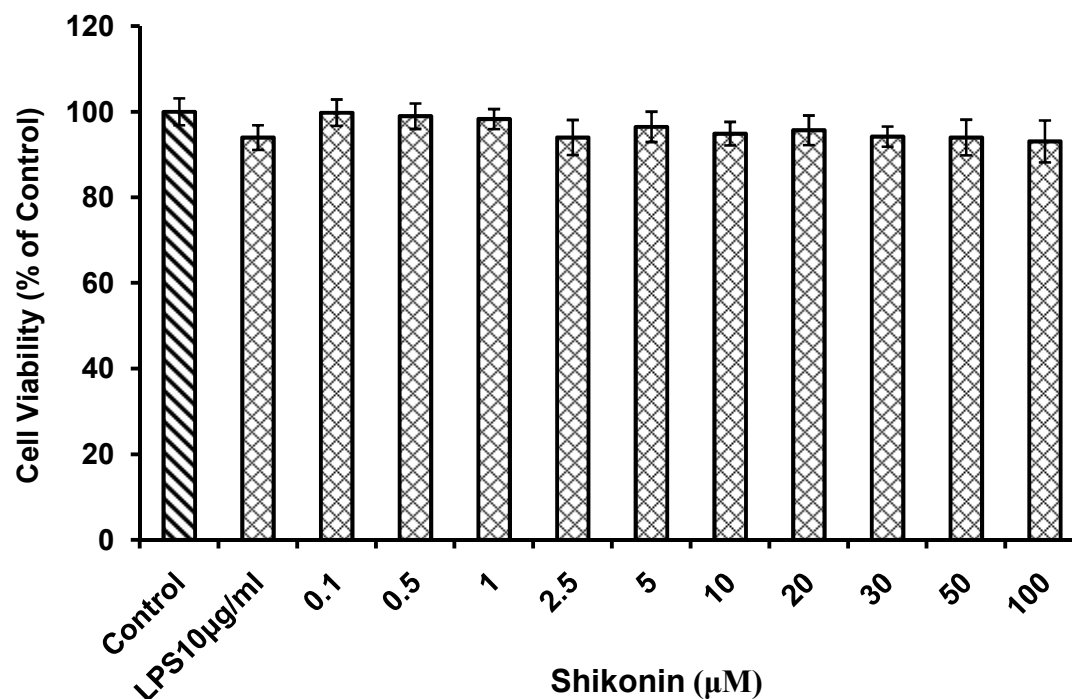
شکل ۴- مقایسه میزان نیتریک اکساید حاصل از گروه‌های سلولی پیش درمانی شده با غلظت‌های مختلف شیکونین در محدوده ۰/۱ تا ۱۰۰ میکرومولار یک ساعت قبل از تیمار با LPS و گروه سلولی تیمار شده با LPS در مدت زمانهای ۲۴ و ۴۸ ساعت توسط آزمون گریس. این شکل نشان می‌دهد میانگین میزان نیتریک اکساید تولید شده توسط گروه‌های سلولی پیش درمانی شده با غلظت‌های ۰/۱، ۰/۵، ۱، ۵، ۱۰ و ۲۰ میکرومولار LPS در مقایسه با گروه سلولهای تیمار شده با LPS کاهش معنی‌داری یافته است ($p < 0.001$ ###). در تمام گروه‌ها، تولید NO پس از گذشت ۴۸ ساعت نسبت به ۲۴ ساعت همان گروه غلظت افزایش یافته است ($p < 0.001$ ###). شکل فوق بخوبی دو محدوده غلظت کم (۰/۱ و ۰/۵ µM) و غلظت زیاد (۵۰ و ۱۰۰ µM) را که واجد اثر کاهنده بر تولید آستروسیتی NO هستند، به همراه محدوده غلظت حد واسط (۱ تا ۳۰ µM) که بدون اثر معنی‌داری در تولید آستروسیتی NO است را نشان می‌دهد. نتایج به صورت $\text{Mean} \pm \text{SEM}$ ارائه شده‌است و n حداقل تکرار در کشت سلولی هر گروه می‌باشد که در تمام آزمایشات $n = 9$ بوده است.



شکل ۵- مقایسه میزان نیتریک اکساید حاصل از گروه‌های سلولی تیمار شده با غلظت‌های مختلف شیکونین در محدوده ۰/۱ تا ۱۰۰ میکرومولار و گروه سلولی کنترل (سلولهای بدون دریافت تیمار) در مدت زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت توسط آزمون گریس. نتایج نشان می‌دهند که تفاوت معنی‌داری بین این گروه‌ها وجود ندارد و شیکونین به خودی خود یک عامل تشدید کننده یا مهار کننده فعالیت سلول برای تولید NO نمی‌باشد. در تمام گروه‌ها، تولید NO پس از ۴۸ ساعت نسبت به ۲۴ ساعت همان گروه غلظت افزایش یافته است ($p < 0.001$ ****). نتایج به صورت $\text{Mean} \pm \text{SEM}$ ارائه شد و n حداقل تکرار در کشت سلولی هر گروه می‌باشد که در تمام آزمایشات $n = 9$ بوده است.



شکل ۶- مقایسه میزان بقای آستروسیت‌ها پس از ۴۸ ساعت در گروه کنترل (سلول‌های بدون دریافت شیکونین و LPS) و گروه‌های سلولی پیش درمانی شده با غلظت‌های مختلف شیکونین یکساعت قبل از تیمار با LPS. این شکل نشان می‌دهد که در مقایسه درصد حیات سلول‌ها، اختلاف معنی‌داری بین گروه کنترل و گروه‌های سلولی پیش درمانی شده با غلظت‌های مختلف شیکونین یکساعت قبل از تیمار با LPS وجود دارد، بدین صورت که گروه‌های سلولی پیش درمانی شده با شیکونین یکساعت قبل از تیمار با LPS در غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ نسبت به سایر گروه‌ها بقای سلولی کاهش یافته‌ای نشان دادند ($p < 0.001$ ***). نتایج به صورت $\text{Mean} \pm \text{SEM}$ ارائه شده است و n حداقل تکرار در کشت سلولی هر گروه می‌باشد که در تمام آزمایشات $n = 9$ بوده است.



شکل ۷- مقایسه میزان بقای آستروسیت‌ها پس از ۴۸ ساعت در گروه کنترل (سلول‌های بدون دریافت تیمار) و گروه سلولی تیمار شده با LPS و گروه‌های سلول‌های تیمار شده با غلظت‌های مختلف شیکونین در محدوده ۰/۱ تا ۱۰۰ میکرومولار. این شکل نشان می‌دهد که در مقایسه میزان حیات سلول‌ها، اختلاف معنی‌داری بین گروه کنترل و گروه سلولی تیمار شده با LPS و گروه سلول‌های تیمار شده با غلظت‌های مختلف شیکونین وجود ندارد. LPS با غلظت ۱۰ μg/ml و غلظت‌های مختلف شیکونین اثر کشندگی قابل توجهی بر آستروسیت‌ها ندارند. نتایج به صورت $\text{Mean} \pm \text{SEM}$ ارائه شده است و n حداقل تکرار در کشت سلولی هر گروه می‌باشد که در تمام آزمایشات $n = 9$ بوده است.

سلول‌ها pH خارج سلولی و میزان سطح یون K^+ را نیز تنظیم می‌کنند [۲۷، ۲۹]. زمانیکه آستروسیت‌ها خود ملتهب شوند (آستروسیت‌های واکنشی) به عنوان مثال در بیماری‌های نورودژنراتیو و یا عفونت HIV، عملکرد فیزیولوژیکی آنها تغییر کرده و انواع سیتوکاین‌ها و کموکاین‌های پیش برنده التهاب مانند اینترلوکین‌های ۱، ۶ و ۱۰، $TNF-\alpha$ و میانجی‌های نوروتوکسیک (NO) و گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) را تولید می‌کنند [۲]. NO یک گاز قابل انتشار است که در بسیاری از وضعیت‌های فیزیولوژیک و پاتولوژیک دیده می‌شود، NO در غلظت‌های کم در Neurotransmission و Vasodilation نقش دارد و مفید است اما در غلظت‌های زیاد، پاتولوژیک و نوروتوکسیک می‌باشد، همچنین NO قادر است تولید $TNF-\alpha$ ، IL-6 و IL-1 β را که در مراحل اولیه التهاب CNS تولید می‌شوند، را تعدیل کند [۲۰]. حال با توجه به نتایج این تحقیق مبنی بر بقای سلولی (شکل ۶) و اثرات کاهش دهنده میزان NO (شکل ۴) در حضور شیکونین با غلظت‌های کم ($0.1 \mu M$ و $0.5 \mu M$) می‌توان فرض کرد که مکانیسم‌های ۱ تا ۳ ذکر شده در زیر احتمالاً مسئول بروز اثرات ضد التهابی شیکونین و بقای سلولی باشد اما به هر روی برای اثبات آن باید تک تک مکانیسم‌های ذکر شده در حضور آستروسیت و شیکونین بررسی گردند.

۱) مهار مستقیم فعالیت آنزیم iNOS (inducible nitric- oxide synthase): مطالعات اخیر نشان می‌دهد که ترکیبات نفتوکوئینونی ضد التهابی گیاهی مانند شیکونین و آلکانین و مشتقات آنها در غلظت‌های پایین، می‌توانند روی پاسخ‌های سلولی شامل تولید NO و iNOS اثر بگذارند اما مکانیسم دقیق چگونگی این اثر هنوز ناشناخته است [۲۴]. امروزه با استفاده از سنجش‌های cell-free مشخص شده‌است که شیکونین در غلظت‌های اندک خود ($1 \mu M$) قادر است سطح بیان تمام ایزوفرم‌های NOS مانند nNOS (neuronal NOS)، eNOS (endothelial NOS) و iNOS را کاهش دهد. این سنجش‌ها نشان داد که اگر در واکنش،

$$L\text{-Argenin} + 3/2 \text{ NADPH} + H^+ + 2O_2 \rightarrow$$

$$L\text{-Citrolin} + NO + 3/2 \text{ NADPH}$$

شیکونین بعد از آرژنین و NADPH به واکنش اضافه شود

کاهش معنی‌داری در میزان NO نسبت به گروه تیمار شده فقط با LPS وجود نداشت. سپس در غلظت‌های بالای شیکونین ($50 \mu M$ و $100 \mu M$) کاهش معنی‌داری در میزان NO مشاهده گردید ($p < 0.001$). بعد از ۴۸ ساعت نیز روند تولید NO به همان صورت قبل بوده ولی میزان تولید آن با توجه به گذر زمان برای هر غلظت نسبت ۲۴ ساعت قبل همان غلظت تشدید شده است ($p < 0.001$) (شکل ۴). همچنین با توجه به شکل ۵، در مدت زمان ۲۴ ساعت میزان NO تولیدی سلول‌های تیمار شده فقط با شیکونین و بدون LPS در حد گروه کنترل مشاهده شد و در تمامی غلظت‌های شیکونین میزان NO تغییر معنی‌داری نداشت. این شکل نشان می‌دهد که شیکونین به تنهایی یک فاکتور فعال کننده سلولی نمی‌باشد. این روند بعد از ۴۸ ساعت هم ادامه داشته است و فقط میزان تولید NO با توجه به گذر زمان در هر غلظتی نسبت به ۲۴ قبل همان غلظت تشدید شده است ($p < 0.001$) (شکل ۵). نتایج حاصل از سنجش MTT بعد از سپری شدن ۴۸ ساعت از تیمار سلول‌ها در گروه کنترل (سلول‌های بدون دریافت تیمار) و گروه سلول‌های پیش درمانی شده با غلظت‌های مختلف شیکونین به مدت یک ساعت و سپس تیمار شده با LPS (شکل ۶)، گروه سلول‌های تیمار شده فقط با LPS و گروه سلول‌های تیمار شده فقط با غلظت‌های مختلف شیکونین نشان داد (شکل ۷)، در گروه‌های پیش درمانی شده با غلظت‌های مختلف شیکونین به مدت یک ساعت و سپس تیمار شده با LPS، میزان بقای سلول‌ها در غلظت‌های بالای شیکونین ($50 \mu M$ و $100 \mu M$) در مقایسه با گروه کنترل کاهش معنی داری یافته است ($p < 0.001$) (شکل ۶) و در سایر گروه‌ها تغییر معنی‌داری در میزان حیات سلول‌ها رخ نداد (شکل ۷).

بحث

آستروسیت‌ها در CNS علاوه بر نقش‌های حفاظتی و تغذیه، در ایمنی و حفظ همئوستازی آن نیز نقش دارند. همچنین این سلول‌ها تنظیم کننده جریان خونی - مغزی هستند از طرفی آستروسیت‌ها با آزاد کردن فاکتورهای نوروتروفیک روی عملکرد نورون‌ها تأثیر می‌گذارند و در متابولیسم نوروترانسمیترها هم شرکت می‌کنند همچنین این

آستروسیت‌ها در حضور شیکونین با غلظت‌های کم قابل طرح باشد.

۳) مهار فعالیت MAPKs (Mitogen-activated protein kinase C) PKC و (Protein kinase A) PKA: بسیاری از مطالعات نشان می‌دهد که LPS پس از اتصال به TLR4 (Toll-Like receptor 4)، MAPKs را مانند ERK، p38، JNK و تعداد زیادی از PKC ها را فعال می‌کند، که شیکونین قادر است در غلظت‌های کم در سلول‌های میکروگلیا و ماکروفاژ، عملکرد آنها را مهار کند [۷، ۲۱]. در مطالعات روی سلول‌های میکروگلیای فعال شده با LPS، دریافتند که ۳۰ دقیقه پس از اثر شیکونین در غلظت‌های کم ($1 \mu\text{M}$) فسفریله شدن ERK و بدنبال آن فسفریلاسیون p38 و JNK مهار و متوقف می‌گردد. در این تحقیق نشان دادند که پس از مهار فعالیت MAPK ها توسط شیکونین، رونویسی از ژن‌های iNOS و COX-2 محدود شده و میزان تولید NO کاهش می‌یابد [۲۱]. با مطالعه روی سلول‌های ملتهب پوست موش صحرایی دریافتند که در این سلول‌ها، ERK و p38 فعال هستند و فسفریلاسیون ERK1/2 بسیار افزایش می‌یابد. از آنجائیکه ERK1/2 از طریق افزایش فسفریلاسیون فاکتور I κ B فعالیت NF- κ B را تنظیم کرده و فرایند اتصال NF- κ B به DNA را می‌افزاید و از این طریق بیان ژن iNOS و میزان تولید NO افزایش می‌یابد اما شیکونین قادر است در غلظت‌های کم خود با مهار فعالیت ERK، فسفریلاسیون فاکتور I κ B را متوقف کند و به فاکتور رونویسی NF- κ B اجازه فعالیت ندهد [۳۱]. بعد از مهار مستقیم iNOS توسط شیکونین در غلظت‌های کم در میکروگلیاها و ماکروفاژها، دومین هدف اثر شیکونین PKA می‌باشد که یافته‌ها نشان دادند شیکونین قادر است در این سلول‌ها PKA را مهار کند پس منجر به کاهش میزان بیان iNOS و کاهش میزان NO می‌گردد [۷، ۲۱]. با توجه به توضیحات فوق، این مکانیسم‌ها ممکن است توسط شیکونین در آستروسیت‌ها نیز بروز نموده باشند و به عنوان دلیل کاهش NO توسط آستروسیت‌ها در حضور شیکونین با غلظت‌های کم قابل طرح باشند. نظر به یافته‌های تحقیق حاضر مبنی بر کاهش بقای سلولی آستروسیت‌ها (شکل ۶) و نیز کاهش میزان NO در حضور غلظت‌های زیاد

دیگر قادر نیست میزان تولید NO را کاهش دهد، این مسئله این حقیقت را آشکار می‌کند که شیکونین به جایگاه‌های ویژه‌ای در آنزیم NOS حمله می‌کند به نحوی که قبل از اتصال آرژنین و NADPH به آنزیم، تولید NO را متوقف می‌کند [۳۶]. علاوه بر این معلوم شده که شیکونین با کاهش سطح بیان iNOS در سلول‌های میکروگلیای موش صحرایی و ماکروفاژهای موشی Raw 246.7 نیز می‌تواند میزان تولید NO را کاهش دهد [۲۱، ۳۶]. لذا مکانیسم فوق ممکن است توسط شیکونین در آستروسیت‌ها نیز بروز نموده باشد و به عنوان دلیل کاهش NO توسط آستروسیت‌ها در حضور شیکونین با غلظت‌های کم قابل طرح باشد.

۲) مهار سیگنالینگ NF- κ B (Nuclear Factor κ B) (kappa-light-chain-enhancer of activated B cells): پروتئینی است که نقش کلیدی را در تنظیم سیستم ایمنی در پاسخ به التهاب ایفا می‌کند [۳]. در سلول‌های در حال استراحت مانند میکروگلیاها، آستروسیت‌ها و ماکروفاژها، زیر واحدهای پروتئین NF- κ B در سیتوزول بوسیله پروتئین‌های مهار می‌مانند I κ B α (Inhibitory κ B Protein)، I κ B β ، I κ B ϵ و I κ B γ نگه داشته می‌شود. LPS می‌تواند پروتئین‌های مهار I κ B را در محل سرین‌های ۳۲ و ۳۶ بوسیله فعال شدن آنزیم IKKs فسفریله کند و باعث فروپاشی این پروتئین‌های مهار شده و بدنبال آن NF- κ B فعال شده و به هسته منتقل می‌شود و در آنجا به جایگاه‌های تنظیمی در پروموتور ژن‌های تولید کننده میانجی‌های پیش برنده التهاب متصل شده و رونویسی از آنها را فعال می‌کند. اما مطالعات نشان داد شیکونین در غلظت‌های کم خود ($1 \mu\text{M}$) قادر است در ماکروفاژها و میکروگلیاها با مهار آنزیم IKK، از فسفریله شدن و فروپاشی پروتئین مهار I κ B α جلوگیری کرده و مانع از ادامه یافتن مسیر سیگنالینگ پروتئین NF- κ B گردد و در نتیجه منجر به عدم فعال شدن این فاکتور هسته‌ای شود [۹، ۲۱، ۲۸، ۳۶]. همچنین نظر بر این است که در ماکروفاژها، شیکونین و مشتقات آن باعث مهار اتصال NF- κ B به DNA ژن‌های عوامل پیش برنده التهاب در هسته می‌شوند و در نتیجه رونویسی این ژن‌ها را متوقف می‌کند [۳۶]. بنابراین مکانیسم فوق ممکن است توسط شیکونین در آستروسیت‌ها نیز بروز نموده باشد و به عنوان دلیل کاهش NO توسط

شیکونین در آستروسیت‌ها نیز بروز نموده باشد و دلیل کاهش تولید NO، بدلیل القاء آپوپتوزیز در حضور شیکونین با غلظت‌های زیاد قابل طرح باشد.

۲) توقف چرخه سلولی (Cell Cycle): مطالعات گوناگون روی اثرات آپوپتوتیک و سیتوتوکسیک شیکونین نشان دادند که این دارو قادر است در غلظت‌های زیاد چرخه سلولی را در بخش‌های مختلف با توجه به نوع سلول متوقف کند و از تکثیر سلول‌ها جلوگیری کرده و منجر به مرگ سلول شود. بسیاری از فرایندهای چرخه سلولی نقش مهمی در مسیر سیگنالینگ آپوپتوزیز دارند و در نهایت اختلال در آنها موجب رها شدن سیتوکروم c از میتوکندری و آپوپتوز سلول می‌گردد [۲۶]. چرخه سلولی در موجودات پرسلولی پیشرفته مرتبط با خانواده‌ای از پروتئین‌ها مانند کینازهای وابسته به سیکلین (CDK) و سیکلین‌ها (Cyclin) می‌باشد که در تنظیم نقاط ایست و بازرسی چرخه سلولی درگیر هستند [۳۵]. چرخه سلولی در سلول‌های سرطانی HeLa تیمار شده با غلظت‌های زیاد شیکونین، بدلیل کاهش بیان ژن‌های Cyclin-E، CDK4 و CDK6، در انتقال از G1 به S متوقف شده و سنتز DNA در سلول‌ها انجام نشده و متحمل آپوپتوز می‌شوند [۳۳]. همچنین مطالعات مختلف نشان دادند که تیمار با غلظت‌های زیاد شیکونین چرخه سلولی را در سلول‌های سرطانی 143B مغز استخوان در مرحله G1، در سلول‌های سرطانی ملانوما بدخیم در انتقال مرحله G2 به M و سلول‌های سرطانی HepG2 را در مرحله S متوقف می‌کند [۴، ۳۴]. بنابراین مکانیسم فوق ممکن است توسط شیکونین در آستروسیت‌ها نیز بروز نموده باشد و دلیل کاهش تولید NO، بدلیل القاء آپوپتوزیز در حضور شیکونین با غلظت‌های زیاد قابل طرح باشد.

۳) افزایش میزان ROS (Reactive oxygen Species): ROS غالباً در سلول‌ها از طریق متابولیسم سلولی ایجاد می‌گردد و می‌تواند به DNA، پروتئین‌ها و لیپیدها آسیب برساند [۲۳]. شیکونین در غلظت‌های زیاد قادر است سلول‌ها را وادار به تولید مقادیر زیادی ROS کند و در نتیجه آنها را متحمل آسیب و در نهایت آپوپتوز می‌کند. در سلول‌های هیپاتومای بدخیم SK-Hep-1، تیمار با غلظت‌های زیاد شیکونین سلول‌ها را وادار به تولید مقادیر فراوانی ROS می‌کند و از اتلاف آن

شیکونین ($100 \mu\text{M}$ و 50) (شکل ۴) احتمالاً کاهش تولید NO را می‌توان به کاهش جمعیت سلول‌های آستروسیتی در حضور غلظت‌های زیاد شیکونین نسبت داد نه اثر ضد التهابی، بنابراین احتمالاً این فرضیه قابل طرح خواهد بود که شیکونین در غلظت‌های زیاد باعث القاء آپوپتوزیز در آستروسیت‌ها می‌شود و در نتیجه جمعیت سلول‌ها کم شده و میزان NO کاهش می‌یابد. برای اثبات این فرضیه نیز باید هرکدام از مکانیسم‌های محتمل در بروز آپوپتوزیز در حضور شیکونین با غلظت زیاد و سلول‌های آستروسیت فعال بررسی گردد. به هر حال مکانیسم‌های ۱ تا ۴ مطرح شده در ذیل چگونگی القاء آپوپتوزیز را در سلول‌های مختلف توسط شیکونین به نمایش می‌گذارند که یک یا چند مورد آن در بررسی مکانیسمی القاء آپوپتوزیز در آستروسیت‌ها توسط غلظت‌های زیاد شیکونین ممکن است قابل طرح باشند.

۱) تغییر در سطح پروتئین‌های Bcl-2 و Bax درگیر در فرآیند آپوپتوز: مطالعات نشان می‌دهند که پروتئین‌های خانواده Bcl-2 شامل عوامل ضد آپوپتوتیکی مانند Bad و Bak نقش اساسی بوسیله غشای میتوکندری در آپوپتوز ایفا می‌کنند، کاهش Bcl-2 و یا افزایش عامل آپوپتوتیک Bax بطوریکه باعث تغییر کاهشی نسبت Bcl-2/Bax شود، منجر به آسیب غشای میتوکندری شده و مسیر Caspase‌ها فعال شده و سلول آپوپتوز می‌گردد [۱۱]. گزارشات حاکی از آن است که شیکونین در غلظت‌های زیاد خود در سلول‌های سرطانی Osteosarcoma قادر است بیان ژن Bcl-2 را کاهش دهد ولی تغییر واضحی در بیان ژن Bax ایجاد نمی‌کند و در نتیجه نسبت Bcl-2/Bax را کاهش داده و بدنبال آن Caspase3 فعال شده و سلول‌ها را دچار آپوپتوز می‌کند [۴]. در سلول‌های سرطانی کولورکتال تیمار با شیکونین در غلظت‌های زیاد باعث کاهش بیان ژن Bcl-2 می‌شود اما روی بیان ژن Bax اثر مشخصی ندارد و همین مسئله منجر به کاهش نسبت پروتئینی Bcl-2/Bax شده و در نتیجه منجر به آپوپتوز سلول‌ها می‌شود [۱۴]. مطالعات نشان دادند که در سلول‌های سرطانی تیمار شده با غلظت‌های زیاد شیکونین نسبت پروتئینی Bcl2/Bax کاهش یافته و شیکونین باعث القاء آپوپتوز از خلال میتوکندری در مسیر وابسته به آبشار کاسپاز ۳ و ۹ می‌شود [۳۴]. لذا مکانیسم فوق ممکن است توسط

قابل طرح باشد. با تأثیر شیکونین به تنهایی و بدون حضور LPS بر آستروسیت‌ها نتیجه جالب این بود که شیکونین به تنهایی موجب تولید NO نمی‌شود و میزان NO گزارش شده در حد گروه کنترل (سلول‌های بدون دریافت تیمار) می‌باشد، بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که شیکونین نیز مانند مینوسایکلین تنها در حضور LPS است که موجب مهار فعالیت توکسیک این ماده بر سلول‌ها شده و میزان تولید NO را کاهش می‌دهد. با توجه به نتایج مشاهده شده، می‌توان شیکونین را به عنوان یک ترکیب مؤثر در درمان بسیاری از نقص‌های پاتولوژیک مغزی مانند بیماری‌های نورودژنراتیو که در آنها آستروسیت‌های فعال شده منجر به آسیب نورون‌ها و در مجموع آسیب CNS می‌گردد، در نظر گرفت. احتمالاً آثار جانبی استفاده از این دارو با توجه به منشاء بیولوژیک آن کمتر از داروهای ساختگی، شیمیایی و نا آشنا با سیستم‌های زیستی دیگر بوده و همین مسئله توجه بیشتر به شیکونین، داروی گیاهی را به عنوان یک استراتژی جدید برای درمان نقص‌های التهابی نورودژنراتیو توسعه خواهد داد. با این حال اثرات سیتوتوکسیک آن در غلظت‌های زیاد در کاربردهای دارویی باید دقیقاً مد نظر قرار گیرد، ضمن آنکه توجه و خلاقیت در کاربردهای احتمالی مفید آپوپتوتیک غلظت‌های زیاد آن نیز دریچه‌ای از توانایی‌های درمانی بالقوه دیگری از این ماده به روی محققین می‌گشاید.

سپاسگزاری

این مقاله مستخرج از پایان‌نامه مصوب در دانشگاه فردوسی مشهد بوده و با همکاری پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری تهران انجام شده است. بدین وسیله از مؤسسات مذکور نهایت تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

توسط غشای میتوکندری جلوگیری کرده و در نهایت سلول دچار آپوپتوز می‌گردد بطوریکه وقتی سلول‌ها را با آنتی‌اکسیدانتهایی مانند گلوتاتیون یا N-استیل سیستئین پیش درمانی می‌کنند شیکونین دیگر نمی‌تواند سلول را متحمل آپوپتوز کند [۵]. در سلول‌های سرطانی سینه MCF-7، تیمار سلول‌ها با غلظت‌های زیاد شیکونین سبب تولید ROS توسط آنها شده و بدنال آن فعالیت فسفریلاسیون آنزیم ERK افزایش یافته و در نتیجه سلول آپوپتوز می‌گردد [۱۳]. لذا مکانیسم فوق ممکن است توسط شیکونین در آستروسیت‌ها نیز بروز نموده باشد و دلیل کاهش تولید NO، بدلیل القاء آپوپتوز در حضور شیکونین با غلظت‌های زیاد قابل طرح باشد.

۴) مهار آنزیم توپوایزومراز II: آنزیم DNA توپوایزومراز II هدف بسیاری از داروهای ضد توموری می‌باشد، این آنزیم باعث از هم گسیختگی دو رشته DNA شده و پاسخ سلولی به آسیب‌های DNA در جهت بازسازی آن می‌باشد. اما داروهای ضد توموری آن را مهار کرده و در نتیجه عدم بالانس بین فعالیت‌های تخریب DNA و بازسازی آن روی فعالیت‌ها و حیات سلول‌های زنده اثر سوء دارند [۱۶]. شیکونین نیز یکی از داروهای مهار کننده فعالیت توپوایزومراز II است و سبب آسیب به DNA و مرگ سلولی می‌شود. شیکونین با غلظت‌های زیاد قادر است در سلول‌های سرطانی A375-S2، سلول‌های سرطانی کیسه صفرا، سلول‌های سرطانی مغز استخوان و سلول‌های سرطانی HeLa آنزیم DNA توپوایزومراز II را مهار کرده و بدنال آسیب‌های DNA و قطعه قطعه شدن آن منجر به آپوپتوز سلول‌ها می‌شود [۴]. بنابراین مکانیسم فوق ممکن است توسط شیکونین در آستروسیت‌ها نیز بروز نموده باشد و دلیل کاهش تولید NO، بدلیل القاء آپوپتوز در حضور شیکونین با غلظت‌های زیاد

References

[1] Abdi A, Mohagheghi F, Sadraie SH, Dargahi L, Khalaj L, Ahmadiani A, Caspase inhibition in neuroinflammation induced by soluble β amyloid monomer, protects cells from abnormal survival and

proliferation, via attenuation of NF κ B activity. *Physiol Pharmacol* 14 (2010) 211-219.

[2] Blaise GA, Gauvin D, Gangal M, Authier S, Nitric oxide, cell signaling and cell death. *Toxicology* 208 (2005) 177-192.

[3] Calzado MA, Bacher S, Schmitz ML, NF- κ B inhibitors

- for the treatment of inflammatory diseases and cancer. *Curr Med Chem* 14 (2007) 367-376.
- [4] Chang IC, Huang YJ, Chiang TI, Yeh CW, Hsu LS, Shikonin Induces Apoptosis through Reactive Oxygen Species/Extracellular Signal-Regulated Kinase Pathway in Osteosarcoma Cells. *Biol Pharm Bull* 33 (2010) 816-824.
- [5] Chen CH, Chern CL, Lin CC, Lu FJ, Shih MK, Hsieh PY, Liu TZ, Involvement of reactive oxygen species, but not mitochondrial permeability transition in the apoptotic induction of human SK-Hep-1 hepatoma cells by shikonin. *Planta Med* 69 (2003) 1119-1124.
- [6] Chen X, Yang L, Oppenheim JJ, Zack Howard OM, Cellular Pharmacology Studies of Shikonin Derivatives. *Phytother Res* 16 (2002) 199-209.
- [7] Cheng YW, Chang CY, Lin KL, Hu CM, Lin CH, Kang JJ, Shikonin derivatives inhibited LPS-induced NOS in RAW 264.7 cells via downregulation of MAPK/NF-kappaB signaling. *J Ethnopharmacol* 120 (2008) 264-271.
- [8] Ciapetti G, Cennia E, Pratellia L, Pizzoferrato A, *In vitro* evaluation of cell/biomaterial interaction by MTT assay. *Biomaterials* 14 (1993) 359-364.
- [9] D'Acquisto F, May MJ, Ghosh S, Inhibition of nuclear factor kappa B (NFkB): an emerging theme in anti-inflammatory therapies. *Molecular interventions* 2 (2002) 22-35.
- [10] Dong Y, Benveniste EN, Immune Function of Astrocytes. *GLIA* 36 (2001) 180-190.
- [11] Festjens N, van Gurp M, van Loo G, Saelens X, Vandenabeele P, Bcl-2 family members as sentinels of cellular integrity and role of mitochondrial intermembrane space proteins in apoptotic cell death. *Acta Haematol* 111 (2004) 7-27.
- [12] Griess P, Bemerkungen zu der abhandlung der H.H Weselesky und Benedict: Ueber eining azoverbindungen. *Chem Ber* 12 (1879) 426-428.
- [13] Hou Y, Guo T, Wu C, He X, Zhao M, Effect of shikonin on breast cells proliferation and apoptosis in vitro. *Yakugaku Zasshi* 126 (2006) 1383-1386.
- [14] Hsu PC, Huang YT, Tasi ML, Wang YG, Lin JK, Pan MH, Induction of apoptosis by shikonin through coordinative modulation of Bcl-2 family, p27 and p53, release of cytochrome c, and sequential activation of caspase in human colorectal carcinoma cells. *J Agricult Food Chem* 52 (2004) 6330-6337.
- [15] Kim WG, Mohny RP, Wilson B, Jeohn GH, Liu B, Hong JS, Regional difference in susceptibility to lipopolysaccharide-induced neurotoxicity in the rat brain: role of microglia. *J Neurosci* 20 (2000) 6309-6316.
- [16] Larsen AK, Escargueil AE, Skladanowski A, From DNA damage to G2 arrest: the many roles of topoisomerase II. *Prog Cell Cycle Res* 5 (2003) 295-300.
- [17] Liu MH, Lin YS, Sheu SY, Sun JS, Anti-inflammatory effects of daidzein on primary astroglial cell culture. *NutrNeurosci* 12 (2009) 123-134.
- [18] Maragakis NJ, Rothstein JD, Mechanisms of Disease: astrocytes in neurodegenerative disease. *Nat ClinPractNeurol* 12 (2006) 679-689.
- [19] McCarthy KD, Vellis JD, Preparation of Separate Astroglial and Oligodendroglial Cell Cultures from Rat Cerebral Tissue. *J Cell Biol* 85 (1980) 890-902.
- [20] Murphy S, Production of Nitric Oxide by Glial Cells: Regulation and Potential Roles in the CNS. *GLIA* 29 (2000) 1-13.
- [21] Nam KN, Son MS, Park JH, Lee EH, Shikonins attenuate microglial inflammatory responses by inhibition of ERK, Akt, and NF-kB: neuroprotective implications. *Neuropharmacol* 55 (2008) 819-825.
- [22] Papageorgiou VP, Assimopoulou AN, Couladouros EA, Hepworth D, Nicolaou KC, The Chemistry and Biology of Alkannin, Shikonin, and Related Naphthazarin Natural Products. *AngewChemInt Ed* 38 (1999) 270-300.
- [23] Pelicano H, Carney D, Huang P, ROS stress in cancer cells and therapeutic implications. *Drug Resistance* 7 (2004) 97-110.
- [24] Rossi D, Volterra A, Astrocytic dysfunction: Insights on the role in neurodegeneration. *Brain Res Bull* 80 (2009) 224-232.
- [25] Saha RN, Pahan K, Signals for the induction of nitric oxide synthase in astrocytes. *NeurochemInt* 49 (2006) 154-163.
- [26] Sankawa U, Ebizuka Y, Miyazaki T, Isomura Y, Otsuka H, Antitumor activity of shikonin and its derivatives. *Chem Pharm Bull* 25 (1977) 2392-2395.
- [27] Seth P, Koul N, Astrocyte, the star avatar: redefined. *J Biosci* 33 (2008) 405-421.

- [28] Silverman N, Maniatis T, NF- κ B signaling pathways in mammalian and insect innate immunity. *Genes Dev* 15 (2001) 2321-2342.
- [29] Sofroniew MV, Vinters HV, Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol* 119 (2010) 7-35.
- [30] Stephen J, Crocker RF, Frausto J, Milner R, A Novel Method to Establish Microglia-Free Astrocyte Cultures: Comparison of Matrix Metalloproteinase Expression Profiles in Pure Cultures of Astrocytes and Microglia. *GLIA* 56 (2008) 1187-1198.
- [31] Tanaka S, Tajima M, Tsukada M, Tabata M, A comparative study on anti-inflammatory activities of the enantiomers, shikonin and alkanin. *J Nat Prod* 49 (2001) 466-469.
- [32] Volterra A, Meldolesi J, Astrocytes, from Brain Glue to Communication Elements: The Revolution Continues. *Nat Rev Neurosci* 6 (2005) 626-640.
- [33] Wu Z, Wu LJ, Li LH, Tashiro S, Onodera S, Ikejima T, Shikonin regulates HeLa cell death via caspase-3 activation and blockage of DNA synthesis. *Natural Prod Res* 6 (2004) 155-166.
- [34] Yingkun N, Lvsong Z, Huimin Y, Shikonin inhibits the proliferation and induces the apoptosis of human HepG2 cells. *J Physiol Pharmacol* 88 (2010) 1138-1146.
- [35] Yoon Y, Kim YO, Lim NY, Jeon WK, Sung HJ, Shikonin, an ingredient of *Lithospermum erythrorhizon* induced apoptosis in HL60 human premyelocytic leukemia cell line. *Planta Med* 65 (1999) 532-535.
- [36] Yoshida LS, Kawada T, Irie K, Yuda Y, Himi T, Ikemoto F, Takano-Ohmuro H, Shikonin Directly Inhibits Nitric Oxide Synthases: Possible Targets That Affect Thoracic Aorta Relaxation Response and Nitric Oxide Release From RAW 264.7 Macrophages. *J Pharmacol Sci* 112 (2010) 343-351.
- [37] Young P, Hernandez MR, Purification of astrocytes from adult human optic nerve heads by immunopanning. *Brain Res Brain Res Protoc* 12 (2003) 67-76.
- [38] Zimmermann M, Ethical considerations in relation to pain in animal experimentation. *Acta Physiol Scand Suppl* 554 (1986) 221-233.