مقاله تحقیقی

مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی بابل
دوره شانزدهم، شمارهٔ ۸، مرداد ۱۳۹۳، صفحه ۶۲-۵۷

اثر سمیت عصاره آنغوزه برسلولهای ماهیچه ای رده C2C12

جواد محیطی اردکانی(PhD)[1*]، سارا عابدینی(MSc)[2]

۱- گروه بیوشیمی و بیولوژی سلولی – مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علم پزشکی شهید صدوقی یزد
۲- دانشگاه پیام نور مشهد

دریافت: ۹۲/۹/۲۳، اصلاح: ۹۲/۱۰/۱۵، پذیرش: ۹۳/۳/۲۴

خلاصه

سابقه و هدف: از گیاه آنغوزه به طور سنتی در درمان بیماریهای مختلفی از قبیل آسم و درد معده، انگل روده، برگشت معده، آنفلوانزا و نارحتی های عصبی استفاده میشود. اگر چه بعضی مطالعات به اثرات گیاه آنغوزه پرداخته اند ولی اثرات سلولی – مولکولی آن کمتر مطالعه شده است، لذا این مطالعه بـه منظـور تعیـین میـران پلـی فنـول هـای موجود در این گیاه و اثر سمیت آن بر سلول های ماهیچه ای رده C2 C12 بعنوان یک مدل سلولی مصرف کننده گلوکز انجام شده است.

مواد و روشها: ابتدا عصاره آبی– الکلی آنغوزه تهیه شد. سـپس میـزان محتـوای پلـی فنـولی آن بـا اسـتفاده از اسـید گالیـک بـه عنـوان اسـتاندارد، از روش Folin–Ciocalteu's تعیین شد. میزان سمیت این گیاه بر رده سلولهای تمایز یافته C2C12، با تهیه غلظت های ۲۵۰۰-۵۰ میکروگرم بر میکرولیتر عصاره آنغـوزه و اثـر دادن روی سلول ها بمدت ۳ ساعت با استفاده از روش تریپان بلو ارزیابی شد.

یافته ها: استخراج آبی–الکلی عصاره آنغوزه نشان دهنده دارا بودن محتوای پلی فنولی می باشد. نتایج جذب غلظت های عصاره گیاه بصورت خطی با جذب غلظت های اسیدگالیک بعنوان استاندارد پلی فنول ها افزایش می یابد (R^2=۰/۹۹۸۹ در مقایسه با R^2=۹۹۸۶). اثر غلظت های متفاوت عصاره آنغوزه بر سلولهای کشت شده در محیط DMEM نشان داد که عصاره آبی– الکلی آن تا غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میکرولیتر اثر سمی بر سلول ها نداشته و سلول ها پس از سه ساعت در محیط تیمار شده آنغوزه پایدار می باشند و میزان زنده ماندن این سلول ها در این مدت در مقایسه با گروه کنترل تفاوت معنی داری مشاهده نشد.

نتیجه گیری: نتایج این مطالعه نشان می دهد که عصاره آنغوزه تا غلظت های ۲۰۰ میکرو گرم در مدت زمان سه ساعت اثر سمیت براین سلول ها بعنوان یک رده سلولی عضلانی ندارد.

واژه های کلیدی: گیاه آنغوزه، رده سلولی C2C12، ترکیبات پلی فنولی.

مقدمه

آنغوزه رزین بدست آمده از شیرابه های ریشه ها و ریزوم های گیاهی بنام Asa-Foetida است. این گیاه متعلق به خانواده آپیاسه می باشد و دارای سه بخش اصلی شامل: رزین (۶۴-۴۰٪)، صمغ (۲۵٪)، روغن فرار (۱۷-۱۰٪) است. این بخش ها دارای ترکیبات کومارین و کومارین های سزکوئی ترپنی و ترکیبات سولفوری می باشد. مردم کشورهای مختلف خصوصا" مردم هند از گیاه Assa-Foetida بعنوان چاشنی غذا و داروی گیاهی استفاده میکنند (۳-۱). گیاه آنغوزه دارای طعم و بوی تلخ و گس مانندی است که به خاطر ترکیبات سولفوری آن می باشد. این گیاه به طور سنتی در درمان بیماریهای مختلفی از قبیل آسم و درد معده، انگل روده، برگشت معده، آنفلوانزا و نارحتی های عصبی استفاده میشود. اخیرا فارماکولوژیستها و بیولوژیستها در مورد فعالیت های صمغ ریشه گیاه آنغوزه مانند فعالیت های آنتی اکسیدانی، آنتی ویروسی، ضد قارچی– ضد دیابتی و ضد انقباض ماهیچه ای مطالعه کرده اند (۷-۳). در سالهای اخیر آنتی اکسیدانهای طبیعی و ارتباط آنها با سلامتی افراد بسیار مورد توجه محققین بوده است. مطالعات متعددی در رابطه با اثر پلی فنول ها موجود در گیاهان گزارش شده است (۱۰-۸). ولی اثرات سلولی– مولکولی آنها بطور محدود گزارش شده است (۱۴-۱۱). امروزه هدف بیشتر مطالعات انجام شده یا درحال انجام بر گیاهان دارویی، تعیین مکانیسم عملکرد و شفاف سازی جنبه های پنهان خواص فارماکولوژیک آنها است. نظر به اینکه گیاه آنغوزه یکی از گیاهان بومی ایران می باشد و همچنین با عنایت به اینکه سلول های ماهیچه ای رده C2C12 بعنوان یک رده سلولی ماهیچه ای در تحقیقات گیاهان داروئی بطور وسیع استفاده شده است (۱۷-۱۵) لذا هدف از این مطالعه تعیین اثر سمیت عصاره این گیاه بر این سلول و تعیین پلی فنولها آن برای مطالعات آتی جهت شناخت مکانیسمهای سلولی گیاه آنغوزه می باشد.

* مسئول مقاله: دکتر جواد محیطی اردکانی
آدرس: یزد، دانشگاه علوم پزشکی، دانشکده پزشکی، گروه بیوشیمی و بیولوژی سلولی – مولکولی، تلفن: ۰۳۵۱-۸۲۰۱۴۱۰
e-mail:mohiti@ssu.ac.ir

[DOR: 20.1001.1.15614107.1393.16.8.8.2]
[DOI: 10.18869/acadpub.jbums.16.8.57]

مواد و روشها

گیاه آنغوزه از منطقه بیابانی یزد در طول تابستان جمع آوری شد. مواد کشت سلول و مواد دیگر از شرکت Gibco (GrandIsland,NY,USA) یا Sigma–Aldrich خریداری شد.

استخراج آبی–الکلی: عصاره آنغوزه به روش عصاره گیری در محیط آبی–الکلی از پودر خشک شده صمغ آنغوزه تهیه گردید و پس از آب گیری در اتانول از پودر بدست آمده غلظت های ۲۵۰۰–۵۰ میکروگرم بر میکرولیتر تهیه گردید (۱۳).

تعیین محتوای پلی فنولی: ترکیبات پلی فنولی موجود در عصاره گیاه آنغوزه به روش Folin–Ciocalteu's تعیین شد. ۵۰۰ میکرو لیتر از غلظت های مختلف ۲۵۰۰–۵۰ میکروگرم بر میکرولیتر عصاره گیاه با ۲/۵ میلی لیتر معرف Folin–Ciocalteu's مخلوط شد و به مدت ۵ دقیقه در درجه هوای اطاق قرار گرفت. سپس ۲ میلی لیتر از محلول کربنات سدیم ۷/۵ درصد اضافه و اجازه داده شد به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق بماند سپس جذب نمونه ها در طول موج ۷۶۰ نانومتر قرائت شد. همین روش را برای محلول اسید گالیک با غلظت های ۲۵۰–۱۰ میکروگرم بر میکرولیتر بعنوان استاندارد پلی فنولی همراه با نمونه ها انجام شد و جذب آنها قرائت گردید و برای مقایسه دو منحنی از ضریب آماری R^2 استفاده گردید (۱۸).

کشت سلول: سلول های C2C12 (سلول های خطی میوبلاست موش) با محیط کشت DMEM و FBS ۱۰٪ و۵۰ واحد بر میلی لیتر پنیسیلین، ۵۰ میکروگرم برمیلی لیتر استرپتومایسین و ۲/۵ میکروگرم بر میکرولیتر آمفوتریپسین B در دمای 37◦C و CO2=5% کشت داده شد. برای تمایز سلول ها به میوتیوب، سلول های C2C12 در پلیت های ۶ خانه به تعداد ۲×۱۰^{۴} سلول کشت داده شد. بعد از ۴۸ ساعت که سلول ها حدود ۸۰٪ کف پلیت را پوشاند، محیط کشت با ۲٪ horse serum (سرم اسب) جایگزین شد. این عمل تا ۴ روز ادامه یافت تا زمانیکه سلول ها کاملا" به شکل میوتیوب تمایز یابند (۱۶). برای ارزیابی میزان پلی فنول های آن، پس از شستشو سلولها با بافر PBS با استفاده از بافر لیز کننده هموژن تهیه شد (۱۵). سنجش ارزیابی سمیت عصاره گیاه بر سلولهای C2C12: اندازه گیری viability (زنده بودن) سلول C2C12 در مقابل گیاه آنغوزه تعیین کننده مقدار دوز استفاده شده این گیاه است. Viability سلول با روش تریپان بلو سنجیده شد. سلول C2C12 در پلیت های ۹۶ خانه به تعداد ۵×۱۰^{۳} سلول به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شد. پس از تهیه سوسپانسیون از طریق سانتریفوژ از رسوب مرحله آخر سوسپانسیونی با محیط کشت حاوی ۱۰ درصد FBS ساخته شد و آنرا به نسبت مساوی با رنگ تریپان بلو (۵۰ لاندا سوسپانسیون + ۵۰ لاندا تریپان بلو) مخلوط کرده و زیر لام هموسیتومتر سلولها شمارش گردید.

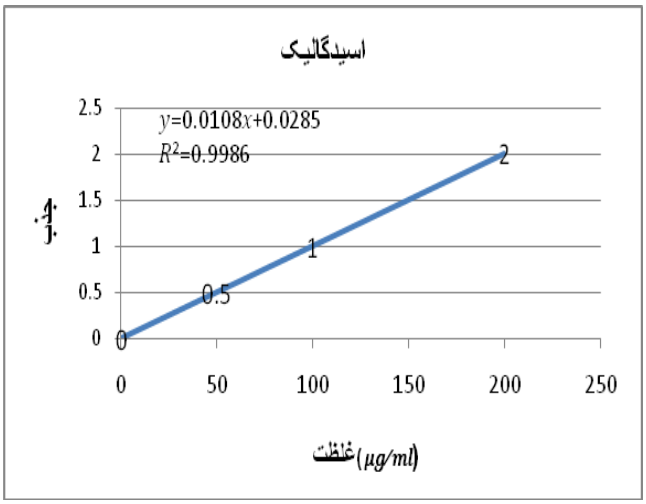
پس از اضافه کردن تریپان بلو به نسبت مساوی به سوسپانسیون سلولی و پس از حدود دو دقیقه سلولهای مرده زیر میکروسکوپ به رنگ آبی دیده میشوند که میتوان آنرا بصورت درصد در مقایسه با سلولهای رنگ نشده گزارش کرد (۱۵).

آنالیز آماری: مقادیر به دست آمده به صورت means ±SD گزارش شده اند. برای مقایسه بین گروه ها از آزمون دانکن استفاده شد و p<۰/۰۵ معنی دار در نظر گرفته شد.

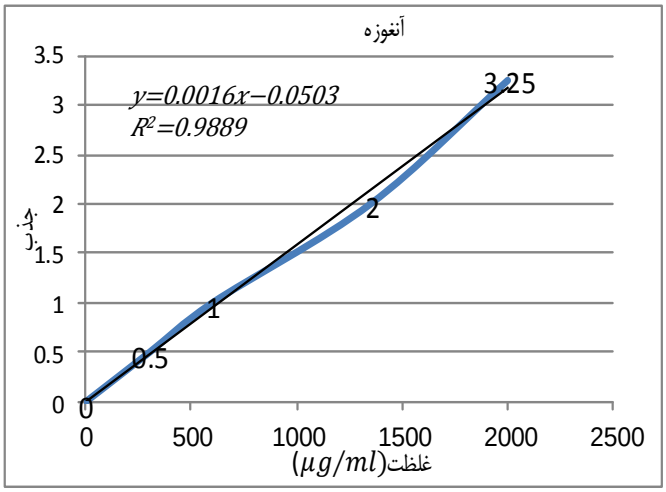
یافته ها

سنجش محتوای پلی فنولی آنغوزه: مقدار جذب پلی فنول ها در عصاره بطور موازی با افزایش غلظت استاندارد افزایش یافت و این بیان کننده ماده اصلی موجود در عصاره می باشد (R^2=۰/۹۹۸۰ در مقابل R^2=۰/۹۹۸۶ برای استاندارد) (نمودار ۱). با استفاده از میزان جذب استاندارد محتوای پلی فنلی هر میکروگرم از عصاره به اندازه ۰/۰۵±۰/۵ میکرومول اسید گالیک است.

سمیت عصاره آنغوزه: Viability سلول ها در این غلظت های ۱۰ تا ۲۰۰ میکروگرم بر میکرولیتر گیاه تفاوت معنی داری ندارد و در نتیجه این سلول ها تا غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میکرولیتر قابل استفاده می باشد (n=۴ ،p>۰/۰۵) (نمودار ۲).



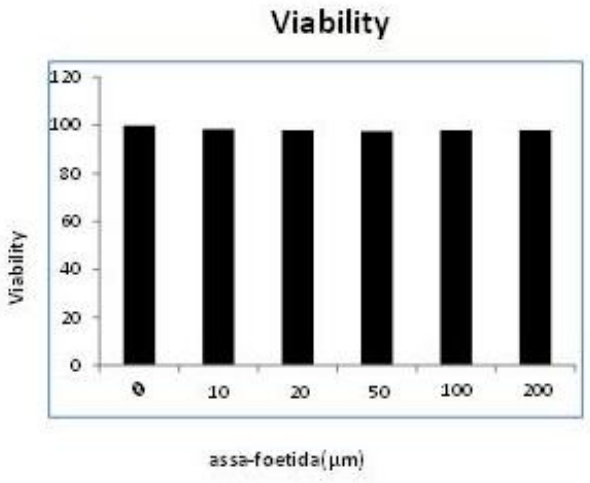
الف



ب

نمودار ۱. جذب پلی فنول های اسید گالیک به عنوان نمونه استاندارد (الف) و عصاره آنغوزه (ب).

[DOR: 20.1001.1.15614107.1393.16.8.8.2]
[DOI: 10.18869/acadpub.jbums.16.8.57]



نمودار ۲. میزان زنده بودن سلول ها در غلظت های متفاوت عصاره آنغوزه بر روی سلولهای C2C12 بعد از سه ساعت.

بحث و نتیجه گیری

نتایج این مطالعه نشان می دهد که گیاه آنغوزه منابع غنی از آنتی اکسیدانی می باشد. ترکیبات پلی فنولی بعضی از گیاهان می توانند تاثیرات ضد سرطانی و ضد التهابی داشته باشند. بطور مثال برخی ترکیبات پلی فنولی موجود در عصاره آنغوزه، دارچین و چای سبز بر روی سلول های دخیل در متابولیسم توانسته اند عملکرد انسولین را شبیه سازی کنند و سبب از بین رفتن عکس الم های منجر به دیابت، مقاومت به انسولین و تجمع چربی در این سلولها شوند (۲۰و۱۹). از آنجائیکه امروزه آنتی اکسیدان های موجود در گیاهان مورد توجه محققین قرار گرفته است (۲۱). در این مطالعه میزان پلی فنول موجود در عصاره آن در مقایسه با اسیدگالیک بعنوان استادار پلی فنولی مورد ارزیابی قرار گرفت. گیاه آنغوزه منابع غنی از آنتی اکسیدانی می باشد. در مطالعه که در دانشگاه علوم پزشکی مشهد انجام شد، ضمن آنالیز شیمیایی گیاه و نشان دادن پلی فنول های اصلی موجود در گیاه، اثر آنتی اکسیدانی آن را به وجود پلی فنل های اسیدفرولیک در مدل موشها نشان دادند (۱۴). عضلات اسکلتی مسئول بیش از ۷۵٪ مصرف گلوکز در پاسخ به انسولین است و نیز مهمترین بافت در تعادل انرژی از این طریق است. سلولهای C2C12 که یک رده سلولی عضلات اسکلتی موش می باشد، مدل خوبی برای انجام مطالعات اثر دارو های گیاهی می باشد (۲۲و۲۰). Nedachi و همکارانش در مطالعه ای استفاده از رده سلولی C2C12 را بعنوان مدل مناسب برای مطالعات سلولی- مولکولی شرح دادند (۲۳). Martin و همکارانش که اثر سرم های تمایز دهنده را بر روی سلول های C2C12 و L6 بررسی کردند، در نهایت نشان دادند که سلول های C2C12 در مقابل شرایط متفاوت سازگاری بهتری از خود نشان میدهد (۲۴). در این مطالعه اثرات سمیت عصاره این گیاه بر روی این رده سلولی بعنوان یک رده سلولی مناسب برای مطالعات گیاهان داروئی انجام شد و همچنانکه نتایج نشان داد غلظت های ۲۰۰-۱۰ میکرو گرم بر میکرولیتر عصاره هیدرو الکلی استخراج شده، اثر سیتوتوکسی بر این نوع سلول ها نداشته و Viability (زنده بودن) سلول ها که از طریق تست تریپان بلو آزمایش شد هیچگونه تغییر معنی داری در مقایسه با کنترل مشاهده نشد.

نتایج حاصل از مطالعه ما نشان داد که آنغوزه بعنوان گیاهی که امروزه خواص ضددیابتی آن مورد بررسی قرار دارد و به عنوان یک شبه انسولین عمل می کنند، می تواند کاندید مناسبی برای مطالعات جامع تر چه در زمینه های بالینی و چه در زمینه های سلولی- مولکولی باشد. در این مطالعه نشان داده شد که یکی از ترکیبات آن پلی فنول هایی هستند که می توانند بعنوان آنتی اکسیدانها عمل کنند. رده سلولی C2C12 رده ای بسیار مناسب برای مطالعه متابولیسم وابسته به انسولین گلوکز با واسطه Glut4 می باشد زیرا این رده سلولی می تواند تحت شرایط متفاوت میزان بیان مولکول Glut4 را تغییر دهد (۱۷و۱۶). در این مطالعه نیز نشان داده شد که علارغم وجود ترکیبات سولفوری تا غلظت های ۲۰۰ میکرو گرم عصاره آنغوزه در مدت زمان سه ساعت اثر سمیت براین سلول ها بعنوان یک رده سلولی عضلانی نداشته و می تواند جهت مطالعات بعدی استفاده گردد.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1393.16.8.8.2]
[DOI: 10.18869/acadpub.jbums.16.8.57]

Toxicity Effect of Assa-Foetida L Extract on C2C12 Cells

J. Mohiti-Ardekani (PhD) [1*], S. Abedini (MSc) [2]

1. Department of Biochemistry & Molecular Biology, Faculty of Medicine, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, I.R. Iran

2. Payame Noor University, Mashhad, I.R. Iran

J Babol Univ Med Sci; 16(8); Aug 2014; pp: 57-62

Received: Dec 14th 2013, Revised: Jan 5th 2014, Accepted: Jun 14th 2014.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: Assa-Foetida L is traditionally used in treatment of different diseases including asthma, roundworm, stomach reflex, flu and nervous disease. Although some studies have done on Assa-Foetida properties, but little studies have been done on its cellular and molecular effects. The aim of this study was to evaluate the amount of polyphenols in Assa-Foetida L and its toxicity effect on C2C12 as a cell model of glucose consumer.

METHODS: At first, hydroalcoholic extract of Assa-Foetida L was prepared. The polyphenols of Assa-Foetida was determined using gallic acid as a standard by Folin–Ciocalteu's method. The toxicity of the herbal on C2C12 cells was evaluated using Tripan blue at concentration of 50-2500µg/µl for 3 hours.

FINDINGS: Hydroalcoholic extract of Assa-Foetida L contain polyphenol contents. Absorbance of Assa-Foetida L increases linearly with gallic acid absorbance **(**R^2=0.9989 vs R^2=9986). Different concentrations of Assa-Foetida L extract showed that its hydro-alcoholic extract up to 200 µg/µl concentration had no toxicity effect on C2C12 and the cells were stable in treated culture of Assa Foetida after 3 hours. There was no significant difference in viability rate of cells between treated and control groups.

CONCLUSION: The results of this study showed that Assa-Foetida L extract up to 200 µg/µl concentrations had no toxicity effect on these cells after 3 hours.

KEY WORDS: *Assa-Foetida, C2C12 cells, Polyphenolic compounds.*

Please cite this article as follows:

Mohiti-Ardekani J, Abedini S. Toxicity effect of Assa-Foetida L extract on C2C12 cells. J Babol Univ Med Sci 2014;16(8):57-62.

* **Corresponding Author; J. Mohiti-Ardekani (PhD)**

Address: Department of Biochemistry & Molecular Biology, Faculty of Medicine, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, I.R. Iran

Tel: + 98 351 8201410

E-mail: mohiti_99@yahoo.com

[DOR: 20.1001.1.15614107.1393.16.8.8.2]

[DOI: 10.18869/acadpub.jbums.16.8.57]

References

1.Abd El-Razek MH, Ohta S, Hirata T. Terpenoid coumarins of the genus Ferula. Heterocycles 2003;60:689-716.

2.Abu-Zaiton AS. Anti-diabetic activity of Ferula assafoetida extract in normal and alloxan-induced diabetic rats. Pak J Biol Sci 2010;13(2):97-100.

3.Abd El-Razek MH, Ohta S, Ahmed AA, Hirata T. Sesquiterpene coumarins from the roots of Ferula assa-Foetida. Phytochemistry 2001;58(8):1289-95.

4.Al-Khalil S, Aqel M, Afifi F, Al-Eisawi D. Effects of an aqueous extract of Ferulas ovina on rabbit and guinea pig smooth muscle. J Ethnopharmacol 1990;30(1):35-42.

5.Najm W, Lie D. Herbals used for diabetes, obesity, and metabolic syndrome. Primary Care 2010;37(2):237-54.

6.Eigner D, Scholz D. Ferula assa-foetida and Curcuma longa in traditional medical treatment and diet in Nepal. J Ethnopharmacol 1999;67(1):1-6.

7.Ross IA. Medicinal plants of the world: Chemical constituents, traditional and modern medicinal uses. 1st ed. Totowa: Humana Press Inc 2005; pp: 223-34.

8.Siwaswamy SN, Balachandran S, Balanehru S, Sivaramakrishnan VM. Mutagenic activity of south Indian food items. Indian J Exp Biol 1991;29:730-7.

9.Sitara U, Niaz I, Naseem J, Sultana N. Antifungal effect of essential oilson in vitro growth of pathogenic fungi. Pak J Botany 2008;40(1):409-14.

10.Tyler VE, Brady LR, Robbers JE. Pharmacognosy. 7th ed. Philadelphia: Lea & Febiger 1976; pp: 2341-58.

11.Ebrahimzadeh MA, Pourmorad F, Bekhradnia AR. Iron chelating activity, phenol and flavonoid content of some medicinal plants from Iran. Afr J Biotech 2008;7(18):3188-92.

12.Hanhineva K, Torronen R, Bondia-Pons I, et al. Impact of dietary polyphenols on carbohydrate metabolism. Int J Molecular Sci 2010;11(4):365-402.

13.Helal EG, Mostafa AM, MhMood AF, Kahwash AA. Hypoglycemic and hyperinsulinemic effects of ferula assafoetida on diabetic malealbino rats. Egyp J Hosp Med 2004;21:95-108.

14.Akhlaghi F, Rajaei Z, Hadjzadeh MR, Iranshahi M, Alizadeh M. Antihyperglycemic effect of asafoetida (ferula assafoetida oleo-gum-resin)in streptozotocin-induced diabetic rat. World Applied Sci J 2012;17(2):157-62.

15.Absalan A, Mohiti-Ardakani J, Hadinedoushan H, Khalili MA. Hydro-alcoholic cinnamon extract, enhances glucose transporter isotype-4 translocation from intracellular compartments into the cytoplasmic membrane of C2C12 myotubes. Indian J Clin Biochem 2012;27(4):351-6.

16.Yaffe D, Saxel O. Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle. Nature 1977;270(5639):725-7.

17.Ahmadipour F, Vakili T, Absalan A, et al. C2C12 cell line is a good model to explore the effects of herbal extracts on GLUT4 expression and translocation. Iran J Diabetes Obesity 2012;4(4):143-51.

18.Singleton VL, Rossi JA. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungtic acid reagents. Am J Enol Vitic 1965;16(3):144-58.

19.Rodriguez SK, Guo W, Liu L, Band MA, Paulson EK, Meydani M. Green tea catechin, epigallocatechin-3-gallate, inhibits vascular endothelial growth factor angiogenic signaling by disrupting the formation of a receptor complex. Int J Cancer 2006,118(7):1635-44.

20.Tapiero H, Tew KD, Ba GN, Mathé G. Polyphenols: do they play a role in the prevention of human pathologies? Biomed Pharmacother 2002;56(4):200-7.

21.Kaur C, Kapoor HC. Anti-oxidant activity and total phenolic content of some Asian vegetables. Int J Food Sci Technol 2002;37(2):153-61.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1393.16.8.8.2]
[DOI: 10.18869/acadpub.jbums.16.8.57]

22.Smith CW, Klaasmeyer JG, Edeal JB, Woods TL, Jones SJ. Effects of serum deprivation, insulin and dexamethasone on polysome percentages in C2C12 myoblasts and differentiating myoblasts. Tissue Cell 1999;31(4):451-8.

23.Nedachi T, Kanzaki M. Regulation of glucose transporters by insulin and extracellular glucose in C2C12 myotubes. Am J Physiol Endocrinol Metab 2006;291(4):E817-28.

24.Martin S, Slot JW, James DE. GLUT4 trafficking in insulin-sensitive cells. A morphological review. Cell Biochem Biophys 1999;30(1):89-113.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1393.16.8.8.2]
[DOI: 10.18869/acadpub.jbums.16.8.57]