

بررسی اثر ۳-او-استیل-بتا-بوسولیک اسید بر بیان ژن اینترلوکین-۶ در رده‌ی سلولی گلیوبلاستوما‌ی انسانی

آتوسا حفیظی^۱، سعیدرضا خاتمی^۲، حمید گله‌داری^۳

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: کندر، صمغ رزین درخت‌های جنس بوسولیا است که در طب قدیم ایران بر اثرات ضد التهابی و ضد توموری آن تأکید شده است. گلیوبلاستوما از بدخیم‌ترین سرطان‌های مقاوم به پرتودرمانی و شیمی‌درمانی در بزرگسالان است. هدف از انجام این مطالعه، بررسی اثر ماده‌ی مؤثره‌ی کندر، ۳-او-استیل-بتا-بوسولیک اسید، بر بیان اینترلوکین-۶ در رده‌ی سلولی گلیوبلاستوما‌ی انسانی بود.

روش‌ها: رده‌ی سلولی گلیوبلاستوما‌ی انسانی از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران خریداری و با غلظت‌های مختلف ۳-او-استیل-بتا-بوسولیک اسید به مدت ۲۴ ساعت تیمار شد و تأثیر آن بر میزان بقای سلولی با استفاده از روش MTT ارزیابی شد و Half maximal inhibitory concentration (IC₅₀) محاسبه گردید. سلول‌های کشت شده با غلظت‌های ۵، ۱۵ و ۲۵ میکرومولار ۳-او-استیل-بتا-بوسولیک اسید تیمار گردید. RNA استخراج و complementary DNA (cDNA) ساخته شد و برای سنجش میزان بیان اینترلوکین-۶ به روش Real-time polymerase chain reaction (Real-time PCR) مورد استفاده قرار گرفت.

یافته‌ها: میزان IC₅₀ برای ۳-او-استیل-بتا-بوسولیک اسید معادل ۳۹/۸۸ میکرومولار به دست آمد و غلظت‌های ۵، ۱۵ و ۲۵ میکرومولار ۳-او-استیل-بتا-بوسولیک اسید، به صورت معنی‌دار و در حالت وابسته به دز، سبب کاهش بیان اینترلوکین-۶ شدند ($P < 0.05$).

نتیجه‌گیری: نتایج حاصل از این آزمایش، حاکی از اثر ضد التهابی و ضد توموری ۳-او-استیل-بتا-بوسولیک اسید از طریق کاهش بیان اینترلوکین-۶ در محیط التهابی سلول‌های توموری گلیوبلاستوما می‌باشد. از این رو، می‌تواند به عنوان ماده‌ای سودمند در درمان سرطان گلیوبلاستوما مورد توجه قرار بگیرد.

واژگان کلیدی: گلیوبلاستوما، اینترلوکین-۶، بوسولیک اسید

ارجاع: حفیظی آتوسا، خاتمی سعیدرضا، گله‌داری حمید. بررسی اثر ۳-او-استیل-بتا-بوسولیک اسید بر بیان ژن اینترلوکین-۶ در رده‌ی سلولی گلیوبلاستوما‌ی انسانی. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۸؛ ۳۷ (۵۱۶): ۱۲۵-۱۳۱

مقدمه

گلیوبلاستوما، شایع‌ترین تومور بدخیم سیستم عصبی مرکزی است که در نخاع یا مغز بروز می‌کند. منشأ گلیوبلاستوما از سلول‌های آستروسیت است و ۲۰ درصد کل تومورهای داخل جمجمه‌ای و ۶۰ درصد تومورهای آستروسیتی را به خود اختصاص می‌دهد (۱). شیوع کلی گلیوبلاستوما ۳-۲ نفر در هر ۱۰۰۰۰۰ نفر است و با وجود درمان‌های تهاجمی شامل برداشت تومور توسط جراحی و پرتودرمانی منطقه‌ای و شیمی‌درمانی سیستمیک، همچنان میانگین امید به زندگی از زمان تشخیص تومور زیر ۱۸ ماه است (۲). در بافت

توموری گلیوبلاستوما، سطوح بالایی از اینترلوکین‌های التهابی از جمله اینترلوکین-۶ مشاهده شده است و مطالعات حاکی از ارتباط بین سطوح بالای اینترلوکین-۶ و افزایش توان حمله و گسترش گلیوبلاستوما می‌باشد. بر همین اساس، پژوهش‌های متعددی بر روی کاهش عملکرد اینترلوکین-۶ در جهت کمک به درمان گلیوبلاستوما تمرکز کرده‌اند (۳-۴).

اینترلوکین-۶ در پاسخ به تحریکات و عوامل خارجی و یا داخلی همچون جهش‌های آنکوژنی در سلول‌های بدخیم تولید می‌شود. نقش اساسی اینترلوکین-۶ در توسعه‌ی گلیوبلاستوما توسط

۱- دانشجوی دکتری، گروه زیست‌شناسی، دانشکده‌ی علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

۲- دانشیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده‌ی علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

۳- استاد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده‌ی علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

نویسنده‌ی مسؤول: آتوسا حفیظی

به دست آمده از درخت‌های جنس بوسولیا از خانواده‌ی Burseraceae می‌باشد (۹). بیش از ۲۰۰ ترکیب مختلف در صمغ رزینی گونه‌های مختلف گیاهان جنس بوسولیا شناخته شده است، اما ترکیب اصلی تشکیل دهنده‌ی رزین که عمده‌ی اثرات ضد التهابی کندر نیز به آن مربوط می‌شود، اسیدهای بوسولیک هستند که شامل تری‌ترین‌های پنج حلقه‌ای، گروه کربوکسیل و حداقل یک گروه کاربندی دیگر می‌باشند. ۳۰ درصد رزین بوسولیا را اسیدهای بوسولیک تشکیل می‌دهند. از میان اسیدهای بوسولیک، اسیدهای بتا-بوسولیک جایگاه درمانی ویژه‌ای را به خود اختصاص داده‌اند. بتا-بوسولیک اسید، کتو-بتا-بوسولیک اسید و استیل-بتا-بوسولیک اسید در آپوپتوز سلول‌های سرطانی، به ویژه تومورهای مغزی و سلول‌های سرطان خون و کولون مؤثر بوده‌اند (۱۰).

۳-او-استیل-بتا-بوسولیک اسید با وزن مولکولی ۴۹۸/۷۴ گرم/مول و فرمول شیمیایی C32H50O4 از بتا-بوسولیک اسیدهای دارای گروه استیل و از مواد مؤثره‌ی موجود در کندر است که در این پژوهش، به منظور بررسی خواص ضد التهابی و ضد توموری، اثر آن بر بیان ژن اینترلوکین-۶ در سلول‌های گلیوبلاستوما‌ی انسانی مورد بررسی قرار گرفت.

روش‌ها

رده‌ی سلولی گلیوبلاستوما‌ی انسانی 1321N1 از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران خریداری و در محیط کشت انستیتو پاستور (DMEM) Dulbecco's modification of Eagle medium دارای (FBS) Fetal bovine serum ۱۰ درصد (Gibco, UK)، ۱۰۰ واحد/میلی‌لیتر پنی‌سیلین و ۱۰۰ میکروگرم/میلی‌لیتر استرپتومایسین (Gibco, UK) در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد، رطوبت ۹۵ درصد و ۵ درصد دی‌اکسید کربن (CO₂) در فلاسک کشت داده شد. در مرحله‌ی بعد، جهت بررسی اثرات سیتوتوکسیک ۳-او-استیل-بتا-بوسولیک اسید بر سلول‌های 1321N1 و محاسبه‌ی Half maximal inhibitory concentration (IC₅₀)، آزمون (MTT) به صورت ۳ بار تکرار انجام شد (۱۱)؛ به این ترتیب که در هر خانه از پلیت ۹۶ خانه‌ای، ۲۰۰۰۰ سلول کاشته شد و پس از ۲۴ ساعت و کسب اطمینان از چسبیدن سلول‌ها به کف چاهک‌ها، محیط سلول‌ها با محیط کشت دارای غلظت‌های ۱۰۰-۰ میکرومولار ۳-او-استیل-بتا-بوسولیک اسید تعویض شد و ۲۴ ساعت پس از تیمار ۱۵ میکرولیتر MTT با غلظت ۵ میلی‌گرم/میلی‌لیتر به هر یک از خانه‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای اضافه شد و پس از ۴ ساعت انکوبه شدن در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد،

Weissenberger و همکاران نشان داده شد. آن‌ها نشان دادند که موش‌های ترانسژنی که در آستروسیت‌های خود دارای نقص در عملکرد اینترلوکین-۶ بودند، با وجود داشتن توانایی بیان آنکوژن SRC، نمی‌توانستند تومورهای گلیوبلاستوما را ایجاد نمایند (۷). انتقال پیام اینترلوکین-۶ با اتصال اینترلوکین-۶ به کمپلکس گیرنده‌های هترومری آن در غشای پلاسمایی آغاز می‌شود. این هترومرا توسط گیرنده‌ی اینترلوکین-۶ و گیرنده‌ی انتقال پیام عمومی گلیکوپروتئین ۱۳۰ ایجاد می‌شوند. نکته‌ی جالب این‌که هر دو گیرنده در بافت‌های گلیوبلاستوما و سلول‌های بنیادی (Stem cell) مشتق شده از گلیوبلاستوما در سطوح بالایی بیان می‌شوند که خود شاهده‌ی بر نقش اینترلوکین-۶ در عملکرد سلول‌های توموری است (۵).

اینترلوکین-۶ به نوبه‌ی خود، سبب فعال شدن عامل نسخه‌برداری Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) می‌شود. زمانی که بیماران مبتلا به گلیوبلاستوما‌ی پیشرفته با بیماران مبتلا به درجات پایین‌تر تومورهای مغزی مقایسه شدند، مقادیر بالاتری از STAT3 فعال در مبتلایان به گلیوبلاستوما مشاهده شد (۵).

فعال شدن STAT3 به واسطه‌ی اینترلوکین-۶، سبب پیشبرد حمله و مهاجرت در سلول‌های گلیوبلاستوما‌ی U251، T98G و U87MG گردید و با افزایش بیان و ترشح MMP-2 Matrix metalloproteinases-2، یک پروتاز دخیل در تحرک سلول‌های گلیوبلاستوما، همراهی نشان داد (۶). به علاوه، اینترلوکین-۶ آزاد شده از سلول‌های مجاور در میکروگلیاهای خاص، به شدت سبب تحریک حمله‌ی سلول‌های گلیوبلاستوما شد (۷). این داده‌ها هم‌راستا با داده‌های به دست آمده از آزمایش‌هایی است که نشان می‌دهند مهار STAT3 سبب کاهش پتانسیل حمله و مهاجرت سلولی در گلیوبلاستوما می‌شود (۸).

از آن‌جاکه گلیوبلاستوماها تومورهایی هستند که به لحاظ ریخت‌شناسی، فنوتیپ و ویژگی‌های ژنتیکی بسیار ناهمگونند و مرزهای بین بافت توموری و بافت سالم مجاور نامشخص است، برداشت کامل تومور غیر ممکن می‌باشد. از این رو، مقاومت بالای این تومورها به درمان‌های رایج، پرتودرمانی و شیمی‌درمانی، سبب نیاز به دستیابی به راه‌های جدید در کنار درمان‌های متداول گلیوبلاستوما شده است که می‌تواند راه‌گشایی در جهت بهبود وضعیت این بیماران باشد.

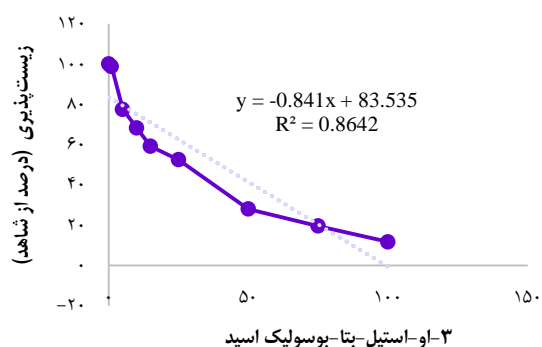
در سال‌های اخیر، طب سنتی و پتانسیل بالای آن در درمان بیماری‌ها به خصوص سرطان، توجه زیادی را به خود معطوف کرده است. از جمله محصولات گیاهی رایج و در دسترس با اثرات ضد توموری اثبات شده در برخی از سرطان‌ها، کندر است که صمغ رزین

جدول ۱. توالی و مشخصات پرایمرهای به کار رفته در آزمایش (Real-time PCR) Real-time polymerase chain reaction

پرایمر	توالی	طول (جفت باز)	دمای ذوب درجه‌ی سانتی‌گراد	میزان توالی GC (%)	طول محصول
F-بتا-اکتین	5'-GAGCATCCCCAAAGTTCACA-3'	۲۱	۶۰/۵۵	۵۲/۳۸	۱۰۳
R-بتا-اکتین	5'-GGGACTTCTGTAAACAACGCA-3'	۲۱	۶۰/۵۴	۵۲/۳۸	
F اینترلوکین-۶	5'-GTGTGAAAGCAGCAAAGAGGC-3'	۲۱	۶۰/۶۰	۵۲/۳۸	۱۴۲
R اینترلوکین-۶	5'-TACCTCAAACCTCCAAAAGACCAGTG-3'	۲۵	۶۰/۹۲	۴۴	

یافته‌ها

اثر کشندگی غلظت‌های ۱۰۰-۰ میکرومولار ۳-او-استیل-بتا-بوسولیک اسید بر روی سلول‌های رده‌ی I321N1 برای ۲۴ ساعت توسط آزمون MTT بررسی شد. همان‌طور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود، میزان بقای سلول‌ها با افزایش غلظت ۳-او-استیل-بتا-بوسولیک اسید کاهش یافت؛ به گونه‌ای که در غلظت ۳۹/۸۸ میکرومولار ۵۰ درصد سلول‌ها توانایی زیستی خود از دست دادند ($CI_{50} = 39/88 \mu M$) و در غلظت ۷۵ میکرومولار، میزان زیست‌پذیری سلولی به ۲۰/۴۶ درصد کاهش یافت و در غلظت ۱۰۰ میکرومولار به نزدیک صفر رسید ($P < 0/001$).



شکل ۱. اثر ۳-او-استیل-بتا-بوسولیک اسید بر زیست‌پذیری سلول‌های گلیوبلاستوما‌ی انسانی

پس از تیمار سلول‌ها با غلظت‌های ۵، ۱۵ و ۲۵ میکرومولار ۳-او-استیل-بتا-بوسولیک اسید به مدت ۲۴ ساعت، RNA استخراج شد و در بررسی اسپکتروفتومتری، نسبت جذب ۲۶۰ به ۲۸۰ آن بین ۱/۸ و ۲ به دست آمد که نشان دهنده‌ی درجه‌ی بالای خلوص RNA و عدم آلودگی آن با پروتئین و DNA ژنومی می‌باشد. پس از سنتز cDNA و سنجش بیان اینترلوکین-۶ در مقابل Housekeeping gene بتا-اکتین، داده‌های حاصل از Real-time PCR به روش Ct delta delta واکاوی شد و نمودار میانگین بیان اینترلوکین-۶ در نمونه‌های تیمار شده در مقایسه با نمونه‌ی شاهد رسم شد (شکل ۲). آزمون Independent t نشان داد

رطوبت ۹۵ درصد و ۵ درصد CO₂، به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر Dimethyl sulfoxide (DMSO) اضافه و به مدت ۲۰ دقیقه Shake گردید.

در نهایت، جذب ۵۷۰ نانومتر با طول موج رفرنس ۶۳۰ نانومتر توسط دستگاه خوانش میکروپلیت BIO INTELLECTICA خوانده شد و IC₅₀ با استفاده از نرم‌افزار Excel در محدوده‌ی ۹۵ درصد برابر با ۳۹/۸۸ میکرومولار محاسبه گردید. سپس، سلول‌های گلیوبلاستوما در پلیت‌های ۶ خانه‌ای کشت داده شد و با غلظت‌های ۵، ۱۵ و ۲۵ میکرومولار ۳-او-استیل-بتا-بوسولیک اسید به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد. RNA سلولی با استفاده از (۵۰) RNeasy Mini Kit دارای شماره‌ی کاتالوگ Cat No./ID: 74104 (Qiagen, USA) بر اساس روش کار ارائه شده در کیت استخراج RNA از نانوگرم از RNA استخراج شده از هر نمونه با استفاده از کیت PrimeScript 1st strand cDNA Synthesis (Takara, Japan) به complementary DNA (cDNA) تبدیل شد. پرایمرهای نوکلئوتیدی جهت انجام واکنش Real-time polymerase chain reaction (Real-time PCR) برای ژن‌های بتا-اکتین به عنوان شاهد داخلی و اینترلوکین-۶ با استفاده از نرم‌افزار Oligo-7 طراحی گردید و در نرم‌افزار NCBI primer blast، از اختصاصی بودن پرایمر اطمینان حاصل شد (جدول ۱).

Real-time PCR با استفاده از ۱۲/۵ میکرولیتر SYBR Green PCR Master Mix (Takara, Japan)، ۵ پیکومول از پرایمرهای پیش‌رو (Forward) و معکوس (Reverse) و ۱/۵-۲ میکرولیتر از cDNA سنتز شده در مرحله‌ی پیشین معادل ۵۰ نانوگرم/میکرولیتر برای هر واکنش در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر در شرایط آرایه شده توسط شرکت سازنده انجام شد. واکاوی داده‌های Real-time PCR با استفاده از روش Ct delta delta انجام شد. تمام نمونه‌ها به سطوح شاهد داخلی بتا-اکتین طبیعی سازی شدند. تمام اندازه‌گیری‌ها به صورت سه بار تکرار انجام شد. اختلاف آماری با استفاده از آزمون Independent t محاسبه و $P < 0/050$ به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

مطالعه‌ی حاضر، تأثیر یکی از مواد مؤثره‌ی صمغ کندر، ۳-او-استیل-بتا-بوسولیک اسید، بر سلول‌های سرطان گلیوبلاستوما مورد بررسی قرار گرفت. در زمینه‌ی بررسی اثر سمیت سلولی عصاره‌ی کندر بر سلول‌های توموری مطالعاتی انجام شده است.

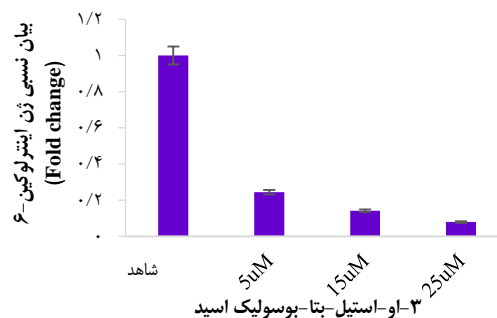
در تحقیقی توسط فروزنده و همکاران، با تهیه‌ی عصاره‌ی از کندر و تأثیر آن بر رده‌ی سلولی HeLa، خاصیت مهاری عصاره‌ی هیدروالکلی کندر بر رشد سلول‌های توموری بررسی شد. نتایج نشان داد که این عصاره، با اثرات سیتوتوکسیک بر سلول‌های سرطانی، سبب مرگ این سلول‌ها می‌شود؛ به طوری که با افزایش دز عصاره، رشد سلول‌های سرطانی بیشتر مهار گردید. به عنوان مثال، در زمان ۴۸ ساعت، درصد مرگ سلولی از ۴۹/۱۹ درصد (در غلظت ۱۲/۵ میکروگرم/میلی‌لیتر) به ۷۵ درصد (در غلظت ۱۰۰ میکروگرم/میلی‌لیتر) افزایش یافت که این اختلاف، از نظر آماری معنی‌دار بود (۱۳).

در مطالعه‌ی دیگری، Bhushan و همکاران، توانایی زیستی سلول‌های لوسمی HL-60 در حضور عصاره‌ی کندر را بررسی کردند. بعد از ۲۴ ساعت، توانایی زیستی سلول‌ها در دز ۱۲ میکروگرم/میلی‌لیتر کاهش یافته بود؛ در حالی که بعد از ۴۸ و ۷۲ ساعت، رشد سلول‌های توموری بیشتر مهار گردید (۱۴). در مطالعه‌ی Hoernlein و همکاران در زمینه‌ی بررسی اثرات ضد توموری استیل-۱۱-کتو-بتا-بوسولیک اسید بر رده‌ی سلولی HL-60، IC₅₀ معادل ۳۰ میکرومولار گزارش شد (۱۵).

در تحقیقی در زمینه‌ی اثر بوسولیک اسید بر روی رده‌ی سلولی سرطان پروستات PC-3 میزان IC₅₀ معادل ۴۹/۱۵-۴۵/۸۰ میکروگرم/میلی‌لیتر محاسبه شد (۱۶). در مطالعه‌ی حاضر، در بررسی اثر ۳-او-استیل-بتا-بوسولیک اسید بر زیست‌پذیری سلول‌های گلیوبلاستوما، IC₅₀ برابر ۳۹/۸۸ میکرومولار به دست آمد که معادل ۱۹/۸۸ میکروگرم/میلی‌لیتر بود. نتایج مطالعات مختلف نشان می‌دهند که برای انواع بوسولیک اسیدها در سلول‌های سرطانی مختلف، یک گستره‌ی اثر IC₅₀ میسر است و علت تفاوت میان مقادیر IC₅₀ مشاهده شده در مطالعات مختلف را می‌توان به تفاوت بودن رده‌های سلولی و انواع مشتقات بوسولیک اسید مورد استفاده، مرتبط دانست. پس از به دست آوردن حد سمیت اثر ۳-او-استیل-بتا-بوسولیک اسید بر رده‌ی سلولی گلیوبلاستوما، تأثیر آن بر میزان بیان اینترلوکین-۶ بررسی شد؛ چرا که بر اساس مطالعات انجام شده، میکرومحیط سلول‌های توموری در موفقیت و شکست درمان سرطان‌های مختلف نقش مهمی ایفا می‌کند و اینترلوکین-۶ یکی از اعضای کلیدی این میکرومحیط است (۱۷).

Ohno و همکاران، نشان دادند که فقدان یا میزان پایین

که میانگین بیان ژن اینترلوکین-۶ در رده‌ی سلولی 1321N1 تیمار شده با ۳-او-استیل-بتا-بوسولیک اسید، نسبت به نمونه‌ی شاهد در حالت وابسته به دز، کاهش معنی‌داری یافته است و بیشترین کاهش مربوط به غلظت ۲۵ میکرومولار بوده است ($P < 0/050$).



شکل ۲. مقایسه‌ی میانگین بیان ژن اینترلوکین-۶ (IL6) در رده‌ی سلولی گلیوبلاستوما‌ی انسانی تیمار شده با غلظت‌های مختلف ۳-او-استیل-بتا-بوسولیک اسید

نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان داد که هر سه غلظت ۳-او-استیل-بتا-بوسولیک اسید به طور معنی‌داری ($P < 0/050$)، توانایی کاهش بیان اینترلوکین-۶ را نسبت به گروه شاهد داشته است. در غلظت ۵ میکرومولار، بیان اینترلوکین-۶ به میزان ۷۵ درصد نسبت به نمونه‌ی شاهد کاهش معنی‌داری نشان داد. در غلظت ۱۵ میکرومولار کاهش بیان اینترلوکین-۶ نسبت به نمونه‌ی شاهد ۸۶ درصد و معنی‌دار بود ($P < 0/001$). در غلظت ۲۵ میکرومولار ۳-او-استیل-بتا-بوسولیک اسید، میزان بیان اینترلوکین-۶ نسبت به نمونه‌ی شاهد به میزان ۹۲ درصد کاهش معنی‌دار نشان داد ($P < 0/001$). تفاوت بیان میان غلظت‌های ۵ و ۱۵ میکرومولار ۳-او-استیل-بتا-بوسولیک اسید ($P = 0/092$) و نیز میان غلظت‌های ۱۵ و ۲۵ میکرومولار ($P = 0/212$) از لحاظ آماری معنی‌دار نبود. میزان کاهش بیان در غلظت ۲۵ میکرومولار نسبت به نمونه‌ی تیمار شده با ۵ میکرومولار نیز معنی‌دار بود ($P = 0/27$).

بحث

با وجود پیشرفت‌های گسترده در حیطه‌ی پزشکی و درمان، سرطان همچنان دومین علت مرگ و میر به حساب می‌آید. از این رو، همواره نیاز به یافتن راه‌های درمانی جدید و داروهایی با اثرات جانبی حداقل در کنار روش‌های درمانی موجود احساس می‌شود (۱۲). از طرفی، گیاهان دارویی به دلیل اثرات جانبی کم و در دسترس بودن، توجه زیادی را به خود معطوف کرده‌اند و تحقیقات روزافزونی بر اثرات درمانی آن‌ها در بیماری‌های مختلف نظیر سرطان‌ها متمرکز کرده‌اند. در

در پژوهشی، Han و همکاران اثربخشی داروی Cpd188 را در کاهش رشد سلول‌های توموری گلیوبلاستوما در محیط آزمایشگاه و در محیط زنده اثبات کردند. Cpd188 توسط هدف قرار دادن مسیر Janus kinase/STAT3 (JAK) اثر خود را اعمال می‌نماید (۱۹). از آن جایی که بر طبق نتایج به دست آمده از این پژوهش و همگام با نتایج حاصل از مطالعات پیشین، تیمار رده‌ی سلولی گلیوبلاستوما‌ی انسانی با ۳-او-استیل-بتا-بوسولیک اسید، سبب کاهش بیان معنی‌دار اینترلوکین-۶ می‌شود. از این رو، می‌توان آن را به عنوان کاندیدایی جهت ساخت داروهای جدید در زمینه‌ی درمان گلیوبلاستوما دانست و به طور کلی، می‌توان در زمینه‌ی درمان سرطان‌هایی که با افزایش بیان اینترلوکین-۶ و مسیرهای پایین‌دست آن همراه هستند، استفاده از ترکیبات ۳-او-استیل-بتا-بوسولیک اسید را به عنوان یکی از اهداف کمک درمانی در کنار داروهای رایج مطرح نمود.

تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته از پایان‌نامه‌ی مصوب دانشگاه شهید چمران اهواز به شماره‌ی ۹۳۱۸۹۰۶ بود که با حمایت مالی آن دانشگاه در گروه ژنتیک انجام شد. بدین وسیله از تمامی افرادی که در اجرای این مطالعه با پژوهشگران همکاری نمودند، قدردانی می‌گردد.

اینترلوکین-۶ در میکرومحیط توموری، سبب افزایش ایمنی نوع ۱ و افزایش بازده ایمونوتراپی در سرطان‌ها می‌شود (۱۸). در مطالعه‌ی Shan و همکاران، مشاهده شد که در خون و مایع مغزی-نخاعی بیماران مبتلا به گلیوبلاستوما در مقایسه با نمونه‌های شاهد، میزان بالاتری از اینترلوکین-۶ مشاهده می‌شود و این میزان، با افزایش درجه‌ی بدخیمی تومور، افزایش نشان می‌دهد. همچنین، مشاهده شد که با افزودن اینترلوکین-۶ به رده‌های سلولی گلیوبلاستوما، میزان حمله‌ی سلول‌های توموری افزایش می‌یابد (۴).

در مطالعه‌ی دیگری Wang و همکاران نشان دادند که غیر فعال کردن اینترلوکین-۶ یا گیرنده‌ی اینترلوکین-۶ توسط RNAهای کوتاه سنجاق سری در سلول‌های بنیادی رده‌ی سلولی گلیوبلاستوما، سبب کاهش تهاجم سلول‌ها و افزایش آپوپتوز می‌شود که این اتفاقات از طریق کاهش عملکرد عامل پایین‌دست اینترلوکین-۶ یعنی STAT3 واسطه‌گری می‌شوند (۳). بر همین اساس، می‌توان میزان بیان بالای اینترلوکین-۶ را عامل کلیدی در تهاجم و بدخیمی گلیوبلاستوما دانست و کاهش بیان و عملکرد اینترلوکین-۶ را به عنوان یک رویکرد درمانی در سرطان گلیوبلاستوما مطرح نمود؛ از این رو، در حال حاضر تلاش برای یافتن داروهای مسدودکننده‌ی مسیرهای پایین‌دست اینترلوکین-۶ جهت کمک به درمان سرطان بسیار رایج است.

References

1. Yeung YT, McDonald KL, Grewal T, Munoz L. Interleukins in glioblastoma pathophysiology: implications for therapy. *Br J Pharmacol* 2013; 168(3): 591-606.
2. Paolillo M, Boselli C, Schinelli S. Glioblastoma under siege: An overview of current therapeutic strategies. *Brain Sci* 2018; 8(1): E15.
3. Wang H, Lathia JD, Wu Q, Wang J, Li Z, Heddleston JM, et al. Targeting interleukin 6 signaling suppresses glioma stem cell survival and tumor growth. *Stem Cells* 2009; 27(10): 2393-404.
4. Shan Y, He X, Song W, Han D, Niu J, Wang J. Role of IL-6 in the invasiveness and prognosis of glioma. *Int J Clin Exp Med* 2015; 8(6): 9114-20.
5. Weissenberger J, Loeffler S, Kappeler A, Kopf M, Lukes A, Afanasieva TA, et al. IL-6 is required for glioma development in a mouse model. *Oncogene* 2004; 23(19): 3308-16.
6. Liu Q, Li G, Li R, Shen J, He Q, Deng L, et al. IL-6 promotion of glioblastoma cell invasion and angiogenesis in U251 and T98G cell lines. *J Neurooncol* 2010; 100(2): 165-76.
7. Zhang J, Sarkar S, Cua R, Zhou Y, Hader W, Yong VW. A dialog between glioma and microglia that promotes tumor invasiveness through the CCL2/CCR2/interleukin-6 axis. *Carcinogenesis* 2012; 33(2): 312-9.
8. Michaud-Levesque J, Bousquet-Gagnon N, Beliveau R. Quercetin abrogates IL-6/STAT3 signaling and inhibits glioblastoma cell line growth and migration. *Exp Cell Res* 2012; 318(8): 925-35.
9. Krohn K, Rao MS, Raman NV, Khalilullah M. High-performance thin layer chromatographic analysis of anti-inflammatory triterpenoids from *Boswellia serrata* Roxb. *Phytochem Anal* 2001; 12(6): 374-6.
10. Liu JJ, Nilsson A, Oredsson S, Badmaev V, Zhao WZ, Duan RD. Boswellic acids trigger apoptosis via a pathway dependent on caspase-8 activation but independent on Fas/Fas ligand interaction in colon cancer HT-29 cells. *Carcinogenesis* 2002; 23(12): 2087-93.
11. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; 65(1-2): 55-63.
12. Kitano H. Cancer as a robust system: Implications for anticancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2004; 4(3): 227-35.
13. Forouzandeh S, Naghsh N, Salimi S, Jahantigh D. Cytotoxic effect of boswellia serrata hydroalcoholic extract on human cervical carcinoma epithelial cell line. *Med Lab J* 2014; 8(1): 7-13. [In Persian].
14. Bhushan S, Kumar A, Malik F, Andotra SS, Sethi VK, Kaur IP, et al. A triterpenediol from *Boswellia serrata* induces apoptosis through both the intrinsic and extrinsic apoptotic pathways in human leukemia HL-60 cells. *Apoptosis* 2007; 12(10): 1911-26.

15. Hoernlein RF, Orlikowsky T, Zehrer C, Niethammer D, Sailer ER, Simmet T, et al. Acetyl-11-keto-beta-boswellic acid induces apoptosis in HL-60 and CCRF-CEM cells and inhibits topoisomerase I. *J Pharmacol Exp Ther* 1999; 288(2): 613-9.
16. Gandhi T, Gandhi K, Monapara K. Evaluation of Anti-cancer activity of Boswellic acid and Montelukast sodium against human prostate cancer cell line PC-3. *Iran J Pharm Sci* 2016; 12(4): 15-32. [In Persian].
17. Binnewies M, Roberts EW, Kersten K, Chan V, Fearon DF, Merad M, et al. Understanding the tumor immune microenvironment (TIME) for effective therapy. *Nat Med* 2018; 24(5): 541-50.
18. Ohno Y, Toyoshima Y, Yurino H, Monma N, Xiang H, Sumida K, et al. Lack of interleukin-6 in the tumor microenvironment augments type-1 immunity and increases the efficacy of cancer immunotherapy. *Cancer Sci* 2017; 108(10): 1959-66.
19. Han TJ, Cho BJ, Choi EJ, Kim DH, Song SH, Paek SH, et al. Inhibition of STAT3 enhances the radiosensitizing effect of temozolomide in glioblastoma cells in vitro and in vivo. *J Neurooncol* 2016; 130(1): 89-98.

The Effect of 3-O-Acetyl –Beta –Boswellic Acid on Interleukin-6 Gene Expression in the Human Glioblastoma Cell Line

Atousa Hafizi¹, Saeid Reza Khatami², Hamid Galehdari³

Original Article

Abstract

Background: Frankincense is a gum resin of *Boswellia* trees genus that has been favored in the Iranian traditional medicine for its anti-inflammatory and anti-tumor properties. Glioblastoma is one of the most malignant adult cancers that is resistant to radiation therapy and chemotherapy. The aim of this study was to investigate the effect of an active ingredient of frankincense, 3-O-acetyl-beta-boswellic acid, on interleukin-6 expression in human glioblastoma cell line.

Methods: Human glioblastoma cell line was obtained from cell bank of Pasteur Institute of Iran, and treated with different concentrations of 3-O-acetyl-beta-boswellic acid for 24 hours. The effect on cell survival was evaluated using MTT assay, and half maximal inhibitory concentration (IC₅₀) was calculated as well. Cultured cells were treated with concentrations of 5, 15, and 25 μM of 3-O-acetyl-beta-boswellic acid. RNA was extracted and converted to complementary DNA (cDNA), and used for interleukin-6 expression studies via real-time polymerase chain reaction (PCR).

Findings: IC₅₀ was calculated as 39.88 μM. 3-O-acetyl-beta-boswellic acid at concentrations of 5, 15, and 25 μM significantly reduced the expression of interleukin-6 in a dose-dependent manner ($P < 0.05$).

Conclusion: The results of this study indicate anti-inflammatory and anti-tumor effects of 3-O-acetyl-beta-boswellic acid by decreasing the expression of interleukin-6 in the inflammatory environment of glioblastoma tumor cells. Therefore, it can be considered as a beneficial ingredient in the treatment of glioblastoma.

Keywords: Glioblastoma, Interleukin-6, Boswellic acid

Citation: Hafizi A, Khatami SR, Galehdari H. **The Effect of 3-O-Acetyl-Beta-Boswellic Acid on Interleukin-6 Gene Expression in the Human Glioblastoma Cell Line.** J Isfahan Med Sch 2019; 37(516): 125-31.

1- PhD Candidate, Department of Biology, School of Science, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

2- Associate Professor, Department of Biology, School of Science, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

3- Professor, Department of Biology, School of Science, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

Corresponding Author: Atousa Hafizi, Email: hz.atousa@yahoo.com