

## بررسی مقایسه‌ای اثرات رزمارینیک اسید و کارنوزیک اسید بر بقای سلولی، متابولیسم سرآمید و واکنش‌های آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت در سلول‌های سرطانی رده Hep-G2

نرگس نجارپور<sup>۱\*</sup>، مسعود مشهدی اکبر بوجار<sup>۱</sup>

دریافت: ۱۳۹۴/۱۰/۱۵ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۳/۲۳

<sup>۱</sup> گروه علوم سلولی مولکولی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران  
<sup>\*</sup>مسئول مکاتبات: najarpour@khu.ac.ir

**چکیده.** کارنوزیک اسید و رزمارینیک اسید جزء خانواده پلی‌فنول‌ها هستند که در گیاه رزماری یافت می‌شوند. این مطالعه به بررسی مقایسه‌ای اثرات این دو ترکیب با تکیه بر متابولیسم سرآمید در سلول‌های Hep-G2 پرداخته است. در این مطالعه تجربی سلول‌های Hep-G2 در محیط DMEM حاوی سرم جنین گاو و آنتی‌بیوتیک کشت شدند. سپس سلول‌ها با رقت دوگانه از دو ماده کارنوزیک اسید و رزمارینیک اسید از غلظت ۰ تا ۷۰ میکرومولار به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شدند و زیست‌پذیری سلول‌ها به روش MTT تعیین شد. جهت سنجش فعالیت آنزیم کاسپاز ۳ از دستگاه اسپکتروفتومتر و برای اندازه‌گیری سطح سرآمید از روش HPLC استفاده شد. در این مطالعه همچنین فعالیت آنزیم‌های اسفنگومیلیناز، اسید سرآمیداز و گلوکوزیل سرآمید سنتاز سنجش شد. کارنوزیک اسید سبب افزایش حیات سلولی در سلول‌های Hep-G2 به گونه وابسته به دوز با کاهش سطح سرآمید و کاهش فعالیت آنزیم‌های کاسپاز ۳، اسفنگومیلیناز، گلوکوزیل سرآمید سنتاز و افزایش فعالیت آنزیم اسید سرآمیداز شد. رزمارینیک اسید از غلظت ۵۰ میکرومولار به بعد سبب کاهش بقای سلولی با افزایش سطح سرآمید و افزایش فعالیت آنزیم اسفنگومیلیناز و کاهش فعالیت آنزیم‌های اسید سرآمیداز و گلوکوزیل سرآمید سنتاز شد. همچنین این ماده از غلظت ۴۰ میکرومولار به بعد سبب افزایش فعالیت آنزیم کاسپاز ۳ شده است. هرچند در اغلب موارد پلی‌فنول‌ها باعث القاء آپوپتوز و کاهش درصد بقای سلولی شده‌اند اما در بعضی مواقع اثر معکوس داشته و سبب رشد سلولی شده‌اند.

**واژه‌های کلیدی.** پلی‌فنول‌ها، کاسپاز ۳، اسید سرآمیداز، اسفنگومیلیناز، گلوکوزیل سرآمید سنتاز

## A comparative study on the effects of rosmarinic acid and carnosic acid on the cell viability, ceramide metabolism and antioxidant enzyme responses in the Hep-G2 cancer cell line

Narges Njarpour<sup>1\*</sup>, Masoud Mashhadi Akbar Boojar<sup>1</sup>

Received: 04/01/2016 / Accepted: 12/06/2016

<sup>1</sup> Department of Cell and Molecular Biology, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran.

\*Correspondent author: najarpour@khu.ac.ir

**Abstract.** Carnosic acid and Rosmarinic acid belong to a family of polyphenols found in Rosemary. In this study the effects of these two compounds were compared based on ceramide metabolism in cell line of Hep-G2. Hep-G2 cells were cultured in DMEM, supplemented with fetal bovine serum and antibiotics. Cells with double dilution were then cultured with Carnosic acid and Rosmarinic acid (with concentrations 0 to 70  $\mu$ M for 24 h) and viability of cells was determined by MTT method. A spectrophotometer and HPLC assay was used to measure of caspase-3 activity and the level of ceramide. The activity of such enzymes as sphingomylinase, acid ceramidase, glucosylceramide synthase was also measured. Carnosic acid increased cell viability in Hep-G2 cells by reducing ceramide levels and the activity of the other enzymes such as caspase-3, sphingomylinase, glucosylceramide synthase and also by increasing the activity of the ceramidase enzyme acid. Rosmarinic acid in concentrations of up to 50  $\mu$ M decreased cell viability by increasing ceramide levels and the activity of caspase-3, sphingomylinase and also by decreasing activity of enzymes such as acid ceramidase and glucosylceramide synthase. This substance also in concentrations of up to 40  $\mu$ M caused increasing activity of caspase-3 enzyme. Although in most cases polyphenols resulted in induction of apoptosis and decreased cell viability, in some cases they affected inversely and caused cell growth.

**Keywords.** polyphenols, caspase-3, acid ceramidase, sphingomylinase, glucosylceramide synthase

## مقدمه

کارسینوما کبدی (Hcc) نوعی سرطان کبدی است که اکثراً پس از ابتلا به بیماری‌هایی مثل هپاتیت ویروسی B و C یا سیروز کبدی که در بیشتر موارد به علت مصرف الکل است رخ می‌دهد (Kumar et al., 2003). هپاتوسل کارسینوما هنگامی که یک موتاسیون در ماشین سلولی رخ دهد، به تکثیر بی‌رویه سلول‌ها منجر شود و یا ناشی از پرهیز سلول از پدیده مرگ سلولی آپوپتوز باشد به وجود می‌آید (Kumar et al., 2003).

از آنجا که بسیاری از میوه‌ها، سبزی‌ها و گیاهان یک‌ساله نقش مهمی در مرحله شروع و نیز جلوگیری از پیشرفت سرطان ایفا می‌کنند، تعداد بی‌شماری از بیماران در سراسر دنیا از گیاهان دارویی به منظور حفظ سلامتی استفاده می‌کنند. بنابراین، دانشمندان نگاه عمیقی به خواص بیولوژیکی و قدرت درمانی این محصولات دارند (Nejad Shahrokhadi, 2009). دو ترکیب رزمارینیک اسید و کارنوزیک اسید در گیاه رزماری (*Rosmarinus Officinalis* L) یافت می‌شوند که خواص ویژه‌ای از جمله ضدسرطان، ضدالتهاب و آنتی‌اکسیدان دارند (Jin min et al., 2014; Shahadat & Rahman, 2014).

در تحقیقات اخیر، مشخص شده که ارزیابی سطح سرامید می‌تواند در تعیین خوش‌خیم و بدخیم بودن سلول‌ها نقش داشته باشد به نحوی که بین میزان افزایش سطح سرآمید در بافت تومور بدخیم ارتباطی وجود دارد (Levy & Futerman, 2010).

براین اساس، مطالعه حاضر به بررسی تأثیر رزمارینیک اسید و کارنوزیک اسید بر بقای سلول‌های رده Hep-G2 می‌پردازد و بیان می‌کند که تغییر در متابولیسم سرآمید به وسیله این دو ماده چه عملکردی بر متابولیسم این سلول‌ها دارد.

## مواد و روش‌ها

در این مطالعه، دو ماده رزمارینیک اسید و کارنوزیک اسید از شرکت سیگماآلدردیج خریداری شد و غلظت‌های ۰، ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۶۰ و ۷۰ میکرومولار از این دو ماده تهیه شد و در پلیت‌های ۹۶ تایی با تعداد سلول‌های ۵۰۰۰ به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شد و اثر عصاره بر زنده‌بودن سلول‌ها با استفاده از آزمون MTT بررسی شد.

## کشت سلولی

سلول‌های سرطانی کبد (Hep-G2) از سرم‌سازی رازی حصارک، ایران تهیه شد. سپس، در محیط کشت DMEM به همراه ۵ درصد سرم جنین گاوی (FBS)، پنی‌سیلین و استرپتومایسین کشت شد. سلول‌ها در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی-گراد در رطوبت ۹۰ درصد و CO<sub>2</sub> ۵ درصد قرار گرفتند. بعد از ۲۴ ساعت، سلول‌ها در معرض غلظت‌های مختلف دو ترکیب قرار گرفتند. هم‌زمان، نمونه‌های کنترل بدون تیمار به صورت سه‌تایی در نظر گرفته شد.

## بررسی زنده‌بودن سلول‌ها

زنده‌بودن سلول‌ها توسط آزمایش MTT [۳، ۵، ۴] دی‌متیل‌تيازول ۵، ۲ دی‌فنیل‌تترازولیوم (Masada, 1973) ارزیابی شد. به طور خلاصه، سلول‌ها به تعداد ۵۰۰۰ در هر چاهک از پلیت ۹۶ تایی سلولی قرار گرفت و با غلظت‌های مختلف دو ترکیب رزمارینیک اسید و کارنوزیک اسید تحت تیمار قرار گرفت. محیط کشت رویی دور ریخته شد. سلول‌ها در محلول MTT (۵ میلی‌لیتر در PBS) به مدت چهار ساعت قرار گرفتند و پس از محلول‌سازی فورمازان توسط ۱۰۰ میکرولیتر DMSO و جذب نوری در ۵۷۰ نانومتر با دستگاه اسپکترومتر خوانده شد.

## سنجش فعالیت آنزیم کاسپاز ۳

جهت سنجش فعالیت آنزیم کاسپاز ۳، بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون سلول‌ها با مواد تیماری، محیط رویی دور ریخته شد. به سلول‌ها تریپسین افزوده، سانتریفوژ صورت گرفته و بافر لیزکننده سلول به نمونه‌ها اضافه شد (Aly, 2014). سپس، مخلوط لیزشده سانتریفوژ شد. محلول حاوی سوبسترای AC-DEVD-PNA به محلول رویی اضافه شد و در انکوباتور قرار گرفت. جذب محلول رویی حاصل جداشدن پارانیتر و آنیلید در ۴۰۵ نانومتر به وسیله اسپکترومتر سنجش شد.

## سنجش فعالیت آنزیم اسفنگومیلیناز

فعالیت این آنزیم با اضافه کردن سوبسترای اسفنگومیلین به عصاره سلولی آغاز می‌شود (Liu, 2014). در اثر فعالیت این

Cer و دارای زمان بازداری ۴/۲ دقیقه است، در مقایسه با پیک استاندارد تعیین شد.

### سنجش سطح سرآمید

برای اندازه‌گیری سلولی سرآمید، ابتدا آنزیم اسید سرآمیداز نو ترکیب به عصاره سلولی اضافه شد که در نتیجه آن، سرآمید موجود در نمونه به طور کامل هیدرولیز شده و به اسفنگوزین (Sphingosine) تبدیل شد (He, 2005). ماده ویژه‌ای به نام نفتالین ۲ و ۳ دی‌آلدید (NDA) که خاصیت فلورسانسی دارد به اسفنگوزین متصل می‌شود. حال، sphingosine-NDA توسط HPLC فاز معکوس از عصاره سلولی جدا شده و در دکتور فلورسانس تعیین مقدار شد. میزان سرآمید دقیقاً معادل اسفنگوزین به دست آمده از روش HPLC در همان نمونه است.

### بررسی آماری

هر آزمایش در سه مرتبه تکرار و مقایسه میانگین داده‌ها با شاهد و تیمارها با هم با آزمون ANOVA و نرم افزار SPSS به دست آمد.

### نتایج

#### تأثیر دو تیمار کارنوزیک اسید و رزمارینیک اسید بر زیست پذیری سلولی

سلول‌های Hep-G2 تحت اثر دو تیمار کارنوزیک اسید و رزمارینیک اسید در غلظت‌های مختلف تفاوت‌های بارز و وابسته به دوز با یکدیگر نشان دادند. تحت اثر تیمار کارنوزیک اسید، با افزایش غلظت این تیمار درصد بقای سلولی افزایش یافت. در اثر تیمار با رزمارینیک اسید با افزایش غلظت از ۵۰ تا ۷۰ میکرومولار کاهش در درصد حیات سلولی مشاهده شد. نتایج سنجش رنگ MTT با اندازه‌گیری جذب نوری (OD) بر اساس غلظت عصاره‌های مورد استفاده در مقایسه با میزان تکثیر مولکولی به صورت رسم نمودار به دست آمد.

#### تأثیر دو تیمار کارنوزیک اسید و رزمارینیک اسید بر فعالیت آنزیم کاسپاز ۳

در اثر تیمار کارنوزیک اسید بر سلول‌های رده Hep-G2 میزان

آنزیم اسفنگومیلین به سرآمید و فسفریل کولین تبدیل می‌شود. با اضافه شدن آنزیم آلکالین فسفاتاز، فسفریل کولین به کولین هیدرولیز می‌شود و کولین هم در حضور آنزیم کولین اکسیداز به بتائین و  $H_2O_2$  تبدیل می‌شود؛ حال، با حضور آنزیم پراکسیداز ماده  $H_2O_2$  با ADHP ترکیب شده و ماده فلورسانس حاصل این واکنش (resorufin) در طول موج تحریک ۵۳۵ نانومتر و طول موج نشر ۵۹۰ نانومتر به وسیله فلورسانس اسپکترومتر ارزیابی شد.

### سنجش فعالیت آنزیم اسید سرآمیداز

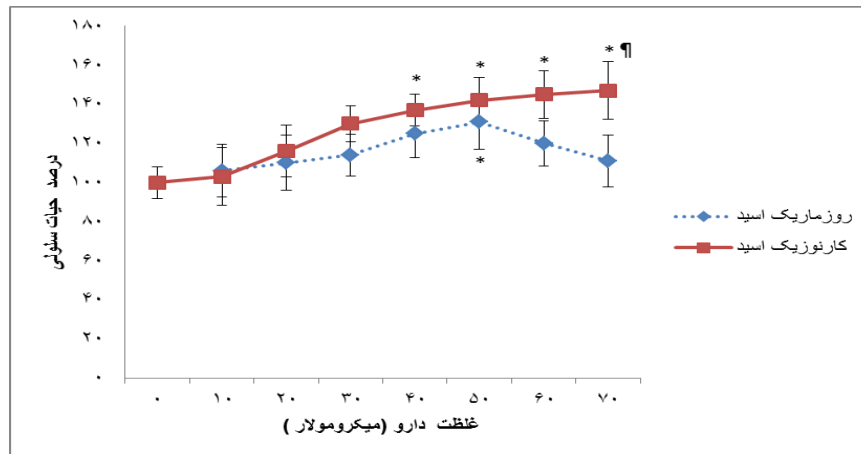
برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم اسید سرآمیداز، در بافر استات سدیم و تریتون X-100 سوسترای NBD-ceramide اضافه و انکوبه شد (Krishna, 2013). سپس، با افزودن کلروفرم-متانول واکنش متوقف شد و سانتریفوژ انجام گرفت و محلول رویی برداشته شد. این لوله به مثابه سوسترای کلیواژ نشده کنترل در دستگاه فلورسانس اسپکترومتر در طول موج‌های خروج و نشر به ترتیب ۴۰۰ و ۵۵۰ نانومتر از نظر راندمان مورد سنجش قرار گرفت. هم‌زمان با این واکنش یک لوله آزمایش دیگر مانند فوق تهیه شد. با این تفاوت که بعد از افزودن سوستر عصاره سلول اضافه شد و راندمان فلورسانس این لوله هم‌زمان با لوله کنترل در طول موج‌های خروج و نشر به ترتیب ۴۳۰ و ۵۵۰ نانومتر تعیین شده نسبت راندمان کلیواژ شده / کلیواژ نشده برحسب درصد ارزیابی شد.

### سنجش فعالیت آنزیم گلوکوزیل-سرآمید سنتاز

آنزیم گلوکوزیل-سرآمید سنتاز واکنش ذیل را کاتالیز می‌کند:  
 $C6\text{-NBD-Cer} + \text{udp-glucose} = C6\text{-NBD-glucose} + \text{Cer} + \text{udp}$   
 فسفات-سالین و EDTA مخلوط و سانتریفوژ شد و مایع رویی udp-glucose و سوسترای C6-NBD-Cer اضافه شد (Hayashi, 2005). آن‌گاه از محلول نهایی حاوی محصول ۲۰ میکرولیتر به دستگاه HPLC با ستون نرمال و قطر داخلی ۴/۵ داده شد که دکتور آن در طول موج ۴۷۰ نانومتر بر آب تحریک و ۵۳۰ نانومتر برای دریافت پرتو تابشی تنظیم شده است. فعالیت آنزیم از طریق محاسبه سطح زیرمنحنی پیک فلورسانس ماده تولیدی که در واقع C6-NBD-glucose -

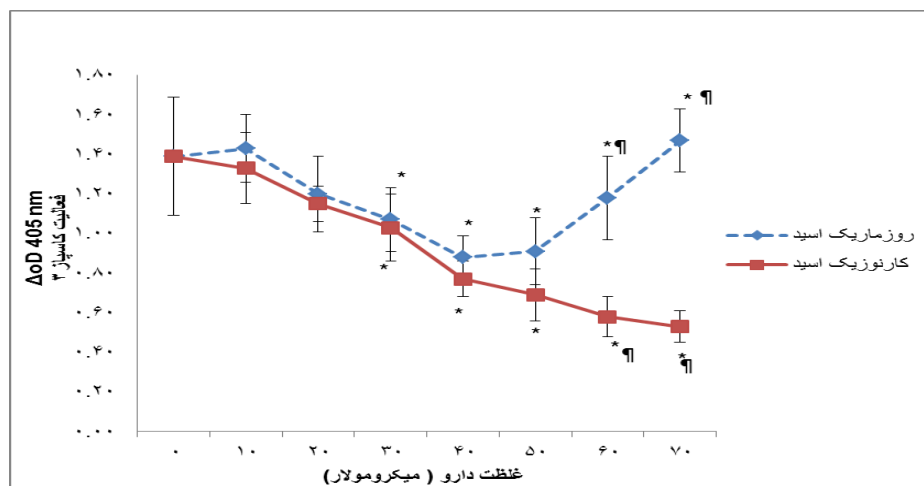
تا ۷۰ میکرومولار افزایش یافت. نمودار زیر نتایج حاصل  
سنجش فعالیت آنزیم کاسپاز ۳ را تحت اثر دو تیمار کارنوزیک  
اسید و رزمارینیک اسید نشان می‌دهد.

فعالیت آنزیم کاسپاز ۳ در روند وابسته به دوز کاهش یافت. در  
اثر تیمار رزمارینیک اسید مشاهده شد که فعالیت آنزیم کاسپاز  
۳ پس از طی روند کاهشی با افزایش غلظت تیمار، از غلظت ۴۰



شکل ۱- تأثیر غلظت های مختلف دو ماده تحت مطالعه بر بقای سلول های Hep-G2 بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون. \* تفاوت معنی دار نسبت به شاهد (  $P < 0.05$  )؛ تفاوت معنی دار یک تیمار نسبت به تیمار دیگر (  $P < 0.05$  ).

Fig. 1. Effects of the various concentrations of the two studied substances on Hep-G2 cell viability after 24 h of incubation. Significant difference compared to control ( $P < 0.05$ ); significant difference of a treatment compared to the other treatment ( $P < 0.05$ ).



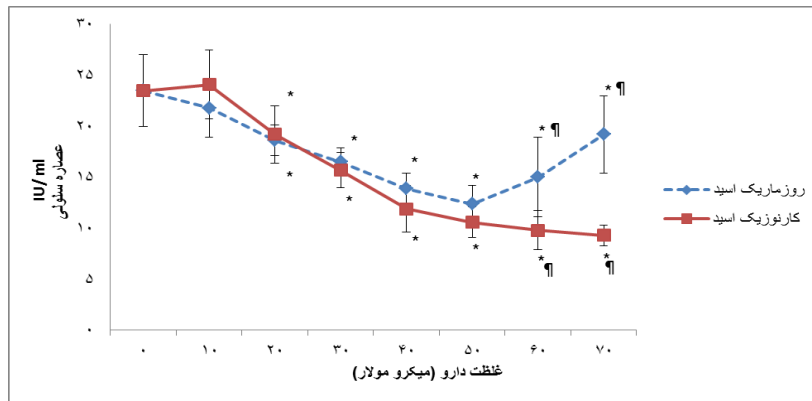
شکل ۲- فعالیت آنزیم کاسپاز ۳ در سلول های رده Hep-G2 تحت تیمار با غلظت های مختلف دو ماده رزمارینیک اسید و کارنوزیک اسید. \* تفاوت معنی دار نسبت به شاهد (  $P < 0.05$  )؛ تفاوت معنی دار یک تیمار نسبت به تیمار دیگر (  $P < 0.05$  ).

Fig. 2. The activity of Caspase-3 enzyme in Hep-G2 cells line treated with various concentrations of rosmarinic and carnosic acids. Significant difference compared to control ( $P < 0.05$ ); significant difference of a treatment compared to the other treatment ( $P < 0.05$ ).

### سنجش سطح سرآمید در سلول های Hep-G2

رو به افزایش گذاشت. نتایج حاصل از سنجش سطح سرآمید در  
سلول های Hep-G2 در نمودار زیر مشاهده می‌شود.

تیمار سلول های Hep-G2 با کارنوزیک اسید سبب کاهش سطح  
سرآمید در روند وابسته به دوز شد. همچنین، تیمار این سلول ها با ماده  
رزمارینیک اسید پس از طی روند کاهشی، از غلظت ۵۰ میکرومولار



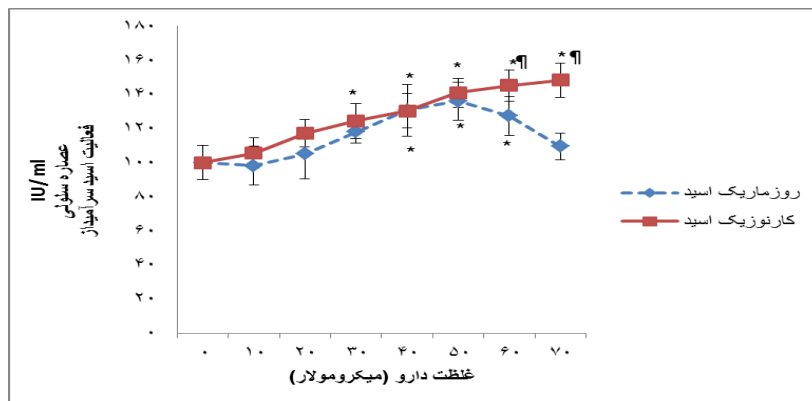
شکل ۳- میزان سطح سرآمید در سلول‌های رده Hep-G2 تحت اثر غلظت‌های مختلف کارنوزیک اسید و رزمارینیک اسید. \* تفاوت معنی‌دار نسبت به شاهد (P<0.05)؛ تفاوت معنی‌دار یک تیمار نسبت به تیمار دیگر (P<0.05).

Fig. 3. Ceramide level in Hep-G2 cell line treated with various concentrations of rosmarinic and carnosic acids. Significant difference compared to control (P <0.05); significant difference of a treatment compared to the other treatment (P <0.05).

افزایشی تا غلظت ۵۰ میکرومولار، سبب کاهش فعالیت آنزیم اسید سرآمیداز شد. نتایج حاصل از سنجش فعالیت آنزیم اسید سرآمیداز در سلول‌های Hep-G2 با دو ماده کارنوزیک اسید و رزمارینیک اسید در نمودار ۴ مشاهده می‌شود.

### تأثیر دو تیمار کارنوزیک اسید و رزمارینیک اسید بر فعالیت آنزیم اسید سرآمیداز

تأثیر تیمار کارنوزیک اسید بر سلول‌های رده Hep-G2 موجب افزایش فعالیت آنزیم اسید سرآمیداز در روند وابسته به دوز شد. تیمار همین سلول‌ها با رزمارینیک اسید پس از طی روند



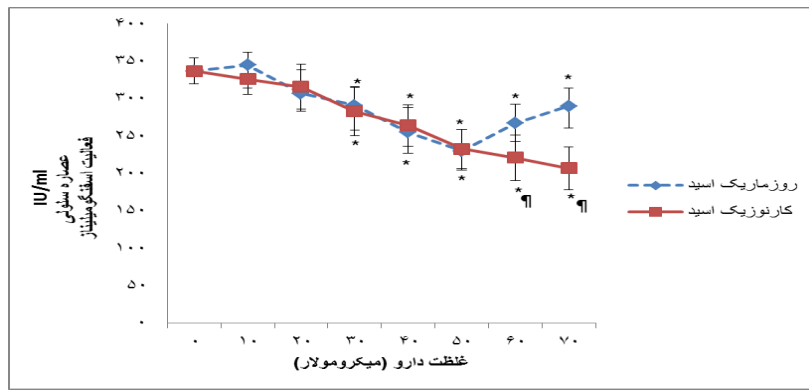
شکل ۴- فعالیت آنزیم اسید سرآمیداز را در سلول‌های رده Hep-G2 تحت تیمار با غلظت‌های مختلف کارنوزیک اسید و رزمارینیک اسید. \* تفاوت معنی‌دار نسبت به شاهد (P<0.05)؛ تفاوت معنی‌دار یک تیمار نسبت به تیمار دیگر (P<0.05).

Fig. 4. The activity of acid ceramidase enzyme in Hep-G2 cell line treated with various concentrations of rosmarinic and carnosic acids. Significant difference compared to control (P <0.05); significant difference of a treatment compared to the other treatment (P <0.05).

فعالیت آنزیم اسفنگومیلیناز ابتدا کاهش یافت و سپس، از غلظت ۵۰ میکرومولار افزایش در فعالیت آنزیم اسفنگومیلیناز مشاهده شد. نمودار ۵ نتایج حاصل از سنجش فعالیت آنزیم اسفنگومیلیناز با دو تیمار کارنوزیک اسید و رزمارینیک اسید را در سلول‌های Hep-G2 را نشان می‌دهد.

### تأثیر دو تیمار کارنوزیک اسید و رزمارینیک اسید بر فعالیت آنزیم اسفنگومیلیناز

تیمار سلول‌های Hep-G2 توسط ماده کارنوزیک اسید سبب کاهش فعالیت آنزیم اسفنگومیلیناز در روند وابسته به دوز شد. در اثر تیمار سلول‌های Hep-G2 با ماده رزمارینیک اسید

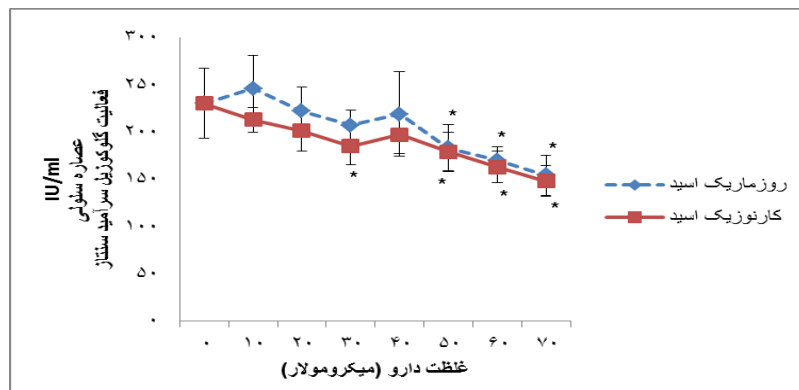


شکل ۵- فعالیت آنزیم اسفنگومیلیناز با دو تیمار کارنوزیک اسید و رزمارینیک اسید در سلول‌های رده Hep-G2. \* تفاوت معنی دار نسبت به شاهد ( $P < 0.05$ ); تفاوت معنی دار یک تیمار نسبت به تیمار دیگر ( $P < 0.05$ ).

Fig. 5. The activity of sphingomyelinase enzyme with two treatment of carnosic and rosmarinic acids in Hep-G2 cell line. Significant difference compared to control ( $P < 0.05$ ); significant difference of a treatment compared to the other treatment ( $P < 0.05$ ).

اسید سبب کاهش فعالیت آنزیم گلوکوزیل سرآمید سنتاز در روند وابسته به دوز شد. نتایج حاصل در نمودار ۶ نمایش داده می‌شود.

**تأثیر دو تیمار کارنوزیک اسید و رزمارینیک اسید بر فعالیت آنزیم گلوکوزیل سرآمید سنتاز**  
تیمار سلول‌های Hep-G2 با کارنوزیک اسید و رزمارینیک



شکل ۶- فعالیت آنزیم گلوکوزیل سرآمید سنتاز در اثر تیمار سلول‌های Hep-G2 با کارنوزیک اسید و رزمارینیک اسید را نشان می‌دهد. \* تفاوت معنی دار نسبت به شاهد ( $P < 0.05$ ).

Fig. 6. The activity of glucosylceramide synthase enzyme in Hep-G2 cells treated by rosmarinic and carnosic acids. Significant difference compared to control ( $P < 0.05$ ).

## بحث

رشد سلول‌های Hep-G2 را با افزایش دوز بیشتر کرده است؛ رزمارینیک اسید پس از طی روند افزایشی، از غلظت ۵۰ میکرومولار سبب کاهش رشد سلول‌های Hep-G2 شده است. علت رشد سلول‌های Hep-G2 را می‌توان به کاهش سطح سرآمید نسبت داد (Narddini *et al.*, 2001). خاصیت ضد سرطانی رزمارینیک اسید از غلظت ۵۰ تا ۷۰ میکرومولار براساس مشاهدات و مطالعات دیگر محققان به اثبات رسیده است (Lin *et al.*, 2007)، درحالی که نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که این ماده از غلظت صفر تا ۵۰ میکرومولار موجب

مسیر سیگنالینگ اسفنگومیلین / سرآمید مسیری تکاملی است که از مخمر تا انسان حفظ شده است. عملکرد سرآمید به منزله یک پیام‌بر ثانویه در این مسیر و القای پاسخ‌های مختلف، بسته به نوع سلول شامل تکثیر، تمایز، توقف رشد یا اغلب موارد آپوپتوز گزارش شده است (Nardini *et al.*, 2001). به منظور درک بهتر و بنیادی از نقش مؤثر پلی‌فنول‌ها در بسیاری از وضعیت آسیب‌شناسی‌های درگیر در مسیر سرآمید، در این تحقیق به بررسی اثر کارنوزیک اسید و رزمارینیک اسید بر رده سلولی سرطان کبد Hep-G2 پرداخته شده است. کارنوزیک اسید

میکرومولار شد که افزایش سطح سرآمید توجیه کننده این روند است.

نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که تحت تیمار با کارنوزیک اسید فعالیت آنزیم اسفنگومیلیناز در روند وابسته به دوز کاهش می‌یابد و سطح سرآمید سلولی کم می‌شود، که این کاهش در نهایت باعث افزایش بقای سلولی می‌شود. تیمار با رزمارینیک اسید سبب افزایش فعالیت آنزیم اسفنگومیلیناز از غلظت ۵۰ میکرومولار شد که به نظر می‌رسد این افزایش باعث بالارفتن سطح سرآمید و در نتیجه، افزایش رشد سلولی در این غلظت شد.

از این گذشته یافته‌های این تحقیق نشان می‌دهد که فعالیت آنزیم گلوکوزیل سرآمید سنتاز در اثر تیمار با کارنوزیک اسید و رزمارینیک اسید کاهش یافته است که علت این کاهش را می‌توان به افزایش فعالیت آنزیم اسید سرآمیداز، کاهش فعالیت اسفنگومیلیناز و همچنین کاهش سطح سرآمید نسبت داد.

از نتایج این تحقیق می‌توان در طب سنتی و کاربرد گیاهان دارویی که در درمان و بهبود روند سرطان نقش دارند استفاده کرد. عصاره گیاه رزماری که حاوی دو ترکیب کارنوزیک اسید و رزمارینیک اسید است در درمان بیماری سرطان در دیگر رده‌های سلولی کاربرد دارد، اما روی سلول‌های سرطانی رده Hep-G2، که در این تحقیق تحت بررسی قرار گرفته‌اند، اثر تحریک کننده رشد داشته و موجب رشد بیشتر این سلول‌های سرطانی شده است؛ بنابراین، نمی‌توان از این مواد در غلظت‌های نامبرده به عنوان داروی ضدسرطان کبد استفاده کرد.

### نتیجه‌گیری

در اغلب موارد پلی‌فنول‌ها باعث القای آپوپتوز و کاهش درصد بقای سلولی شده‌اند، اما در بعضی مواقع اثر معکوس داشته و سبب رشد سلولی شده‌اند.

رشد سلول‌های سرطانی تحت مطالعه شده است. کاسپازها خانواده‌ای از سیستمین پروتئازها، تنظیم کننده مرکزی آپوپتوز هستند. در میان اعضای خانواده کاسپازها، کاسپاز ۳ یکی از مهم‌ترین کاسپازهای اجراکننده در راه‌اندازی آپوپتوز است. فعال شدن کاسپاز ۳ به عنوان مارکر متعارف سلول‌های آپوپتوتیک در نظر گرفته می‌شود. فعال شدن کاسپازهای اجراکننده، مانند کاسپاز ۳ و ۷ می‌تواند موجب ازم‌پاشیدگی بسترهای سیتوپلاسمی، هسته‌ای، کلیواژ درون سلولی و قطعه‌قطعه شدن DNA شود (Xiang et al., 2015). در این تحقیق، همچنین مشخص شده است که کارنوزیک اسید در روندی وابسته به دوز سبب کاهش فعالیت آنزیم کاسپاز ۳ شده و به تبعیت از آن درصد بقای سلولی در سلول‌های Hep-G2 افزایش یافته است. تحت تأثیر رزمارینیک اسید، میزان فعالیت این آنزیم پس از طی روند کاهشی، از غلظت ۴۰ میکرومولار افزایش داشته است که به نظر می‌رسد علت کاهش بقای سلولی، افزایش سطح سرآمید و گرایش سلول به سمت فرآیندهای آپوپتوتیک باشد.

یافته‌های این تحقیق نشان می‌دهد که تحت تیمار کارنوزیک اسید، میزان سطح سرآمید در روندی وابسته به دوز کاهش یافت که علت را می‌توان به سبب افزایش آنزیم اسید سرآمیداز که موجب تجزیه سرآمید شده (Park & Schuchman, 2006) و کاهش آنزیم اسفنگومیلیناز که سبب تولید سرآمید از طریق تجزیه اسفنگومیلین می‌شود (Pavoine & Pecker, 2009) نسبت داد. تیمار رزمارینیک اسید پس از طی روند کاهشی از غلظت ۵۰ میکرومولار به بعد سبب افزایش سطح سرآمید شد که علت آن به نظر می‌رسد کاهش فعالیت آنزیم اسید سرآمیداز و افزایش فعالیت اسفنگومیلیناز در این غلظت است. در این تحقیق مشخص شده که در اثر تیمار کارنوزیک اسید فعالیت آنزیم اسید سرآمیداز در روند وابسته به دوز افزایش یافته که کاهش سطح سرآمید تأیید کننده این امر است. همچنین تیمار با رزمارینیک اسید سبب کاهش فعالیت این آنزیم از غلظت ۵۰

## References

Aly, A., Hamdy, A. and Kafagy, R.M. 2014. Taurine reverses endosulfan induced oxidative stress and apoptosis in adult rat testis. – Food Chem. Toxicol. 6: 1-9.

Abdullaev, F.I. 2001. Plant-derived agents in cancer. In: Gupta SK, ed. Pharmacology and therapeutics in the New Millennium. – New Delhi: Narosa Publishing House: 345-354.

- Hayashi, Y., Horibata, Y., sakaguchi, k., okino, N. and Ito, M.** 2005. Asensitive and reproducible assay to measure the activity of glucosylceramide synthase and lactosyl seramide synthase using HPLC and fluorescent substrates. – *Anal. Biochem.* 345: 181-186.
- Hamdy, A., Aly, A. and Kafagy, R.M.** 2014. Taurine reverses endosulfan induced oxidative stress and apoptosis in adult rat testis. – *Food Chem. Toxicol.* 64:1-9.
- He, X., Dagan, A., Gatt, S. and Schuchman, E. H.** 2005. Simultaneous quantitative analysis of ceramide and sphingosine in mouse blood by naphthalene-2,3- dicarboxy aldehyde (NDA) derivatization after ydrolysis with ceramidase. – *Anal. Biochem.* 340: 113-122.
- Jinmin, k., Jin jung, k. and Kyu kwon, T.** 2014. Carnosic acid induces apoptosis through reactive oxygen species-mediated endoplasmic reticulum stress induction in human renal carcinoma Caki cells. – *J. Cancer Prev.* 19: 170-178.
- Kumar, V., Fausto, N. and Abbas, A.** 2003. Robbins & Cotran pathologic basis of disease. 7th ed. – Philadelphia W.B. Saunders 914-917.
- Levy, M., and Futerman, A.H.** 2010. Mammalian ceramide synthases. – *IUBMB Life* 62: 347-356.
- Krishna, P.B., Burkard, k., Andrea, H. and Chistrophe, A.** 2013. Effect on inhibition of acid and natural ceramidase by novel B-13 and LCL -464 analogues. – *Bioorganic Med. Chem.* 21: 824-888.
- Lin, C.S., Kuo, C.L., Wang, J.P. and Cheng, J.S.** 2007. Growth inhibitory and apoptosis inducing effect of *Perilla frutescens* extract on human hepatoma HepG2 cells. – *J. Ethnopharmacol.* 112: 557-567.
- Masada, Y., Inoue, T., Hashimoto, K., Fujioka, M. and Shiraki, K.** 1973. Studies on the pungent principles of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) by GC-MS. – *Yakugaku Zasshi* 93: 318-321.
- Nardini, M., Leonardi, F., Scaccini, C. and Virgili, F.** 2001. Modulation of ceramide -induced nf-kb binding activity and apoptotic response by caffeic acid in u937 cells: comparison with other antioxidants. – *Free Radic. Biol. Med.* 30: 722-733.
- Nejad Shahrokhadi, K.H., Tavakkol Afshari, J., Rakhshandeh, H. and Barouk, A.** 2009. Study Of cytotoxicity effect of total saffron extract on hepatocarcinoma cell line (HepG2). – *Med. Sci. J. Islamic Azad University* 3: 154-159.
- Pavoine, C. and Pecker, F.O.** 2009. Sphingomyelinases: their regulation and roles in cardiovascular physiology. – *Cardiovascular Res.* 82: 175-181.
- Park, J.H. and Schuchman, E.H.** 2006. Acid ceramidase and human disease. – *Biochim. Biophys.* 1758: 2133-2138.
- Shahada, T., Hossa, Md., Rahman, Sh., Anwarul Basha, A.B.M., Jahan, R., Al-Nahain, A. and Rahmatullah, M.** 2014. Rosmaric acid: a review of its anticancer action. – *World J. Pharmacy Pharmaceutical Sci.* 3: 57-70.
- Xiang, Q., Yunfang, M., Dong, J. and Shen, R.** 2015. Carnosic acid induces apoptosis associated with mitochondrial dysfunction and Akt inactivation in HepG2 cells. – *Int. J. Food Sci. Nutr.* 66(1): 76-84.

\*\*\*\*\*

Njarpour, N. and Mashhadi Akbar Boojar, M. 2016. A comparative study on the effects of rosmarinic acid and carnosic acid on the cell viability, ceramide metabolism and antioxidant enzyme responses in the HEP-G2 cancer cell line. – *Nova Biol. Rep.* 3: 61-68.

نچارپور، ن. و مشهدی اکبر بوجار، م. ۱۳۹۵. بررسی مقایسه‌ای اثرات رزمارینیک اسید و کارنوزیک اسید بر بقای سلولی، متابولیسم سرآمید و واکنش‌های آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت در سلول‌های سرطانی رده Hep-G2. – یافته‌های نوین در علوم زیستی ۳: ۶۸-۶۱.