مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد
دوره ۲۴، شماره ۶، شهریور ۱۳۹۵
صفحه: ۴۹۰-۴۷۹

Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences
Vol. 24, No.6, Sep 2016
Pages: 479-490

اثر مهاری کروسین بر ملانوژنز در سلول‌های رده ملانومای موشی B16F10

جواد بهارآرا*[۱]، زهرا طیرانی نجاران[۲]، الهه امینی[۳]، فرزانه سالک عبداللهی[۴]

چکیده

مقدمه: زعفران در طب سنتی کاربردهایی همچون ضد اسپاسم و آرام بخشی دارد. هدف از مطالعه حاضر، بررسی خواص ضد ملانوژنز و آنتی‌اکسیدان یکی از ترکیبات مؤثره زعفران(کروسین) بر روی دودمان سلولی ملانومای موشی B16F10 است.

روش بررسی: در انجام این پژوهش تجربی آزمایشگاهی، سلول‌های ملانومایی از بانک سلولی پاستور تهیه، در محیط کشت دارای ۱۰٪ سرم جنین گاوی همراه ۱٪ آنتی‌بیوتیک در ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت شدند. درصد بقاء سلولی پس از تیمار با غلظت‌های کروسین(۱۶، ۸، ۴، ۲، ۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر) ارزیابی و اثرات مهاری کروسین بر ملانوژنز توسط آزمون تیروزیناز قارچی، تیروزیناز سلولی، سنتز ملانین و اثر آنتی‌اکسیدانی توسط روش فلوریمتری اندازه‌گیری شد. داده‌های کمی توسط آزمون ANOVA، آزمون Tukey در سطح $p< ۰/۰۵$ تحلیل شدند.

نتایج: یافته‌ها نشان داد غلظت‌های ۱ تا ۱۶ میکروگرم کروسین سمیت چشمگیری بر سلول‌های ملانومایی نداشت، به‌علاوه فعالیت تیروزیناز قارچی($p\leq ۰/۰۰۱$)، فعالیت تیروزیناز سلولی و محتوای ملانین در یک روش وابسته به دوز در سلول‌های B16F10 کاهش یافت. کاهش رادیکال آزاد در سلول‌های ملانومایی تیمار شده نشان داد این ترکیب در غلظت‌های ۴ و ۸ میکروگرم و در غلظت ۱۶ میکروگرم معنی‌دار هستند و دارای ظرفیت آنتی‌اکسیدانی است.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد که کروسین به عنوان عامل مهارکننده ملانوژنز در سلول‌های B16F10 مطرح بوده و می‌تواند به عنوان یک ترکیب سفیدکننده پوستی پیشنهاد شود.

واژه‌های کلیدی: ملانوژنز، ملانوما، زعفران، کروسین

۱- استاد، دکترای تخصصی تکوین جانوری، مرکزتحقیقات بیولوژی کاربردی تکوین جانوری، دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد
۲- استادیار، دکترای تخصصی فارماکولوژی، گروه فارماکودینامی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی، مشهد
۳- دکترای تخصصی زیست شناسی تکوین جانوری، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران
۴- دانشجوی دکتری زیست شناسی سلولی تکوینی جانوری، دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد
* (نویسنده مسئول)؛ تلفن: ۰۵۱۳۸۴۳۷۰۹۲ ، پست الکترونیکی: baharara@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۴/۳/۲۹ تاریخ پذیرش: ۹۴/۷/۲۳

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-25]

مقدمه

ملانین نقش مهمی در حفاظت از پوست در برابر آسیب پرتوی ماوراءبنفش ایفا نموده و مسئول ایجاد رنگ پوست است(۱،۲). تیروزیناز آنزیم کلیدی در دو مرحله اول بیوسنتز ملانین است که در آن تیروزین به دوپا هیدروکسیله می‌شود (۳،۴). گزارش شده است که عامل رونویسی مرتبط با میکروفتالمی(MITF) و آنزیم‌های دیگر مانند پروتئین مرتبط با تیروزیناز ۱(TRP-1) و پروتئین مرتبط با تیروزیناز ۲ (TRP-2) نیز به تولید ملانین کمک می‌کنند(۵،۶). با این حال، تولید و تجمع بیش از حد ملانین می‌تواند چندین اختلال پوستی از جمله کک و مک و سندرم هیپرپیگمانتاسیون ایجاد کند، به‌گونه‌ای که اخیراً، کاربرد مهارکننده‌های سنتز ملانین به طور فزاینده‌ای در لوازم آرایشی مراقبت از پوست برای پیشگیری از هیپرپیگمانتاسیون بکار می‌روند(۵). سنتز ملانین موجب تولید پراکسید هیدروژن(H_2O_2) و دیگر گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) شده که باعث می‌شود ملانوسیت‌ها تحت استرس اکسیداتیو شدید قرار بگیرند(۷)؛ بنابراین از آنجایی که ROS نقش مهمی در تنظیم سنتز ملانین ایفا می‌کند، مهارکننده‌های تولید ROS ممکن است موجب کاهش سنتز ملانین شوند(۸)؛ بنابراین، آنتی‌اکسیدان‌هایی مانند مشتقات اسکوربیک اسید و احیا کنندگان گلوتاتیون(GSH) به عنوان عوامل مهارکننده سنتز ملانین شناخته شده‌اند(۹).

امروزه، تولید ترکیبات سفیدکننده به دلیل مشکلات مهم ناشی از هیپرپیگمانتاسیون پوست توجه زیادی را به خود جلب کرده است(۱۰،۱۱). بسیاری از عوامل بیرونی، به‌ویژه پرتوی فرابنفش، عامل مهم اختلالات پوستی مانند کک و مک‌های خورشیدی هستند (۱۲،۱۳). مصرف بسیاری از ترکیبات روشن‌کننده حاوی ویتامین C به عنوان مهارکننده سنتز ملانین گزارش شده است، به علاوه نه تنها ویتامین C، بلکه کوجیک اسید و آربوتین نیز به عنوان بازدارنده فعالیت تیروزیناز مطرح هستند(۱۴). علاوه بر این، اثر مثبت منیزیم فسفات در محافظت از پوست در برابر آسیب‌های پوستی ناشی از تابش پرتوی فرابنفش UV-B اثبات شده است(۱۵). با این حال، برخی از عواملی که قبلاً به عنوان محافظ در برابر پرتوی خورشید گزارش شده‌اند، مانند هیدروکینون و محصولات حاوی جیوه دارای سمیت سلولی هستند(۱۶). به طور کلی در معرض قرار گرفتن پوست در برابر پرتوی فرابنفش و اکسید کننده‌های زیست‌محیطی آلاینده موجب افزایش استرس اکسیداتیو و تولید و تجمع ملانین و نهایتاً هیپرپیگمنتاسیون التهابی می‌گردد(۱۷)؛ بنابراین، تلاش به منظور دستیابی به عامل سفیدکننده مؤثر، امن‌تر و بیوسنتزی که بتواند سنتز ملانین را بدون سمیت سلولی کاهش دهد، توجه بسیاری از محققین را به خود جلب نموده است(۱۸).

گیاه زعفران با نام علمی Crocus sativus از خانواده Iridaceae گیاهی علفی، بدون ساقه و پایا است که در طب سنتی به عنوان ضد اسپاسم، تسکین دهنده ناراحتی‌های لثه، ضد آبریزش، آرام بخش، ضد نفخ، افزاینده تعریق، خلط‌آور، محرک، مقوی معده، محرک تمایلات جنسی و قاعده آور بکار می‌رود(۱۹). به علاوه اخیراً مطالعات دیگر اثرات ضدالتهابی، ضد درد عصاره‌های کلاله و گلبرگ زعفران و کاهش دهنده قند خون و لیپید کروسین را نشان داده است(۲۰،۲۱). همچنین تحقیقات نشان داده که عصاره زعفران دارای خاصیت ضد توموری بوده و در برابر تعدادی از تومورهای موشی و سلول‌های لوسمی انسانی و چندین مدل سرطانی مؤثر است(۲۲،۲۳).

هدف از مطالعه حاضر، بررسی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کروسین به عنوان یکی از ترکیبات مؤثره زعفران و اثر مهاری این ترکیب بر روی فعالیت تیروزیناز قارچی، تیروزیناز سلولی و محتوای ملانین در سلول‌های ملانومای B16F10 است.

روش بررسی

کروسین توسط مهاجری و همکاران از کلاله زعفران جداسازی و خالص‌سازی و به صورت آماده از پژوهشکده بوعلی مشهد خریداری گردید(۱۹). طبق این پروتوکل، ابتدا ۱۰ گرم کلاله خشک شده زعفران، با اتانول سرد ۸۰ درصد به مدت ۲ دقیقه ورتکس شده، به مدت ۱۰ دقیقه در ۴۰۰۰ دور سانتریوفوژ شده و بخش رویی جداسازی شد. سپس در ۸

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-25]

مرحله عصاره‌گیری با اتانول ۸۰ صورت گرفت. در مرحله بعد مایع رویی در دمای ۵- درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت در تاریکی نگهداری شد. در انتها کریستال‌های کروسین پس از دومرتبه کریستالیزاسیون جدا شده و توسط اسپکتروفتومتری ماوراءبنفش و HPLC تخلیص گردید، شایان ذکر است که میزان خلوص کروسین تهیه شده در این روش ۹۷ درصد گزارش شده است(۱۹).

برای انجام کشت سلول و ارزیابی میزان سمیت کروسین، رده سلولی B16F10 از بانک سلولی انستیتو پاستور تهران تهیه و در محیط کشت RPMI1640 (ایده زیست، ایران) با ۱۰٪ FBS، ۱٪ آنتی‌بیوتیک(Gibco, USA) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵٪ دی اکسید کربن کشت شدند. زمانی که تراکم سلول‌ها به ۸۰ درصد رسید، سمیت سلولی کروسین بر روی سلول‌های سرطان ملانوما B16F10 با استفاده از روش MTT (Applichem, Germany) ارزیابی شد. این روش بر اساس فعالیت دهیدروژنازهای میتوکندریایی است که ازجمله مارکرهای مهم در بقاء سلول به شمار می‌روند(۱). برای این منظور سلول‌ها با تراکم ۲×۱۰^{۴} سلول در پلیت ۹۶ خانه کشت داده شدند. ۲۴ ساعت پس از کشت، سلول‌ها با غلظت‌های مختلف کروسین(غلظت‌های ۱۶، ۸، ۴، ۲، ۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر) به مدت ۲۴ ساعت تیمار شدند(n=۳). پس از این مدت مورفولوژی سلول‌ها توسط میکروسکوپ معکوس و سمیت سلولی توسط روش MTT مورد ارزیابی قرار گرفت.

به منظور سنجش فعالیت بازدارنده غلظت‌های مختلف کروسین(غلظت‌های ۱۶، ۸،۴،۲، ۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر) بر روی تیروزیناز قارچی (Sigma, USA)، به طور خلاصه ۱۰ میکرو لیتر از محلول آبی تیروزیناز قارچی (۲۰۰ واحد) به پلیت ۹۶ خانه، به ۲۰۰ میکرو لیتر مخلوط ۵ میلی ال- دوپا (Sigma, USA) حل شده در بافر فسفات افزوده شده، سپس ۱۰ میکرو لیتر کروسین اضافه شد. سپس این مخلوط به مدت ۳۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شده و پس از انکوباسیون، مقدار دوپاکروم تولید شده در مخلوط واکنش، توسط اسپکتروفتومتری در ۴۹۰ نانومتر(OD 490) در میکروپلیت اندازه‌گیری شد(۲۴). سپس درصد مهار توسط معادله زیر محاسبه شد: درصد مهار فعالیت تیروزیناز (٪) = (B-A) / A × ۱۰۰ که در آن B میانگین مقادیر OD 490 اندازه‌گیری شده از کنترل بوده و A میانگین مقادیر OD 490 اندازه‌گیری شده برای غلظت‌های مختلف کروسین است.

جهت سنجش اندازه‌گیری محتوای ملانین، ابتدا سلول‌ها در پلیت ۱۲ خانه کشت داده و بعد از گذشت ۲۴ ساعت با غلظت‌های مختلف کروسین تیمار شدند. سپس ۲۴ ساعت بعد از تیمار، سلول‌ها با استفاده از تریپسین از کف پلیت جدا شده، ۲ بار با PBS شستشو داده شده و سپس محتوای ملانین با استفاده از افزودن ۱۰۰ میکرو لیتر NaoH ۲ مولار به مدت ۳۰ دقیقه در ۱۰۰ درجه اندازه‌گیری شده و جذب آن در طول موج ۴۰۵ نانومتر خوانده شد (۲۵).

برای ارزیابی فعالیت تیروزیناز سلولی ۵×۱۰^{۴} سلول ملانومایی درون پلیت ۲۴ خانه کشت شده و بعد از ۲۴ ساعت با غلظت‌های مختلف کروسین تیمار شدند. در مرحله بعد پس از یک شبانه‌روز، سلول‌ها تریپسینه شده، پلیت سلولی با PBS شستشو داده شده و سپس با ۱۰۰ میکرو لیتر PBS حاوی ۱ درصد ترایتون هموژنایز شده و بعد از سانتریفیوژ در دور ۱۰۰۰۰ در ۴ درجه سانتی‌گراد، پلیت سلولی به مدت ۲۰ دقیقه در معرض ۱۰۰ میکرو لیتر محلول ال- دوپا قرار گرفته، به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه انکوبه شده و سپس در طول موج ۴۷۵ نانومتر جذب خوانده شد(۲۶،۲۷).

جهت تعیین سطح ROS سلولی، سلول‌های ملانوما B16F10 در پلیت ۹۶ خانه به تعداد ۵×۱۰^{۴} کشت داده شده و پس از یک شبانه‌روز با غلظت‌های مختلف کروسین تیمار شدند. بعد از گذشت ۲۴ ساعت سلول‌ها در معرض ۵۰ میکرو لیتر H_2O_2 ۲۴ میلی‌مولار در ۳۷ درجه برای ۳۰ دقیقه انکوبه شدند. سپس ۵۰ میکرو لیتر از DCFH-DA (Sigma, USA) به سلول‌ها اضافه شدند و شدت فلورسنس DCF در طول موج ۵۰۴ نانومتر و طول موج ۵۲۴ نانومتر با استفاده از فلوریمتر اندازه‌گیری شد(۹).

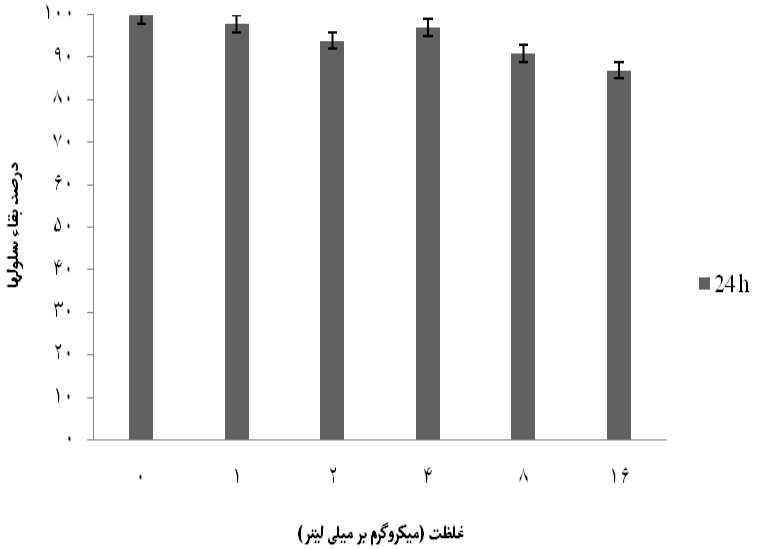
[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-25]

آنالیز آماری

آنالیز آماری توسط نرم‌افزار SPSS، آزمون یک‌طرفه ANOVA آزمون توکی به منظور مقایسه داده‌ها صورت گرفته و سطح $p\leq ۰/۰۵$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج

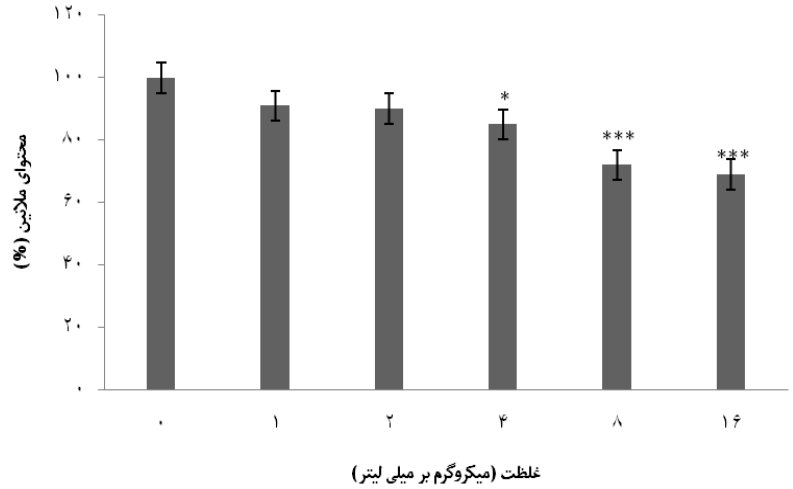
برای اندازه‌گیری میزان سمیت سلولی کروسین، سلول‌های رده B16F10 با غلظت‌های مختلف کروسین(۱۶، ۸ ، ۴ ، ۲ ، ۱) میکروگرم بر میلی‌لیتر تیمار شدند. سپس بقا سلولی با استفاده از آزمون MTT اندازه‌گیری شد که در نمودار ۱ نشان داده شده است. نتایج نشان داد که کروسین در غلظت‌های ۱ تا ۱۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر سمیت چشمگیری بر سلول‌های ملانومایی نداشت($p\geq ۰/۰۵$) که نشان دهنده ایمن بودن کروسین به عنوان یکی از ترکیبات گیاهی در صنایع آرایشی است.



نمودار ۱: اثر کروسین بر بقا سلولی سلولهای ملانومای B16F10. سلول‌ها با غلظت‌های مختلف کروسین(۱۶، ۸، ۴، ۲، ۱) میکروگرم بر میلی‌لیتر به مدت ۲۴ ساعت تیمار شده و بقا سلولی توسط روش MTT اندازه‌گیری شد. همان‌طور که مشاهده می‌شود غلظت‌های بکار رفته کروسین تفاوت معنی‌داری در میزان بقاء سلولی نسبت به کنترل(که با ۰ نشان داده شده) ایجاد نکرده است. نتایج به‌صورت میانگین ± SE ارائه شده است.

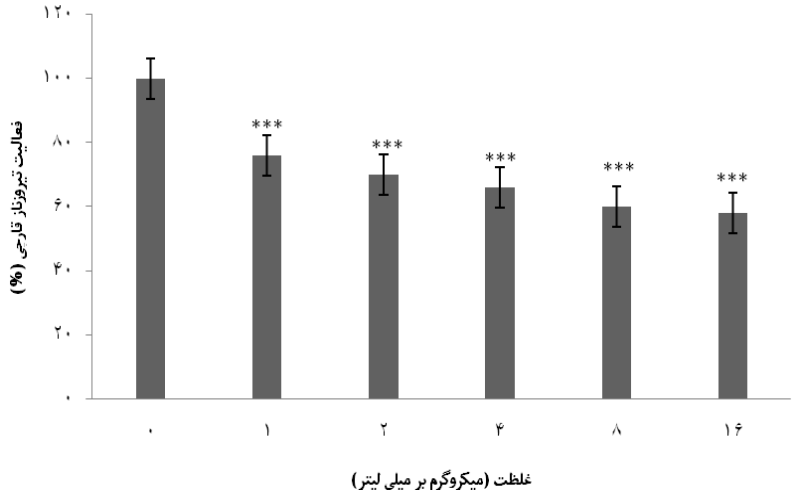
برای تعیین اثر کروسین بر روی سنتز ملانین، سلول‌های رده B16F10 با غلظت‌های مختلف کروسین تیمار شدند و محتوای ملانین توسط اسپکتروفتومتری تعیین شده که در نمودار ۲ نشان داده شده است. نتایج حاصل از آزمون ملانین نشان داد کروسین در غلظت‌های مختلف بر رده سلولی ملانوما B16F10 اثر داشته و باعث کاهش تولید ملانین به صورت وابسته به دوز شده است. مقایسه غلظت‌های مختلف کروسین با کنترل نشان داد غلظت ۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر، ۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر، ۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر، ۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر و ۱۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر کروسین دارای ۰/۰۳ ± ۹۱٪، ۰/۰۱ ± ۹۰/۳٪، ۰/۰۱± ۸۵٪، ۰/۰۳ ±۷۲/۳٪، ۰/۰۲± ۶۹/۱٪ اثر مهاری بر سنتز ملانین است. از نظر آماری نیز با وجود اثر مهاری وابسته به دوز کروسین، این ترکیب توانسته است تنها در غلظت‌های ۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر با($p\leq ۰/۰۵$*)، ۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر با($p\leq ۰/۰۰۱$***) و ۱۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر با($p\leq ۰/۰۰۱$***) به صورت معنی‌داری اثر بازدارنده بر سنتز ملانین اعمال کند.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-25]



نمودار ۲: اثر کروسین بر میزان سنتز ملانین. سلول‌های B16F10 توسط غلظت‌های مختلف کروسین (۱۶، ۸، ۴، ۱،۲) میکروگرم بر میلی‌لیتر تیمار شدند و ۲۴ ساعت بعد محتوای ملانین اندازه‌گیری شد. نتایج کاهش در سنتز ملانین را نشان داده و به عنوان درصد نسبت به کنترل (بدون تیمار) بیان شده و داده‌ها به صورت میانگین ± SE ارائه شده است. $p\leq۰/۰۵$*، $p\leq۰/۰۰۱$*** معنی‌دار در نظر گرفته شد.

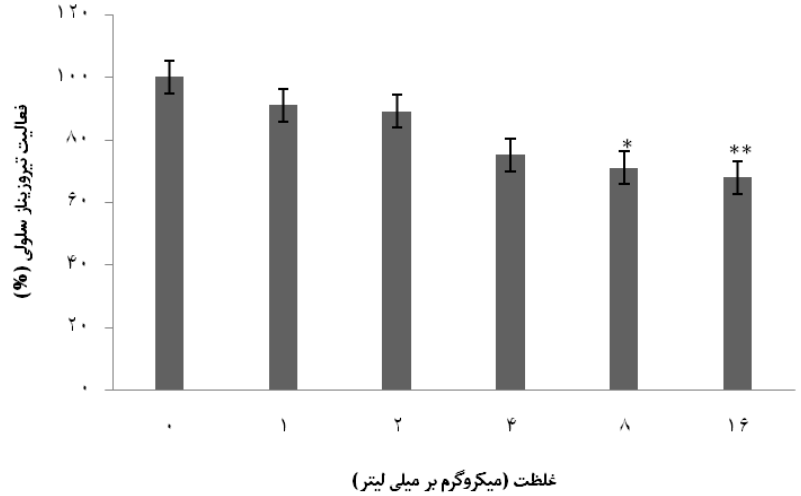
برای بررسی میزان فعالیت تیروزیناز قارچی فعالیت دوپا در مسیر سنتز ملانین از طریق اسپکتروفتومتری اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که کروسین در غلظت‌های مختلف بر رده سلولی ملانوما B16F10 اثر داشته و باعث مهار فعالیت تیروزیناز قارچی شد. مقایسه غلظت‌های مختلف کروسین با کنترل در نمودار ۳ نشان داد غلظت ۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر، ۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر، ۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر، ۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر و ۱۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر کروسین ۰/۰۶ ± ۷۶٪، ۰/۰۸ ± ۶۹.۹٪، ۰/۰۲ ± ۶۶.۱٪، ۰/۰۴ ± ۵۹.۴٪، ۰/۰۱ ± ۵۷.۲٪ اثر مهاری بر تیروزیناز قارچی بود. این نتایج نشان دهنده این مطلب است که این ترکیب در محدوده غلظت ۱ تا ۱۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر به طور معنی‌داری با($p\leq۰/۰۰۱$***) کاهش دهنده فعالیت تیروزیناز قارچی است.



نمودار ۳: اثر کروسین بر فعالیت تیروزیناز قارچی. غلظت‌های مختلف کروسین(۱۶، ۸، ۴، ۱،۲) میکروگرم بر میلی‌لیتر و تیروزیناز قارچی انکوبه شدند. پس از انکوباسیون مقدار دوپاکروم تولید شده در ۴۹۰ نانومتر توسط روش اسپکتروفتومتری تعیین شد. داده‌ها به صورت میانگین ± SE ارائه شده است. نتایج کاهش قابل‌توجه فعالیت تیروزیناز قارچی در مقایسه با کنترل (فاقد تیمار) را نشان می‌دهد. $p\leq۰/۰۰۱$*** معنی‌دار در نظر گرفته شد.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-25]

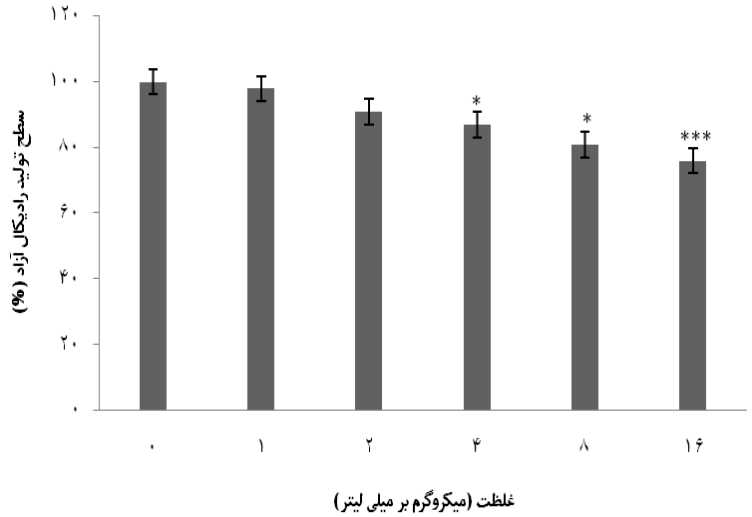
برای اندازه‌گیری فعالیت تیروزیناز سلولی به روش اسپکتروفتومتری، اثر غلظت‌های موردنظر کروسین در مهار مسیر ملانوژنز و ممانعت از تبدیل دوپا به دوپاکروم توسط آنزیم تیروزیناز داخل سلولی بررسی شد. نتایج نشان داد(نمودار ۴) که کروسین باعث مهار تیروزیناز سلولی و تبدیل دوپا به دوپا کروم شد. مقایسه غلظت‌های مختلف کروسین نشان داد که کروسین در غلظت ۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر، ۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر، ۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر، ۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر و ۱۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر کروسین به ترتیب ۰/۱ ±۸۹/۱٪، ۰/۰۲ ±۸۸/۴٪، ۰/۰۱ ± ۷۴/۹٪، ۰/۱±۷۰/۸٪، ۰/۰۱±۶۸/۲٪ اثر مهاری بر فعالیت تیروزیناز سلولی داشت، منتهی در غلظت‌های ۸ و ۱۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر به ترتیب با(۰/۰۵ ≤p*) و (۰/۰۱ ≤p**) به طور معنی‌داری بازدارنده فعالیت تیروزیناز سلولی است.



نمودار ۴: اثر کروسین بر فعالیت تیروزیناز سلولی. ۲۴ ساعت پس از کشت، سلول‌های B16F10 با غلظت‌های مختلف کروسین(۱۶، ۸، ۴، ۲، ۱) میکروگرم بر میلی‌لیتر تیمار شدند و ۲۴ ساعت بعد فعالیت تیروزیناز سلولی اندازه‌گیری شد. نتایج به عنوان درصد نسبت به کنترل(فاقد تیمار) بیان شده و داده‌ها به عنوان میانگین ± SE ارائه شده است. *p≤۰/۰۵ **p≤۰/۰۱ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

جهت ارزیابی اثر کروسین بر میزان ROS، میزان تولید گونه‌های فعال اکسیژن در سلول و اندازه‌گیری اثر محافظتی غلظت‌های مختلف کروسین بر تولید آن است. غلظت ۱۵ میلی‌مولار آب اکسیژنه در این آزمون بکار گرفته شد. نمودار ۵ نشان داد که فعالیت ROS درون سلولی القا شده توسط آب اکسیژنه پس از تیمار با غلظت‌های ۱۶، ۸، ۴، ۲، ۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر کروسین به صورت وابسته به دوز کاهش‌یافته است. به گونه‌ای که در غلظت ۴ و ۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر با ۰/۰۵ ≤p* و در غلظت ۱۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر با ۰/۰۰۱ ≤p*** به طور معنی‌داری اثر بازدارنده بر تولید رادیکال آزاد داشته که بیانگر پتانسیل آنتی‌اکسیدانی بالی این ترکیب است.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-25]



نمودار ۵: تعیین محتوای ROS در سلول‌های B16F10. سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت با غلظت‌های مختلف کروسین (µg/ml ۱۶، ۸، ۴، ۲، ۱) تیمار شدند و سپس محتوای ROS توسط روش DCF-DA اندازه‌گیری شد. نتایج به‌دست‌آمده به عنوان درصد از کنترل (بدون تیمار) نشان داده شده است و داده‌ها به عنوان میانگین ± SE ارائه شده است. مقادیر به طور قابل توجهی در مقایسه با کنترل متفاوت هستند. $p\leq۰/۰۵$* $p\leq۰/۰۰۱$*** معنی‌دار در نظر گرفته شد.

بحث

برخـــی از عوامـل سفیدکننـده‌ای که در صنایع آرایشـــی و بهداشتی برای درمان پوست و اختلالات رنگ‌دانه‌ای مورداستفاده قرار دارند، سمیت سلولی یا اثرات نامطلوب جانبی در پی دارند که موجب شده بسیاری از مطالعات در جستجوی ترکیبات ایمن، مؤثر و به دست آمده از منابع طبیعی باشند(۲۸). تحقیقات نشان داده است که به‌کارگیری فرمولاسیون حاوی ۳ درصد عصاره زعفران C. sativus موجب دپیگمنتاسیون و کاهش سطح ملانین پوستی شده که برای پوست انسان در مدیریت بیماری ملانوما حائز اهمیت است(۲۹).

در این مطالعه اثر غلظت‌های مختلف کروسین زعفران گونه C. sativus بر رده سلولی B16F10 مورد بررسی و آزمایش قرار گرفت. روش MTT برای تعیین سمیت سلولیِ عوامل دارویی که زنده ماندن و رشد سلول را تحریک یا مهار می‌کنند، مورداستفاده قرار می‌گیرد. نتایج حاصل از آزمون MTT نشان داد که غلظت‌های مختلف کروسین ۱ تا ۱۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر در این آزمایش اثر سمیت چشمگیری بر رده سلولی B16F10 ملانوما نداشت.

مطالعات نشان داده است که تابش اشعه ماوراءبنفش موجب تشکیل ROS در بافت‌های پوستی و تحریک تغییرات سمی مانند پراکسیداسیون لیپید می‌شود(۲۴). در مقابل پوست برای مقابله با آسیب اکسیداتیو، با شبکه‌ای از سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی آنزیمی و غیر آنزیمی مجهز شده است(۲۸). با این وجود گزارش شده است که قرار گرفتن در معرض مزمن اشعه فرابنفش خورشید نقش مهمی در شکل‌گیری چندین اختلال پوستی، ازجمله پوسته پوسته شدن، چروک، خشکی و اختلالات رنگ‌دانه خالدار مانند هیپوپیگمانتاسیون و هیپرپیگمانتاسیون دارد، بنابراین نیاز مبرمی برای شناسایی عوامل مؤثر که بتواند موجب جلوگیری از اختلالات پوستی فعالیت محافظت نوری و سفیدکنندگی پوست شود، حس می‌شود(۲۴).

محققین بر روی اثر ضد ملانوژنز یک عصاره گیاهی به دست آمده از پوست درخت کاج به نام پیکنوژنول که دارای ترکیبات آنتی‌اکسیدانی و هضم کننده رادیکال آزاد است، مطالعاتی انجام داده و نشان دادند که پیکنوژنول اثر ضد تیروزیناز قوی داشته و موجب سرکوب بیوسنتز ملانین شده و از طریق عملکرد آنتی‌اکسیدانی اثر ضد ملانوژنزی خود را اعمال می‌کند(۳۰). در پژوهشی که در سال ۲۰۱۴ صورت گرفت، نیز نشان داده شد که اثر دپیگمانتاسیون عصاره زعفران احتمالاً مرهون وجود

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-25]

ترکیبات آنتی‌اکسیدان و ضدالتهاب موجود در عصاره زعفران همچون سافرانال، کروسین و پیکروکروسین است(۲۹).

در این پژوهش، برای تایید ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کروسین در محیط سلولی، سطح ROS داخل سلولی اندازه‌گیری شد. در این روش DCFH-DA از طریق غشای سلول و به شکل آنزیمی توسط استراز به DCFH هیدرولیز شده، با ROS (مانند H_2O_2) واکنش داده تا DCF را ایجاد کند. افزایش سریع در DCF، اکسیداسیون DCFH توسط رادیکال‌های داخل سلولی را نشان می‌دهد. نتایج نشان داد که کروسین، ROS داخل سلولی را در روش وابسته به دوز مهار کرد که هم راستا با تحقیق سایر پژوهشگران نشان دهنده پتانسیل قوی آنتی‌اکسیدانی زعفران و ترکیبات فعال آن است.

تیروزیناز نقش اساسی در دو مرحله اول از مسیر سنتز ملانین دارد. این آنزیم می‌تواند تیروزین را به دوپا تبدیل نموده و دوپا را به شکل دوپاکروم اکسید کند. تیروزیناز قارچی به طور گسترده‌ای به عنوان آنزیم هدف در غربالگری مهارکننده‌های بالقوه سنتز ملانین استفاده می‌شود(۲۸). نتایج این پژوهش نشان داد که کروسین اثر مهاری بر فعالیت تیروزیناز قارچی داشت. جهت نشان دادن اثر مهاری ترکیبات در سنتز ملانین، محتوای ملانینِ سلول‌های ملانومایی و فعالیت تیروزیناز داخل اندازه‌گیری می‌شود.

تحقیقات نشان داده است که محدوده وسیعی از ترکیباتی که ملانوژنز را تنظیم می‌کنند، مشتقات فنولی هستند، از آنجایی که چای دارای ترکیبات پلی فنولی است در سال ۲۰۱۵ پژوهشی بر روی اثرات عصاره چای سبز، سفید و سیاه بر ملانوژنز صورت گرفت و نتایج نشان داد که عصاره حاوی هر سه نوع چای دارای اثر مهاری بر ملانوژنز است که از طریق مهار تولید و تجمع ملانین و فعالیت تیروزیناز وساطت می‌شود(۳۱). در سال ۲۰۱۵ Lee و همکاران پتانسیل جنسنوزید Rg3(یکی از ترکیبات فعال زیستی گیاه جنسینگ) بر مهار ملانوژنز را مورد بررسی قرار داده و نشان دادند که این ترکیب با کاهش سطح ملانین و محتوای پروتئینی تیروزیناز دارای اثر مهاری بر ملانوژنز بوده که آن را به عنوان یکی از کاندیداهای ایمن به عنوان سفیدکننده پوست در بهبود زیبایی پوست پیشنهاد نمود(۱۷).

نتایج این پژوهش نیز نشان داد که کروسین اثر مهاری قوی در شکل‌گیری ملانین در سلول‌های B16F10 دارد. همچنین نتایج نشان داد که کروسین فعالیت تیروزیناز داخل سلولی B16F10 را در روش وابسته به دوز مهار می‌کند. شواهد ارائه شده از سنجش فعالیت تیروزیناز و سنتز ملانین نشان داد که کروسین مهارکننده ملانوژنز در سلول‌های ملانومای B16F10 است و از طریق مهار سنتز تیروزیناز و یا کاهش ROS سلولی بازدارنده سنتز ملانین است. نتایج این پژوهش در تطابق با یافته‌های سایر پژوهشگران مبنی بر ظرفیت بالای برخی از ترکیبات یا عصاره‌های طبیعی همچون چای، زعفران جنسنوزید و پیکنوژنول در کاهش ملانوژنز و آسیب استرس اکسیداتیو ناشی از پرتوی ماوراءبنفش بیانگر پتانسیل بالای کروسین به عنوان یک ترکیب کاهنده ملانوژنز است.

نتیجه‌گیری

با توجه به مشاهدات حاصل از این پژوهش اثرات بازدارنده تیروزیناز، بازدارنده سنتز ملانین، آنتی‌اکسیدان و عدم سمیت کروسین در غلظت‌های کمتر از ۱۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر بر سلول‌های ملانومای پوستی، کروسین را به عنوان یک ترکیب بالقوه در ساخت فرآورده‌های ضد لک و یا ضد پیری معرفی می‌کند. با این وجود بایستی اثر کروسین بر دودمان‌های ملانومای انسانی و مکانیسم‌های مولکولی دقیق اثر مهار ملانوژنز کروسین مورد ارزیابی بیشتر قرار گیرد.

سپاسگزاری

از همکاران محترم مرکز تحقیقاتی بیولوژی کاربردی تکوین جانوری دانشگاه آزاد اسلامی مشهد و نیز بخش سم‌شناسی دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی مشهد که در اجرای این پژوهش همکاری صمیمانه سپاسگزاریم.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-25]

References:

1- Cha J, Kim S. ***Anti-melanogenesis in B16F0 Melanoma Cells by Extract of Fermented Cordyceps militaris Containing High Cordycepin.*** J Life Sci 2013; 23(12): 1516-24.

2- Wu L, Chang L, Chen S, Fan N, Ho JA. ***Antioxidant activity and melanogenesis inhibitory effect of the acetonic extract of Osmanthus fragrans: A potential natural and functional food flavor additive.*** Food Sci Technol 2009; 42(9):b1513-9.

3- Sariri R, Sabbaghzadeh R, Poumohamad F. ***In-Vitro Antioxidant and Anti-Tyrosinase Activity of Methanol Extracts from Crocus Sativus Flowers.*** Pharmacology Online 2011; 3: 1-11.

4- Moreira CG, Horinouchi CDS, Souza-filho CS, Campos FR, Barison A, Cabrini DA, et al. ***Hyperpigmentant activity of leaves and flowers extracts of Pyrostegia venusta on murine B16F10 melanoma.*** J Ethnopharmacol 2012; 141(3): 1005-11.

5- Yoon WJ, Ham YM, Yoon HS, Lee WJ, Lee NH, Hyun CG. ***Acanthoic Acid Inhibits Melanogenesis through Tyrosinase Down- regulation and Melanogenic Gene Expression in B16 Melanoma Cells.*** Nat Prod Commun 2013; 8: 1-4.

6- Zhou J, Shang J, Ping F, Zhao G. ***Alcohol extract from Vernonia anthelmintica (L .) willd seed enhances melanin synthesis through activation of the p38 MAPK signaling pathway in B16F10 cells and primary melanocytes.*** J Ethnopharmacol 2012; 143(2): 639-47.

7- Tsai T, Huang C, Wu W, Huang W, Chyuan J, Tsai P. ***Antioxidant, cell-protective, and anti-melanogenic activities of leaf extracts from wild bitter melon (Momordica charantia Linn. var. abbreviata Ser.) cultivars.*** Bot Stud 2014; 55(78): 1-11.

8- Boonpisuttinant K, Ruksiriwanich W, Winitchai S. ***In Vitro Anti-melanogenesis and Collagen Biosynthesis Stimulating Activities of Star Grass (Hypoxis aurea Lour) Extracts.*** Asian J Appl Sci 2014; 2(4): 405-13.

9- Huang H, Hsieh W, Niu Y, Chang T. ***Inhibition of melanogenesis and antioxidant properties of Magnolia grandiflora L.*** flower extract. Complement Altern Med 2012; 12(1): 1-9.

10- Ebanks JP, Wickett RR, Boissy RE. ***Mechanisms Regulating Skin Pigmentation: The Rise and Fall of Complexion Coloration.*** Int J Mol Sci 2009; 10: 4066-87.

11- Smit N, Vicanova J, Pavel S. ***The Hunt for Natural Skin Whitening Agents.*** Int J Mol Sci 2009; 10: 5326-49

12- Chang T. ***Natural Melanogenesis Inhibitors Acting Through the Down-Regulation of Tyrosinase Activity.*** Materials 2012; 5: 1661-85.

13- Han JH, Byeon S, Hyun C, Lee NH. ***Melanogenesis Inhibitory Activity in the Extracts of Oreocnide fruticosa (Gaudich.) Hand.-Mazz Branches.*** J Appl Pharm Sci 2014;4(1):166-9.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-25]

14- Kuo PC, Damu AG, Cherng CY, Jeng JF, Teng CM, Lee EJ, et al. ***Isolation of a natural antioxidant, dehydrozingerone from zingiber officinale and synthesis of its analogues for recognition of effective antioxidant and antityrosinase agents.*** Arch Pharm Res 2005; 28: 518-28.

15- Elmore AR. ***Final report of the safety assessment of l-ascorbic acid, calcium ascorbate, magnesium ascorbate, magnesium ascorbyl phosphate, sodium ascorbate, and sodium ascorbyl phosphate as used in cosmetics.*** Int J Toxicol 2005; 24: 51-111.

16- Yao C, Lin Y, Shaaban M, Chen J. ***Inhibitory effect of ectoine on melanogenesis in B16-F0 and A2058 melanoma cell lines.*** Biochem Eng J 2013; 78: 163-69.

17- Lee SJ, Lee WJ, Chang SE, Lee G. ***Antimelanogenic effect of ginsenoside Rg3 through extracellular signal-regulated kinase-mediated inhibition of microphthalmiaassociated transcription factor.*** J Ginseng Res 2015; 39: 238-42.

18- Hashemi F, Zarei MA. ***Tyrosinase Inhibitory Activity Within Hexane Extract of Ten Screened Plants From Kurdistan Province of Iran.*** Int J Adv Biol Biomed Res 2014; 2(11): 2795-99.

19- Hadizadeh F, Mohajeri SA, Seifi M. ***Extraction and Purification of Crocin from Saffron Stigmas Employing a Simple and Efficient Crystallization Method.*** Pak J Biol Sci 2010; 13 (14): 691-98.

20- Christodoulou E, Kadoglou NP, Kostomitsopoulos N, Valsami G. ***Saffron: a natural product with potential pharmaceutical applications.*** J Pharm Pharmacol 2015;67(12):1634-49.

21- Shirali S, Zahra Bathaie S, Nakhjavani M. ***Effect of crocin on the insulin resistance and lipid profile of streptozotocin-induced diabetic rats.*** Phytother Res 2013;27(7):1042-47.

22- Srivastava R, Ahmed H, Dharamveer RK, Saraf SA. ***Crocus sativus L: A comprehensive review.*** Pharmacogn Rev 2010; 4(8): 200-08.

23- Gutheil WiG, Reed G, Ray A, Dhard A. ***Crocetin: an agent derived from saffron for prevention and therapy for cancer.*** Curr Pharm Biotechnol 2012; 13(1): 173-79.

24- Piperaceae CDC. ***Antioxidant and Anti-tyrosinase Activities from Piper officinarum C.DC (Piperaceae).*** J Appl Pharm Sci 2014; 4(5): 87-91.

25- Lee D, Cha B, Lee Y, Kim G, Noh H. ***The Potential of Minor Ginsenosides Isolated from the Leaves of Panax ginseng as Inhibitors of Melanogenesis.*** Int J Mol Sci 2015; 16: 1677-90.

26- Qiao Z, Koizumi Y, Zhang M, Natsui M, Flores MJ, Gao L, et al. ***Anti-Melanogenesis Effect of Glechoma hederacea L.*** Extract on B16 Murine Melanoma Cells. Biosci J 2012; 10: 1877- 83.

27- Wang TJ, An J, Chen XH, Deng QD, Yang L. ***Assessment of Cuscuta chinensis seeds′ effect on melanogenesis: comparison of water and ethanol fractions in vitro and in vivo.*** J Ethnopharmacol 2014; 154(1): 240- 48.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-25]

28- Chiang HM, Chien YC, Wu CH, Kuo YH, Wu WC, Pan YY, et al. ***Hydroalcoholic extract of Rhodiola rosea L. (Crassulaceae) and its hydrolysate inhibit melanogenesis in B16F0 cells by regulating the CREB/MITF/tyrosinase pathway.*** Food Chem Toxicol 2014; 65: 129-39.

29- Akhtar N, Muhammad H, Khan S, Ashraf S, Shair I, Ali A. ***Skin Depigmentation Activity of Crocus sativus Extract Cream.*** Trop J Pharm Res 2014; 13(11): 1803-08.

30- Kim YJ, Kang KS,Yokozawa T. ***The anti-melanogenic effect of pycnogenol by its anti-oxidative actions.*** Food Chem Toxicol 2008; 46(7): 2466-71.

31- Kim YC, Choi SY, Park EY. ***Anti-melanogenic effects of black, green, and white tea extracts on immortalized melanocytes.*** Vet Sci 2015; 16(2): 135-43.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-25]

The Inhibitory Effect of Crocin on Melanogenesis of B16F10 Melanoma Cell Line

Javad Baharara(PhD)*[1], Zahra TayaraniNajaran (PhD)[2]
ElahehAmini (PhD)[3], FarzanehSalekAbdollahi (PhD Student)[4]

[1] *Research Center for Animal Development Applied Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran.*
[2] *Faculty of Pharmacology, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran.*
[3] *Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran.*
[4] *Faculty of Biological Sciences, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Iran*.

Received: 19 Jun 2015 ***Accepted:*** 15 Oct 2015

Abstract

Introduction: Saffron has some applications such as anti-spasmodic and analgesic effects in traditional medicine. The aim of this study was to evaluate the anti melanogenesis and antioxidant properties of crocin (one of the saffron active components) on B16F10 mouse melanoma cell line.

Methods: In this experimental study, B16F10 cells were prepared from Pasteur Institute (NCBI) and were grown in medium containing 10% FBS with 1% antibiotics at 37° C.Then, the cell viability was assessed, the inhibitory effect of crocin on melanogenesis was investigated by fungal tyrosinase,and tyrosinase activity assessment, melanin synthesis and cellular antioxidant capacity was evaluated after treatment with various concentrations of crocin (1, 2, 4, 8, 16 µg/ ml) by DCFDA assay. Quantitative data were analyzed using SPSS software, one way ANOVA, Tukey test at $p \leq 0.05$.

Results: The data revealed no significant cytotoxicity of crocin($p>0.05$) (concentrations of 1-16 µg/ ml) on B16F10 cells, in addition, fungal tyrosinase activity (***$p\leq 0.001$), intracellular tyrosinase activity (*$p< 0.05$, **$p\leq 0.01$) and melanin content (*$p< 0.05$, **$p\leq 0.01$, ***$p\leq 0.001$) have suppressed in a dose-dependent manner. Further, reduction of free radicals in treated melanoma cells exhibited that crocin in concentrations of 4and 8 µg/ ml in $p<0.05$ and-16 µg/ mlin $p\leq 0.001$ possess significant antioxidant efficacy.

Conclusion: Our results elucidated that crocin was proposed as melanogenesis inhibitor in B16F10 cells, which can be considered as an effective whitening agent.

Keyword: Melanogenesis; Melanoma; Saffron; Crocin

This paper should be cited as:
Javad Baharara, Zahra Tayarani Najaran, Elaheh Amini, Farzaneh Salek Abdollahi. ***The inhibitory effect of crocin on melanogenesisof b16f10 melanoma cell line.*** J Shahid Sadoughi Univ Med Sci 2016; 24(6): 479-90.

Corresponding author: Tel: 05138437092, email: baharara@yahoo.com

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-25]