مقاله اصیل

بررسی اثر سایتوتوکسیک چالکون سنتتیک جدید حامل گروه٤-متوکسی فنیل بر رده سلولی HeLa با روش MTT

باقرسیدعلیپور*[1]، مقدسه فاضلی[2]، سلمان احمدی اسب چین[3]، حمید چشمی[4]، لیلا سادات الداغی[5]

[1] استادیار، دکتری تخصصی بیوشیمی، گروه زیست سلولی و مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران

[2] کارشناس ارشد تکوین سلولی، گروه زیست سلولی و مولکولی ، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قائم شهر، قائم شهر، ایران

[3] دانشیار، دکتری تخصصی میکروبیولوژی، گروه زیست سلولی و مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران

[4] مربی گروه بیوشیمی، مرکزتحقیقات سلولی ومولکولی، دانشگاه علوم پزشکی سبزوار، سبزوار، ایران

[5] کارشناس ارشد تکوین سلولی، مرکزتحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی سبزوار، سبزوار، ایران

* **نشانی نویسنده مسئول:** دانشگاه مازندران، دانشکده علوم پایه، گروه زیست سلولی و مولکولی، باقر سید علیپور
E-mail: b.alipour81@gmail.com

وصول: ۱۳۹۴/۱/۲۶، اصلاح: ۱۳۹۴/۲/۲۶، پذیرش: ۱۳۹۴/۵/۳۱

چکیده

زمینه و هدف: چالکون ها متعلق به رده مهمی از فلاونوئیدها می باشند که فعالیت آنتی اکسیدانی، ضد التهابی و ضد سرطانی شان به اثبات رسیده است. هدف مطالعه حاضر، بررسی اثر سمیت سلولی چالکون سنتتیک جدید بر روی رده سلولی Hela می باشد.

مواد و روشها: در این مطالعه تجربی که بصورت in vitro انجام پذیرفت، سلول های HeLa برای مدت ۷۲ ساعت، تحت تاثیر غلظت های مختلف چالکون قرار گرفته و میزان مرگ ومیر سلول ها با کمک آزمون MTT مورد بررسی قرار گرفت. داده های حاصل بااستفاده از روش Students T-Test آنالیز شده و تغییرات ریخت شناختی نیز با روش های رنگ آمیزی اکریدین اورنج و پروپیدیوم آیوداید بررسی گردید.

یافته ها: نتایج ما نشان داد که چالکون سنتتیک جدید در غلظت های مورد مطالعه، رشد سلول های سرطانی را مهار نموده است بصورتی که بالاترین درصد مهار رشد در غلظت µg/ml ٤٠ به میزان ٥٠/٤٤ بوده و مقدار IC50 برابر µg/ml ٤٠ بعد از ۷۲ ساعت بدست آمد. نتایج تغییرات مورفولوژیک سلول های HeLa بعد از ٢٤ ساعت نیز احتمال مرگ برنامه ریزی شده سلولی را قوت می بخشد.

نتیجه گیری: نتایج نشان داد که چالکون جدید دارای اثر مهاری بر رشد رده سلولی سرطانی HeLa می باشد و احتمالا با مکانیسم همچون القاء آپوپتوزیس باعث مرگ سلول های مورد مطالعه می گردد.

واژه های کلیدی : *چالکون، Hela ، سمیت سلولی، MTT*

مقدمه

سرطان از جمله بیماری های مزمنی است که در سلول های مختلف، مسیرهای سیگنالینگ و عملکرد سلولی را در اختیار گرفته و از طریق غیر طبیعی شدن تکثیر سلولی و ایجاد اختلال در آپوپتوز بدن را درگیر می نماید (۱). این بیماری که انواع مختلفی را شامل می شود،

یکی از شایع‌ترین علل مرگ و میر در جوامع بشری بوده بطوری که بر اساس گزارش سازمان بهداشت جهانی، حدود ۱۳ درصد از کل مرگ و میر انسان ها در سراسر جهان ناشی از این بیماری می باشد. در این میان، سرطان گردن رحم ششمین سرطان شایع در بین همه انواع سرطان‌ها و دومین علت مرگ ناشی از این نوع بیماری ها در زنان است (۲). اگرچه درمان‌های رایج کنونی توانسته-اند پیش آگهی مبتلایان به این سرطان را بهبود بخشند، امّا بسیاری از این تومورها به اقدامات درمانی کنونی پاسخ نمی‌دهند (۳). بنابراین در مورد سرطان گردن رحم نیز همانند سایر سرطان‌ها، تلاش برای یافتن داروهای مؤثرتر و با عوارض جانبی کمتر ادامه دارد. سلول Hela رده ای از سلول های سرطانی انسانی است که در سال ۱۹۵۱ از سرطان گردن رحم جدا شد و اکنون در بسیاری از مطالعاتی که روی سلول های سرطانی انجام می شود مورد توجه و استفاده قرار می‌گیرد (٤). از طرفی، تا کنون محققان زیادی در سرتاسر جهان تلاش های موثری را جهت شناسایی ترکیبات جدید طبیعی یا سنتزی که دارای خواص ضد سرطانی مفید و موثری باشند بکار گرفته اند. از جمله این مواد، ترکیبات آلی هتروسایکلیک می باشند که به دلیل وجود گروه های واکنش دهنده و خاصیت سیتوتوکسیک ساختاری آنها به منظور درمان احتمالی تومورها مورد توجه قرار گرفته اند. چالکون ها کتون های آروماتیکی هستند که ساختار هسته مرکزی آنها معمولا در برهمکنش های زیستی شان اهمیت دارد (۵). همانطور که در شکل ۱ نشان داده شده است این گروه از ترکیبات، کتون های غیر اشباع متشکل از دو حلقه آروماتیک (حلقه های A وB) و پیوند های دو گانه کونژوگه و سیستم الکترونی غیر مستقر در هر دو حلقه بنزن هستند (٦ , ۷). چالکون ها در طبیعت از طریق دو مسیر ساخته می شوند که در هر دو مورد، استخلاف های مورد نظر، به صورت همزمان، بر روی موقعیت های شماره ۲و ٤و ٦ می نشینند در حالی که در چالکون مورد استفاده در این مطالعه شرایط سنتزی ایجاد گردیده و استخلاف مورد نظر تنها روی جایگاه ٤ قرار داده شده است. امری که با توجه به مطالعات پیشین، احتمالا از طریق برهمکنش الکترونی با جایگاه فعال آنزیم بر رفتار و سرنوشت سلول تیمار شده تاثیر می گذارد. این نکته جالب توجه است که گروه متوکسی از طریق برهمکنش با آرژنین موجود در ساختار پروتئین ها موجب اعمال اثر ساختاری احتمالی می شود (۸).

چالکون ها پیش سازهای مهمی به منظور سنتز بسیاری از هتروسایکل های بیولوژیکی کلیدی همچون benzothiazepine، pyrazolines ، 1-4-diketones و Flavon می باشند. این ترکیبات در گیاهان خوراکی فراوان بوده و به عنوان پیش سازی برای گروه های فلاونوئیدی و ایزوفلاونوئیدی در نظر گرفته می شوند (۹). از این رو و با توجه به مطالعات گذشته که اثرات سمیت ترکیبات چالکونی بر سلول های سرطانی را عنوان نموده اند، در این مطالعه اثر سمیت سلولی چالکون سنتیتیک جدید بر رده سلول های سرطانی Hela و تعیین IC_{50} مربوطه به این ماده مدنظر قرار گرفته است.

مواد و روش ها

تعیین میزان سمیت سلولی

در این مطالعه تجربی، ابتدا ٤ میلی گرم از چالکون مورد نظر(E)-1-(6-hydroxy-3-(prop-1-en-2-yl) benzofuran-5-yl)-3-(4-methoxy phenyl) prop-2-en-1-one) که در آزمایشگاه شیمی آلی دانشگاه قائم شهر سنتز شده بود توسط ترازوی حساس دیجیتالی توزین گردید. ترکیب مذکور در ۱۰۰ میکرو لیتر حلال دی متیل سولفوکساید (DMSO) حل گردید و در نهایت با محیط کشت RPMI-1640 به حجم ۱۲ میلی لیتر رسیده و رقت‌های مورد نظر شامل ۱۰ ، ۲۰ ، ٤۰ و ٦۰ میکروگرم بر میلی لیتر از آن تهیه شد. میزان DMSO در محلول نهایی موجود در چاهک های کشت سلول کمتر از یک

درصد محاسبه گردید تا اثر سمیت این ماده به حداقل مقدار خود برسد.

رده سلولی Hela از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران خریداری شد و در محیط کشت مایع RPMI1640 حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاو (FBS) غیر فعال شده، ۲ میلی مولار گلوتامین، محلول پنی سیلین (۱۰۰ واحد در هر میلی لیتر) و استرپتومایسین (۱۰۰ میکرو گرم در میلی لیتر) و در شرایط دمایی ۳۷ درجه سانتی‌گراد همراه با ۵ درصد CO_2 و ۹۵ درصد رطوبت کشت گردید. پس از ۷۲ ساعت تیمار سلول ها با غلظت های مورد نظر و در شرایط مذکور، به منظور بررسی اثر سمیت سلولی ماده مورد مطالعه از روش رنگ سنجی با استفاده از نمک تترازولیوم معروف به تست MTT استفاده شد(۱٦). پس از کشت سلول ها و پر شدن کف چاهک های پلیت در حد ۷۰ تا ۸۰ درصد، رقت‌های مناسب از چالکون مورد نظر تهیه و ۱۰۰ میکرولیتر از هر رقت به چاهک‌های پلیت اضافه گردید. سپس سلول‌ها به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه و ۵٪ CO_2 در انکوباتور قرار داده شدند. در نهایت، به هر چاهک ۲۰ میکرولیتر از محلول ۵ میلی گرم بر میلی یتر MTT (سیگما)اضافه شد. پلیت ها به مدت ٤ ساعت انکوبه شده و در نهایت، محلول رویی خارج و به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر DMSO اضافه گردید تا بلورهای فورمازان تشکیل شده حل گردد. به منظور تعیین میزان جذب نوری هر چاهک که معرف میزان سلول های زنده آن می باشد، جذب نوری در ۵۷۰ نانومتر توسط دستگاه الایزا ریدر(Awareness Technology Inc, Stat Fax2100) خوانده شد. چاهک های دارای سلول و بدون چالکون به عنوان کنترل و چاهک های بدون سلول و تنها دارای محیط کشت به همراه سرم جنین گاوی به عنوان Blank در نظر گرفته شدند. از سلول های نرمال لنفوسیتی نیز به منظور تعیین اثر سمیت احتمالی ترکیب مورد نظر بر سلول های طبیعی غیرسرطانی استفاده گردید. تعیین درصد بقای سلولی به کمک فرمول زیر محاسبه شد:

$$\%OD = \frac{OD_{\text{چاهک های تحت تاثیر عصاره}} - OD_{\text{بلانک}}}{OD_{\text{کنترل}} - OD_{\text{بلانک}}} \times 100$$

و در نهایت، با توجه به مقادیر جذب نوری بدست آمده بوسیله دستگاه الایزا ریدر در صد مهار رشد مربوط به هر غلظت با بکار گیری فرمول زیر محاسبه شد:

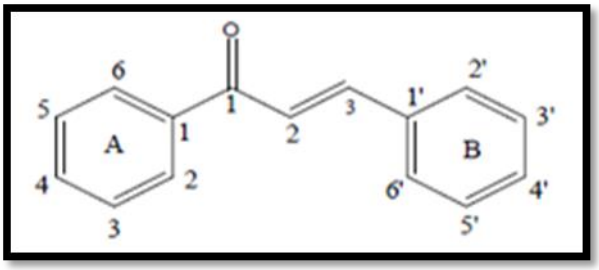
$$\text{درصد مهاررشدسلولی} = 100 - \frac{\text{میانگین درصد OD برای هرگروه تیمار}}{\text{میانگین درصد OD برای گروه کنترل}} \times 100$$

تعیین نوع مرگ سلولی از طریق رنگ آمیزی دوگانه آکریدین اورنج / پروپیدیوم آیوداید

پس از تهیه سوسپانسیون سلولی و کشت سلول ها در چاهک های پلیت ۹٦ خانه ای، مقدار چالکونی که با توجه به داده های مرحله قبل دارای بیشترین اثر مهاری بر سلول های سرطانی بود (غلظت ٤۰ میکروگرم بر میلی لیتر) به چاهک ها اضافه شد، یک ردیف از چاهک ها به عنوان گروه کنترل انتخاب شد تا بقیه چاهک ها با آن سنجیده شوند. سلول ها به مدت ۲٤ ساعت با غلظت چالکون مورد نظر تیمار گشته، سپس محیط رویی را خارج کرده و حدود ۱۰۰ میکرولیتر الکل ۹۵٪ به چاهک ها اضافه شده و به منظور تثبیت نمودن سلول ها، مدت ۳۰ دقیقه در دمای ٤ درجه ی سانتی گراد قرار داده شدند. در نهایت، الکل هر چاهک، خارج شد و سلول های تثبیت شده با مخلوطی از ۱۰ میکروگرم بر میلی لیتر آکریدین اورنج (AO) و۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر پروپیدیوم آیوداید (PI) به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق تیمار گردیدند. در گام آخر، مخلوط رنگی خارج گشته و چاهک ها با PBS شستشو داده شد و با استفاده از میکروسکوپ فلورسانس با درشت نمایی ۲۰۰ مورد مطالعه قرار گرفت.

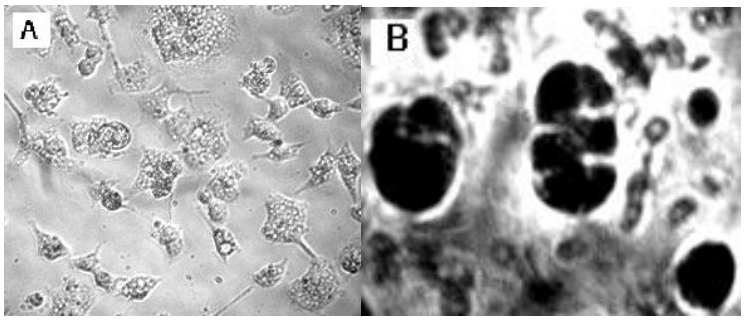
روش تجزیه و تحلیل آماری داده ها

داده ها به صورت میانگین±انحراف معیار (SD) حاصل از ۳ تکرار نمایش داده شده اند. جهت رسم

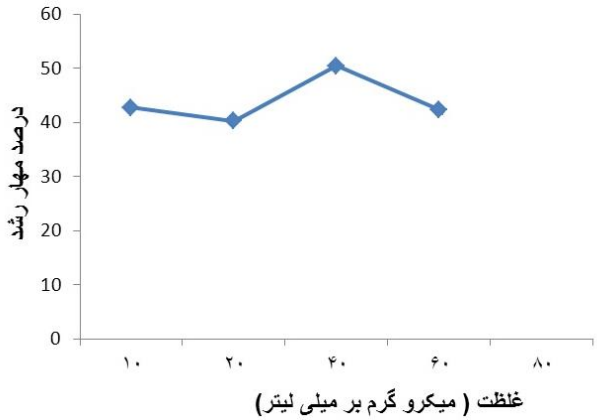


4-Methoxyacetophenone + Benzaldehyde | 1-(4-Methoxyphenyl)-3-phenylpropenone | $C_{16}H_{14}O_2$

شکل۱: ساختار کلی چالکون ها و فرمول چالکون مورد استفاده در این مطالعه همراه با اسامی پیش سازهای آن



شکل ۲: تغییرات ریخت شناختی رده سلولی Hela پس از تیمار با چالکون سنتتیک جدید A) سلول های تیمار نشده (40X) B) سلول های تیمار شده با غلظت ٤٠ میکروگرم بر میلی لیتر چالکون بعد از ٢٤ ساعت (200X).



نمودار ۱: درصد مهاری رشد سلول های سرطانی Hela در غلظت های مختلف چالکون سنتتیک جدید. هر نقطه بیانگر Mean±SD است. نتایج هر غلظت میانگینی از سه تکرار می باشد.

نمودار از نرم افزار Excel (Microsoft Office) استفاده شد. ازآزمون Students T-Test به منظور بررسی تفاوت بین گروه های کنترل و تیمار مورد استفاده قرار گرفت و مقادیر کمتر از ۰.۵ معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته ها

به منظور بررسی اثرات سمیت سلولی چالکون جدید بر رده سلولی Hela غلظت های مختلفی از چالکون تهیه و بر روی سلول Hela اثر داده شد. از آنجایی که برای حل کردن ترکیب مورد نظر از DMSO استفاده شد از این محلول به عنوان کنترل استفاده شد. نتایج نشان می دهد DMSO در غلظت به کار برده شده، اثر معنی داری بر سلول Hela در مقابل گروه کنترل نداشته است. نتایج بدست آمده در این مطالعه نشان می دهد که ترکیب مورد مطالعه بر رده سلولی سرطانی Hela در غلظت های ۱۰ ، ۲۰ ، ٤٠ ، ٦٠ میکروگرم بر میلی لیتر

جدول ۱: اثر غلظت های مختلف چالکون بر میزان جذب نوری و مهار رشد سلول های سرطانی Hela به کمک روش MTT در مقایسه با گروه کنترل

غلظت چالکون(میکروگرم بر میلی لیتر)	میانگین جذب نوری ± انحراف معیار	در صد مهار
۱۰	./۴۲۹ ± ./۰۰۹*	۴۲/۷۵
۲۰	./۴۳۹±./۰۱۲**	۴۰/۲۸
۴۰	./۳۸۷±./۰۴۱	۵۰/۴۴
۶۰	./۴۰۷±./۰۳۲	۴۲/۳۳
DMSO	./۴۸۴±./۰۲۸	۱۸/۵۶
سلول طبیعی(لنفوسیت)	./۴۳۹±./۰۳۷	۲۱/۸
کنترل	./۵۰۹±./۰۰۸	

* اختلاف در سطح احتمال ۵ درصد ** اختلاف در سطح احتمال ۱ در صد. هر عدد بیانگر میانگین به دست آمده±خطای معیار مربوط به سه تکرار آزمایش می باشد.

باعث مهار رشد این سلول ها به ترتیب به میزان ۴۲/۷۵، ۴۰/۲۸، ۵۰/۴۴، ۴۲/۳۳ شده است (نمودار ۱).

نتایج مربوط به بررسی تغییرات ایجاد شده در سلول های سرطانی HeLa در طی آپوپتوز

تغییرات ایجاد شده در سلول در طی مرگ برنامه ریزی شده سلولی با میکروسکوپ معکوس فلورسانس با بزرگنمایی ۲۰۰X مورد بررسی قرار گرفت. آکریدین اورنج به تمامی سلول ها (مرده و زنده) نفوذ می کند. سلول های دارای هسته یکنواخت، سلول های زنده هستند در حالی که سلول هایی که کروماتین متراکم شده و یا قطعه قطعه شده را نمایان ساختند به عنوان سلول های مرده درنظر گرفته شدند. همان طور که در شکل ۲ مشاهده می شود پس از تیمار ۲۴ ساعته سلول ها با غلظت ۴۰ میکروگرم بر میلی لیتر چالکون مورد نظر، ریخت شناسی سلول های تحت تیمار در مقایسه با سلول های گروه کنترل تغییر کرد.

بحث

مواد پلی فنولی در اکثر گیاهان وجود دارند و نشان داده شده که فلاونوئیدها فعالیت ضد باکتری، ضد التهابی، ضد حساسیت، ضد ویروسی، ضد سرطانی، ضد ترومبوتیک و گشاد کنندگی عروق دارند (۱۰). در طول دهه گذشته ، تقریبا ۹۰ ترکیب چالکونی با فعالیت های ضدتوموری مختلف گزارش شده و عنوان شده است که این مواد عمدتا موجب شروع مرگ برنامه ریزی شده سلولی و اختلال در فاز میتوزی چرخه سلول می شوند(۱۱). این مواد گروهی از ترکیبات پلی فنولی مشتق از گیاه و متعلق به خانواده فلاونوئید ها به حساب می آیند که باعث القای آپوپتوز و مهار مسیر چرخه سلولی در فاز G2/M می شوند (۱۲). به عنوان مثال، چالکون 1,3-diphenylpropen-1-ones که عضوی از خانواده فلاونوئید ها است تا کنون به طور وسیعی در سطوح درمانی مختلف مخصوصا به عنوان داروی احتمالی آنتی تومور مورد ارزیابی قرار گرفته و بررسی ها نشان داده که این ماده با افزایش بیان مولکول های پیش آپوپتوزی روی چرخه سلولی تاثیر گذاشته و باعث مهار چرخه سلولی می شود (۱۳).

چالکون ها و مشتقات آنها با افزایش کاربرد های متعدد دارویی توجه محققان را به خود جلب کرده اند. از این رو و به منظور یافتن ترکیبات سنتزی ضد سرطان قوی و البته با عوارض جانبی کمتر، در این تحقیق اثر مهارکنندگی چالکون سنتتیک (E)-1-(6-hydroxy-3-(prop-1-en-2-yl) benzofuran-5-yl)-3-(4-methoxy phenyl) prop-2-en-1-one مورد ارزیابی قرار گرفت. مطالعات قبلی نشان داده اند که مشتقات چالکون حاوی گروه متوکسی بر روی حلقه آروماتیک، دارای اثر مهاری بر تکثیر سلول های سرطانی می باشد (۱۴). امری که نتایج حاصل از این مطالعه را تایید کرده و آن را قابل اعتمادتر می سازد. از طرف دیگر، بررسی اثرات سمیت سلولی ۲-۴- متوکسی فنیل)-بنزوایمیدازول بر سلول های سرطان پستان و تعیین میزان زنده ماندن این سلول ها

نشان داده که میزان IC 50 برای سلول های MCF -7 پس از گذشت ٤٨ و ٧٢ ساعت به ترتیب برابر ١٣٥ و ٤٠ میکروگرم بر میلی لیتر بوده است (١٥و ١٦) و این در حالی است که در این مطالعه نیز میزان مذکور برای سلول های Hela در مدت زمان ٧٢ ساعت معادل ٤٠ میکروگرم بر میلی لیتر تعیین گردیده است. به این نکته باید توجه نمود که جهت برآورد و نتیجه گیری بهتر و نهایی در مورد اهمیت و کارایی این مواد در زمینه ایجاد آپوپتوز در سلول های سرطانی باید سمیت مواد مذکور بر روی سلول های نرمال نیز مورد نظر قرار گیرد. البته می توان اثر احتمالی این نوع از مواد را بر کلیه سلول ها تا حدی پیش بینی نمود. به این صورت که چالکون ها علاوه بر توقف چرخه سلولی در مرز G2/M از طریق مسیر وابسته به میتوکندری باعث آپوپتوز می شوند. این مواد باعث کاهش شدید سطح Bcl-2 و متعاقب آن افزایش Bax در میتوکندری می شوند. بنابراین چالکون در مسیر وابسته به میتوکندری باعث آزاد سازی سیتوکروم C از میتوکندری و درحقیقت بصورت غیر مستقیم موجب فعال شدن کاسپاز ٩ و آپوپتوز می گردد (١٧و ١٨و ١٩). نتایج بدست آمده بیانگر سمیت سلولی چالکون سنتتیک بر رده سلولی سرطان Hela بوده که با نتایج گزارش شده در مطالعات مشابه و مکانیسم اثر چالکون هم راستا می باشد. همانطوری که در شکل ٢ مشاهده می شود مقایسه نتایج حاصل از تست MTT و رنگ آمیزی دوگانه نشان می دهد که غلظتی از چالکون که با درصد بالای مهار رشد همراه است توانسته در روش رنگ آمیزی دوگانه موجب القای اپوپتوز در سلول های تحت تیمار گشته و پس از ٢٤ ساعت ریخت شناسی سلول ها را بصورت متراکم شدن مواد هسته ای و قطعه قطعه شدن کروماتین سلول ها تغییر دهد. برخی مطالعات نیز سمیت این ماده بر سلول های TCC را تایید کرده و عنوان نموده اند که این ماده می تواند اثرات خود را از طریق ایجاد گرانول های سیتوپلاسمی مخصوصا بعد از ٧٢ ساعت ظاهر سازد (٢٠) . بررسی تغییرات ریختی سلول های مورد مطالعه نشان داد که ماده مورد مطالعه موجب تشکیل اجسام آپوپتوزی و حباب زدگی غشا گشته و احتمالا می توان این موارد را به وقوع مرگ برنامه ریزی شده در سلول های تحت تیمار نسبت داد. هرچند که یقینا به منظور اثبات موارد مذکور، مطالعات دقیق تری مورد نیاز است.

نتیجه گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که چالکون سنتتیک جدید دارای خاصیت مهارکنندگی بر رده سلولی سرطانی Helaمی باشد. البته به منظور نتیجه گیری قطعی مکانیسم سلولی نوع تاثیر این ماده، انجام مطالعات بیشتر بر روی دیگر رده های سلولی و تست های تخصصی تری که بر بیان ژن ها و پروتئین های آپوپوپتوزی تمرکز نمایند امری ضروری می باشد.

تشکر و قدر دانی

بدین وسیله سپاسگزاری خود را از کارشناسان محترم آزمایشگاه، جناب آقای قاسمی و سرکار خانم محمدی که در امور مربوط به آزمایشات این مطالعه، محققان این پژوهش را یاری نمودند اعلام می داریم
.

References

1. Ranjit PM, Rahaman SA, Kumar KP, Prasad YR, Santhipriya T, Sudeepthi NL. Synthesis, Screening and in vitro Anticancer Activity of Piperazine Nucleus Containing Novel Chalcones on Different Cell Lines. Int J Pharm Tech Res. 2013; 5(1):284-93.
2. Castellsague X, Diaz M, Sanjose S. Worldwide human papillomavirus etiology of cervical adenocarcinoma and its cofactors: implications for screening and prevention. J Natl Cancer Inst. 2006; 98: 303–15.

3. Magné N, Chargari C, Deutsch E, Castadot P, Ghalibafian M, Bourhis J. Molecular profiling of uterine cervix carcinoma: an overview with a special focus on rationally designed target-based anticancer agents. Cancer Metastasis Rev. 2008; 27(4):737-50.
4. Scherer WF, Syverton JT, Gey GO. Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix. J Exp Med. 1953; 97(5):695-10.
5. Motta LF, Gaudio AC, Takahata Y. Quantitative structure-activity relationships of a series of chalcone derivatives (1,3-diphenyl-2-propen-1-one) as anti-Plasmodium falciparum agents (antimalaria agents). Internet Electron J Mol Des. 2006; 5:555-69.
6. Awasthi SK, Mishra N, Kumar B, Sharma M, Bhattacharya A, Mishra LC et al. Potent antimalarial activity of newly synthesized substituted chalcone analogs in vitro. Med Chem Res. 2009; 18:407-20.
7. Lim SS, Kim HS, Lee DU. In vitro antimalarial activity of flavonoids and chalcones. Bull Korean Chem Soc. 2007; 28(12): 2495-2497.
8. Sivakumar PM, Ganesan S, Veluchamy P, Doble M. Novel chalcones and 1, 3, 5-triphenyl- 2-pyrazoline derivatives as antibacterial agents. Chem Biol Drug Des. 2010; 76: 407–11.
9. Rahman A, Qureshi R, Kiran M, Ansari FL. Electron Affinities, Solvation Energies and Redox Potentials of Some Chalcones: Substituents`Effect and Correlation with Semi-Empirical MO Energies. Turk J Chem. 2007; 31: 25–34.
10. Alan L, Miller ND. Antioxidant Flavonoids: Structure, Functionand Clinical Usage. Alt Med Rev. 1996; 1(2): 103-11.
11. Edwards ML, stemerick Dm, sunkara PS. Chalcones: a new class of antimitotic agents. J med chem. 1990; 33: 1948-54.
12. Katsori AM1, Hadjipavlou-Litina D. Chalcones in cancer: understanding their role in terms of QSAR. Curr Med Chem. 2009; 16(9):1062-81.
13. Boumendjel A, Ronot X, Boutonnat J. Chalcones derivatives acting as cell cycle blockers: potential anti cancer drugs? Curr Drug Targets. 2009; 10(4):363-71.
14. Choi EJ, Lee JI, Kim GH. Effects of 4, 7-dimethoxyflavanone on cell cycle arrest and apoptosis in human breast cancer MCF-7 cells. Arch Pharm Res. 2011; 34: 2125–30.
15. white AW, curtin NJ, Eastman BW, Golding BT, Hostomsky Z, Kyles Lij, et al. potentiation of cytotoxic drug activity in human tumour cell lines , by mine- substituted 2- arylbenzimidazole-4- carboxamide paop-1 in hibitors. Bioorg Med Chem Lett. 2004; 14: 2433-37.
16. Hassan zadeh H, Matin MM, Bahrami AR, Saeinasab M, Rahimizadeh M, Eshghi H, et al. Evaluating the in Vitvo toxicity of 2-(4-methoxyphenyl)-1H- benzodimidazole on MCF7 cells. Proceedings of the 7th National Biotechnology Congress of I.R.Iran. 12-14 Sep, 2011, Niroo Research Institute, Tehran, Iran.
17. Hseu YC1, Lee MS, Wu CR, Cho HJ, Lin KY, Lai GH, et al. The chalcone flavokawain B induces G2/M cell-cycle arrest and apoptosis in human oral carcinoma HSC-3 cells through the intracellular ROS generation and downregulation of the Akt/p38 MAPK signaling pathway. J Agric Food Chem. 2012; 60(9):2385-97.
18. Yang HL, Chen SC, Chen CS, Wang SY, Hseu YC. Alpinia pricei rhizome extracts induce apoptosis of human carcinoma KB cells via a mitochondria-dependent apoptotic pathway. Food Chem Toxicol. 2008; 46: 3318−24.
19. Lin E, Lin WH, Wang SY, Chen CS, Liao J W, Chang HW, et al. Flavokawain B inhibits growth of human squamous carcinoma cells: Involvement of apoptosis and cell cycle dysregulation in vitro and in vivo. J Nutr Biochem. 2012; 23(4):368-78.
20. Liang H, Salinas RA, Leal BZ, Kosakowska-Cholody T, Michejda C J, Waters SJ, et al. Caspase-mediated apoptosis and caspaseindependentcell-death induced by irofulven in prostate cancer cells. Mol. Cancer Ther. 2004; 3: 1385−96.

Original Article

Cytotoxicity effect of synthetic Chalcone derived from 4-Methoxyphenyl on HeLa cell line

Bagher Seyedalipour.,
Assistant Professor, PhD in Biochemistry, Department of Cellular and Molecular Biology, faculty of Basic Sciences, University of Mazandaran, Babolsar, Iran.

Moghadase fazeli.,
MSc in Cellular and Developmental Biology, Departments of Cellular and Molecular Biology, Islamic Azad University, Qaemshahr, Iran.

Salman Ahmady-Asbchin.,
Associate Professor, PhD in Microbiology, Department of Cellular and Molecular Biology, faculty of Basic Sciences, University of Mazandaran, Babolsar, Iran.

Hamid Cheshomi.,
Instructor of Department of Biochemistry, Cellular and Molecular Research Center, Sabzevar University of Medical Sciences, Sabzevar, Iran.

Leilasadat aldaghi.,
MSC in Cellular and Developmental Biology, Cellular and Molecular Research Center, Sabzevar University of Medical Sciences, Sabzevar, Iran.

Received:15/04/2015**, Revised:**16/05/2015**, Accepted:**22/08/2015

Correspondent Author:
Bagher Seyedalipour,
Mazandaran, Babolsar,
University of Mazandaran,
Babolsar, Iran
E-mail: b.alipour81@gmail.com

Abstract

Background and objective: Chalcones are belonged to an important group of flavonoids which has proven anti-inflammatory and antineoplastic effects. Assessing cellular Cytotoxicity effect of new synthetic chalcone on HeLa cell line is the aim of present study.

Materials and Methods: In this experimental *in vitro* study, HeLa cells were treated with various concentrations of chalcone for 72 hours and cell death rates was evaluated by MTT test. Results were analyzed by Student T-Test and morphological changes were assessed by Acridine orange and propidium iodide (PI) staining.

Results: Our results showed that new synthetic chalcone in studied concentrations inhibited tumor cell growth. Highest percent (50.44%) of growth inhibition was seen in 40 µg/ml concentration and after 72 hours IC50 was 40µg/ml. morphological changes of HeLa cells after 24 hours were also strengthened the probability of cellular apoptosis.

Conclusion: The results showed that new chalcone has inhibitive effects on HeLa tumor cell line and a probable mechanism of apoptosis can causes cellular death.

Key words: *Chalcone, HeLa, Cytotoxicity, MTT*