

## Effect of Embelin on Inhibition of Cell Growth and Induction of Apoptosis in k562 Cell Line

Bargeshadi Z, Pazhang Y\*

Departement of Biology, Faculty of Sciences, Urmia University, Urmia, Iran

\* *Corresponding author.* Tel/Fax: +984431944229, E-mail: y.pazhang@urmia.ac.ir

Recieved: Jun 20, 2017

Accepted: Dec 21, 2017

### ABSTRACT

**Background & objectives:** Cancer is one of the leading causes of morbidity and mortality worldwide. Leukemia is a cancer of blood cells and bone marrow, which is characterized by abnormal growth of white blood cells, known as blasts. Chronic myeloid leukemia is a clonal hematopoietic stem cell disorder that accounts for 15-20 percent of adult leukemia. Embelin, a natural compound found in the fruit of Embeliaribes plant, has low toxicity and potent anticancer properties. Several studies have shown that the anticancer properties of Embelin are due to inhibition of XIAP (X-linked inhibitor of the apoptosis protein) and modulation of NF-kB signaling pathway. The aim of this study was to investigate the effect of Embelin on the growth and apoptosis of K562 cell line.

**Methods:** K562 cells were cultured in RPMI-1640 medium containing 10 % FBS and 1% penicillin. Then, the cells were treated with different concentrations of Embelin (2, 4, 6, 8  $\mu$ M/ml) for 72 hours. MTT assay was used to determine the viability of cells. Hoechst staining and DNA electrophoresis were used for apoptosis analysis.

**Result:** Based on the results of MTT assay, Embelin inhibited the viability of K562 cells. The results of Hoechst staining showed that DNA fragmentation was increased in the treated cells. DNA electrophoresis analysis revealed that Embelin induced apoptosis.

**Discussion:** As the results showed, Embelin inhibited the cell growth and induced apoptosis in K562 cells time- and dose-dependently. Therefore, Embelin may be a candidate for treatment of chronic myeloid leukemia.

**Keywords:** K562 Cell Line; Apoptosis; Embelin; Anticancer Effect.

# تاثیر ترکیب Embelin بر مهار رشد سلولی و القای آپوپتوز در سلول سرطانی رده K562

زینب برگشادی، یعقوب پازنگ\*

گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران  
\* نویسنده مسئول. تلفاکس: ۰۴۴۳۱۹۴۴۲۲۹. پست الکترونیک: y.pazhang@urmia.ac.ir

## چکیده

**زمینه و هدف:** سرطان یکی از علل عمده مرگ و میر در سراسر جهان است. بیماری لوسمی یک نوع سرطان خون و مغز استخوان است که با افزایش غیرطبیعی سلول‌های سفید خون به نام بلاست مشخص می‌شود. در این میان لوسمی میلوئیدی مزمن (CML) اختلال کلونال سلول‌های بنیادی خون‌ساز است که مسئول ۲۰-۱۵ درصد لوسمی‌های بزرگسالان می‌باشد. Embelin به طور طبیعی در میوه Embelia یافت می‌شود. Embelin ترکیب گیاهی است که سمیت کمی داشته و دارای خاصیت ضدسرطان قوی می‌باشد. مطالعات متعدد نشان می‌دهد که ویژگی ضد سرطان Embelin به دلیل توانایی آن در مهار کردن پروتئین مهار کننده آپوپتوز به نام XIAP و تنظیم مسیر NF-κB می‌باشد. هدف از این تحقیق بررسی اثر ترکیب Embelin بر روی رشد و آپوپتوز رده سلولی F<sub>1</sub>N k562 است.

**روش کار:** ابتدا سلول‌های k562 در محیط حاوی RPMI-1640 و FBS ۱۰٪ و پنی‌سیلین ۱٪ کشت داده شدند و سپس به مدت ۷۲ ساعت با غلظت‌های مختلف از Embelin به صورت (۲.۴۶۸ میکرومول بر میلی لیتر) تیمار شدند. برای بررسی زنده‌مانی سلول‌ها از تست MTT استفاده شد. از رنگ آمیزی هوخست و الکتروفورز DNA برای بررسی وقوع آپوپتوز استفاده شد.

**یافته‌ها:** بر اساس نتایج به دست آمده از آزمایش MTT، Embelin باعث کاهش رشد در سلول‌های تیمار شده گردید. رنگ آمیزی هوخست نشان داد در سلول‌های تیمار شده DNAی قطعه‌قطعه شده افزایش یافته است، همچنین الکتروفورز DNA، القای آپوپتوز توسط Embelin را نشان داد.

**نتیجه گیری:** بر اساس نتایج به دست آمده Embelin باعث کاهش بقای سلولی و القا آپوپتوز در سلول‌های K562 می‌شود و تاثیر آن وابسته به غلظت ترکیب و مدت زمان تیمار می‌باشد. بنابراین می‌توان از این ترکیب به عنوان یک راهکار در درمان لوسمی میلوئید مزمن استفاده کرد.

**واژه‌های کلیدی:** رده سلولی k562، آپوپتوز، Embelin، اثرات ضد سرطانی

دریافت: ۱۳۹۶/۰۳/۳۰ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۹/۳۰

## مقدمه

سرطان یک گروه از بیماری‌هایی است که با رشد غیرعادی سلول‌ها و تهاجم و گسترش آنها از یک عضو مبدأ، به قسمت‌های دیگر بدن مشخص می‌شوند. بیش از ۲۰۰ نوع از سرطان تا به امروز طبقه بندی

شده اند [۱]. لوسمی<sup>۱</sup> نوعی سرطان خون یا مغز استخوان است که با تولید و افزایش غیرمعمول گلبول‌های سفید مشخص می‌شوند. لوسمی یکی از سرطان‌های بدخیم اولیه است که با تولید miRNA

<sup>1</sup> Leukemia

غیرنرمال در ارتباط است، اگر چه پیدا کردن رابطه دقیق آن نیاز به بررسی‌های بیشتر دارد [۲].

### لوسمی میلوئیدی مزمن (CML)<sup>۱</sup>

اختلال کلونال سلول‌های بنیادی خون‌ساز است که منجر به تظاهر کروموزوم فیلادلفیا t(۹:۲۲) یا ژن bcr/abl در سلول‌های آسیب دیده می‌شود، افزایش تعداد گلبول‌های سفید و نابالغ مثل میلوپوسیت‌ها در خون محیطی از جمله تظاهرات بیماری است. تعداد پلاکت‌ها معمولاً افزایش یافته، امکان وجود بازوفیلی و بزرگی طحال نیز شایع می‌باشد. این بیماری به صورت تیبیک افراد میانسال را درگیر می‌کند و مسئول ۲۰-۱۵ درصد از لوسمی‌های بزرگسالان می‌باشد. میزان بروز آن تا اواسط دهه پنجم زندگی به کندی می‌باشد، ولی در بین ۴۰ تا ۵۰ سالگی میزان بروز به سرعت افزایش می‌یابد [۳].

آپوپتوز<sup>۲</sup> یک فرآیند بیولوژیکی حیاتی با هدف مرگ سلول است که تکثیر سلولی را کنترل می‌کند. در سرطان مقاومت به آپوپتوز افزایش می‌یابد. یکی از مکانیسم‌هایی که از طریق آن سلول‌های تومور که برای به دست آوردن مقاومت در برابر آپوپتوز از آن استفاده می‌کنند بیان بالای پروتئین مهارکننده آپوپتوز (IAP)<sup>۳</sup> می‌باشد [۴]. مهارکننده‌های آپوپتوز با بقای تومور مقاوم به شیمی درمانی، موجب پیشرفت بیماری می‌شوند. این پروتئین‌ها مرگ سلولی را از طریق تنظیم کاسپازها کنترل می‌کنند، همچنین به عنوان مهم‌ترین تنظیم کننده‌های مسیرهای پیام‌رسانی داخل سلولی نقش دارند به ویژه فعال سازی فاکتور κB در مسیر NF-κB<sup>۴</sup> را موجب می‌شوند [۵]. به طور کلی ۸ نوع پروتئین مهارکننده آپوپتوز (IAP) در انسان وجود دارد. XIAP پروتئین مهارکننده آپوپتوز وابسته به کروموزوم X است که

بطور مستقیم به کاسپازها متصل شده (کاسپاز ۳،۷) و مهار کاسپازی را موجب شده و باعث مهار آپوپتوز می‌شود. درحالی که IAP‌های سلولی مانع از تجمع پروتئین‌های القاکننده آپوپتوز در مسیرهای پیام‌رسانی شده و بیان مولکول‌های آنتی‌آپوپتوز را تنظیم می‌کنند [۶]. گزارش‌های متفاوتی درباره ارتباط لوسمی میلوئید حاد (AML)<sup>۵</sup> و میزان XIAP وجود دارد. در دو مطالعه بیان پایین XIAP در سیتوژنتیک و اثربخشی مطلوب در بیماری لوسمی میلوئید گزارش شده است [۷، ۸].

ماده مؤثره Embelin با ساختار شیمیایی 2,5 benzoquinone-3dihydroxy-1,4undecyl از نوعی گیاه دارویی به نام Embelia به دست می‌آید (گونه R. Embelia) و دارای طیف گسترده‌ای از خواص دارویی است. هزاران سال قبل از Embelin برای درمان تب و بیماری‌های التهابی و بیماری‌های دستگاه گوارش استفاده می‌شد، این خاصیت ممکن است به دلیل مهار رادیکال‌های آزاد اکسیدکننده و خاصیت آنتی‌اکسیدانی این گیاه باشد [۹]. Embelin حداقل سمیت را دارا بوده و دارای خاصیت ضدسرطانی قوی می‌باشد، مطالعات متعدد نشان می‌دهد که ویژگی ضدسرطانی آن به دلیل توانایی آن در مهار کردن پروتئین مهارکننده آپوپتوز به نام XIAP و تنظیم مسیر NF-κB می‌باشد [۱۰].

در این مطالعه اثر Embelin بر روی رشد سلول‌های لوسمی میلوئید مزمن انسانی، رده K562 مورد بررسی قرار گرفته است.

### روش کار

در یک مطالعه تجربی از سلول‌های سرطانی K562 که از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران، تهران خریداری شدند، استفاده گردید. برای کشت سلول‌ها از محیط کشت RPMI 1640 (Gibco، آمریکا)، پنی‌سیلین استرپتومایسین و FBS (Sigma، آمریکا)

<sup>1</sup> Chronic Myeloid Leukemia

<sup>2</sup> Apoptosis

<sup>3</sup> Inhibitor of Apoptosis Protein

<sup>4</sup> Nuclear Factor Kappa-Light-Chain-Enhancer of Activated B Cells

<sup>5</sup> Acute Myeloid Leukemia

محاسبه IC50 ترکیب Embelin توسط نرم افزار Compusyn  
نرم افزار Compusyn توسط دو دانشمند Chou و Talalay در مورد بررسی اثر دارو طرح ریزی شده است. این نرم افزار جهت تعیین IC50<sup>۵</sup> دارو (غلظتی از دارو که باعث مرگ نیمی از سلول‌ها می‌شود) و بررسی اثر سینرژیسم دو ترکیب به کار می‌رود و از شاخص ترکیبی CI<sup>۲</sup> برای توصیف برهم کنش ترکیباتی مانند دارو استفاده می‌کند [۱۱]. برای محاسبه IC50 از این نرم افزار استفاده شد.

#### بررسی آپوپتوز از طریق رنگ آمیزی هوخست<sup>۶</sup>

در این روش در دو چاهک یک پلیت ۲۴ خانه ای دو میلی لیتر محیط کشت حاوی ۱۰<sup>۵</sup> × ۲ سلول اضافه شد. چاهک اول به عنوان کنترل در نظر گرفته شد. چاهک دوم با غلظت IC50 ترکیب Embelin تیمار شد. بعد از ۷۲ ساعت انکوباسیون سلول‌های هر چاهک سانترفیوژ شدند. برای فیکس کردن سلول‌ها روی رسوب سلولی ۲۰۰ میکرولیتر متانول ریخته و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد گذاشته شد. بعد از سانترفیوژ سلول‌ها، بر روی ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی در بافر PBS، ۱ میکرولیتر از رنگ هوخست (Hoechst 3342) اضافه شده و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه انکوبه شد. در نهایت بعد از سانترفیوژ و حل کردن رسوب سلولی در ۵۰ میکرولیتر از بافر PBS و سپس ۱۰ میکرولیتر از آن روی لام میکروسکوپی قرار داده شد. سپس توسط میکروسکوپ فلورسنت مشاهده و عکس برداری گردید. با استفاده از رنگ آمیزی هوخست 3342 بررسی وقوع مرگ سلولی و تشخیص مرگ سلولی از نوع آپوپتوز صورت گرفت. از میکروسکوپ فلورسنت جهت مشاهده سلول‌های رنگ گرفته استفاده شد. برای مطالعه آپوپتوز به وسیله میکروسکوپ فلورسنت، در رنگ آمیزی با رنگ

استفاده شد. سلول‌ها در محیط RPMI حاوی ۱۰٪ سرم جنین گاوی (FBS) و ۱٪ پن استریپ کشت داده شد. شرایط لازم برای کشت سلول‌های K562 دمای ۳۷ درجه و رطوبت ۹۵٪ و CO<sub>2</sub> ۵٪ می‌باشد. با استفاده از انکوباتور کشت سلولی، کشت سلول‌ها در شرایط ذکر شده صورت گرفت.

#### تهیه غلظت‌های مختلف از ترکیب Embelin

ترکیب Embelin از شرکت سیگما خریداری شد. با استفاده از وزن مولکولی ترکیب، مقدار مورد نیاز از ترکیب Embelin برای تهیه محلول استوک، محاسبه و توسط ترازوی دیجیتالی دقیق وزن و در حلال DMSO<sup>۱</sup> حل شد. سپس غلظت‌های ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۰ میکرومولار از ترکیب تهیه شد.

#### بررسی اثرات سیتوتوکسیک ترکیب Embelin با آزمون MTT

در این روش به منظور بررسی اثرات ضد توموری ترکیب Embelin، ۵۰۰۰ سلول در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه ای به همراه محیط کشت حاوی رقت‌های ۲، ۴، ۶، ۸ میکرومول از ترکیب به هر چاهک اضافه شد. ۳ چاهک ردیف اول در پلیت به عنوان چاهک کنترل، ۳ چاهک ردیف دوم با حلال DMSO تیمار شد. پس از ۷۲ ساعت ۱۰ میکرولیتر از محلول MTT<sup>۲</sup> (۱ میلی گرم از پودر MTT بر ۱ میلی لیتر بافر PBS<sup>۳</sup>) بر روی هر چاهک اضافه شده و به مدت ۴ ساعت انکوبه گردید. پس از ۴ ساعت به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر DMSO خالص اضافه شد. بعد از ۲۰ دقیقه انکوباسیون و حل شدن رسوب، نور جذب شده در طول موج ۵۴۰ نانومتر توسط دستگاه الیزا ریدر ثبت گردید. بر اساس جذب هر چاهک نسبت به چاهک کنترل، میزان زنده‌مانی<sup>۴</sup> نمونه‌های تیمار به دست آمد.

<sup>۱</sup> Dimethyl sulfoxide

<sup>۲</sup> 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide

<sup>۳</sup> Phosphate Buffered Saline

<sup>۴</sup> Viability

<sup>۵</sup> Half Maximal Inhibitory Concentration

<sup>۶</sup> Hoechst

اولیگونوکلئوتیدی می‌باشد، این DNA قطعه قطعه شده توسط الکتروفورز قابل مشاهده است. DNA ژنومی سلول‌های تیمار شده به صورت اسمیر یا لکه روی ژل الکتروفورز دیده می‌شود [۱۲].

#### تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

نمودارها در نرم افزار Excel رسم شد و داده‌های بدست آمده نیز توسط T-Test از نرم افزار Excel جهت بررسی ارتباط غلظت داروی تیمار شده و زمان تیمار در مقایسه با نمونه کنترل در سطح  $p \leq 0.05$  تجزیه و تحلیل شد. مقادیر ارائه شده در نمودارها به صورت میانگین سه تکرار مسقل  $\pm$  انحراف استاندارد می‌باشد.

#### یافته‌ها

##### بررسی اثرات سیتوتوکسیک ترکیب Embelin بر

##### روی سلول‌های سرطانی رده K562

در این تحقیق برای بررسی اثرات سیتوتوکسیک ترکیب Embelin بر روی سلول‌های K562 از روش رنگ سنجی MTT استفاده شد. اثرات مهارتی ترکیب در ۴ غلظت ۲،۴،۶،۸ میکرومولار بمدت ۲۴،۴۸،۷۲ ساعت بر روی رشد سلول‌ها بررسی شد. بدین منظور ۵۰۰۰ سلول کشت داده شد و با مقادیر مختلف ترکیب Embelin تیمار شدند. نتایج بدست آمده از آزمون MTT بعد از گذشت ۷۲ ساعت نشان‌دهنده تأثیر این ترکیب بر کاهش رشد سلولی در مقایسه با گروه کنترل بود، به طوری که اثر کاهندگی رشد سلول‌ها ارتباط معنی‌دار مستقیمی با غلظت دارو، و مدت زمان تیمار با دارو داشت. بطوری‌که در ۷۲ ساعت تیمار با غلظت ۸ میکرومولار، از ترکیب بیشترین کاهش در رشد سلول‌ها مشاهده شد، که برابر با ۶۰ درصد کاهش رشد سلولی بود (نمودار ۱). داده‌های حاصل به نرم افزار Compusyn وارد و IC50 ترکیب Embelin در غلظت‌های تیمار داده شده محاسبه گردید، که مقدار آن برابر با ۴ میکرومولار بود، یعنی در غلظت ۴ میکرومولار ۵۰٪

هوخست سلول‌های طبیعی به صورت یکنواخت دیده می‌شوند، در صورتی که هسته سلول‌های آپوپتوز شده به واسطه متراکم شدن کروماتین و قطعه قطعه شدن هسته، به طور غیرمنظم و به صورت نقاط درخشان قابل مشاهده است.

##### بررسی آپوپتوز با استفاده از تکنیک الکتروفورز DNA

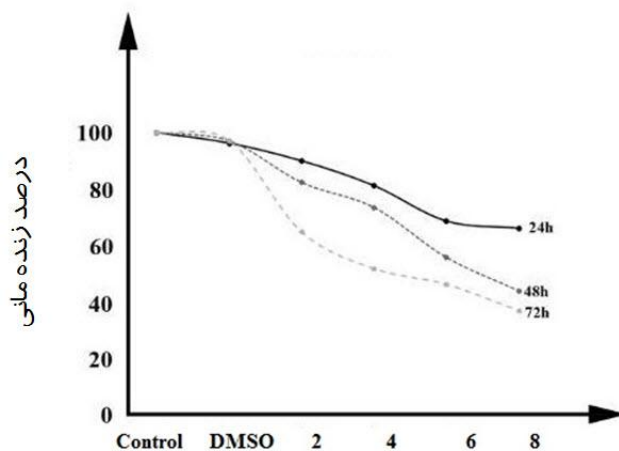
بدین منظور تعداد  $\frac{2 \times 10^6}{MI}$  سلول در فلاسک کشت داده شد. یک فلاسک بعنوان کنترل در نظر گرفته شد و فلاسک بعدی با غلظت IC50 محاسبه شده برای ترکیب Embelin تیمار شد. این فلاسک‌ها به مدت ۷۲ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد و ۵٪ CO<sub>2</sub> انکوبه شدند. پس از گذشت ۷۲ ساعت سلول‌های هر فلاسک به صورت مجزا در میکروتیوپ‌های ۱ میلی‌لیتری جمع‌آوری شدند تا استخراج DNA روی آن‌ها انجام بگیرد. بدین صورت که ابتدا ۶۰۰ میکرولیتر بافر لیز بر روی سلول‌ها اضافه، و به همراه ۲۰ میکرولیتر پروتئیناز K در دمای ۵۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ ساعت انکوبه شدند. بر روی محلول سلولی، محلول فنول / کلروفرم / ایزوآمیل الکل با نسبت ۲۵:۲۴:۱ اضافه شد. محلول رویی به دقت برداشته و در میکروتیوپ تمیز ریخته شد و سپس به روی آن محلول NaCl ۶ مولار و دوبرابر حجم محلول، اتانول مطلق به هر نمونه اضافه و DNA نمونه‌ها رسوب داده شد. سپس برای ته‌نشینی، نمونه‌ها به مدت یک شب در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. پس از سانترفیوژ در دمای ۴ درجه و برداشت مایع رویی رسوب DNA در بافر TE با pH=۸ حل و جهت الکتروفورز آماده شد. DNA آماده شده توسط دستگاه الکتروفورز با ولتاژ ۸۰ ولت به مدت یک ساعت در ژل آگارز یک درصد حاوی اتیدیوم بروماید جداسازی گردید. مولکول‌های DNA بر حسب وزن خود بر روی ژل حرکت و ایجاد باند نمودند. در نهایت توسط دستگاه ژل‌داک عکس‌برداری از ژل صورت گرفت. در سلول‌های آپوپتوز شده DNA به صورت قطعات

از سلول‌ها در مقایسه با سلول‌های کنترل دچار مرگ سلولی شدند (نمودار ۲). در تمامی غلظت‌ها و زمان‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲ ساعت کاهش رشد سلول‌ها معنی‌دار بود.

**اثرات مورفولوژیک ترکیب Embelin بر روی سلول‌های K562**

شکل ظاهری سلول‌های تیمارشده بعد از ۲۴، ۴۸، ۷۲ ساعت تیمار با غلظت IC50 محاسبه شده از ترکیب Embelin توسط میکروسکوپ معکوس مشاهده و

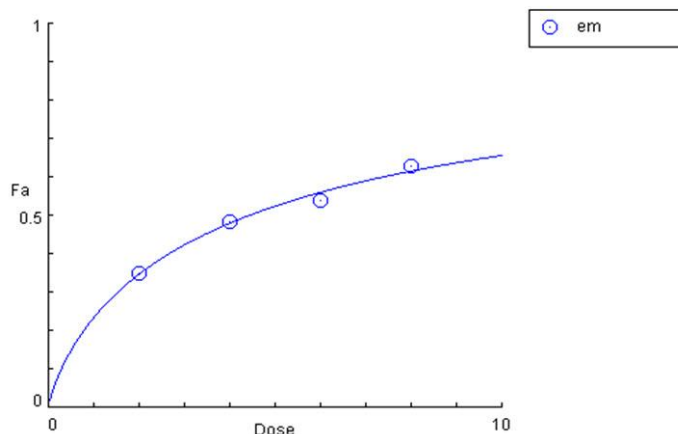
عکس‌برداری شد. مشاهدات نشان داد که تیمار با دارو باعث تغییر در شکل ظاهری سلول‌ها و از بین بردن شکل منظم در مورفولوژی سلول‌ها می‌شود. به طوری که شکل ظاهری سلول‌ها نشان‌دهنده وقوع آپوپتوز در آن‌ها می‌باشد و با افزایش غلظت و زمان اثر دارو تعداد سلول‌های دارای مورفولوژی آپوپتوتیک بیشتر می‌شود (شکل ۱).



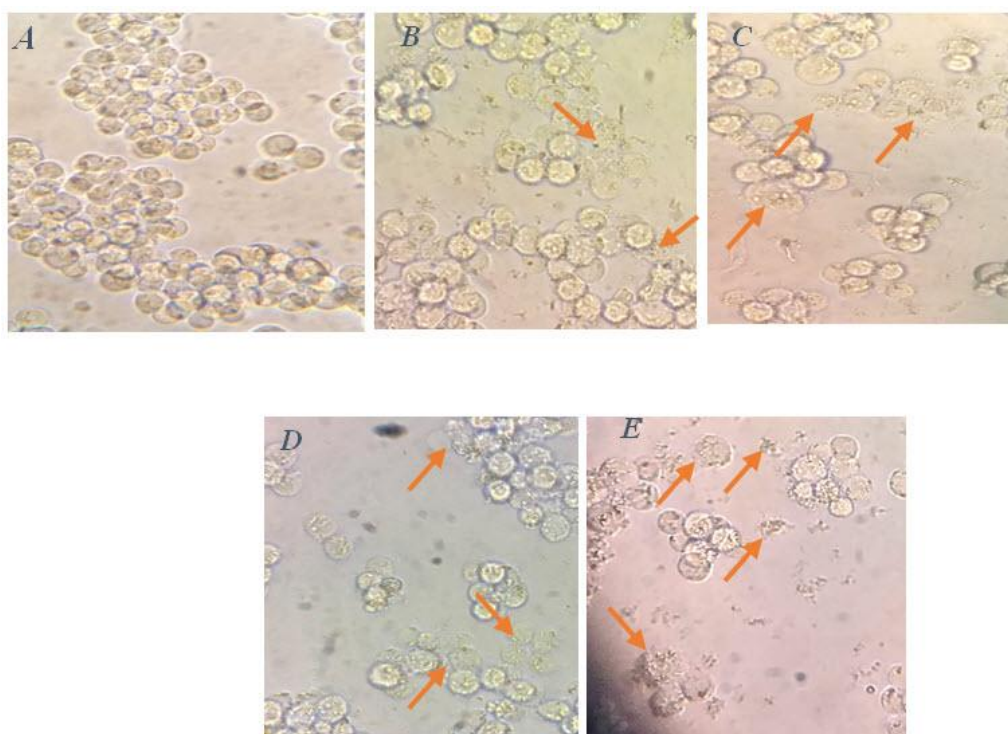
غلظت (میکرومولار)

نمودار ۱. تاثیر غلظت‌های مختلف ترکیب Embelin بر میزان زنده‌مانی سلول‌های K562 در زمان‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲ ساعت. اثرات سیتوتوکسیک این ترکیب به صورت وابسته به زمان و غلظت می‌باشد، طبق نمودار، میزان زنده‌مانی سلول‌های سرطانی با افزایش غلظت کاهش می‌یابد.

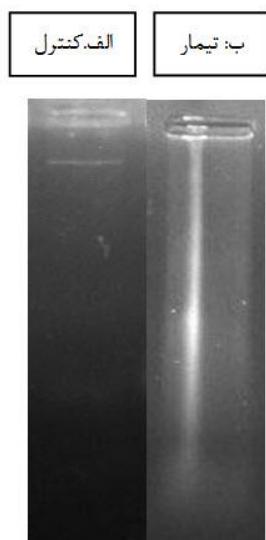
IC50: 4.40796



نمودار ۲. محاسبه غلظت IC50 ترکیب Embelin توسط نرم افزار CompuSyn. این نمودار حاصل برآیند نقاط داده شده به نرم افزار می‌باشد. fraction affected::Fa بر همکنش‌های موثر



شکل ۱. اثرات مورفولوژیک ترکیب Embelin بر روی سلول‌های K562 بعد از ۷۲ ساعت. بزرگنمایی ۴۰×  
 A: سلول‌های کنترل، B: سلول‌های تیمار با غلظت ۲ میکرومولار، C: سلول‌های تیمار با غلظت ۴ میکرومولار، D: سلول‌های تیمار با غلظت ۶ میکرومولار، E: سلول‌های تیمار با غلظت ۸ میکرومولار



شکل ۲. بررسی آپوپتوز سلول‌های K562 بر روی ژل الکتروفورز. شکل الف، DNA سلول‌های بدون تیمار بر روی ژل الکتروفورز. شکل ب، DNA سلول‌های تحت تیمار با غلظت IC50 Embelin بعد از 72 ساعت بر روی ژل الکتروفورز.

تکنیک الکتروفورز جهت بررسی وقوع آپوپتوز در سلول‌های K562 تیمار شده توسط ترکیب Embelin به منظور بررسی آپوپتوز توسط الکتروفورز DNA، سلول‌های K562 به مدت ۷۲ ساعت توسط غلظت IC50 محاسبه شده ترکیب Embelin که معادل ۴ میکرومولار بدست آمد، تیمار شدند. همانگونه که در شکل ۲ مشاهده می‌شود DNA استخراج شده از سلول‌های تیمار شده بر روی ژل الکتروفورز حرکت می‌کند و ایجاد اسمیر می‌کند که نشان‌دهنده قطعه‌قطعه شدن DNA و وجود آپوپتوز در سلول‌های تیمار شده می‌باشد در حالی که DNA سلول‌های کنترل به صورت تک باند بر روی ژل ظاهر می‌شود.

غیرمنظم و تشکیل قطعات سلولی در مقایسه با سلول‌های کنترل که دارای هسته کامل و رنگ یکنواختی بودند، نشان‌دهنده وقوع مرگ سلولی از نوع آپوپتوز بود. در نمونه‌های تیمارشده هسته‌های آپوپتوتیک بیشتر بودند که این نشان‌دهنده آپوپتوز توسط Embelin می‌باشد.

**بررسی آپوپتوز با استفاده از رنگ آمیزی هوخست**  
به منظور بررسی وقوع آپوپتوز در این تکنیک، سلول‌های K562 به مدت ۷۲ ساعت با غلظت IC50 محاسبه شده ترکیب Embelin تیمار شده و پس از رنگ آمیزی هوخست با میکروسکوپ فلورسانس مشاهده و عکس برداری شد. قطعه قطعه شدن هسته‌های سلول‌های تیمار شده و نقاط درخشان



شکل ۳. سلول‌های K562 رنگ آمیزی شده با Hoechst زیر میکروسکوپ فلورسانس. شکل چپ سلول‌های بدون تیمار، راست سلول‌های تیمارشده توسط غلظت IC50 ترکیب Embelin ب مدت ۷۲ ساعت، پیکانها نشان دهنده سلولهای آپوپتوتیک هستند.

بالای پروتئین‌های مهارکننده آپوپتوز در سرطان و اهمیت فعالیت آنها در بقای تومورهای سرطانی و همچنین مقاومت در برابر داروهای ضدسرطانی، این پروتئین‌ها را به عنوان اهداف بالقوه در درمان سرطان می‌توان در نظر گرفت. بدین منظور استراتژیهای متعددی مانند مولکول‌های کوچک به عنوان آنتاگونیست‌های IAP و الیگونوکلوئوتیدهای آنتی سنس به کار گرفته شده اند [۶].

IAP ها از طریق اتصال به کاسپازها مرگ سلولی را کنترل می‌کنند. XIAP، نوعی مهارکننده آپوپتوزی است که به طور اختصاصی به کاسپازهای ۳،۷،۹ متصل می‌شود و از طریق مهار فعالیت افکتورهای پایین دست این کاسپازها را مهار می‌کند [۱۶]. این پروتئین‌ها به عنوان تنظیم‌کننده‌های مسیر آبخشاری گیرنده‌های TNF عمل می‌کنند. TNF شامل دو نوع گیرنده FAS، TNFR1 که حاوی دامین‌های مرگ هستند و این دامین‌ها باعث فعال شدن مسیر آبخشاری می‌شود، این گیرنده‌ها در التهاب، گردش خون و

### بحث

از آنجا که مقاومت اکتسابی سلول به آپوپتوز یکی از مارکرهای اصلی سرطان است، مهارکننده‌های داخلی آپوپتوز می‌توانند به عنوان اهداف بالقوه در درمان سرطان در نظر گرفته شوند. علاوه بر این، مهارکننده‌های آپوپتوزی در تنظیم فعالیت‌های سلولی از قبیل، تکثیر، تمایز و مهاجرت، و همچنین پاسخ‌های پیش التهابی و ایمنی نقش دارند [۱۳]. مهارکننده‌های آپوپتوز (IAP) گروهی از پروتئین‌ها هستند که به عنوان تنظیم‌کننده‌های منفی کاسپازها و مرگ سلولی شناخته شده اند [۱۴]. مهم‌ترین ویژگی پروتئین‌های مهارکننده آپوپتوز کنترل مسیرهای پیام‌رسانی وابسته به یوبی کوئیتین (UB) می‌باشد که باعث تنظیم فاکتور  $\kappa B$  در مسیر (NF- $\kappa B$ ) و تنظیم پروتئین کیناز وابسته به مسیر MAPK<sup>1</sup> می‌شود، که باعث بیان شدن ژن‌های درگیر در التهاب، ایمنی، مهاجرت سلولی، و بقای سلولی می‌شود [۱۵].

<sup>1</sup> Mitogen-Activated Protein Kinase



می‌یابد. Embelin در شرایط آزمایشگاهی اثرات سیتوتوکسیک در رده سلولی فیبروسارکوما داشته و همچنین مشتقات Embelin مانند 5-O-ethylembelin و 5-O-methylembelin باعث مهار رشد و تکثیر در لوسمی رده سلولی HL-60 انسانی و همچنین سلول‌های Hela در سرطان دهانه رحم را موجب می‌شود [۲۶].

با استفاده از تست MTT بقای سلولی و زنده‌مانی سلول‌ها بررسی می‌شود [۲۷]. بدین منظور در نمودار ۱ در مطالعه حاضر بقای سلول‌های سرطانی تیمار شده با غلظت‌های مختلف ترکیب Embelin در مقایسه با سلول‌های کنترل محاسبه و ترسیم گردیده است. بر اساس نتایج حاصله ملاحظه می‌شود بقای سلول‌های تیمار نسبت به سلول‌های کنترل کاهش یافته است. به طوری که افزایش غلظت ترکیب Embelin و افزایش مدت زمان تیمار کاهش بیشتر در رشد سلولی را نشان می‌دهد.

مطالعه دیگری القای آپوپتوز در سلول‌های لوسمی انسانی توسط Embelin که از طریق کاهش بیان XIAP در این سلول‌ها است را نشان می‌دهد [۲۸].

در مطالعات اخیر Embelin باعث کاهش بقای سلول‌های سرطانی معده، القای آپوپتوز، افزایش فعالیت ضدتوموری 5-FU در سلول‌های سرطانی معده می‌شود. همچنین Embelin باعث القای توقف چرخه سلولی در فاز G2/M, S می‌شود. از لحاظ مولکولی Embelin باعث کاهش بیان پروتئین (XIAP) و پروتئین‌های تنظیم کننده چرخه سلولی، مانند CDK1, CDC25B, CDC25C, cyclinB1 می‌تواند CDK2 می‌شود. علاوه بر این Embelin می‌تواند چندین مسیر مرتبط با رشد سلولی و آپوپتوز مانند JAK/STAT, p38/ MAPK, AKT/PI3K و p53 تنظیم کند [۲۹]. لیگاند القای آپوپتوز مرتبط با فاکتور نکروز توموری (TRAIL) می‌تواند موجب القای آپوپتوز در سلول‌های توموری، بدون ایجاد سمیت در سلول‌های سالم شود، که به عنوان یک راه

پاسخ‌های ایمنی نقش دارند [۱۷]. از آنجایی که تنظیم‌کننده‌های آپوپتوزی نقش ویژه‌ای در فعال کردن فاکتورهای ضد آپوپتوزی شامل (Bcl-2, Bcl-xL) و غیرفعال کردن فاکتورهای آپوپتوتیک (p53) و کاهش مقاومت سلول‌های سرطانی را موجب می‌شوند، می‌توان از آن‌ها به عنوان یک استراتژی در درمان سرطان استفاده کرد [۱۸].

XIAP یکی از بهترین، موثرترین و قوی‌ترین مهارکننده‌های درونی کاسپازاست، و به عنوان یک تنظیم‌کننده کلیدی فیزیولوژیک در مرگ سلولی در نظر گرفته می‌شود [۱۹،۲۰]. همچنین ارتباط بین XIAP و مقاومت سلول‌های سرطانی به شیمی‌درمانی در برخی مطالعات نشان داده شده است [۲۱،۲۲].

Embelin ترکیب استخراج شده از گیاه *Embelia ribes*، با اتصال به پروتئین (XIAP) و مهار این پروتئین، موجب مهار مسیرهای التهابی می‌شود [۲۳].

Embelin منجر به کاهش بقای سلولی و مهار رشد به صورت وابسته به دوز و زمان می‌شود، علاوه بر این Embelin باعث دپلاریزاسیون پتانسیل غشایی میتوکندری شده و تنظیم بیان پروتئین (XIAP) می‌شود، همچنین با فعال‌سازی کاسپاز ۹ منجر به القای آپوپتوز در سلول‌های لوسمی انسانی می‌شود [۲۴]. بسیاری از مطالعات نشان داده‌اند از لحاظ مولکولی، Embelin ژن‌های درگیر در سرطان را در سلول‌های سرطانی مختلف مورد هدف قرار می‌دهد، برای مثال در مطالعات اخیر Embelin از طریق تنظیم بیان PPARc در سرطان روده موجب مهار رشد سلولی و القای آپوپتوز می‌شود [۲۵].

در مطالعه حاضر همانطور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود تغییرات مورفولوژی سلول‌های تیمار در مقایسه با سلول‌های کنترل مشهود است. Embelin با اثر بر روی سلول‌های رده k562 باعث کاهش رشد و تکثیر سلولی می‌شود. با افزایش دوز ترکیب و مدت زمان تیمار، اثر کاهندگی بر رشد سلول‌ها افزایش

باعث کاهش رشد سلولی و القای آپوپتوز به صورت وابسته به زمان و وابسته به دوز می‌شود. از آنجایی که ماده موثر یک گیاه به عنوان یک داروی استاندارد با کمترین خطرات اثر جانبی در نظر گرفته می‌شود، با توجه به حداقل سمیت و اثر مهاری Embelin بر کاهش رشد و تکثیر سلول‌های K562 می‌توان از این ترکیب به عنوان یک پیشنهاد در درمان سرطان لوسمی میلوئید مزمن استفاده کرد. از محدودیت‌های این پژوهش می‌توان به عدم استفاده ترکیب Embelin در موارد انسانی اشاره کرد که تاکنون تاثیر این ترکیب بر روی انسان مورد مطالعه قرار نگرفته است.

### تشکر و قدردانی

این مقاله از پایان‌نامه تصویب شده در دانشگاه ارومیه با شماره ۴۱۷/ت.د.ت. ۲/ استخراج شده است. بدین وسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه ارومیه به دلیل تامین بودجه این طرح تشکر و قدردانی می‌گردد.

امیدوارکننده در درمان سرطان محسوب می‌شود. Embelin می‌تواند با اثر بر این لیگاند باعث مهار رشد سلول‌های لوسمی و همچنین فعال کردن مسیر کاسپازها و علاوه بر این، تنظیم مسیر NF- $\kappa$ B و کاهش رونویسی از ژن‌های این مسیر شود [۳۰]. در ادامه برای مطالعات مرگ سلولی از رنگ آمیزی هوخست و الکتروفورز DNA استفاده شد. مشاهدات میکروسکوپی نشان دادند سلول‌های تیمار شده با ترکیب Embelin در مقایسه با سلول‌های کنترل دارای هسته‌های آپپتوتیک بوده که نشان‌دهنده القای آپپتوز توسط ترکیب Embelin می‌باشد (شکل ۳). همچنین نتایج الکتروفورز در شکل ۲ نشان داد در نمونه‌های تیمار DNA به صورت قطعات اسمیر دیده می‌شود، وجود این قطعات نشان‌دهنده آپپتوز در نمونه‌های تیمار شده با ترکیب Embelin می‌باشد.

### نتیجه گیری

یافته‌های این تحقیق نشان داد ترکیب Embelin دارای اثرات کشندگی، ضد تکثیر سلولی و محرک آپپتوز است، به طوری که Embelin در رده سلولی K562

### References

- 1-Pecorino L. Molecular Biology of Cancer, Mechanisms, Targets, and Therapeutics, 3<sup>rd</sup>ed. United Kingdom; Oxford University Press, OUP, 2012:1-2.
- 2-Fernandes Q. MicroRNA: Defining a new niche in Leukemia. Blood rev. 2017 May; 31(3):129-138.
- 3-Deininger, MW, Goldman JM, Melo JV. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. Blood. 2000 Nov;96(10): 3343-3356.
- 4-Nachmias B, Ashhab Y, Ben-Yehuda D. The inhibitor of apoptosis protein family (IAPs): an emerging therapeutic target in cancer. Semin Cancer Biol. 2004 Aug; 14(4): 231-243.
- 5-Kocab AJ, Duckett CS. Inhibitor of apoptosis proteins as intracellular signaling intermediates. FEBS J. 2016 Jan;283(2):221-31.
- 6-Fulda S, Vucic D. Targeting IAP proteins for therapeutic intervention in cancer. Nat Rev Drug Discov. 2012 Feb; 11(2): 109-24.
- 7-Tamm I, Richter S, Scholz F, Schmelz K, Oltersdorf D, Karawajew L, et al. XIAP expression correlates with monocytic differentiation in adult de novo AML: impact on prognosis. Hematol J. 2004 Jan;5 (6): 489-495.
- 8-Tamm I, Kornblau SM, Segall H, Krajewski S, Welsh K, Kitada S, et al. Expression and prognostic significance of IAP-family genes in human cancers and myeloid leukemias. Clin Cancer Res. 2000 May; 6(5): 1796-1803.
- 9-Joshi R, Kamat JP, Mukherjee T. Free radical scavenging reactions and antioxidant activity of embelin: biochemical and pulse radiolytic studies. Chem Biol Interact. 2007 Apr; 167(2): 125-34.

- 10-Shah P, Djisam R, Damulira H, Aganze A, Danquah M. Embelin inhibits proliferation, induces apoptosis and alters gene expression profiles in breast cancer cells. *Pharmacol Rep.* 2016 Jun; 68(3): 638-644.
- 11-Bijnsdorp IV, Giovannetti E, Peters GJ. Analysis of drug interactions. *Methods Mol Biol.* 2011; 731: 421-34.
- 12-Singh NP. A simple method for accurate estimation of apoptotic cells. *Exp cell res.* 2000 Apr; 256(1):328-37.
- 13-Philchenkov A, Miura K. The IAP Protein Family, SMAC Mimetics and Cancer Treatment. *Crit Rev Oncog.* 2016; 21(3-4): 185-202.
- 14-Gyrd-Hansen M, Meier P. IAPs: from caspase inhibitors to modulators of NF-kappaB, inflammation and cancer. *Nat Rev Cancer.* 2010 Aug. 10(8): 561-74.
- 15-Silke J, Meier P. Inhibitor of Apoptosis (IAP) Proteins—Modulators of Cell Death and Inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013 Feb; 5(2). pii: a008730.
- 16-Hunter AM, LaCasse EC, Korneluk RG. The inhibitors of apoptosis (IAPs) as cancer targets. *Apoptosis.* 2007 Sep; 12(9): 1543-1568.
- 17-Walczak H. TNF and ubiquitin at the crossroads of gene activation, cell death, inflammation, and cancer. *Immunol Rev.* 2011 Nov; 244(1): 9-28.
- 18-Pistritto G, Trisciuglio D, Ceci C, Garufi A, D'Orazi G. Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. *Aging (Albany NY).* 2016 Apr; 8(4): 603-19.
- 19-Siegelin MD, Gaiser T, Siegelin Y. The XIAP inhibitor embelin enhances TRAIL mediated apoptosis in malignant gliomacells by down-regulation of the short isoform of FLIP. *Neurochem Int.* 2009 Nov ;55(6):423-30.
- 20-Mori T, Doi R, Kida A, Nagai K, Kami K, Ito D, et al. Effect of the XIAP inhibitor embelin on TRAIL-induced apoptosis of pancreatic cancer cells. *J Surg Res.* 2007 Oct ;142(2):281-6.
- 21-Sapi E, Alvero AB, Chen W, O'Malley D, Hao XY, Dwipoyono B, et al. Resistance of ovarian carcinoma cells to docetaxel is XIAP dependent and reversible by phenoxodiol. *Oncol Res.* 2004 Jan ;14(11-12):567-78.
- 22-Muris JJ, Cillessen SA, Vos W, van Houdt IS, Kummer JA, van Krieken JH, et al. Immunohistochemical profiling of caspase signaling pathways predicts clinical response to chemotherapy in primary nodal diffuse large B-cell lymphomas. *Blood.* 2005 Apr. 105(7):2916-23.
- 23-Reuter S, Prasad S, Phromnoi K, Kannappan R, Yadav VR, Aggarwal BB. Embelin Suppresses Osteoclastogenesis Induced by RANKL and Tumor cells In Vitro Through Inhibition of the NF-κB Cell Signaling Pathway. *Mol Cancer Res.* 2010 Oct; 8(10): 1425-36.
- 24-Hu R, Zhu K, Li Y, Yao K, Zhang R, Wang H, et al. Embelin induces apoptosis through down-regulation of XIAP in human leukemia cells. *Med Oncol.* 2011 Dec; 28(4):1584-1588.
- 25-Dai Y, Qiao L, Chan KW, Yang M, Ye J, Ma J. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma contributes to the inhibitory effects of embelin on colon carcinogenesis. *Cancer Res.* 2009 Jun; 69(11):4776–4783.
- 26-Xu M, Cui J, Fu H, Proksch P, Lin W, Li M. Embelin derivatives and their anticancer activity through microtubule disassembly. *Planta Med.* 2005 Oct. 71(10):944–948.
- 27-Ferrari M, Fornasiero MC, Isetta AM. MTT colorimetric assay for testing macrophage cytotoxic activity in vitro. *J Immunol Methods.* 1990 Aug ;131(2):165-72.
- 28-Hu R, Zhu K, Li Y, Yao K, Zhang R, Wang H, et al. Embelin induces apoptosis through down-regulation of XIAP in human leukemia cells. *Med Oncol.* 2011 Dec; 28(4):1584-8.
- 29-Wang DG, Sun YB, Ye F, Li W, Kharbuja P, Gao L, et al. Anti-tumor activity of the X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) inhibitor embelin in gastric cancer cells. *Mol Cell Biochem.* 2014 Jan;386(1-2):143-52.
- 30-Yang T, Lan J, Huang Q, Chen X, Sun X, Yang P, et al. Embelin sensitizes acute myeloid leukemia cells to TRAIL through XIAP inhibition and NF-κB inactivation. *Cell Biochem Biophys.* 2015 Jan; 71(1): 291-7.