



مقاله پژوهشی

تأثیر ضد سرطانی سلاسترویل بر روی سلول‌های سرطانی رده K562

سونیا دده‌خانی^۱، یعقوب پاژنگ^{۲*}، مهدی ایمانی^۳

۱- پژوهشکده زیست‌فناوری، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

۲- گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

۳- دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۷/۰۷/۱۴

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۶/۱۲/۰۶

چکیده

زمینه و هدف: سطح بیان فاکتور NF- κ B (فاکتور رونویسی که باعث افزایش بیان ژن‌های التهابی می‌شود) اغلب در سرطان‌های مختلف انسانی افزایش می‌یابد، لذا مهارکننده‌های این فاکتور مانند سلاسترویل می‌توانند جهت جلوگیری از پیشرفت سرطان کاربرد داشته باشند. این مطالعه باهدف بررسی اثر ضد سرطانی سلاسترویل بر روی سلول‌های K562 انجام شد.

مواد و روش‌ها: ابتدا سلول‌های K562 کشت داده شدند و اثرات سیتوتوکسیسیته ترکیب سلاسترویل با آزمون MTT تعیین شد. از رنگ‌آمیزی هوخست و الکتروفورز DNA برای بررسی وقوع آپوپتوز استفاده شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها توسط نرم‌افزار SPSS ویرایش ۱۶ و آزمون آماری ANOVA انجام گردید. ($P < 0/05$)

نتایج: بررسی آماری داده‌های به‌دست‌آمده از آزمون MTT نشان داد که رشد سلول‌های تیمار شده با غلظت‌های مختلف سلاسترویل به‌صورت معنی‌داری کاهش پیدا کرده است ($P < 0/05$) که این تأثیر مهار سلاسترویل وابسته به غلظت و مدت‌زمان تیمار است، لذا بیشترین تأثیر در غلظت $8 \mu\text{M}$ و 72 ساعت مشاهده شد. غلظت IC_{50} سلاسترویل برابر با $4 \mu\text{M}$ میکرومولار به دست آمد. نتایج و تصاویر به‌دست‌آمده از الکتروفورز DNA و رنگ‌آمیزی هوخست سلول‌های تیمار شده، قطعه‌قطعه شدن DNA و هسته سلول را نشان داد.

نتیجه‌گیری: بر اساس نتایج به‌دست‌آمده، سلاسترویل باعث کاهش بقای سلولی ($P < 0/05$) و القا آپوپتوز در سلول‌های K562 می‌شود و تأثیر آن وابسته به غلظت ترکیب و مدت‌زمان تیمار است. در نتیجه احتمالاً از این ترکیب می‌توان به‌عنوان یک داروی ضد سرطان در درمان لوسمی میلوئید مزمن استفاده کرد.

کلمات کلیدی: سلاسترویل، رده سلولی K562، اثرات ضد سرطانی، لوسمی

مقدمه

سرطان یک بیماری چندعاملی با آمار مرگ‌ومیر بالا است و در سال‌های اخیر به علت افزایش ابتلا به بیماری سرطان، این بیماری به‌عنوان یک عامل تهدیدکننده برای سلامت عمومی مطرح است. در حال حاضر سرطان عامل 15% مرگ‌ومیر در جهان محسوب می‌شود (۱-۴) و سومین عامل مرگ‌ومیر در ایران است. در میان انواع سرطان‌ها، لوسمی یکی از خطرناک‌ترین آن‌ها است که پنجمین علت مرگ‌ومیر ناشی از سرطان در جهان است (۵-۶). سرطان خون یکی از انواع سرطان‌ها است که امروزه اکثر روش‌های درمانی برای لوسمی، پرتودرمانی و شیمی‌درمانی است که این روش‌ها با مشکلات بسیار و همچنین اثرات جانبی ترکیبات شیمیایی و مقاومت دارویی همراه است. لذا امروزه محققان به دنبال یافتن ترکیبات دیگر با اثرات جانبی کمتر و اثر ضد سرطانی بیشتر برای درمان لوسمی می‌باشند. لوسمی بر

سرطان یک بیماری چندعاملی با آمار مرگ‌ومیر بالا است و در سال‌های اخیر به علت افزایش ابتلا به بیماری سرطان، این بیماری به‌عنوان یک عامل تهدیدکننده برای سلامت عمومی مطرح است. در حال حاضر سرطان عامل 15% مرگ‌ومیر در جهان محسوب می‌شود (۱-۴) و سومین عامل مرگ‌ومیر در ایران است. در میان انواع سرطان‌ها، لوسمی یکی از خطرناک‌ترین آن‌ها است که پنجمین علت مرگ‌ومیر ناشی از سرطان در جهان است (۵-۶). سرطان خون یکی از انواع سرطان‌ها است که امروزه اکثر روش‌های درمانی برای لوسمی، پرتودرمانی و شیمی‌درمانی است که این روش‌ها با مشکلات بسیار و همچنین اثرات جانبی ترکیبات شیمیایی و مقاومت دارویی همراه است. لذا امروزه محققان به دنبال یافتن ترکیبات دیگر با اثرات جانبی کمتر و اثر ضد سرطانی بیشتر برای درمان لوسمی می‌باشند. لوسمی بر

*نویسنده مسئول: یعقوب پاژنگ، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
E-mail: y.pazhang@urmia.ac.ir
<https://orcid.org/0000-0002-0572-2980>

ماده طبیعی که در طب سنتی چینی مورد استفاده قرار می‌گیرند به شدت مورد مطالعه قرار گرفته و تأثیرات ضد توموری آن‌ها در انواع سرطان انسانی نشان داده شده است (۱۵). یکی از دلایل استفاده گسترده از طب سنتی در درمان سرطان مدرن این است که در مقایسه با شیمی‌درمانی، عوامل طبیعی نسبت به بافت‌های طبیعی کمتر سمی هستند (۱۶).

سلاسترویل ترکیبی به فرمول شیمیایی $C_{29}H_{38}O_4$ است که از ریشه گیاه تریپتیرگیوم ویلفاریدی استخراج می‌شود. در حالی که خود این گیاه سمی است، اما از ریشه آن انواع ترکیبات فعال استخراج می‌شود (۱۷). سلاسترویل یک ترکیب تری ترپنوئیدی از خانواده‌ی متید کوئینون‌ها است که در درمان‌های سنتی چین کاربرد دارد. در شرایط *in vitro* و *in vivo* سلاسترویل فعالیت آنتی‌اکسیدانی، ضد عفونی‌کننده و ضد توموری نشان می‌دهد. مطالعات انجام‌شده در درمان سرطان اثرات قابل توجهی از سلول‌کشی و کاهش رشد تومورها توسط سلاسترویل در برخی از مدل‌های حیوانی و انواعی از بدخیمی‌های انسانی را نشان می‌دهند (۱۲، ۱۸، ۱۹) یکی از مهم‌ترین اهداف مولکولی سلاسترویل، فاکتور رونویسی NF- κ B است و به‌طور خاص فعالیت آن را باهدف قرار دادن I κ B kinase (I κ B kinase)، مهار می‌کند. همچنین مطالعات انجام‌شده نشان‌دهنده خاصیت مهارکنندگی سلاسترویل بر روی فاکتور NF- κ B و همچنین کاهش پروتئین‌های ضد آپوپتوز Bcl-2، سورواپوین و STAT3 هستند و از این طریق می‌تواند اثر مهارری روی پیشرفت و رشد سرطان داشته باشد (۱۷).

به دلیل نبود مطالعه‌ای در زمینهٔ درمان سلول‌های K562 با ترکیب سلاسترویل و مقاومت این سلول‌ها به درمان و همچنین با توجه به تأثیر مهارری داروی سلاسترویل بر روی فاکتور NF- κ B، این مطالعه بامنظور امکان ارائه مکانیسم درمانی برای درمان لوسمی در نظر گرفته شد.

مطالعه حاضر باهدف بررسی تأثیر مهارری داروی سلاسترویل بر روی رشد سلول‌های رده K562 (لوسمی میلوئید مزمن) انجام شد.

مواد و روش‌ها

این مطالعه تجربی در آزمایشگاه کشت سلول پژوهشکده زیست‌فناوری دانشگاه ارومیه و طی مراحل زیر به مدت تقریباً یک سال انجام شد. سلول‌های سرطانی K562 از بانک سلولی

اساس نوع سلول‌های درگیر و شدت و سرعت پیشرفت بیماری لوسمی به ۴ نوع تقسیم می‌شود: لوسمی میلوئیدی حاد (AML)، لوسمی میلوئیدی مزمن (CML)، لوسمی لنفوئیدی حاد (ALL)، لوسمی لنفوئیدی مزمن (CLL) (۶). در این میان لوسمی میلوئیدی مزمن ۱۵٪ از کل لوسمی‌ها را تشکیل می‌دهد (۷) که ویژگی آن وجود کروموزوم فیلادلفیا و انکوژن *bcr-abl* است که از جابجایی دوطرفه بین ژن *abl* کروموزوم ۹ و ژن *bcr* در کروموزوم ۲۲ در سلول‌های بنیادی چندتوان به وجود می‌آید. در نتیجه این مکانیسم، پروتئین BCR-ABL P210 تولید می‌شود که فعالیت تیروزین کینازی فعال و مداومی را دارا است. فعالیت مداوم این پروتئین باعث تکثیر بی‌رویه سلول‌های پیش‌ساز میلوئیدی و اختلال در روند آپوپتوز می‌شود. همچنین این پروتئین باعث تغییر در تماس سلول به سلول می‌گردد (۹-۸). چندین رده سلولی از لوسمی میلوئیدی تهیه شده است که یکی از آن‌ها رده K562 است (۱۰).

فاکتور هسته‌ای کاپا یا NF- κ B (Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) پروتئینی کنترل‌کننده رونویسی DNA است که درگیر و مسئول در پاسخ‌های سلولی به محرک‌هایی همچون استرس، سیتوکین‌ها، رادیکال‌های آزاد، تابش‌های فرابنفش، LDL اکسیده و آنتی‌ژن باکتریایی یا ویروسی است. پژوهش‌ها نشان می‌دهد که NF- κ B نقشی کلیدی در تنظیم پاسخ ایمنی به عفونت دارد و فاکتور ضروری در پیشرفت التهاب و سرطان است و در بسیاری از فرایندهای فیزیولوژیکی سلول‌ها از جمله آپوپتوز، تکثیر، تهاجم و رگ زایی نقش دارد. تنظیم نادرست NF- κ B با سرطان، بیماری‌های التهابی و خودایمنی، شوک سپتیک، عفونت ویروسی و توسعه نامناسب سیستم ایمنی مرتبط است (۱۲-۱۱). NF- κ B به‌طور گسترده توسط سلول‌های یوکاریوتی به‌عنوان تنظیم‌کننده بیان ژن‌هایی که در تکثیر و بقا نقش دارند، مورد استفاده قرار می‌گیرد. از همین رو بسیاری از تومورهای انسانی دارای NF- κ B غیرعادی و تنظیم‌نشده می‌باشند به این گونه که در آن‌ها NF- κ B به‌صورت دائم فعال است. NF- κ B فعال بیان ژن‌هایی که تکثیر سلولی را فعال نگه می‌دارند روشن می‌کند و از طرف دیگر سلول را در مقابل آپوپتوز حفظ می‌نماید (۱۳)؛ بنابراین انتظار می‌رود که با مهار بیان این فاکتور در سلول‌های سرطانی بتوان از تکثیر بیشتر سلول‌ها جلوگیری کرد (۱۴). داروهای گیاهی سنتی توان بالقوه‌ای را در درمان سرطان نشان داده‌اند. چندین



جذب نوری هر چاهک در طول موج ۵۷۰ نانومتر توسط دستگاه الیزا ریدر (Biotek, Korea South) ثبت گردید (۲۰).

محاسبه IC₅₀ داروها توسط نرم‌افزار Compusyn

با استفاده از داده‌های به‌دست‌آمده از آزمون MTT، درصد بقای سلول‌ها محاسبه و وارد نرم‌افزار Compusyn شد و غلظت IC₅₀ (Concentration Inhibitory 50-) مربوط به ترکیب سلاسترویل به دست آمد. این نرم‌افزار توسط دو دانشمند به نام‌های چو و تالالای ارائه شده است.

بررسی اثرات مورفولوژیک داروی سلاسترویل بر روی سلول‌های K562

در یک چاهک از یک پلیت ۲۴ خانه‌ای تعداد ۵×۱۰^۵ سلول در یک میلی‌لیتر محیط کشت RPMI حاوی ۱۰٪ FBS ریخته شد و بدون تیمار به‌عنوان سلول‌های کنترل کشت داده شدند و در چهار چاهک دیگر تعداد ۵×۱۰^۵ سلول در یک میلی‌لیتر محیط کشت حاوی غلظت‌های ۲، ۴، ۶ و ۸ میکرومولار از داروی سلاسترویل ریخته و به مدت ۷۲ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵٪ CO₂ تیمار شدند. شکل ظاهری سلول‌ها بعد از گذشت ۷۲ ساعت توسط میکروسکوپ معکوس مشاهده و عکس‌برداری شد.

الکتروفورز DNA

از ویژگی سلول‌های آپوپتوتیک قطعه‌قطعه شدن DNA آن به قطعات اولیگونوکلوئیدی است که DNA ژنومی سلول‌های K562 تیمار شده به‌صورت اسمیر یا لکه روی ژل الکتروفورز دیده می‌شود. برای این کار سلول‌های K562 از فلاسک برداشته و با روش تریپان بلو شمارش شدند. درون دو فلاسک تعداد ۲×۱۰^۶ سلول به همراه محیط کشت RPMI حاوی ۱۰٪ FBS ریخته شد. یک فلاسک به‌عنوان کنترل در نظر گرفته شد و سلول‌ها تنها توسط محیط کشت و بدون تیمار دارویی کشت داده شدند و فلاسک بعدی با غلظت IC₅₀ محاسبه‌شده برای ترکیب سلاسترویل تیمار شد. این فلاسک‌ها به مدت ۷۲ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵٪ CO₂ انکوبه شدند. پس از گذشت ۷۲ ساعت سلول‌های هر فلاسک به‌صورت مجزا در میکروتیوپ‌های ۱ میلی‌لیتری جمع‌آوری شدند تا استخراج DNA روی آن‌ها انجام گیرد. ۶۰۰ میکرولیتر بافر لیز (حاوی کلرید سدیم ۱۰۰ میلی‌مولار، EDTA ۱۰ میلی‌مولار، Tris ۵۰ میلی‌مولار و SDS ۰/۵٪، pH = ۸)

انستیتو پاستور تهیه و کشت داده شد. برای کشت سلول‌ها از محیط کشت RPMI ۱۶۴۰ (Gibco, USA)، پنی‌سیلین استرپتومایسین (Sigma, Germany) و (Fetal bovine serum) (FBS) (Sigma, Germany) استفاده شد. سلول‌ها در محیط RPMI (Roswell Park Memorial Institute) حاوی ۱۰٪ سرم جنین گاوی و ۱٪ پن استریپ کشت داده شد. جهت کشت سلول‌های K562 شرایط خاصی از دما رطوبت و CO₂ لازم است. انکوباتور (Mettler, Germany) کشت سلول دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۹۵٪ و CO₂ ۵٪ را فراهم می‌آورد.

تهیه غلظت‌های مختلف از ترکیب سلاسترویل

پودر سلاسترویل (Sigma, Germany) تهیه شد. با در دست داشتن وزن مولکولی ترکیب سلاسترویل، مقدار موردنیاز از ترکیب سلاسترویل برای تهیه محلول استوک، محاسبه و توسط ترازوی دیجیتالی دقیق وزن و در حلال (DMSO) حل شد. سپس غلظت‌های ۲، ۴، ۶ و ۸ میکرومولار از دارو با توجه به حجم محیط کشت به دست آورده شد.

بررسی بقا سلول‌های تیمار شده با ترکیب سلاسترویل توسط رنگ سنجی MTT

برای بررسی اثرات ضد سرطانی ترکیب سلاسترویل ۵۰ میکرولیتر محیط کشت حاوی ۴×۱۰^۳ سلول در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه‌ای ته صاف ریخته و ۵۰ میکرولیتر محیط کشت حاوی رقت‌های مختلف سلاسترویل به هر چاهک اضافه شد (رقت‌های نهایی ۲، ۴، ۶ و ۸ میکرومولار از سلاسترویل بودند). شمارش سلول‌ها توسط رنگ‌آمیزی تریپان بلو و لام نتوبار انجام گرفت. ۳ چاهک به‌عنوان کنترل در نظر گرفته شد که حاوی سلول‌های بدون تیمار در ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت بودند و ۳ چاهک نیز با ۲ میکرومولار DMSO تیمار شد. سپس پلیت به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد با ۵٪ CO₂ انکوبه شد. در پایان روز سوم ۱۰ میکرولیتر از محلول MTT (۵ میلی‌گرم از پودر MTT بر ۱ میلی‌لیتر بافر PBS) بر روی هر چاهک اضافه‌شده و به مدت ۴ ساعت انکوبه گردید. در این مدت آنزیم سوکسینات دهیدروژناز موجود در میتوکندری سلول‌های سالم محلول MTT (Sigma, Germany) را احیا کرده و آن را به‌صورت ذرات نامحلول بنفش‌رنگ فورمازان درمی‌آورد. پس از ۴ ساعت به هر چاهک پلیت ۵۰ میکرولیتر DMSO خالص اضافه شد. بعد از ۱۵ دقیقه انکوباسیون و حل شدن ذرات فورمازان،

تهیه‌ی اسمیر، سلول‌ها با لامل پوشانده شده و با بزرگنمایی ۱۰۰ توسط میکروسکوپ فلورسنت مشاهده و عکس‌برداری گردید (۲۲).

تجزیه و تحلیل آماری

نمودارها در نرم‌افزار Excel رسم شد و داده‌های به‌دست‌آمده نیز توسط نرم‌افزار SPSS ویرایش ۱۶ و آزمون ANOVA جهت بررسی ارتباط بقا سلول‌ها با غلظت داروی تیمار شده و زمان تیمار در مقایسه با نمونه کنترل در سطح $P < 0.05$ تجزیه و تحلیل شد.

نتایج

بررسی اثرات سیتوتوکسیک داروی سلاسترون بر روی

سلول‌های سرطانی رده K562

به‌منظور بررسی اثرات مهارتی ترکیب سلاسترون بر روی رشد سلول‌های K562 از روش رنگ سنجی MTT استفاده شد. در این تحقیق اثرات مهارتی ترکیب در ۴ غلظت ۲، ۴، ۶ و ۸ میکرومولار به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بر روی رشد سلول‌ها بررسی شد. بدین منظور 4×10^3 سلول در هر چاهک کشت داده شد و با مقادیر مختلف سلاسترون تیمار شد. نتایج به‌دست‌آمده از آزمون MTT بعد از گذشت ۷۲ ساعت نشان‌دهنده تأثیر این دارو بر کاهش رشد سلولی در مقایسه با گروه کنترل بودند. تأثیر این دارو در کاهندگی رشد سلول‌ها ارتباط معنی‌دار مستقیمی با غلظت دارو و مدت‌زمان تیمار با دارو داشت. به‌طوری‌که در ۷۲ ساعت تیمار با غلظت ۸ میکرومولار از سلاسترون بیشترین کاهش در رشد سلول‌ها مشاهده شد که برابر با ۵۷ درصد کاهش رشد سلولی بود (نمودار ۱). در تمامی غلظت‌ها و زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت کاهش رشد سلول‌ها معنی‌دار بود و مقادیر P به ترتیب برابر با ۰/۰۰۲، ۰/۰۱۶ و ۰/۰۱۵ به دست آمد ($P < 0.05$). داده‌های حاصل به نرم‌افزار COMPUSYN وارد و IC_{50} داروی سلاسترون در غلظت‌های تیمار داده شده محاسبه گردید که مقدار آن برابر با ۴ میکرومولار بود (نمودار ۲)؛ یعنی در این غلظت ۵۰٪ از سلول‌ها در مقایسه با سلول‌های کنترل از بین رفته بودند (جذب نوری و درصد سلول‌ها در تمام مراحل آزمایش با گروه کنترل مقایسه شد).

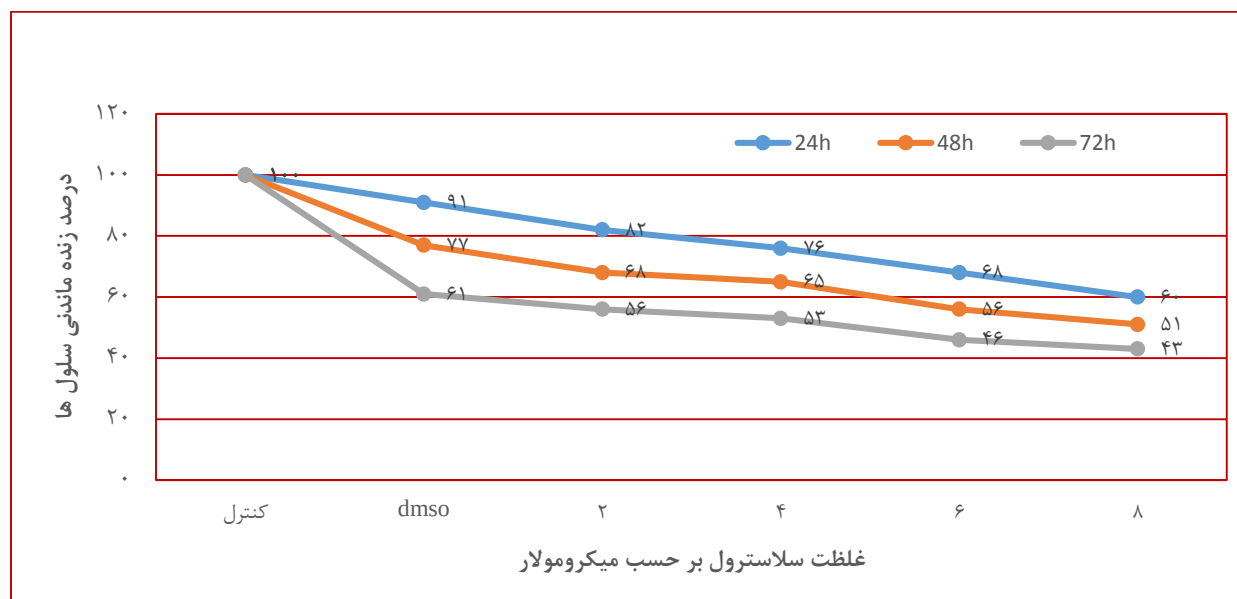
اثرات مورفولوژیک ترکیب سلاسترون بر روی سلول‌های K562

شکل ظاهری سلول‌های تیمار شده بعد از ۷۲ ساعت تیمار با

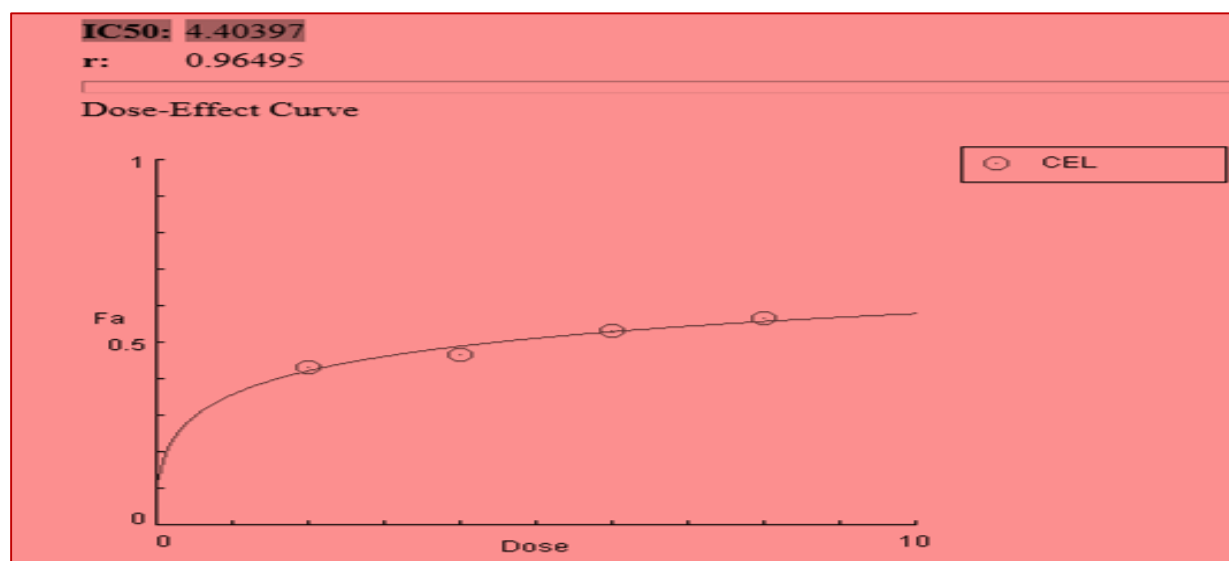
(Sigma, Germany) به روی سلول‌ها اضافه و به همراه ۵ میکرولیتر پروتئیناز K (Sigma, Germany) در دمای ۵۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ ساعت گذاشته شدند. DNA سلول‌ها توسط روش فنول/کلروفرم/ایزوامیل الکل (۱:۲۴:۲۵) استخراج شد. محلول رویی به‌دقت برداشته و در میکروتیوپ تمیز ریخته و به روی آن ۳۰ میکرولیتر محلول NaCl، ۶ مولار و دو برابر حجم محلول، اتانول مطلق به هر نمونه اضافه و DNA نمونه‌ها رسوب داده شد. برای ته‌نشینی و غلیظ شدن اسیدنوکلئیک‌های استخراج‌شده، نمونه‌ها به مدت یک‌شب در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. در روز بعد رسوب DNA در بافر TE (Tris - EDTA) (شامل ۱۰ Tris میلی‌مولار و ۱۰ EDTA میلی‌مولار، pH=۸) حل و جهت الکتروفورز آماده شد. DNA آماده‌شده توسط دستگاه الکتروفورز (Bio Rad, America) با ولتاژ ۸۰ ولت به مدت یک ساعت در ژل یک درصد آگارز حاوی اتیدیموم بروماید جداسازی گردید و درنهایت توسط دستگاه عکس‌برداری از ژل صورت گرفت (۲۱).

تشخیص آپوپتوز با رنگ آمیزی هوخست

به‌منظور بررسی وقوع مرگ سلولی و تشخیص آنکه مرگ سلولی از نوع آپوپتوز است، از میکروسکوپ فلورسنت و رنگ‌آمیزی هوخست (33342) استفاده شد. برای مطالعه آپوپتوز به‌وسیله میکروسکوپ فلورسنت در رنگ‌آمیزی با رنگ هوخست، سلول‌های طبیعی به‌صورت یکنواخت دیده می‌شوند، در صورتی‌که هسته سلول‌های آپوپتوز شده به‌واسطه متراکم شدن کروماتین و قطعه‌قطعه شدن هسته، به‌طور غیرمنظم و به‌صورت نقاط درخشان قابل مشاهده است. بدین منظور در دو چاهک یک پلیت ۲۴ خانه‌ای یک میلی‌لیتر محیط کشت حاوی غلظت 2×10^5 سلول ریخته شد. یک چاهک بدون تیمار و یک چاهک با غلظت IC_{50} سلاسترون تیمار شدند. بعد از ۷۲ ساعت انکوباسیون سلول‌های هر چاهک رسوب داده شد. برای فیکس کردن سلول‌ها روی رسوب سلولی ۲۰۰ میکرولیتر متانول ریخته و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد گذاشته شد. بعد از سانترفیوژ سلول‌ها، بر روی ۱۰۰ میکرولیتر از سوپانسیون سلولی در بافر (Phosphate Buffered) PBS (saline) ۲ میکرولیتر از رنگ هوخست اضافه‌شده و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه انکوبه شد. درنهایت بعد از سانترفیوژ و حل کردن رسوب سلولی در ۱۰۰ میکرولیتر از بافر PBS، ۱۰ میکرولیتر از آن روی لام میکروسکوپی قرار داده شد. بعد از



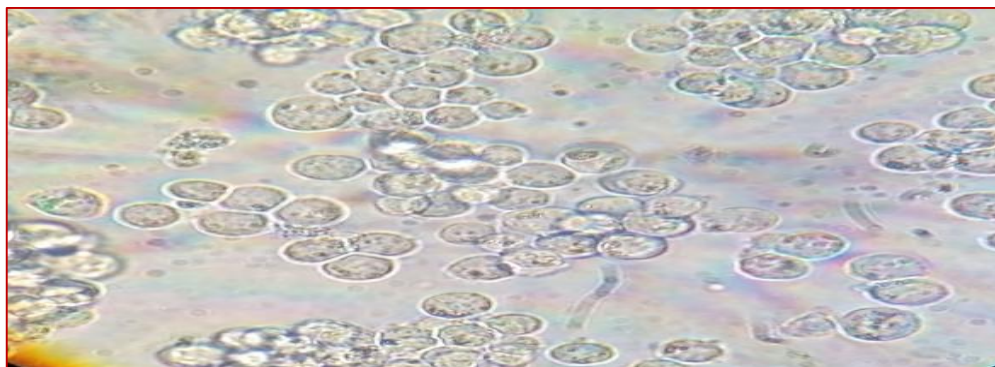
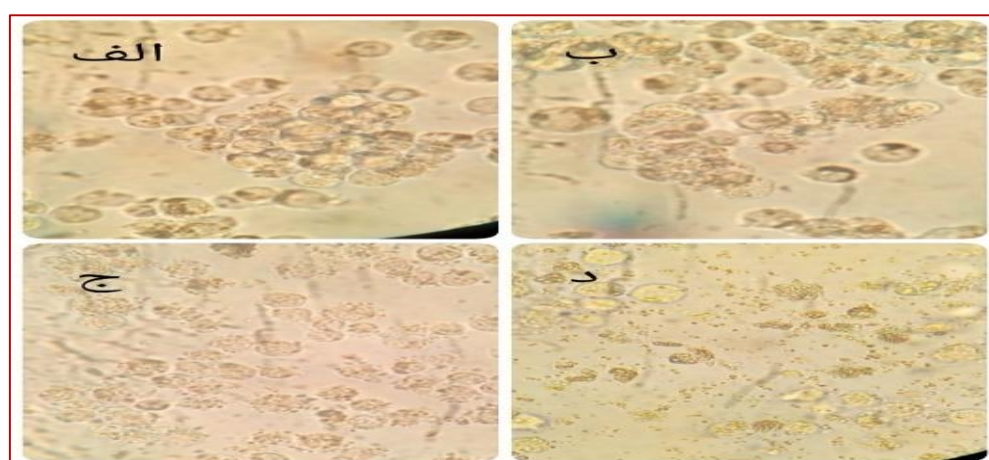
نمودار ۱- تأثیر غلظت‌های مختلف داروی سلاسترویل بر روی رشد سلول‌های سرطانی رده K562 بعد از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تیمار. مقادیر ارائه شده در نمودار به صورت میانگین سه تکرار مستقل $\pm$ انحراف استاندارد است.



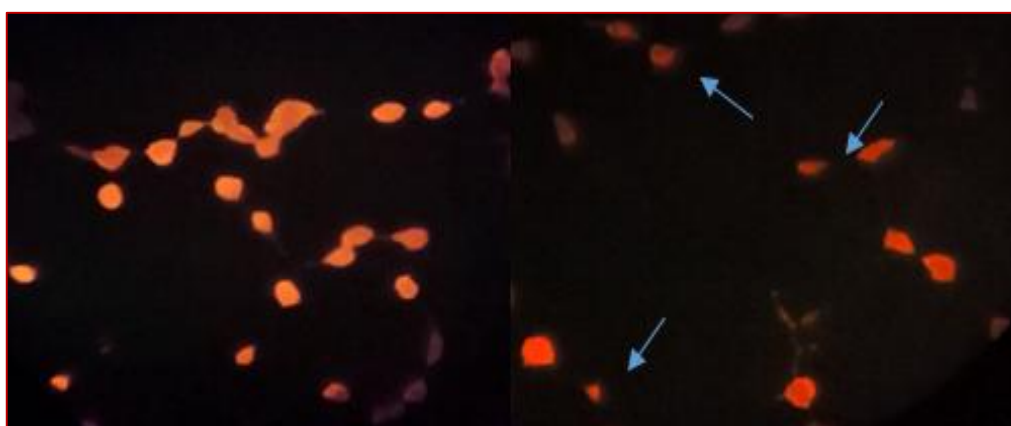
نمودار ۲- محاسبه‌ی غلظت IC₅₀ برای داروی سلاسترویل توسط نرم‌افزار COMPUSYN

آن‌ها است و با افزایش غلظت و زمان اثر دارو تعداد سلول‌های دارای مورفولوژی آپوپتوتیک بیشتر می‌شود (شکل ۱ و ۲).
مطالعه آپوپتوز با استفاده از رنگ‌آمیزی هوخست و میکروسکوپ فلورسانس
بدین منظور سلول‌های K562 به مدت ۷۲ ساعت با غلظت IC₅₀ محاسبه شده داروی سلاسترویل تیمار و پس از رنگ‌آمیزی هوخست با میکروسکوپ فلورسانس مشاهده و عکس‌برداری شد.

غلظت ۲، ۴، ۶ و ۸ میکرومولار از داروی سلاسترویل و همچنین سلول‌های کنترل، توسط میکروسکوپ معکوس مشاهده و عکس‌برداری شد. مشاهدات نشان داد که تیمار با دارو باعث تغییر در شکل ظاهری سلول‌ها و به هم ریختگی در مورفولوژی سلول‌ها می‌شود. به طوری که شکل سلول‌های کنترل دارای غشای سالم و یکدست می‌باشند در حالی که سلول‌های تیمار شده دارای غشای قطعه‌قطعه شده و برجسته شدند که نشان‌دهنده وقوع آپوپتوز در

شکل ۱- سلول‌های کنترل K562 (Scale bar 40 μ m)

شکل ۲- تأثیر مورفولوژیک داروی سلاسترویل بر روی سلول‌های K562 بعد از ۷۲ ساعت. الف) غلظت ۲ میکرومولار ب) غلظت ۴ میکرومولار ج) غلظت ۶ میکرومولار د) غلظت ۸ میکرومولار. با افزایش دوز سلاسترویل تعداد سلول‌هایی آپوپتوز شده (دارای غشا قطعه‌قطعه شده و دارای برجستگی) افزایش یافته است.



شکل ۳- سلول‌های K562 رنگ‌آمیزی شده با Hoechst زیر میکروسکوپ فلورسانس. چپ) سلول‌های بدون تیمار، راست) سلول‌های تیمار شده توسط غلظت IC_{50} داروی سلاسترویل به مدت ۷۲ ساعت، پیکان‌ها نشان‌دهنده سلول‌های آپوپتوتیک هستند که در مقایسه با هسته سلول‌های کنترل دارای هسته قطعه‌قطعه شده می‌باشند.

قطعه‌قطعه شدن هسته‌های سلول‌های تیمار شده و نقاط درخشان غیرمنظم در مقایسه با سلول‌های کنترل که دارای هسته کامل و رنگ یکنواختی بودند، نشان‌دهنده وقوع مرگ سلولی از نوع آپوپتوز بود (شکل ۳).

بررسی وقوع آپوپتوز در سلول‌های K562 تیمار شده با داروی سلاسترویل توسط الکتروفورز DNA

جهت بررسی آپوپتوز توسط الکتروفورز DNA، سلول‌های K562 به مدت ۷۲ ساعت توسط غلظت IC_{50} محاسبه‌شده داروی سلاسترویل که معادل ۴ میکرومولار به دست آمد، تیمار شدند. همان‌گونه که در شکل ۴ مشاهده می‌شود DNA استخراج‌شده 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 است درحالی‌که DNA سلول‌های کنترل به‌صورت تک باند بر روی ژل ظاهر می‌شود (شکل ۴).



شکل ۴- بررسی وضعیت مرگ سلولی سلول‌های K562
چپ. DNA سلول‌های بدون تیمار بر روی ژل الکتروفورز
راست. DNA سلول‌های تحت تیمار با غلظت IC_{50} سلاسترویل بعد از ۷۲ ساعت
بر روی ژل الکتروفورز

بحث

از میان عوامل و مسیرهای مختلفی که موجب بروز سرطان می‌شوند، می‌توان به مسیرهای التهابی اشاره کرد. در دو دهه اخیر مولکول‌های متعددی شناسایی شده‌اند که نقش مهمی در التهاب دارند. این مولکول‌ها شامل فاکتور نکروزکننده (TNF)، اینترلوکین ۱ و ۶، سیکلواکسیژناز (COX2)، متالوپروتئینازهای ماتریکس (MMP) و فاکتور رشد اندوتلیال رگی (VEGF) می‌باشند. ویژگی مشترک تمامی مولکول‌های نامبرده این است

که همگی به‌وسیله فاکتور NF- κ B تنظیم می‌شوند. این فاکتور رونویسی ژن‌های تأثیرگذار در التهاب و سرطان را به هم مرتبط کرده است و چندین فرایند مهم فیزیولوژیکی از قبیل واکنش‌های ایمنی و التهابی، رشد سلول و آپوپتوز را تنظیم می‌کند. در بیشتر بافت‌های سرطانی میزان بیان NF- κ B افزایش می‌یابد ولی در سلول‌های طبیعی NF- κ B در سیتوزول به‌صورت یک کمپلکس غیرفعال که به پروتئین مهارکننده I κ B متصل است، یافت می‌شود. پروتئین I κ B با NF- κ B هتروداایمر را ایجاد می‌کند، بنابراین از انتقال NF- κ B به داخل هسته جلوگیری می‌کند. فاکتور NF- κ B یک کمپلکس پروتئینی کنترل‌کننده رونویسی DNA است و تمام علائم شناخته‌شده سرطان ازجمله تکثیر سریع سلول‌ها و بقا آن‌ها، متاستاز، رگ زایی، مقاومت درمانی و سرکوب ایمنی تحت تأثیر فعالیت NF- κ B ایجاد می‌شوند (۱۸، ۲۳، ۲۴).

در سال‌های اخیر، داروهای طبیعی که در درمان‌های سنتی به کار گرفته می‌شود، در درمان سرطان موردتوجه بسیاری قرار گرفته‌اند. محصولات به‌دست‌آمده از گیاه تریپتیرگیوم ویلفاریدی، ازجمله سلاسترویل و تریپتولید فعالیت‌های ضد سرطانی قابل‌توجهی را در درمان انواع سرطان نشان داده‌اند و ازاین‌رو در میان داروهای گیاهی سنتی هستند که بیشترین پتانسیل را در درمان سرطان دارند (۱۲). این دارو امروزه به علت توانایی آن در مهار رشد سلول‌های توموری در شرایط Invivo و Invitro موردتوجه قرار گرفته است. این ترکیب فعالیت ضد سرطانی، ضدالتهابی، کاهنده فشارخون بالا و ضد دیابتی از خود نشان می‌دهد (۱۹). مطالعات نشان می‌دهد سلاسترویل دارای اثرات قابل‌توجهی در سلول کشی و کاهش تهاجم انواع تومورهای حیوانی ازجمله سرطان پروستات (۲۵)، پستان (۲۶)، کبد (۲۷) و سینه (۲۸) است.

فعال شدن رونویسی از فاکتور NF- κ B و STAT3 یکی از مهم‌ترین عوامل دخیل در بیماری‌زایی و مقاومت به درمان در مولتیپل میلوما است و میزان مرگ‌ومیر را بالا می‌برد. Kannaiyan در سال ۲۰۱۱ نشان داد که سلاسترویل با ایجاد تداخل در مسیر NF- κ B و STAT3 می‌تواند تکثیر سلول‌های MM (Multiple myeloma) را کاهش دهد و این امر با کاهش بیان محصولات ژن‌های گوناگونی که در تکثیر سلول‌ها و تداخل در آپوپتوز نقش دارند، ازجمله Bcl-Xl، Bcl-2، Cyclin D1، XIAP و همچنین پروتئین سورواپوین، همراه است (۲۹). در

رده K562 بررسی شد. مشابه مطالعات گذشته یافته‌های مطالعه حاضر نشان‌دهنده نقش مؤثر داروی سلاستروپل در کاهش رشد و افزایش مرگ سلولی به‌صورت وابسته به غلظت در لوسمی میلوئید مزمن (رده سلولی K562) است. همچنین نتایج حاصله نشان داد که مرگ سلول‌های تیمار شده از نوع آپوپتوز بود، ولی برای بررسی‌های بیشتر و پی بردن به درصد دقیق آپوپتوز، نیاز به استفاده از روش‌های کمی همچون فلوسایتومتری است. به نظر می‌رسد این ترکیب از طریق تداخل با مسیرهای مختلفی از قبیل مسیر فاکتور NF-kb خاصیت ضدسرطانی نشان می‌دهد و تمامی این مسیرها به‌خوبی شناخته نشده است و نیاز به بررسی پروتئین‌های بیشتر برای شناخت مکانیسم اثر آن وجود دارد. همچنین تحقیقات نشان می‌دهد که با تلفیق این ترکیب با داروهای دیگر، با اثر سینرژیستی می‌توان اثر درمانی آن را افزایش داد لذا پیشنهاد می‌شود تأثیر این دارو به همراه ترکیبات دیگر در شرایط *In vivo* و *In vitro* بر روی حیوانات آزمایشگاهی و همچنین مکانیسم القا آپوپتوز در سطح بیان ژن بررسی شود. عدم مطالعه تأثیر این دارو بر روی چند رده سلولی سرطان به‌صورت هم‌زمان، نقطه‌ضعف این مطالعه و مشاهده اثرات ترکیب سلاستروپل بر روی سلول‌های مقاوم به درمان K562 و ارائه پیشنهاد راه‌حل درمانی برای لوسمی از نقاط قوت این مطالعه است.

تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته از پایان‌نامه دوره کارشناسی ارشد با تصویب به شماره ۱۹۰-۱۰۳ است. با توجه به این‌که مطالعه حاضر بر روی سلول‌های تهیه‌شده از انستیتو پاستور انجام شد، نویسندگان مراتب تشکر و قدردانی از مسئولان پژوهشکده زیست فن‌آوری را ابراز می‌دارند.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ‌گونه تعارض منافی را اعلام نکرده‌اند.

مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۴ انجام شد، نشان داده شد که تیمار سلول‌های LP-1 میلوما با سلاستروپل باعث کاهش بیان فاکتور NF-Kb و کاهش پروتئین‌های ضدآپوپتوز Bcl-2 و سورواپوین در این رده سلولی می‌شود. همچنین در این مطالعه افزایش میزان آپوپتوز بعد از تیمار با سلاستروپل در این رده مشاهده شده است که این افزایش با دز ترکیب و زمان تیمار ارتباط مستقیم معنی‌داری داشت (۳۰). همچنین تحقیقی در سال ۲۰۱۲ نشان داد که ترکیب سلاستروپل باعث کاهش تهاجم، چسبندگی و متاستاز در سرطان ریه می‌شود (۳۱). این دارو همچنین با انواعی از ترکیبات در مهار رشد سلول‌های سرطانی و القا آپوپتوز اثر سینرژیستی نشان می‌دهد. مطالعاتی در این زمینه انجام گرفته است. بنا بر گزارش یک گروه تحقیقاتی در سال ۲۰۱۶ بر روی سلول‌های سرطانی رده HL-60 (لوسمی میلوئید حاد)، سلاستروپل باعث کاهش رشد سلول‌های سرطانی، القا آپوپتوز و همچنین کاهش بیان پروتئین ضد آپوپتوز سورواپوین در این سلول‌ها به‌صورت وابسته به غلظت و مدت‌زمان تیمار می‌شود، این ویژگی داروی سلاستروپل در ترکیب با امبلین افزایش معنی‌داری می‌یابد و این دو ترکیب به همراه هم دارای تأثیر سینرژیستی در مهار رشد سلول‌ها و القا آپوپتوز می‌شود (۳۲). بیان پروتئین‌های سورواپوین، AKT و EGFR که در سلول‌های سرطانی افزایش می‌یابند و باعث مهار آپوپتوز و افزایش رشد و تکثیر سلولی می‌شوند، توسط داروی سلاستروپل کاهش می‌یابند و این کاهش در ترکیب سلاستروپل با تریپتولید بیشتر می‌شود و تأثیر سینرژیستی مشاهده می‌شود (۳۳). همچنین داروی سلاستروپل به همراه داروی ABT737 باعث افزایش وقوع آپوپتوز در سلول‌های رده Bel-7402 و HepG2 (هپاتوسلولار کارسینوما) و فعال‌سازی مسیر میتوکندری آپوپتوز در این سلول‌ها می‌شود (۳۴).

نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر تأثیر ترکیب سلاستروپل بر روی سلول‌های



References

1. Merlin NJ, Parthasarathy V, Santhoshkumar TR. Induction of apoptosis in human breast cancer cell line MCF-7 by phytochemicals from *Gmelina asiatica*. *African Journal of Biotechnology*. 2010;9(28):4451-6.
2. Işıkdag İ, Özkay Y, İncesu Z. Synthesis and anticancer activity of some bisquinoxaline derivatives. *Turk J. Pharm. Sci.* 2011 Jul 1;8:179-88.
3. Kwan JM, Fialho AM, Kundu M, Thomas J, Hong CS, Gupta TK, Chakrabarty AM. Bacterial proteins as potential drugs in the treatment of leukemia. *Leukemia research*. 2009 Oct 31;33(10):1392-9.
4. Delluc S, Tourneur L, Michallet AS, Boix C, Varet B, Fradelizi D, Guillet JG, Buzyn A. Autologous peptides eluted from acute myeloid leukemia cells can be used to generate specific antileukemic CD4 helper and CD8 cytotoxic T lymphocyte responses in vitro. *Haematologica*. 2005 Jan 1;90(8):1050-62.
5. Saffar A, Rahgozar M, Shahi F, Biglarian A. Survival analysis of acute myeloid leukemia. *Razi J Med Sci* 2015; 22(134): 41-48.
6. Salehi M, Gohari MR, Vahabi N, Zayeri F, Yahyazadeh SH, Kafashian MR. Comparison of artificial neural network and cox regression models in survival prediction of breast cancer patients. *J ILAM Univ Med Sci* 2013; 21(2): 120-128.
7. Löffler H, Bergmann J, Hochhaus A, Hehlmann R, Krämer A, German CML Study Group. Reduced risk for chronic myelogenous leukemia in individuals with the cytochrome P-450 gene polymorphism CYP1A1* 2A. *Blood*. 2001 Dec 15;98(13):3874-5.
8. Deininger MW, Goldman JM, Melo JV. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2000 Nov 15;96(10):3343-56.
9. Clarkson B, Strife A, Wisniewski D, Lambek CL, Liu C. Chronic myelogenous leukemia as a paradigm of early cancer and possible curative strategies. *Leukemia*. 2003 Jul 1;17(7):1211-62.
10. Karpas A, Hayhoe FG, Greenberger JS, Barker CR, Cawley JC, Lowenthal RM, Moloney WC. The establishment and cytological, cytochemical and immunological characterisation of human haemic cell lines: evidence for heterogeneity. *Leukemia Research*. 1977 Jan 1;1(1):35-49.
11. Baldwin AS. Series introduction: the transcription factor NF-κB and human disease. *The Journal of clinical investigation*. 2001 Jan 1;107(1):3-6.
12. Wang Z, Zhai Z, Du X. Celastrol inhibits migration and invasion through blocking the NF-κB pathway in ovarian cancer cells. *Experimental and therapeutic medicine*. 2017 Jul 1;14(1):819-24.
13. Gilmore TD. Introduction to NF-κB: players, pathways, perspectives. *Oncogene*. 2006 Oct 30;25(51):6680-4.
14. Brasier AR. The NF-κB regulatory network. *Cardiovascular toxicology*. 2006 Jun 1;6(2):111-30.
15. Corson TW, Crews CM. Molecular understanding and modern application of traditional medicines: triumphs and trials. *Cell*. 2007 Sep 7;130(5):769-74.
16. Sak K. Chemotherapy and dietary phytochemical agents. *Chemotherapy research and practice*. 2012 Dec 20;2012.
17. Amirruidin NS, Kumar AP, Teo AK, Sethi G. Role of Celastrol in Chemosensitization of Cancer. In *Role of Nutraceuticals in Cancer Chemosensitization 2018* (pp. 141-150).
18. Perkins ND. Integrating cell-signalling pathways with NF-κB and IKK function. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2007 Jan 1;8(1):49-62.
19. Wong KF, Yuan Y, Luk JM. Tripterygium wilfordii bioactive compounds as anticancer and anti-inflammatory agents. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 2012 Mar;39(3):311-20.
20. Morgan DM. Tetrazolium (MTT) assay for cellular viability and activity. In *Polyamine protocols 1998* (pp. 179-184). Humana Press.
21. Bellosillo B, Pique M, Barragan M, Castano E, Villamor N, Colomer D, et al. Aspirin and salicylate induce apoptosis and activation of caspases in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood* 1998; 92(4): 1406- 14.
22. Allen S, Sotos J, Sylte MJ, Czuprynski CJ. Use of Hoechst 33342 staining to detect apoptotic changes in bovine mononuclear phagocytes infected with *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis*. *Clinical and diagnostic laboratory immunology* 2001; 8(2):460-4.
23. Allison AC, Cacabelos R, Lombardi VR, Álvarez XA, Vigo C. Celastrol, a potent antioxidant and anti-inflammatory drug, as a possible treatment for Alzheimer's disease. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 2001 Oct 31;25(7):1341-57.
24. Taniguchi K, Karin M. NF-κB, inflammation, immunity and cancer: Coming of age. *Nature Reviews Immunology*. 2018 Jan 22.
25. Chiang KC, Tsui KH, Chung LC, Yeh CN, Chen WT, Chang PL, Juang HH. Celastrol blocks interleukin-6 gene expression via downregulation of NF-κB in prostate carcinoma cells. *PloS One*. 2014 Mar 24;9(3):e93151.
26. Kim Y, Kang H, Jang SW, Ko J. Celastrol inhibits breast cancer cell invasion via suppression of NF-κB-mediated matrix metalloproteinase-9 expression. *Cellular physiology and biochemistry: international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*. 2011;28(2):175-84.
27. Li PP, He W, Yuan PF, Song SS, Lu JT, Wei W. Celastrol induces mitochondria-mediated apoptosis in hepatocellular carcinoma Bel-7402 cells. *The American journal of Chinese medicine*. 2015;43(01):137-48.

28. Wang GZ, Liu YQ, Cheng X, Zhou GB. Celastrol induces proteasomal degradation of FANCD 2 to sensitize lung cancer cells to DNA crosslinking agents. *Cancer science*. 2015 Jul;106(7):902-8.
29. Kannaiyan R, Hay HS, Rajendran P, Li F, Shanmugam MK, Vali S, Abbasi T, Kapoor S, Sharma A, Kumar AP, Chng WJ. Celastrol inhibits proliferation and induces chemosensitization through down-regulation of NF- κ B and STAT3 regulated gene products in multiple myeloma cells. *British journal of pharmacology*. 2011 Nov 1;164(5):1506-21.
30. Ni H, Zhao W, Kong X, Li H, Ouyang J. NF-kappa B modulation is involved in celastrol induced human multiple myeloma cell apoptosis. *PloS one*. 2014 Apr 22;9(4):e95846.
31. Xu J, Wu CL, Huang J. Effect of celastrol in inhibiting metastasis of lung cancer cells by influencing Akt signaling pathway and expressing integrins. *Zhongguo Zhong yao za zhi= Zhongguo zhongyao zazhi= China journal of Chinese materia medica*. 2015 Mar;40(6):1129-33.
32. Pazhang Y, Jaliani HZ, Imani M, Dariushnejad H. Synergism between NF-kappa B inhibitor, celastrol, and XIAP inhibitor, embelin, in an acute myeloid leukemia cell line, HL-60. *Journal of cancer research and therapeutics*. 2016 Jan 1;12(1):155.
33. Jiang QW, Cheng KJ, Mei XL, Qiu JG, Zhang WJ, Xue YQ, Qin WM, Yang Y, Zheng DW, Chen Y, Wei MN. Synergistic anticancer effects of triptolide and celastrol, two main compounds from thunder god vine. *Oncotarget*. 2015 Oct 20;6(32):32790.
34. Zhu H, Yang W, He LJ, Ding WJ, Zheng L, Huang P, Lu W, He QJ, Yang B. Upregulating Noxa by ER stress, celastrol exerts synergistic anti-cancer activity in combination with ABT-737 in human hepatocellular carcinoma cells. *PLoS One*. 2012 Dec 20;7(12):e52333.



Original Article

The Anti-cancer Effects of Celastrol on K562 Cell Line

Dadakhani S¹, Pazhang Y^{2*}, Imani M³

1. Biotech Center, Faculty of science, Urmia University, Urmia, Iran

2. Biology Department, Faculty of science, Urmia University, Urmia, Iran

3. Faculty of veterinary, Urmia University, Urmia, Iran

Received: 25 Feb 2018

Accepted: 06 Oct 2018

Abstract

Background & Objective: The level of NF- κ B factor expression (a transcriptional factor which increases the expression of inflammatory genes) is often increased in various human cancers. Therefore, NF- κ B inhibitors such as Celastrol may prevent cancer development. The purpose of this study was to evaluate the anticancer effects of Celastrol on K562 cells proliferation.

Materials & Methods: First, the K562 cells were cultured and cytotoxicity effects of celastrol were determined by MTT assay. Hoechst staining and DNA electrophoresis are used to check apoptosis. Data analysis was performed using SPSS, version 16 and ANOVA test ($P < 0.05$)

Results: Statistical analysis of MTT assay data showed that the growth of treated cells with different concentrations of the Celastrol significantly decreased ($P < 0.05$) and inhibitory effect of Celastrol was time and concentration-dependent; so in higher concentrations (8 μ M) and 72 hours, the maximum effect has occurred. The IC_{50} value of Celastrol was obtained 4 μ M. Also, the results of Hoechst staining and DNA electrophoresis showed that Celastrol caused fragmentation of cell nucleus and DNA.

Conclusion: Based on the results, Celastrol decreases cells viability ($P < 0.05$) and induces apoptosis in K562 cells, its effect is time and dose-dependent. In conclusion, the agent may be applied as an anticancer drug for treatment of chronic myeloid leukemia.

Keywords: Celastrol, K562 cell line, anticancer effects, leukemia

***Corresponding Author:** Pazhang Yaghub, Biology Department, Faculty of science, Urmia University, Urmia, Iran

E-mail: y.pazhang@urmia.ac.ir

<https://orcid.org/0000-0002-0572-2980>