

اثر بتآيونن بر ميزان فعاليت آنزيم تلومراز در رده سلول لوسمى انسان K562

زهرة فائزى زاده*

گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی،
دانشگاه آزاد اسلامی واحد بروجرد

امير قریب

گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی،
دانشگاه آزاد اسلامی واحد بروجرد

مسعود گودرزى

گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه،
دانشگاه آزاد اسلامی واحد بروجرد

*عهده‌دار مکاتبات: بروجرد، خیابان مدرس،
ساختمان مرکزی دانشگاه آزاد اسلامی واحد
بروجرد، گروه علوم آزمایشگاهی، تلفن:
09169656718, 066-42500201

Email: faezizadeh@gmail.com

دریافت: 1393/10/20
پذیرش: 1394/3/12

زمینه: آنزیم تلومراز در اغلب سلول‌های سرطانی فعالیت بالایی دارد، بنابراین مهار فعالیت آن می‌تواند به‌عنوان راهکار جدید و امیدبخش برای درمان سرطان مطرح گردد. برخی از ترکیبات ضدسرطانی مشتق‌شده از گیاهان از طریق مهار تلومراز و القاء آپوپتوز عمل می‌نمایند. گزارش شده بتآيونن به‌عنوان یک کاروتنوئید استخراج‌شده از گیاهان خانواده Roseaceae دارای خواص ضدسرطانی است. هدف از مطالعه حاضر بررسی اثر بتآيونن بر القاء آپوپتوز در سلول‌های سرطانی K562 با تأکید ویژه بر نقش آن در مهار آنزیم تلومراز می‌باشد.

روش‌ها: در این مطالعه اثر بتآيونن بر مهار رشد سلول‌های K562 توسط تست MTT بررسی شد. رنگ‌آمیزی هوخست و آنالیز فلوسایتومتری جهت تعیین میزان وقوع آپوپتوز استفاده گردید. سپس میزان فعالیت آنزیم تلومراز به‌وسیله روش TRAP-ELISA سنجش گردید.

یافته‌ها: در معرض قرار دادن سلول‌های K562 با بتآيونن منجر به کاهش رشد این سلول‌ها به‌صورت وابسته به دوز گردید. آنالیز فلوسایتومتری و رنگ‌آمیزی هوخست نشان داد که با افزایش غلظت بتآيونن درصد سلول‌های آپوپتوزی افزایش می‌یابد. در مقایسه با سلول‌های شاهد، تیمار سلول‌های K562 با بتآيونن منجر به کاهش فعالیت آنزیم تلومراز گردید. علاوه بر این در سلول‌های تیمار شده ارتباط مستقیمی بین مهار فعالیت تلومراز و القاء آپوپتوز مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: بر اساس این نتایج، بتآيونن گزینه مناسب برای مهار فعالیت آنزیم تلومراز در سلول‌های K562 بوده و ممکن است به‌عنوان داروی جدید بر علیه برخی از سلول‌های لوسمى به‌کار گرفته شود.

کلیدواژه‌ها: لوسمى انسانی، بتآيونن، مهارکنندگان تلومراز، آپوپتوز

The effect of β -ionone on telomerase activity in the human leukemia cell line K562

Background: Telomerase is highly activated in most human cancer cells, therefore, its inhibition has been proposed as a novel and promising strategy for cancer therapy. Many plant-derived anticancer agents act through inhibition of telomerase activity and induction of apoptosis. β -ionone, a carotenoid compound isolated from Roseaceae, has been reported to possess anticancer properties. The present study was undertaken to examine the mechanism of β -ionone-induced apoptosis in human leukemia cell line K562 with special emphasis on its role in telomerase inhibition.

Method: In this study the anti-proliferation effect of β -ionone on K562 cells was evaluated by MTT assay. Apoptosis rate was detected by Hoechst staining and flow cytometry analysis. Telomerase activity was measured by (TRAP) ELISA assay.

Results: Exposure of K562 cells to β -ionone caused a dose-dependent decrease in proliferation. Flow cytometry analysis and Hoechst staining showed that percentage of apoptotic cells markedly increased with an increase in β -ionone concentration. Compared to control cells, treatment of K562 cells with β -ionone resulted in a significant decrease of telomerase activity. Moreover, a positive correlation was detected between telomerase inhibition and apoptosis induction in the treated K562 cells.

Conclusion: Based on these results, β -ionone is an appropriate candidate for inhibiting telomerase activity in K562 cells. Therefore, it may be utilized as a novel drug against some leukemia cell lines.

Key Words: human leukemia, β -ionone, telomerase inhibitors, apoptosis

Zohreh Faezizadeh*

Department of Laboratory
Sciences, Faculty of Paramedical
Sciences, Borujerd Branch,
Islamic Azad University,
Borujerd, Iran.

Amir Gharib

Department of Laboratory
Sciences, Faculty of Paramedical
Sciences, Borujerd Branch,
Islamic Azad University,
Borujerd, Iran.

Masoud Goudarzi

Department of Biology, Faculty of
Sciences, Borujerd Branch,
Islamic Azad University,
Borujerd, Iran.

*Corresponding author:

Department of Laboratory
Sciences, Faculty of Paramedical
Sciences, Borujerd Branch,
Islamic Azad University, Moades
St., Borujerd, Iran.
Tel: +98 6642500201, +98
9169656718
Email: faezizadeh@gmail.com

Received: 10 January, 2015

Accepted: 02 June, 2015

مقدمه

سلول‌های سرطانی جهت حفظ طول تلومر و به دنبال آن حفظ توانایی تکثیر نامحدود، مکانیسم‌های مختلفی دارند. از جمله این مکانیسم‌ها، بیان بیش از حد آنزیم تلومراز است که از کوتاه شدن طول تلومر در طی تقسیمات سلولی جلوگیری می‌کند. تلومراز یک آنزیم ترانس کریپتاز معکوس است که ردیف‌های تکراری تلومر را به انتهای کروموزوم‌های یوکاریوتیک اضافه می‌کند (1 و 2). مطالعات نشان می‌دهد که در 90 درصد سلول‌های سرطانی بیان آنزیم تلومراز افزایش یافته است. بنابراین محققان به دنبال کشف داروهای ضد سرطانی با خاصیت ضدتلومرازی هستند، زیرا این داروها به عنوان کاندیداهای قوی جهت درمان سرطان محسوب می‌شوند (3-5). ترکیبات متنوعی با خاصیت مهارکنندگی آنزیم تلومراز طراحی و ساخته شده‌اند که می‌توان به آزیدوتیمیدین، GRN163L، BIBR 1532، قطعات الیگونوکلوئیدی و SiRNA اشاره نمود (6-10). اما استفاده از این عوامل به منظور مهار تلومراز دارای محدودیت‌هایی است، که از جمله می‌توان به سمی بودن ترکیبات سنتزی برای سلول‌های طبیعی بدن، عدم پایداری آن‌ها، عدم اختصاصی بودن، مقاومت سلول‌های سرطانی به عوامل درمانی، مشکلات در طراحی، تولید و نیز انتقال آن‌ها به سلول سرطانی اشاره نمود (5). به همین دلیل محققان به دنبال یافتن ترکیبات طبیعی با خاصیت مهارکنندگی آنزیم تلومراز هستند و این عوامل را به عنوان کاندیداهای با پتانسیل بالا برای درمان سرطان معرفی می‌کنند (11). علاوه بر این، ترکیبات طبیعی در دوزهای درمانی، اثرات سمی بر روی سلول‌های طبیعی بدن نداشته و یا اثرات بسیار کمی دارند (12 و 13). در رده سلولی K562 (مشتق از بیماران لوسمی میلوئید مزمن) میزان بالایی از فعالیت تلومراز دیده می‌شود. لوسمی میلوئید مزمن (CML) به علت ناهنجاری کروموزومی (کروموزوم فیلادلفیا) در سلول‌های بنیادی خون‌ساز ایجاد شده است. در اثر این ناهنجاری در این سلول‌ها انکوژن

BCR-ABL فعال می‌شود که سبب گسترش رده میلوئیدی می‌گردد (14). دارویی که امروزه برای بهبود این بیماری استفاده می‌شود ایمتینیب (Imatinib) است که فعالیت آنزیم تلومراز را در این سلول‌ها مهار می‌کند (15). این دارو و سایر داروهای شیمیایی برای درمان لوسمی دارای اثرات جانبی بر روی سلول‌های نرمال نیز می‌باشند. تحقیقات نشان داده است که برخی ترکیبات مشتق از گیاهان دارویی می‌توانند فعالیت آنزیم تلومراز را در برخی رده‌های سرطانی مهار نموده و منجر به القاء آپوپتوز شوند. از ترکیبات گیاهی با خاصیت مهارکنندگی فعالیت آنزیم تلومراز می‌توان به اپی‌گالوکاتچین گالات، کورکومین، گوسپیل، بوئین، بربرین، جینسینگ، واگونین، بولدین، کروسیل، اوریدونین، کوئرستین، سیلیمارین و عصاره برخی گیاهان مانند *Platycodon grandiflorum*، *Atractylis lancea* و *Savda munziq* اشاره نمود که اثر آن‌ها در مهار فعالیت آنزیم تلومراز در برخی رده‌های سلول سرطانی مطالعه شده است (16-30). بتایونن در بسیاری از میوه‌ها، سبزیجات، حبوبات و به طور عمده در گیاهان خانواده رُز (Rosaceae) وجود دارد، این ترکیب یک ایزوپرنوئید بوده و در دسته کاروتنوئیدها قرار می‌گیرد و در بدن انسان منبع غذایی مهمی برای تولید ویتامین A می‌باشد (31). سال‌هاست که بتایونن به عنوان یک داروی آنتی‌اکسیدان، ضدسرطانی و ضدالتهابی مورد توجه محققان قرار گرفته است. اثرات ضدسرطانی بتایونن در مورد برخی سرطان‌ها از جمله سرطان سینه، ملانوما و مننژیوما مورد مطالعه قرار گرفته و گزارش شده با مکانیسم‌های مختلف از جمله مهار فعالیت 17-بتاسترادیول، تضعیف عملکرد فاکتور رشد شبه انسولین، مهار سایکلین D1، کاهش بیان آنزیم HMG-COA ردوکتاز می‌تواند خواص ضدسرطانی خود را اعمال نماید (32-37). با توجه به این‌که در مورد اثر بتایونن در مهار فعالیت آنزیم تلومراز در سلول‌های سرطانی تاکنون هیچ‌گونه گزارشی منتشر نشده است، لذا در این تحقیق به بررسی اثر بتایونن در جلوگیری از رشد و

تکثیر رده سلول لوسمی K562 با تأکید ویژه روی نقش آن در مهار فعالیت آنزیم تلومراز پرداخته می‌شود.

مواد و روش‌ها

کیت اندازه‌گیری فعالیت آنزیم تلومراز به روش TRAP-ELISA و کیت اختصاصی تشخیص آپوپتوز Annexin-V-Fluorescein PI از شرکت Roche آلمان خریداری شد. بتآیونین و رنگ تریپان‌بلو از شرکت سیگما تهیه گردید. حلال DMSO از شرکت مرک آلمان تهیه شد. همچنین موادی از جمله محیط کشت سلولی RPMI 1640، آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین و استرپتومایسین و سرم جنینی گاوی (FBS) از شرکت گیبکو تهیه گردیدند. داروی Imatinib نیز از شرکت Alexis Biochemicals آمریکا خریداری شد.

رده سلول لوسمی انسان K562 از بانک سلولی انستیتو پاستور تهیه شد. سلول‌های K562 به صورت سوسپانسیون در محیط کشت کامل RPMI-1640 حاوی 10 درصد FBS غیرفعال و یک درصد آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین (10000 واحد بر میلی‌لیتر) و استرپتومایسین (10000 میکروگرم بر میلی‌لیتر) در دمای 37 درجه سانتی‌گراد و فشار 5 درصد دی‌اکسیدکربن و رطوبت 95 درصد کشت داده شدند. برای تهیه محلول استوک بتآیونین (1 میلی‌مولار)، مقدار 1/0738 میلی‌گرم بتآیونین در یک میلی‌لیتر حلال اتانل حل گردید و جهت تهیه غلظت‌های مورد آزمایش (25، 50، 100، 200، 300 و 400 میکرومولار) محلول استوک به کمک محیط کشت کامل رقیق شد. در تمام آزمایش‌ها سلول‌های تیمارنشده به‌عنوان کنترل منفی (گروه شاهد) در نظر گرفته شدند. محلول 1 میکرومولار داروی Imatinib به‌عنوان کنترل مثبت در تمام آزمایشات مورد استفاده قرار گرفت (به‌کمک تست MTT مؤثرترین غلظت Imatinib بعد از 24 ساعت انکوباسیون، یک میکرومولار به‌دست آمد (اطلاعات نشان داده نشده است)).

برای بررسی اثر مهارتی بتآیونین بر رشد سلول‌های K562، در هر یک از چاهک‌های پلیت 96 خانه‌ای 105 سلول در میلی‌لیتر کشت داده شد و با غلظت‌های مختلف بتآیونین (25، 50، 100 و 200 میکرومولار) تیمار گردید. چاهک کنترل (بدون دارو) و چاهک کنترل حلال نیز در نظر گرفته شدند. در چاهک کنترل حلال به‌میزان چاهک متناظر خود، تنها حلال اتانول اضافه گردید. در تمام آزمایشات، غلظت اتانل فراتر از 0/1 درصد حجمی/حجمی نبود. پس از گذشت زمان انکوباسیون (24، 48، 72 و 96 ساعت) میزان رشد و تکثیر سلول‌ها به‌کمک تست MTT تعیین گردید. اساس این روش احیای نمک زرد MTT به فورمازون نامحلول بنفش آبی رنگ است که توسط میتوکندری سلول‌های زنده انجام می‌گیرد (38). برای انجام این تست، 20 میکرولیتر محلول MTT به هر یک از چاهک‌ها اضافه گردید و برای مدت 2 ساعت در دمای 37 درجه سانتی‌گراد انکوبه شد تا کریستال‌های فورمازون تشکیل شوند. سپس 200 میکرولیتر حلال DMSO به هر چاهک اضافه شد تا کریستال‌های فورمازون حل گردد و در نهایت جذب نوری چاهک‌ها در طول موج 570 نانومتر توسط دستگاه Elisa reader قرائت گردید و بدین ترتیب درصد زنده‌مانی (Viability) محاسبه گردید (38).

تست تعیین میزان سلول‌های زنده به‌کمک رنگ تریپان‌بلو انجام گرفت. این رنگ جزء رنگ‌هایی است که سلول‌های زنده قادر به مقاومت در برابر ورود رنگ بوده ولی در سلول‌های مرده، رنگ به راحتی به درون سلول راه یافته و سیتوپلاسم رنگ می‌گیرد. پس از تیمار سلول‌های K562 با غلظت‌های مختلف بتآیونین (25، 50، 100 و 200 میکرومولار) در زمان‌های مختلف (24-96 ساعت)، 20 میکرولیتر سوسپانسیون سلولی با همان حجم از رنگ تریپان‌بلو (0/4%) در یک میکروتیوپ مخلوط شد و بعد از تهیه لام نئوبار، تعداد سلول‌های زنده در میلی‌لیتر محاسبه شد (39).

میزان فعالیت نسبی آنزیم تلومراز در سلول‌های K562 تیمار شده با غلظت‌های مختلف بتایونن، کنترل منفی و کنترل مثبت براساس دستور کار کیت اندازه‌گیری فعالیت تلومراز به روش PCR- ELISA (شرکت Roche کشور آلمان) انجام گرفت. اساس اندازه‌گیری فعالیت نسبی تلومراز به‌طور خلاصه بدین‌صورت بود که از سلول‌های تیمار شده با غلظت‌های مختلف بتایونن بعد از گذشت 24 ساعت انکوباسیون، به‌کمک معرف لیزات عصاره سلولی تهیه گردید. سپس 3-1 میکرولیتر از این عصاره سلولی به پرایمرهای بیوتینه و نوکلئوتیدها اضافه گردید. آنزیم تلومراز موجود در عصاره سلولی، تکرارهای تلومریک را به انتهای پرایمرهای بیوتینه اضافه نمود. در مرحله بعد محصولات تلومریک وارد واکنش PCR شدند و در نهایت محصولات حاصل از PCR به‌روش الیزا مورد سنجش قرار گرفتند. در این حالت میزان فعالیت تلومراز با شدت رنگ ایجاد شده متناسب می‌باشد و بر اساس فرمول موجود در دستورالعمل کیت، میزان فعالیت نسبی آنزیم تلومراز (RTA) محاسبه گردید.

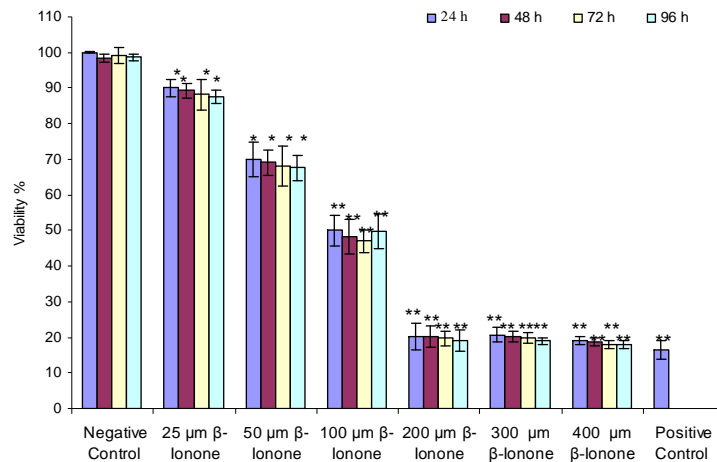
در این تحقیق، هر آزمایش 3 بار تکرار گردید و نتایج به‌صورت میانگین \pm انحراف معیار (Mean \pm SD) گزارش شد و داده‌ها با استفاده از تست آماری ANOVA و با کمک نرم افزار SPSS مورد تجزیه و آنالیز قرار گرفت.

یافته‌ها

بعد از تیمار سلول‌های K562 با غلظت‌های مختلف بتایونن (25، 50، 100، 200، 300 و 400 میکرومولار) در زمان‌های متفاوت (24، 48، 72 و 96 ساعت) به‌کمک تست MTT مشاهده گردید که میزان رشد و تکثیر سلول‌های تیمار شده با بتایونن کاهش می‌یابد (نمودار 4-1)، به‌طوری‌که کاهش رشد و تکثیر سلول‌های تیمار شده با بتایونن تا غلظت 200 میکرومولار وابسته به دوز است. بدین معنی که با افزایش غلظت بتایونن از 25 به 200 میکرومولار، میزان تکثیر سلول‌های K562 به‌صورت وابسته به دوز کاهش یافته، ولی اثر غلظت‌های

پس از تیمار سلول‌ها با غلظت‌های مختلف بتایونن، در پایان زمان انکوباسیون با استفاده از رنگ‌آمیزی هوخست، درصد سلول‌های آپوپتوزی تعیین گردید. یکی از روش‌هایی که به‌کمک آن می‌توان نوع مرگ سلولی نشان داد، استفاده از رنگ‌هایی نظیر هوخست که از رنگ‌های هسته‌دوست بوده و هسته سلول‌های آپوپتوزی و غیرآپوپتوزی را رنگ می‌نماید. از آن‌جایی که سلول‌های آپوپتوزی دارای خصوصیات مرفولوژیک خاص، از جمله هسته قطعه قطعه و کروماتین متراکم می‌باشند، به‌کمک این نوع رنگ‌آمیزی به‌راحتی می‌توان سلول‌های آپوپتیک را از سلول‌های غیرآپوپتیک مشخص نمود. سلول‌های آپوپتیک با الگوی هسته دانه تسییحی و سلول‌های غیرآپوپتیک با الگوی مرفولوژیک هسته طبیعی به‌کمک میکروسکوپ فلورسنت قابل تشخیص می‌باشند (40). جهت انجام این آزمایش، سلول‌های تیمار شده با غلظت‌های مختلف بتایونن به‌کمک بافر PBS شسته شدند و پس از فیکس شدن در محلول فرمالدئید یک درصد، به‌مدت 20 دقیقه در متانول خالص قرار داده شدند. پس از گذشت 20 دقیقه و به‌دنبال یک مرحله سائریفوژ، سلول‌ها با بافر PBS شسته شدند و محلول هوخست با غلظت نهایی 0/12 میکروگرم بر میلی‌لیتر به سلول‌ها اضافه شد و بعد از 15 دقیقه مجدداً سلول‌ها با بافر PBS شسته شدند. پس از تهیه لام، هسته سلول‌ها توسط میکروسکوپ فلورسنت مورد بررسی قرار گرفت و درصد سلول‌های آپوپتوزی حداقل در 3 اسلاید مجزا محاسبه شد.

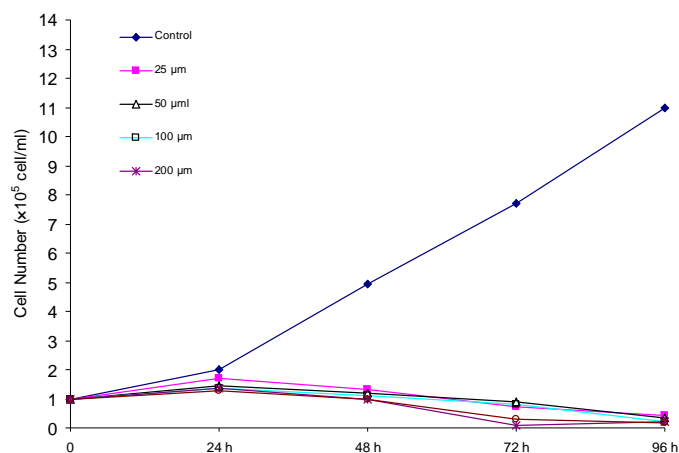
برای تشخیص آپوپتوز (مرگ برنامه‌ریزی شده سلول) القاء شده توسط بتایونن از کیت رنگ‌آمیزی PI و Annexin-V-FLOUS استفاده گردید. پس از گذشت 24 ساعت از تیمار سلول‌های K562 با غلظت‌های مختلف بتایونن (25، 50، 100 و 200 میکرومولار)، براساس دستورالعمل این کیت، سلول‌ها رنگ‌آمیزی شدند و میزان وقوع آپوپتوز در سلول‌های تیمار شده به‌کمک دستگاه فلوسایتمتر بررسی گردید (41).



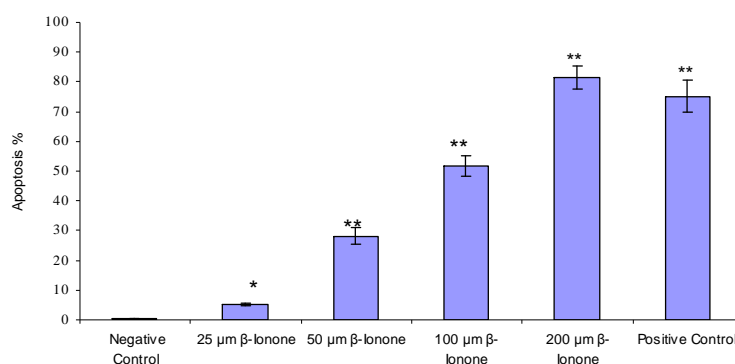
نمودار 1- نتایج بررسی اثر غلظت‌های متفاوت بتآیونین در زمان‌های متفاوت (24، 48، 72 و 96 ساعت) بر رشد و تکثیر سلول‌های لوسمی K562 به کمک تست MTT. کنترل منفی سلول‌های تیمار نشده و کنترل مثبت سلول‌های تیمار شده با Imatinib می‌باشد ($P < 0/05$ و $P < 0/001$)*

پس از گذشت 24، 48، 72 و 96 ساعت از تیمار سلول‌های K562 با غلظت‌های مختلف بتآیونین (25، 50، 100 و 200 میکرومولار)، تعداد سلول‌های زنده به کمک رنگ‌آمیزی تریپان‌بلو محاسبه گردید و اثر غلظت‌های مختلف بتآیونین بر تعداد سلول‌های زنده مشخص شده است. بر اساس نتایج، تمام غلظت‌های بتآیونین نسبت به گروه تیمار نشده، به طور معنادار باعث کاهش تعداد سلول‌های زنده K562 شده است ($P < 0/05$) (نمودار 2). پس از تیمار سلول‌های K562 با غلظت‌های مختلف بتآیونین بعد از 24 ساعت انکوباسیون، مورفولوژی هسته

300 و 400 میکرومولار در مهار تکثیر سلول‌های K562 نسبت به غلظت 200 میکرومولار تفاوت معناداری نشان نمی‌دهد ($P > 0/05$). نتایج نشان داد که بین گروه‌های تیمار شده و گروه کنترل (تیمار نشده)، اثر غلظت‌های متفاوت بتآیونین بعد از 24 ساعت انکوباسیون معنادار می‌باشد، اما نتایج به دست آمده در ساعت 24 با نتایج به دست آمده در ساعت‌های 48، 72 و 96 تفاوت معناداری نشان نمی‌دهد. بدین معنی که بیشترین تأثیر بتآیونین در تمام غلظت‌های مورد مطالعه (200-25 میکرومولار) در ساعت 24 رخ داده است.



نمودار 2- نتایج بررسی اثر غلظت‌های متفاوت بتآیونین بر تعداد سلول‌های K562 در زمان‌های مختلف انکوباسیون (24، 48، 72 و 96 ساعت) به کمک رنگ‌آمیزی تریپان‌بلو



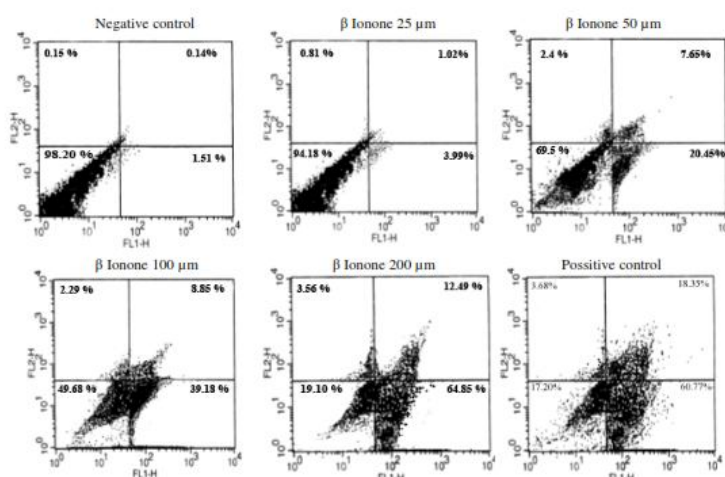
نمودار 3- نتایج بررسی اثر غلظت‌های مختلف بتایونن بر میزان آپوپتوز سلول‌های K562 بعد از 24 ساعت انکوباسیون به کمک رنگ‌آمیزی هوخست H33342. کنترل منفی سلول‌های تیمار نشده و کنترل مثبت سلول‌های تیمار شده با Imatinib می‌باشد ($P < 0/001$ و $P < 0/05$)

آپوپتوزی اولیه، آپوپتوزی دیررس و نکروز بررسی شد. مطابق با این آنالیز با افزایش غلظت بتایونن، درصد سلول‌های زنده کاهش می‌یابد و به درصد سلول‌های آپوپتوزی اضافه می‌شود (نمودار 4).

در این بخش از مطالعه اثر غلظت‌های مختلف بتایونن بر میزان فعالیت آنزیم تلومراز بعد از 24 انکوباسیون مورد آنالیز قرار گرفت و روش TRAP-ELISA برای تعیین فعالیت آنزیم تلومراز استفاده گردید. نتایج اثر غلظت‌های مختلف بتایونن بر میزان فعالیت آنزیم تلومراز به صورت درصد فعالیت نسبی آنزیم تلومراز (RTA) نسبت به گروه کنترل نشان داده شد. پس از گذشت 24 ساعت از تیمار سلول‌های K562 با

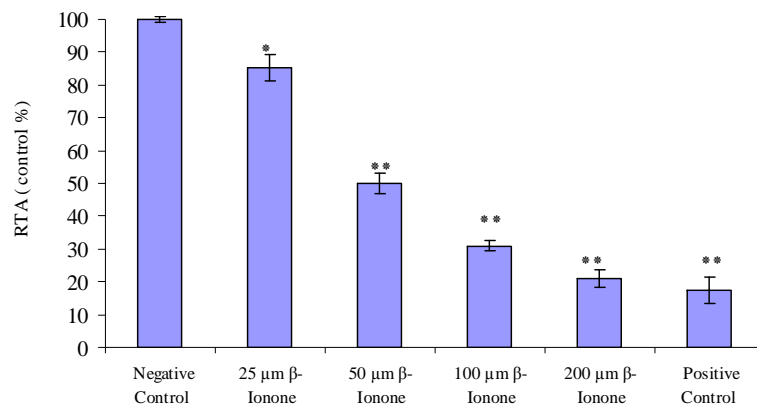
سلول‌ها به کمک رنگ هوخست مورد بررسی قرار گرفت و درصد سلول‌هایی که دچار آپوپتوز شده بودند، در هر اسلاید محاسبه گردید. با افزایش غلظت بتایونن، درصد سلول‌های آپوپتوز شده نسبت به گروه کنترل به طور معنادار افزایش می‌یابد به طوری که میزان سلول‌های آپوپتوزی از $5/19 \pm 0/5$ درصد به حدود $81/54 \pm 4$ درصد پس از تیمار با غلظت‌های 25 و 200 میکرومولار بتایونن به ترتیب رسیده است ($P < 0/05$) (نمودار 3).

پس از گذشت 24 ساعت از تیمار سلول‌های K562 با غلظت‌های مختلف بتایونن به کمک آنالیز فلوسایتومتری، انواع مرگ سلولی تشخیص داده شد. در ادامه اثر غلظت‌های مختلف بتایونن بر درصد سلول‌های زنده،

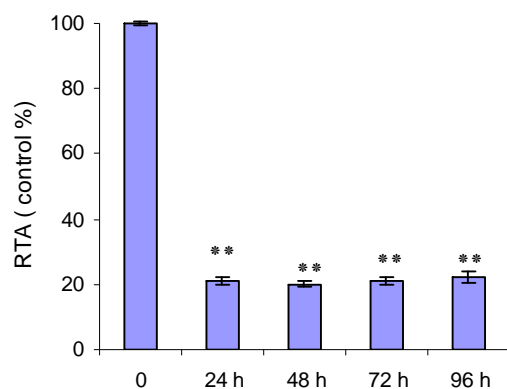


نمودار 4- بررسی اثر غلظت‌های مختلف بتایونن بر میزان وقوع آپوپتوز سلول‌های K562 بعد از 24 ساعت انکوباسیون به کمک فلوسایتومتری.

کنترل منفی سلول‌های تیمار نشده با بتایونن و کنترل مثبت سلول‌های تیمار شده با Imatinib می‌باشد



نمودار 5- نتایج بررسی اثر غلظت های مختلف بتا آیونن بر میزان فعالیت نسبی تلومراز در سلول های K562 بعد از 24 ساعت انکوباسیون. کنترل منفی سلول های تیمار نشده و کنترل مثبت سلول های تیمار شده با Imatinib می باشد ($P < 0/05$ و $**P < 0/001$)



نمودار 6- نتایج بررسی اثر زمان های مختلف انکوباسیون (24، 48، 72 و 96 ساعت) بر میزان فعالیت آنزیم تلومراز بعد از تیمار با غلظت 200 میکرومولار بتا آیونن ($**P < 0/001$)

بحث

بتا آیونن یک ترکیب گیاهی با خواص ضد سرطانی، مهار رشد سلول های سرطانی و القا آپوپتوز می باشد و با مکانیسم های مختلفی اثرات خود را اعمال می نماید (32-37). از جمله مکانیسم های ضد سرطانی بتا آیونن خاصیت آنتی اکسیدانی است و از این طریق می تواند به طور موثر از سرطان سینه القاء شده توسط ماده 7 و 12-دی متیل بنزانتراسن (DMBA) جلوگیری نماید (33). مکانیسم ضد سرطانی دیگر آن از طریق افزایش بیان ژن DR₅ و کاهش بیان ژن NF-KappaB می باشد و از این طریق رشد سلول های سرطان کبد را مهار نموده و سبب القاء آپوپتوز در آنها می گردد (19). همچنین بتا آیونن

غلظت های مختلف بتا آیونن، درصد فعالیت نسبی آنزیم تلومراز نسبت به گروه کنترل به صورت وابسته به دوز کاهش می یابد، به طوری که بعد از تیمار سلول ها با غلظت 25 میکرومولار بتا آیونن، درصد فعالیت نسبی آنزیم تلومراز حدود 15/76 درصد کاهش یافت و با افزایش دوز بتا آیونن به 200 میکرومولار، فعالیت نسبی آنزیم تلومراز نسبت به گروه کنترل $79 \pm 2/6$ درصد کاهش نشان داد. در تمام غلظت های مورد مطالعه بتا آیونن، میزان کاهش فعالیت آنزیم تلومراز نسبت به گروه کنترل معنادار می باشد ($P < 0/05$) (نمودار 5).

جهت بررسی اثر زمان های مختلف انکوباسیون (24، 48، 72 و 96 ساعت) بر میزان فعالیت آنزیم تلومراز در سلول های K562 مؤثرترین غلظت بتا آیونن (200 میکرومولار) انتخاب گردید. نتایج اثر تیمار سلول های K562 در زمان های مختلف انکوباسیون بررسی شد. در تمام ساعات های مورد مطالعه، درصد فعالیت نسبی تلومراز (RTA) نسبت به گروه کنترل کاهش می یابد ($P < 0/05$). همچنین نتایج نشان می دهند که کاهش فعالیت تلومراز تا ساعت 24 وابسته به زمان می باشد ($P < 0/05$) و به طور مشخص بین نتایج به دست آمده در ساعت 24 و نتایج به دست آمده در ساعات های 48، 72 و 96 اختلاف معناداری وجود ندارد ($P > 0/05$) (نمودار 6).

نتایج آن‌ها نشان داد که بوتین در سلول‌های K562 خاصیت ضدتلومرازی دارد (23). در تحقیقی که در سال 2004 توسط Li و همکارانش انجام شد مشاهده گردید که oridonin ترکیب فنلی مشتق از گیاه دارویی *Rabdosia rubescens* توانست فعالیت آنزیم تلومراز را در رده سلول K562 مهار کند (24). از مهم‌ترین یافته‌های این تحقیق این است که بتا‌آیونن می‌تواند فعالیت آنزیم تلومراز را در رده سرطان لوسمی K562 مهار کند و بین مهار آنزیم تلومراز و القا آپوپتوز رابطه مستقیمی وجود دارد. مطابق مطالعات انجام‌شده توسط سایر محققان، ترکیبات گیاهی با خاصیت ضدتلومرازی از طریق کاهش بیان ژن زیر واحد کاتالیتیک آنزیم تلومراز (hTERT)، موجب کاهش بیوسنتز و فعالیت آنزیم تلومراز می‌گردند (17-23). احتمالاً بتا‌آیونن نیز با همین مکانیسم اثرات ضدتلومرازی خود را اعمال می‌نماید. هرچند که نیاز است در آینده مکانیسم اثر آن در مهار فعالیت آنزیم تلومراز در سلول‌های K562 و سایر رده‌های سلول سرطانی مورد مطالعه قرار گیرد.

نتیجه‌گیری

نتایج این تحقیق نشان داد که بتا‌آیونن می‌تواند در رده سلولی K562 خاصیت مهارکنندگی تلومراز داشته باشد، لذا می‌توان آن را به‌عنوان یک کاندیدای دارویی مؤثر در درمان لوسمی در کنار سایر داروهای موجود استفاده قرار داد، زیرا همان‌طور که اشاره شد داروهای با خاصیت مهار تلومراز امروزه به‌عنوان داروهای مؤثر برای درمان سرطان در نظر گرفته می‌شوند.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل از طرح پژوهشی بوده که با حمایت مالی دانشگاه آزاد اسلامی واحد بروجرد به انجام رسیده است. بدین‌وسیله از مسئولین دانشگاه، که شرایط اجرای فعالیت‌های پژوهشی را فراهم می‌آورند صمیمانه تشکر و قدردانی می‌گردد.

می‌تواند در سلول‌های سرطانی SGC-790 (نوعی رده سلولی سرطان معده) از طریق فعال نمودن مسیر PI3K-AKT سبب القاء آپوپتوز گردد (37). در این تحقیق نیز اثر بتا‌آیونن در کاهش فعالیت آنزیم تلومراز، به‌عنوان یک مکانیسم ضد سرطانی جدید، در سلول‌های سرطانی K562 مورد ارزیابی قرار گرفت. بدین منظور در ابتدا، اثر غلظت‌های مختلف بتا‌آیونن بر رشد و تکثیر سلول‌های K562 به کمک تست MTT بررسی گردید و نتایج نشان داد که موثرترین دوز بتا‌آیونن برای مهار رشد و تکثیر سلول‌های K562 غلظت 200 میکرومولار در زمان 24 ساعت می‌باشد. به منظور تفکیک نوع مرگ سلولی از فلوسایتومتری و رنگ‌آمیزی هوخست 33342 استفاده گردید و مشاهده شد که در اثر تیمار سلول‌های K562 با غلظت 200 میکرومولار بتا‌آیونن بعد از 24 ساعت درصد سلول‌های آپوپتوزی به حدود $81/54 \pm 4$ درصد نسبت به گروه کنترل رسیده است. در مرحله بعد اثر بتا‌آیونن بر مهار فعالیت آنزیم تلومراز مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این تحقیق نشان داد که بتا‌آیونن در غلظت 200 میکرومولار می‌تواند فعالیت آنزیم تلومراز را در رده سلول K562 تا $79 \pm 2/6$ درصد نسبت به کنترل کاهش دهد. نتایج این تحقیق با نتایج به‌دست‌آمده از اثر Imatinib (به‌عنوان یک داروی شیمیایی) و ترکیبات گیاهی مانند Gossypol و Butein بر روی سلول‌های K562 مطابقت دارد (15، 22 و 23). در این خصوص در مطالعه‌ای که توسط Mor-Tzuntz و همکارانش در سال 2010 انجام گرفت، مشاهده گردید که Imatinib در سلول‌های K562 خاصیت ضدتلومرازی دارد (15). در مطالعه‌ای که توسط Moon و همکارانش در سال 2008 در مورد اثر ماده گیاهی گوسپیل (یک ترکیب پلی‌فنولیک مشتق از پنبه‌دانه) انجام گرفت، مشاهده گردید که گوسپیل فعالیت آنزیم تلومراز را در سلول‌های K562 مهار می‌کند (22). همین محققان در سال 2009 اثر ماده فنلی‌بوتین (مشتق از گیاه *Smecarpus anacadium*) را بر مهار فعالیت تلومراز در رده سلول K562 مطالعه کردند.

References

1. Sekhri K. Telomeres and telomerase: understanding basic structure and potential new therapeutic strategies targeting it in the treatment of cancer. *J Postgrad Med.* 2014; 60(3): 303-8.
2. Cheung AL, Deng W. Telomere dysfunction, genome instability and cancer. *Front Biosci.* 2008; 1(13): 2075-90.
3. See comment in PubMed Commons below Ruden M, Puri N. Novel anticancer therapeutics targeting telomerase. *Cancer Treat Rev.* 2013; 39(5): 444-56.
4. Tian X, Chen B, Liu X. Telomere and telomerase as targets for cancer therapy. *Appl Biochem Biotechnol.* 2010; 160 (5):1460-72.
5. Harley CB. Telomerase and cancer therapeutics. *Nat Rev Cancer.* 2008; 8(3): 167-79.
6. Gomez DE, Armando RG, Alonso DF. AZT as a telomerase inhibitor *Front Oncol.* 2012; 2: 113
7. Gomez-Millan J, Goldblatt EM, Gryaznov SM, Mendonca MS, Herbert BS. Specific telomere dysfunction induced by GRN163L increases radiation sensitivity in breast cancer cells. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2007; 67(3): 897-905
8. Bashash D, Ghaffari SH, Mirzaee R, Alimoghaddam K, Ghavamzadeh A. Telomerase inhibition by non-nucleosidic compound BIBR1532 causes rapid cell death in pre-B acute lymphoblastic leukemia cells. *Leuk Lymphoma.* 2013; 54(3): 561-8.
9. See comment in PubMed Commons below Zvereva MI, Zatsepin TS, Azhibek DM, Shubernetskaya OS, Shpanchenko OV, Dontsova OA. Oligonucleotide inhibitors of telomerase: prospects for anticancer therapy and diagnostics. *Biochemistry (Mosc).* 2015; 80(3): 251-9
10. Li Y, Li M, Yao G, Geng N, Xie Y, Feng Y, et al. Telomerase inhibition strategies by siRNAs against either hTR or hTERT in oral squamous cell carcinoma. *Cancer Gene Ther.* 2011; 18(5): 318-25.
11. Mergny JL, Riou JF, Mailliet P, Teulade-Fichou MP, Gilson E. Natural and pharmacological regulation of telomerase. *Nucleic Acids Res.* 2002; 15; 30(4) :839-65.
12. Shiezadeh F, Mousavi SH, Amiri MS, Iranshahi M, Tayarani-Najaran Z, Karimi G. Cytotoxic and apoptotic potential of *Rheum turkestanicum* Janisch Root Extract on Human Cancer and Normal Cells. *Iran J Pharm Res.* 2013; 12(4): 811-9.
13. Wang H, Khor TO, Shu L, Su Z, Fuentes F, Lee J.H, et al. Plants Against Cancer: A Review on Natural Phytochemicals in Preventing and Treating Cancers and Their Druggability. *Anticancer Agents Med Chem.* 2012; 12(10): 1281-1305.
14. Chai JH, Zhang Y, Tan WH, Chng WJ, Li B, Wang X. Regulation of hTERT by BCR-ABL at multiple levels in K562 cells. *BMC Cancer.* 2011; 11: 512-8.
15. Mor-Tzuntz R, Uziel O, Shpilberg O, Lahav J, Raanani P, Bakhanashvili M, et al. Effect of imatinib on the signal transduction cascade regulating telomerase activity in K562 (BCR-ABL-positive) cells sensitive and resistant to imatinib. *Exp Hematol.* 2010; 38 (1): 27-37.
16. Huang ST, Wang CY, Yang RC, Chu CJ, Wu HT, Pang JH. Wogonin, an active compound in *Scutellaria baicalensis*, induces apoptosis and reduces telomerase activity in the HL-60 leukemia cells. *Phytomedicine.* 2010; 17 (1): 47-54.
17. Park SE, Park C, Kim SH, Hossain MA, Kim MY, Chung HY, et al. Korean red ginseng extract induces apoptosis and decreases telomerase activity in human leukemia cells. *J Ethnopharmacol.* 2009; 121 (2): 304-312.
18. Thelen P, Wuttke W, Jarry H, Grzmil M, Ringert RH. Inhibition of telomerase activity and secretion of prostate specific antigen by silibinin in prostate cancer cells. *J Urol.* 2004; 171(5):1934-8.
19. Wang X, Hao MW, Dong K, Lin F, Ren JH, Zhang HZ. Apoptosis induction effects of EGCG in laryngeal squamous cell carcinoma cells through telomerase repression. *Arch Pharm Res.* 2009; 32 (9): 1263-9.
20. Lin SC, Li WC, Shih JW, Hong KF, Pan YR, Lin JJ. The tea polyphenols EGCG and EGC repress mRNA expression of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) in carcinoma cells. *Cancer Lett.* 2006; 236 (1): 80-8.
21. Chakraborty S, Ghosh U, Bhattacharya NP, Bhattacharya RK, Roy M. Inhibition of telomerase activity and induction of apoptosis by curcumin in K562 cells. *Mutat Res.* 2006; 596 (1-2): 81-90.
22. Moon DO, Kim MO, Choi YH, Lee HG, Kim ND, Kim GY. Gossypol suppresses telomerase activity in human leukemia cells via regulating hTERT. *FEBS Lett.* 2008; 582 (23-24): 367-73.
23. Moon DO, Kim MO, Lee JD, Choi YH, Kim GY. Butein suppresses c-Myc-dependent transcription and Akt-dependent phosphorylation of hTERT in human leukemia cells. *Cancer Lett.* 2009; 286 (2): 172-9.
24. Li RF, Wang QD. Regulation of telomerase activity and cell cycle of K562 cells by oridonin. *Acta Pharm Sinica.* 2004; 39(11):865-8.
25. Bishayee K, Ghosh S, Mukherjee A, Sadhukhan R, Mondal J, Khuda-Bukhsh AR. Quercetin induces cytochrome-c release and ROS accumulation to promote apoptosis and arrest the cell cycle in G2/M, in cervical carcinoma: signal cascade and drug-DNA interaction. *Cell Prolif.* 2013;46(2):153-63

26. Faezizadeh Z, Mesbah-Namin SA, Allameh A. The effect of silymarin on telomerase activity in the human leukemia cell line K562. *Planta Med.* 2012; 78(9): 899-902.
27. Kazemi Noureini S, Tanavar F. Boldine, a natural aporphine alkaloid, inhibits telomerase at non-toxic concentrations. *Chem Biol Interact.* 2015; 25(231):27-34.
28. Noureini SK, Wink M. Antiproliferative effects of crocin in HepG2 cells by telomerase inhibition and hTERT down-regulation. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2012; 13(5): 2305-9.
29. Guo WQ, Li LZ, He ZY, Zhang Q, Liu J, Hu CY, et al. Anti-proliferative effects of *Atractylis lancea* (Thunb.) DC. via down-regulation of the c-myc/hTERT/telomerase pathway in Hep-G2 cells. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2013;14(11): 6363-7.
30. Abliz G, Mijit F, Hua L, Abdixkur G, Ablimit T, Amat N, et al. Anti-carcinogenic effects of the phenolic-rich extract from abnormal Savda Munziq in association with its cytotoxicity, apoptosis-inducing properties and telomerase activity in human cervical cancer cells (SiHa). *BMC Complement Altern Med.* 2015;12(15):23-9.
31. Gomes-Carneiro MR, Dias DM, Paumgartten FJ. Study on the mutagenicity and antimutagenicity of beta-ionone in the Salmonella/microsome assay. *Food Chem Toxicol.* 2006; 44(4): 522-7.
32. Janakiram NB, Cooma I, Mohammed A, Steele VE, Rao CV. Beta-ionone inhibits colonic aberrant crypt foci formation in rats, suppresses cell growth, and induces retinoid X receptor-alpha in human colon cancer cells. *Mol Cancer Ther.* 2008; 7(1):181-90.
33. Liu JR, Dong HW, Sun XR, Wang Q, Sun WG, Parry JW, et al. Effects of beta-ionone on mammary carcinogenesis and antioxidant status in rats treated with DMBA. *Nutr Cancer.* 2010; 62(1):58-65.
34. Kim MO, Moon DO, Kang CH, Kwon TK, Choi YH, Kim GY. beta-ionone enhances TRAIL-induced apoptosis in hepatocellular carcinoma cells through Sp1-dependent upregulation of DR5 and downregulation of NF-kappaB activity. *Mol Cancer Ther.* 2010; 9(4):833-43.
35. Cardozo MT, de Conti A, Ong TP, Scolastici C, Purgatto E, Horst MA, et al. Chemopreventive effects of beta-ionone and geraniol during rat hepatocarcinogenesis promotion: distinct actions on cell proliferation, apoptosis, HMGCoA reductase, and RhoA. *J Nutr Biochem.* 2011; 22(2):130-5.
36. Asokkumar S, Naveenkumar C, Raghunandhakumar S, Kamaraj S, Anandakumar P, Jagan S, et al. Antiproliferative and antioxidant potential of beta-ionone against benzo(a)pyrene-induced lung carcinogenesis in Swiss albino mice. *Mol Cell Biochem.* 2012; 363(1-2):335-45.
37. Liu Q, Dong HW, Sun WG, Liu M, Ibla JC, Liu LX, et al. Apoptosis initiation of beta-ionone in SGC-7901 gastric carcinoma cancer cells via a PI3K-AKT pathway. *Arch Toxicol.* 2013; 87(3):481-90
38. Holder A.L, Goth-Goldstein R, Lucas D, Koshland K.P. Particle-induced artifacts in the MTT and LDH viability assays. *Chem Res Toxicol.* 2012 17; 25(9): 1885-1892.
39. Sarma KD, Ray D, Antony A. Improved sensitivity of trypan blue dye exclusion assay with Ni²⁺ or Co²⁺ salts. *Cytotechnology.* 2000; 32 (2): 93-5.
40. Feng Q, Cao HL, Xu W, Li XR, Ren YQ, Du LF. Apoptosis induced by genipin in human leukemia K562 cells: involvement of c-Jun N-terminal kinase in G₂/M arrest. *Acta Pharmacol Sin.* 2011;32(4):519-27.
41. Darzynkiewicz Z, Bedner E, Smolewski P. Flow cytometry in analysis of cell cycle and apoptosis. *Semin Hematol.* 2001; 38 (2):179-93.