

اثر سینرژیستی ایندول تری کرینول با دوکسوروبیسین در افزایش القای آپوپتوز بر رده سلولی لوسمی لنفوبلاستیک حاد (NALM-6)

بهناز توسلی^۱، دکتر مجید صفا^۲، دکتر احمد کاظمی^۳

چکیده

زمینه و هدف: ایندول تری کرینول (I3C) که در سبزیجات براسیکا یافت می‌شود خاصیت ضد سرطانی داشته و مکانیسم اصلی آن مهار فاکتور رونویسی هسته‌ای کاپا-B (NF-κB) است. از سوی دوکسوروبیسین به عنوان یک داروی شیمی درمانی در کنار القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی، باعث فعال شدن NF-κB می‌شود. این فاکتور رونویسی با القای بیان ژن‌های دخیل در بقای سلولی از آپوپتوز جلوگیری می‌کند و باعث کاهش نتایج درمان می‌شود. هدف از این مطالعه تعیین اثر I3C در همراهی با دوکسوروبیسین بر افزایش آپوپتوز در سلول‌های لوسمی لنفوبلاستیک حاد (NALM-6) است.

روش بررسی: در این مطالعه بنیادی، رده سلولی لوسمی لنفوبلاستیک حاد، گونه پیش ساز لنفوسیت B با غلظت‌های مختلف I3C برای ۱ ساعت تیمار شد و سپس با دوکسوروبیسین ۱۲۵ نانو مولار به مدت ۲۴ ساعت مجاور گردید. بررسی محتوای DNA سلولی و رنگ آمیزی Annexin V-FITC برای ارزیابی میزان آپوپتوز انجام شد و با فلوسایتومتری مورد مطالعه قرار گرفت. بررسی داده‌ها با آزمون تی زوجی صورت گرفت.

یافته‌ها: نتایج بررسی سیکل سلولی نشان داد I3C به صورت سینرژیستی در همراهی با دوکسوروبیسین باعث افزایش سلول‌ها در ناحیه‌ی sub-G1 یا ناحیه مربوط به سلول‌های آپوپتوتیک می‌شود. بررسی فلوسایتومتری رنگ آمیزی Annexin V-FITC نیز نشان دهنده‌ی اثر I3C در افزایش سلول‌های آپوپتوتیک در همراهی با دوکسوروبیسین بود.

نتیجه‌گیری: نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد I3C به صورت سینرژیستی در همراهی با دوکسوروبیسین باعث افزایش القای آپوپتوز در سلول‌های NALM-6 می‌شود.

واژه‌های کلیدی: ایندول تری کرینول، آپوپتوز، دوکسوروبیسین، لوسمی لنفوبلاستیک حاد

* نویسنده مسئول:

دکتر احمد کاظمی؛

دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم

پزشکی ایران

Email:

A.kazemi@iums.ac.ir

- دریافت مقاله: مرداد ۱۳۹۳ پذیرش مقاله: آبان ۱۳۹۳

مقدمه

ایندول تری کرینول (I3C) که با اسامی دیگری از جمله: تری ایندولیل کرینول و تری ایندولیل متانول، نیز شناخته می‌شود حاصل اتولیز یک گلوکوزینولات

به نام گلوکوبراسیسین است که در سبزیجاتی از جمله: کلم، کلم پیچ و گل کلم یافت می‌شود. این ترکیب در شرایط آزمایشگاهی قادر به مهار تولید سلول‌های مختلف سرطانی مانند پروستات، کولون و سلول‌های سرطانی اندوتلیال است. در اغلب این سلول‌ها I3C باعث توقف چرخه‌ی سلولی در فاز G1/S می‌شود (۱-۴). در شرایط بالینی نیز نتایج تحقیقات نشان می‌دهد که این مولکول می‌تواند جراحتهای پیش سرطانی را در سرطان سرویکس

^۱ کارشناس ارشد هماتولوژی و بانک خون، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی

ایران، تهران، ایران

^۲ استادیار هماتولوژی و بانک خون، گروه هماتولوژی و بانک خون، دانشکده پیراپزشکی،

مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

^۳ استاد گروه هماتولوژی و بانک خون، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران،

تهران، ایران

پیش ساز لنفوسیت B، شایع ترین بدخیمی در کودکان و بالغان جوان است که با شیوه‌های شیمی درمانی کنونی تا حدودی قابل درمان است، اما در گروهی از بیماران عود بیماری رخ می‌دهد و گروهی نیز از شیمی درمانی طولانی مدت رنج می‌برند(۹). بنابراین مطالعه در مورد روشهایی که بتواند دوز دارو را کاهش دهد و در عین حال سلولهای بدخیم را به طور موثری دچار آپوپتوز کند می‌تواند بسیار راهگشا باشد. هدف از این مطالعه تعیین اثر I3C بر افزایش القای آپوپتوز در سلولهای لوسمی لنفوبلاستیک حاد (NALM-6) تحت تیمار با دوکسوروبیسین می‌باشد.

روش بررسی

در این مطالعه‌ی بنیادی، رده سلولی NALM-6 (لوسمی لنفوبلاستیک حاد با گونه‌ی پیش ساز لنفوسیت B) از انستیتو پاستور ایران تهیه شد. سلولها در محیط کشت RPMI-1640 (Gibco) به همراه ۱۰٪ سرم جنین گاوی (Gibco) و ۱٪ پنی سیلین-استرپتومایسین (۱۰۰U/ml) پنی سیلین و ۱۰۰µg/ml استرپتومایسین) و در انکوباتور (Memert, Germany) با رطوبت ۹۰٪، CO₂ ۵٪ و دمای ۳۷°C کشت داده شدند. کشت‌ها به صورت روزانه به وسیله‌ی میکروسکوپ معکوس از نظر مورفولوژی سلولها، آلودگی و تراکم رشد، بررسی و در صورت نیاز، کشت مجدد شدند. محیط کشت سلولها هر ۴۸ ساعت یک بار تعویض شد. برای تهیه‌ی استوک اولیه (Sigma) I3C با غلظت ۱۰۰ میلی مولار، مقدار مشخص I3C در DMSO حل شد و سپس استوک کاربردی با غلظت ۲ میلی مولار آماده گردید و با فیلتر ۰/۲۲ میکرونی استریل شد. پس از سه مرحله پاساژ دادن، سلولها شمارش شده و در هر یک از چاهک‌های پلیت‌های ۱۲ خانه‌ای مقدار ۷×۱۰^۵ سلول

برطرف کند، عملکرد سیستم ایمنی را تغییر دهد و باعث تعادل هورمونی شود. این ترکیب همچنین به سم زدایی روده‌ها و کبد کمک می‌کند و به عنوان یک آنتی اکسیدان، محرک تولید آنزیم‌هایی است که باعث از بین رفتن خاصیت سمی ترکیبات مختلف و حفظ ساختارهای سلولی از جمله DNA می‌شوند(۵و۶). مکانیسم احتمالی عملکرد این ترکیب که بیشتر مورد قبول واقع شده است، دخالت در مسیر فعالیت فاکتور هسته‌ای کاپا B (NF-κB) و تاثیر در بیان ژن‌های مختلف می‌باشد(۱). NF-κB یک فاکتور رونویسی است که در پاسخ به محرکهای سرطان زا و التهابی مانند اینترلوکین یک (IL-1)، فاکتور نکروز دهنده تومور (TNF) و عوامل آسیب رسان به DNA شامل اشعه یونیزان و داروهای شیمی درمانی از قبیل دوکسوروبیسین فعال شده و بیان ژن‌های دخیل در آپوپتوز، تکثیر سلولی و متاستاز را تنظیم می‌کند(۷). نتایج یک مطالعه در مورد بررسی اثر I3C بر رده‌های سلولی لوسمی لنفوسیت T انسانی (Jurkat cells)، میلوئیدی انسانی (KBM-5) و مالتیپل مایلوما انسانی (U266) نشان داد که I3C از طریق افزایش آپوپتوز در این سلولها باعث افزایش خاصیت توکسیک ترکیباتی چون TNF می‌شود(۸). داروهای خانواده‌ی آنتراسایکلین مانند دوکسوروبیسین که به عنوان داروهای شیمی درمانی در بدخیمی‌های خونی نظیر لوسمی لنفوبلاستیک حاد (Acute Lymphoblastic Leukemia) مورد استفاده قرار می‌گیرند در کنار فعال کردن آپوپتوز در سلولهای سرطانی با دخالت در مسیر NF-κB و فعال کردن آن باعث فعال شدن ژن‌های دخیل در بقای سلولی شده و سلولهای سرطانی را زنده نگه می‌دارند و بنابراین پاسخ مورد انتظار را در فرآیند درمانی کاهش می‌دهند(۱و۷). لوسمی لنفوبلاستیک حاد با زیر گروه

دستگاه با استفاده از نرم افزار Cell Quest آنالیز گردید. سلولهای آپوپتوتیک در شرایط *in Vitro* در مراحل انتهایی این فرآیند، انسجام غشایی خود را از دست می‌دهند که با رنگ آمیزی رنگ پروپیدیوم ایداید مشخص می‌شوند و در محدوده‌ای قرار می‌گیرند که احتمال حضور سلولهای نکروتیک نیز وجود دارد. برای بررسی دقیق تر آپوپتوز از طریق بروز فسفاتیدیل سرین در بخش خارجی غشای سلول با استفاده از رنگ آمیزی AnnexinV-FITC، سلول‌ها به تعداد $10^5 \times 7$ در هر چاهک کشت داده شدند و در مجاورت I3C در غلظت‌های ۴۰ و ۶۰ میکرومولار به مدت ۱ ساعت قرار گرفتند. سپس دوکسورویسین ۱۲۵ نانو مولار با گروهی از سلول‌ها که پیش از این با I3C تیمار شده بودند به مدت ۲۴ ساعت مجاور شد. پس از پایان این زمان، سلول‌ها برداشت شده و با بافر فسفات-سالین (PBS) شستشو داده شدند. به سلولها ۲ میکرولیتر معرف AnnexinV-FITC و ۱۰۰ میکرولیتر بافر انکوباسیون اضافه شد و سلولها به مدت ۵ دقیقه در تاریکی در دمای اتاق انکوبه شدند. بررسی سلول‌ها با استفاده از دستگاه فلوسیتومتر با طول موج تحریک ۴۸۸ نانومتر و طول موج بازتابش ۵۱۸ نانومتر (FL-1) برای تعیین فلوروسین FITC یا Fluorescein انجام گرفت. آنالیز داده‌ها با نرم افزار SPSS انجام شد. تفاوت بین گروه‌ها با استفاده از آزمون آماری تی زوجی مورد مطالعه قرار گرفت و *p* value کمتر از ۰/۰۵ معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

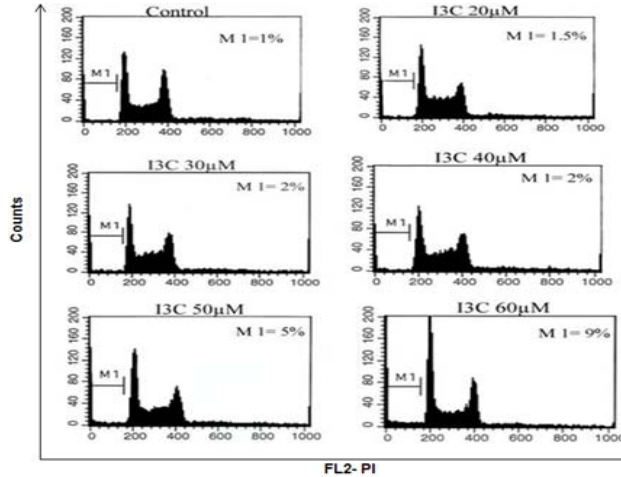
تأثیر ناچیز I3C در القای آپوپتوز بر سلول‌های NALM-6

ابتدا در این مطالعه برای بررسی میزان القا آپوپتوز توسط غلظت‌های مختلف I3C در سلول‌های

با حجم نهایی ۲ میلی لیتر کشت داده شد و سپس در چاهک‌های جداگانه با توجه به الگوی طراحی شده غلظت‌های ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰ و ۶۰ میکرومولار از I3C با سلولها مجاور گردید. پس از گذشت ۱ ساعت به سلولهای ۵ چاهک که پیش از این با I3C تیمار شده بودند، داروی دوکسورویسین با غلظت ۱۲۵ نانومولار اضافه شد. لازم به ذکر است برای بررسی اثر دوکسورویسین به تنهایی نیز یک چاهک در نظر گرفته شد. در نهایت پس از ۲۴ ساعت سلولها برای بررسی میزان آپوپتوز به وسیله رنگ آمیزی هسته‌ای با رنگ پروپیدیوم ایداید (PI) برداشت شده و با بافر فسفات-سالین (PBS) شستشو داده شدند. در ادامه، برای تثبیت به سلولها ۲ میلی لیتر اتانول ۷۰٪ سرد اضافه شد و به منظور جلوگیری از به هم چسبیدن سلولها این مرحله روی شیکر انجام گردید. سپس سلولها به مدت یک شب (overnight) در دمای ۲۰- درجه انکوبه شدند. پس از شستشوی سلولها با بافر فسفات-سالین سرد طبق روش کار به سلولها ۲۵۰ میکرولیتر بافر سترات و ۲۵۰ میکرولیتر بافر فسفات-سالین اضافه و سلولها به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شدند. در نهایت به سلولها ۵ میکرولیتر RNaseA (Sigma) برای حذف RNA و ۵۰ میکرولیتر پروپیدیوم ایداید (۱ میلی گرم در میلی لیتر) اضافه شد و سلولها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق در تاریکی انکوبه شدند. سپس رنگ شدن هسته‌ی سلولها با رنگ پروپیدیوم ایداید در سوسپانسیون‌های سلولی با استفاده از دستگاه فلوسیتومتر مدل FACSCalibur (Beckton Dickinson) مورد بررسی قرار گرفت. رنگ پروپیدیوم ایداید (PI) با طول برانگیزش ۴۸۸ نانومتر و طول موج بازتابش ۶۱۷ نانومتر در کانال FL2 خوانده شد. برای هر نمونه $10^4 \times 10$ سلول ضبط شده و اطلاعات خروجی

استفاده از فلوسایتومتری مورد مطالعه قرار گرفت.

NALM-6 رنگ آمیزی هسته‌ای پروپیدیوم ایداید (PI) انجام شد و هیستوگرام سیکل سلولی با

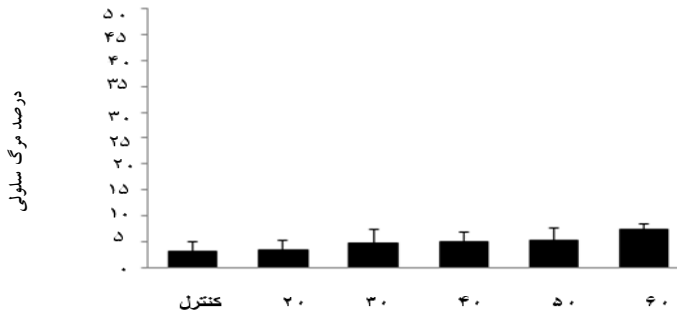


M1 نشان دهنده درصد سلولهای آپوتوتیک است.

شکل ۱: هیستوگرام‌های سیکل سلولی با رنگ آمیزی هسته‌ای پروپیدیوم ایداید (PI)

نداشته است. در هیستوگرام‌ها درصد سلولها در ناحیه‌ی sub-G1 (ناحیه مربوط به سلول‌های آپوتوتیک) با نماد M1 نشان داده شده است.

با توجه به شکل ۱، درصد مرگ سلولی در نمونه‌های تیمار شده با غلظت‌های مختلف I3C نسبت به نمونه‌ی کنترل افزایش قابل ملاحظه‌ای



I3C (میکرومولار)

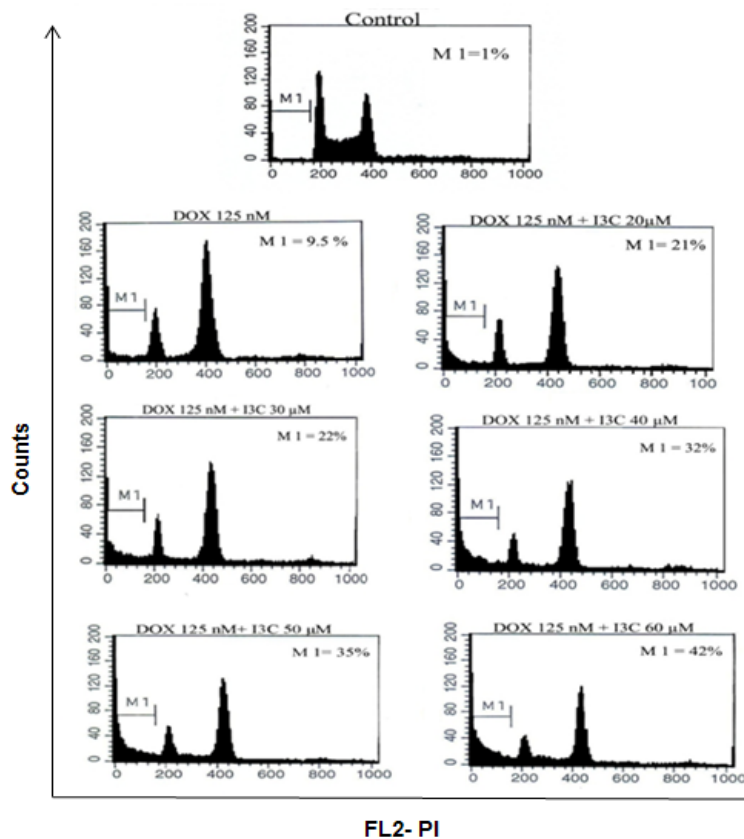
نمودار ۱: درصد مرگ سلولی با رنگ آمیزی هسته‌ای پروپیدیوم ایداید (PI)

از غلظت‌ها معنی دار ($p > 0.05$) نبوده است.

مطابق نمودار ۱، میزان آپتوز در اثر مجاورت سلولها با I3C در مقایسه با نمونه‌ی کنترل در هیچ یک

سپس با غلظت ۱۲۵ نانومولار دوکسوروبیسین مجاور شدند. رنگ آمیزی هسته‌ای پروپیدیوم ایداید (PI) به منظور بررسی جمعیت سلولهای آپوتوتیک انجام شد و با فلوسایتومتری مورد مطالعه قرار گرفت.

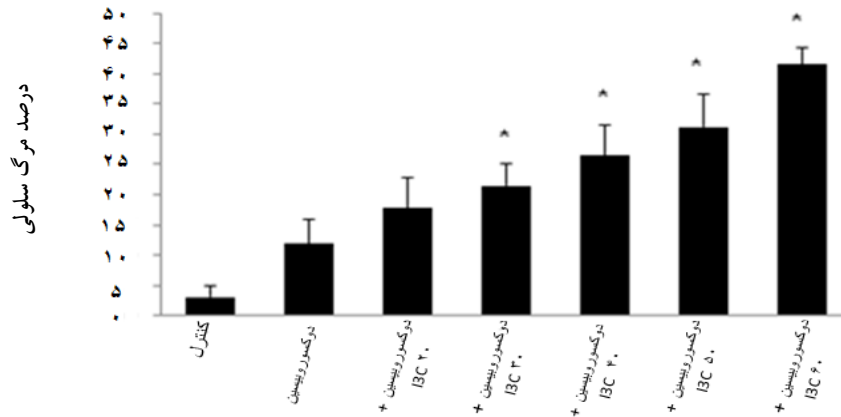
اثر سینرژیستی I3C بر القای آپتوز در سلولهای NALM-6 تیمار شده با دوکسوروبیسین سپس برای ارزیابی تاثیر I3C در افزایش القای آپتوز در همراهی با دوکسوروبیسین، سلولهای NALM-6 ابتدا با غلظت‌های مختلف I3C تیمار و



شکل ۲: هیستوگرام‌های سیکل سلولی با رنگ آمیزی هسته‌ای پروپیدیوم ایداید (PI).
M1 نشان دهنده درصد سلولهای آپوتوتیک است

دوکسوروبیسین ۱۲۵ نانومولار در مقایسه با سلولهایی که تنها با دوکسوروبیسین ۱۲۵ نانومولار مجاور شده‌اند، افزایش یافته است.

همانگونه که در شکل ۲ مشاهده می‌شود، جمعیت سلولهای آپوتوتیک در هیستوگرام‌های مربوط به سلولهای NALM-6 تیمار شده با I3C در غلظت‌های مختلف (۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰ و ۶۰ میکرومولار) و

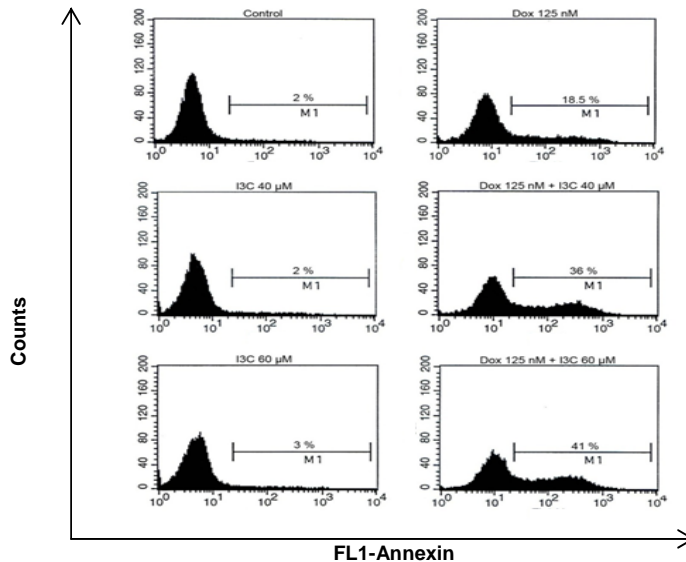


نمودار ۲: درصد مرگ سلولی با رنگ آمیزی هسته‌ای پروپیدیوم ایداید (PI)

بروز فسفاتیدیل سرین در سلولهای آپوپتوتیک، رنگ آمیزی AnnexinV-FITC نیز انجام شد. پس از تیمار سلولها با غلظت‌های ۴۰ و ۶۰ میکرو مولار I3C و مجاورت با دوکسوروبیسین به مدت ۲۴ ساعت رنگ آمیزی AnnexinV - FITC انجام گرفت.

با توجه به نمودار ۲، درصد مرگ سلولی در سلولهای تیمار شده با I3C در غلظت‌های مشخص شده به همراه دوکسوروبیسین در مقایسه با سلولهای تیمار شده با دوکسوروبیسین به تنهایی معنی دار ($p \text{ value} < 0.05$) است.

همچنین به منظور بررسی دقیقتر آپوپتوز از طریق

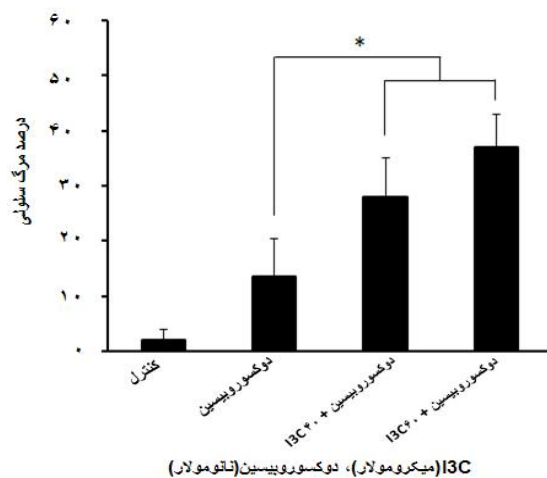


شکل ۳: هیستوگرام میزان آپوپتوز با استفاده از رنگ آمیزی انکسین-V

درصد سلولهای آپوپتوتیک با نماد M1 مشخص شده است

دوکسوروبیسین ۱۲۵ نانومولار بیشتر از سلولهای است که تنها با دوکسوروبیسین مجاور شده‌اند.

همانگونه که در شکل ۳ مشاهده می‌شود، درصد سلولهای آپپتوتیک در نمونه‌های تیمار شده با I3C در غلظت‌های ۴۰ و ۶۰ میکرو مولار و



نمودار ۳: درصد مرگ سلولی با رنگ آمیزی انکسین-V

ایندول تری کرینول بر افزایش القای آپپتوز در همراهی با دوکسوروبیسین مورد بررسی قرار گرفته است. نتایج حاصل نشان می‌دهد که درصد سلولهای آپپتوتیک در نمونه‌های تیمار شده با غلظت‌های مختلف I3C و دوکسوروبیسین بیشتر از نمونه‌ای است که تنها با دوکسوروبیسین با همان غلظت تیمار شده است. مطالعه‌ی Takada و همکاران در سال ۲۰۰۵ حاکی از آن است که I3C باعث افزایش القای آپپتوز و خاصیت سایتوتوکسیک TNF در رده‌ی سلولی Jurkat می‌شود (۸). نتایج مطالعه‌ی دیگر حاکی از خاصیت ترکیبات حاصل از I3C در افزایش اثر بخشی داروهای شیمی درمانی بر رده‌ی سلولهای سرطانی است. در این مطالعه نشان داده شد تیمار سلولهای سرطان پستان (MDA-MB-231) با ترکیبات حاصل از I3C باعث افزایش میزان آپپتوز توسط داروی taxotere می‌شود. تقویت خاصیت آپپتوتیک

مطابق نمودار ۳، درصد مرگ سلولی در سلولهای تیمار شده با غلظت‌های ۴۰ و ۶۰ میکرومولار I3C به همراه دوکسوروبیسین ۱۲۵ نانومولار در مقایسه با سلولهای تیمار شده با دوکسوروبیسین به تنهایی معنی دار ($p \text{ value} < 0.05$) است.

بحث

در مورد اثر I3C در القای آپپتوز و همچنین تأثیر آن در جلوگیری از تولید سلولهای سرطانی مختلف و ایجاد توقف در چرخه‌ی سلولی مطالعات زیادی انجام شده است. به طور کلی نتایج این مطالعات حاکی از آن است که I3C و ترکیبات حاصل از آن در pH=5-7 که عمدتاً شامل 3,3'-diindolylmethane (DIM) می‌شوند، عامل القای آپپتوز و جلوگیری از تولید سلولهای سرطانی در انواع متنوعی از بدخیمی‌ها به شمار می‌روند (۱۳-۱۰). اما در مطالعه‌ی حاضر اثر

DNA شده و این مسئله منجر به القای آپوپتوز می‌شود. از سوی دیگر، در کنار این فرآیند مسیر دیگری نیز فعال می‌شود که با بکارگیری NF- κ B و به دنبال آن فعال شدن ژنهای دخیل در بقای سلولی مانند Survivin، c-IAP1 و XIAP از مرگ سلولی جلوگیری می‌کند (۱۶ و ۱۷). نتایج مطالعات نشان می‌دهد I3C و ترکیبات حاصل از آن از طریق مهار فاکتور رونویسی NF- κ B می‌تواند باعث القای آپوپتوز در سلولهای سرطانی مختلف شود (۱۸ و ۱۹). در بسیاری از موارد فرآیند شیمی درمانی به علت ایجاد مقاومت در سلولهای سرطانی نتایج مورد نظر را در پی ندارد. یکی از چندین عامل دخیل در ایجاد مقاومت سلولی افزایش بیان P-glycoprotein در سطح سلولهای سرطانی می‌باشد. این پروتئین با صرف انرژی باعث پمپ کردن داروهای شیمی درمانی لیپوفیل می‌شود. مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۵ توسط Arora و همکاران انجام شد، نشان داد I3C در همراهی با وینبلاستین با تنظیم بیان P-glycoprotein باعث افزایش آپوپتوز در سلولهای لوسمی میلوئیدی می‌شود (۲۰). اگرچه در این مطالعه برای تنظیم بیان این پروتئین غشا گذر توسط I3C مکانیسم مشخصی مطرح نشده است، اما با توجه به مطالعاتی که نشان می‌دهند I3C تنظیم کننده‌ی مسیر NF- κ B است (۸) و در نظر گرفتن این مطلب که مسیر پیام دهی NF- κ B می‌تواند تنظیم کننده‌ی بیان P-glycoprotein باشد (۲۱)، می‌توان نتیجه گرفت که I3C با مهار مسیر NF- κ B اثر خود را بر کاهش بیان P-glycoprotein اعمال می‌کند. علاوه بر تنظیم مسیرهای پیام دهی داخل سلولی به عنوان مکانیسم اصلی عملکرد I3C نتایج برخی مطالعات به مکانیسم‌های دیگری نیز اشاره دارد. داده‌های حاصل از مطالعه‌ی Christensen و همکاران نشان داده است ترکیبات

taxotere در این مطالعه با بررسی مدل‌های حیوانی نیز تایید شده است (۱۴). یافته‌های حاصل از مطالعه‌ی Harding و همکاران نیز نشان می‌دهد I3C می‌تواند به صورت معنی داری باعث افزایش اثر بخشی bortezomib در جلوگیری از رشد سلولهای سرطان تخمدان و افزایش آپوپتوز در آنها شود که با نتایج مطالعه حاضر سازگار است (۱۵). با توجه به درصد اندک سلولهای آپوپتوتیک در نمونه‌ای که تنها با I3C تیمار شده بود، می‌توان بیان کرد که این ترکیب به تنهایی در غلظت‌های عنوان شده، خاصیت سایتوتوکسیک چندانی بر رده‌ی سلولی لوسمی لنفوبلاستیک حاد با گونه‌ی پیش ساز لنفوسیت B (NALM-6) نداشته است. نتایج مطالعه‌ی Takada و همکاران نیز نشان داد مرگ سلولی در سلولهای Jurkat که تنها با غلظت مشخص I3C تیمار شده بودند بسیار اندک بوده است (۸). لوسمی لنفوبلاستیک حاد با گونه‌ی پیش ساز لنفوسیت B شایع ترین بدخیمی در کودکان است. با توجه به روشهای شیمی درمانی کنونی حدود ۸۰ درصد این بیماران درمان می‌شوند، اما درصدی از این بیماران از عوارض شیمی درمانی به مدت طولانی رنج می‌برند و در گروهی نیز بیماری دوباره عود می‌کند. لذا استفاده از روشهایی که دوز دارو را کاهش دهد و سلولهای بدخیم را به طور موثرتری دچار آپوپتوز کند، یکی از اهداف درمان سرطان‌هاست (۹). اگرچه استفاده از داروهای خانواده آنتراسیکلین‌ها در درمان بیماران لوسمی لنفوبلاستیک حاد به صورت معمول انجام می‌شود، اما از عوارض جانبی این داروها فعال کردن مسیرهای پیام دهی داخل سلولی می‌باشد که به نفع سلول سرطانی است (۷). به دنبال تیمار سلولها با دوکسوروبیسین این ترکیب از طریق اتصال به DNA دو رشته‌ای و پایدارگی کمپلکس آنزیم توپوایزومراز II، مانع سنتز

گروه از داروها شود. نتیجه‌ی این مطالعه و بررسی‌های مشابه آن نشان دهنده‌ی نوعی رابطه‌ی محتمل بین تغذیه و بهبود شیمی درمانی است. اگرچه انجام مطالعات کامل تری برای بررسی دقیقتر مکانیسم مولکولی I3C مورد نیاز است.

حاصل از I3C باعث افزایش حساسیت تومورهای دارای ژن مقاومت چند دارویی (MDR) به ترکیبات شیمی درمانی چون دوکسوروبیسین و وینبلاستین می‌گردند (۲۲). گرچه مکانیسم‌های مطرح شده متفاوت است اما تمامی آنها بیانگر اثر I3C در کاهش مقاومت به ترکیبات شیمی درمانی است.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله مراتب قدردانی خود را از همکاران محترم مرکز تحقیقات سلولی-مولکولی و آزمایشگاه هماتولوژی دانشگاه علوم پزشکی ایران اعلام می‌داریم.

نتیجه گیری

با توجه به نتایج مطالعه‌ی حاضر و دیگر مطالعات ذکر شده می‌توان بیان کرد استفاده از I3C در کنار داروهای شیمی درمانی خانواده آنتراسیکلین‌ها می‌تواند به عنوان ادجوان باعث افزایش اثربخشی این

منابع

1. Aamir A, Wael AS & KM Vahidur R. Role of nuclear factor-kappa B signaling in anticancer properties of indole compounds. *J Exp Clin Med* 2011; 3(2): 55-62.
2. Coll DA, Rosen CA, Auburn K, Potsic WP & Bradlow HL. Treatment of recurrent respiratory papillomatosis with indole-3-carbinol. *Am J Otolaryngol* 1997; 18(4): 283-5.
3. Jin L, Qi M, Chen DZ, Anderson A, Yang GY, Arbeit JM, et al. Indole-3-carbinol prevents cervical cancer in human papilloma virus type 16 (HPV16) transgenic mice. *Cancer Res* 1999; 59(16): 3991-7.
4. Kojima T, Tanaka T & Mori H. Chemoprevention of spontaneous endometrial cancer in female donryu rats by dietary indole-3-carbinol. *Cancer Res* 1994; 54(6): 1446-9.
5. Brandi G, Paiardini M, Cervasi B, Fiorucci C, Filippone P, De Marco C, et al. A new indole-3-carbinol tetrameric derivative inhibits cyclin -dependent kinase 6 expression, and induces G1 cell cycle arrest in both estrogen-dependent and estrogen-independent breast cancer cell lines. *Cancer Res* 2003; 63(14): 4028-36.
6. Arif JM, Gairola CG, Kelloff GJ, Lubet RA & Gupta RC. Inhibition of cigarette smoke related DNA adducts in rat tissues by indole-3-carbinol. *Mutat Res* 2000; 452(1): 11-8.
7. Janssens S & Tschopp J. Signals from within: The DNA-damage-induced NF-kappa B response. *Cell Death Differ* 2006; 13(5): 773-84.
8. Takada Y, Andreeff M & Aggarwal BB. Indole-3-carbinol suppresses NF-kappaB and IkappaBalpha kinase activation, causing inhibition of expression of NF-kappaB-regulated antiapoptotic and metastatic gene products and enhancement of apoptosis in myeloid and leukemia cells. *Blood* 2005 Jul; 106(2): 641-9.
9. Schrappe M, Beier R & Burger B. New treatment strategies in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol* 2002 Dec; 15(4): 729-40.

10. Hwang IS, Lee J & Lee DG. Indole-3-carbinol generates reactive oxygen species and induces apoptosis. *Biol Pharm Bull* 2011; 34(10): 1602-8.
11. Zhang X & Malejka-Giganti D. Effects of treatment of rats with indole-3-carbinol on apoptosis in the mammary gland and mammary adenocarcinomas. *Anticancer Res* 2003 May-Jun; 23(3): 2473-9.
12. Hong C, Firestone GL & Bjeldanes LF. Bcl-2 family-mediated apoptotic effects of 3, 3'-diindolylmethane (DIM) in human breast cancer cells. *Biochem Pharmacol* 2002 Mar; 63(6): 1085-97.
13. Chen DZ, Qi M, Auborn KJ & Carter TH. Indole-3-carbinol and diindolylmethane induce apoptosis of human cervical cancer cells and in murine HPV16-transgenic preneoplastic cervical epithelium. *J Nutr* 2001 Dec; 131(12): 3294-302.
14. Rahman KM, Ali S, Aboukameel A, Sarkar SH, Wang Z, Philip PA, et al. Inactivation of NF- κ B by 3, 3'-diindolylmethane contributes to increased apoptosis induced by chemotherapeutic agent in breast cancer cells. *Molecular Cancer Therapeutics* 2007 Jul; 6(10): 2757-65.
15. Taylor Harding B, Agadjanian H, Nassanian H, Kwon S, Guo X, Karlan BY, et al. Indole-3-carbinol synergistically sensitises ovarian cancer cells to bortezomib treatment. *British Journal of Cancer* 2012; 106(2): 333-43.
16. Salvatore C, Camarda G, Maggi CA, Goso C, Manzini S & Binaschi M. NF-kappaB activation contributes to anthracycline resistance pathway in human ovarian carcinoma cell line A2780. *Int J Oncol* 2005 Sep; 27(3): 799-806.
17. Karin M & Lin A. NF- κ B at the crossroads of life and death. *Nature Immunology* 2002 Mar; 3(3): 221-7.
18. Chinni SR, Li Y, Upadhyay S, Koppolu PK & Sarkar FH. Indole-3-carbinol (I3C) induced cell growth inhibition, G1 cell cycle arrest and apoptosis in prostate cancer cells. *Oncogene* 2001; 20(23): 2927-36.
19. Rahman KM, Li Y & Sarkar FH. Inactivation of akt and NF-kappaB play important roles during indole-3-carbinol-induced apoptosis in breast cancer cells. *Nutrition and Cancer* 2004; 48(1): 84-94.
20. Arora A, Seth K, Kalra N & Shukla Y. Modulation of p-glycoprotein-mediated multidrug resistance in K562 leukemic cells by indole-3-carbinol. *Toxicol Appl Pharmacol* 2005 Feb; 202(3): 237-43.
21. Wang Y, Liu X, Zhang HT, Yu M & Wang H. NF-kappaB regulating expression of mdrl gene and P-gp to reverse drug-resistance in leukemic cells. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi* 2007 Oct; 15(5): 950-4.
22. Christensen JG & LeBlanc GA. Reversal of multi drug resistance in vivo by dietary administration of the phytochemical indole-3-carbinol. *Cancer Res* 1996 Feb; 56(3): 574-81.

Synergistic Apoptotic Effect Of Indole-3-Carbinol And Doxorubicin On Pre-B Acute Lymphoblastic Leukemia Cells

Tavasoli Behnaz¹(M.Sc.) – Safa Majid²(Ph.D) – Kazemi Ahmad³(Ph.D)

1 Master of Sciences in Hematology & Blood Banking, School of Allied Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

2 Assistant Professor, Hematology & Blood Banking Department, School of Allied Medicine, Cellular and Molecular Research Center, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

3 Professor, Hematology & Blood Banking Department, School of Allied Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Abstract

Received : Jul 2014
Accepted : Nov 2014

Background and Aim: Indole-3-carbinol (I3C), found in *Brassica* species vegetables, exhibits antitumor effects. It has been shown that I3C induces apoptosis in various cell types through inactivation of the nuclear factor-kappa B (NF-κB) pathway. Anthracyclines such as doxorubicin, is widely used in the treatment of hematological malignancies, induce apoptosis in tumor cells via DNA damage and activation of p53. However, NF-κB pathway that activated by anthracyclines as a part of DNA damage response can induce chemo resistance. In this study the apoptotic effect of doxorubicin in combination with NF-κB inhibitor I3C was assessed in acute lymphoblastic leukemia cells.

Materials and Methods: Human pre-B acute lymphoblastic leukemia cell line, NALM-6 cells, were preincubated with various concentrations of I3C for 1 hour and then treated with 125nM doxorubicin at 37°C for 24 hours. Cellular DNA content assay and Annexin V-FITC staining were performed by flowcytometry for evaluation of apoptosis.

Results: DNA histogram analysis of NALM-6 cells indicates that combination of I3C with doxorubicin synergistically escalated the percentages of sub-G1 population cells (apoptotic cells) as compared to doxorubicin-only treated group. Annexin V-FITC staining showed that cotreatment of NALM-6 cells with I3C and doxorubicin increased the proportion of Annexin-V positive cells (early apoptotic cells) in comparison with the doxorubicin treated cells.

Conclusion: The results of cell culture treatments and cell death analysis by flowcytometry suggest that I3C synergistically potentiates doxorubicin-induced apoptosis in human leukemia NALM-6 cells.

Key words: I3C, Apoptosis, Doxorubicin, Acute Lymphoblastic Leukemia

* Corresponding

Author:
Kazemi A;
E-mail:
A.kazemi@iums.ac.ir