

## مهار رشد و القای آپوپتوزیس توسط متابولیت های محلول در اتر باکتری *Streptomyces sp. ABRINW 111* در سلول های K562 لوسمی میلوییدی انسان

سید محمد امین موسوی<sup>۱\*</sup>، فریده قنبروند<sup>۱</sup>، علیرضا دهناد<sup>۲</sup>

۱- گروه زیست شناسی جانوری، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

۲- پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی شمال و شمال غرب، تبریز، ایران

\* پست الکترونیک نویسنده مسئول: moosav\_m@tabrizu.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۱۰/۲۷

تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۸/۲

### چکیده

**هدف:** از آنجایی که القای آپوپتوزیس در سلول های سرطانی یکی از روش های مناسب برای درمان سرطان بوده و یافتن ترکیبات ضدسرطان جدید به ویژه ترکیبات القاء کننده آپوپتوزیس اولویت تحقیقاتی محسوب می گردد، لذا در این مطالعه متابولیت های محلول در اتر باکتری بومی ایران به نام *Streptomyces sp. ABRINW 111* جدا سازی و اثرات ضدسرطانی متابولیت ها با استفاده از رده سلولی K562 لوسمی میلوییدی مزمن مورد بررسی قرار گرفت.

**مواد و روش ها:** سلول های K562 با غلظت های مختلف متابولیت های محلول در اتر و برای مدت زمان ۱۲ تا ۷۲ ساعت تیمار شد. از آزمون دفع رنگ تریپان بلو و آزمون قطعه قطعه شدن DNA به ترتیب برای بررسی مهار رشد و وقوع آپوپتوزیس استفاده شد.

**نتایج:** متابولیت های محلول در اتر باعث مهار رشد وابسته به غلظت و زمان در سلول های K562 گردید، بطوری که میزان IC<sub>50</sub> ۲۴ و ۴۸ ساعت به ترتیب برابر ۱۰۰۰ و ۴۰۰ نانوگرم بر میلی لیتر بود. به علاوه، این متابولیت ها باعث کاهش معنی دار ( $P < 0/05$ ) در زیستایی سلول های K562 شد. نتایج حاصل از مشاهدات میکروسکوپ نوری و آزمون قطعه قطعه شدن DNA حاکی از القای آپوپتوزیس در سلول های K562 بود.

**نتیجه گیری:** به طور کلی، با توجه به نقایص به وجود آمده در فرآیند آپوپتوزیس در سلول های سرطانی و نیز وجود مقاومت دارویی در این سلول ها، شناسایی ترکیبات جدید القا کننده آپوپتوزیس همانند متابولیت های محلول در اتر می تواند برای مطالعات بیشتر در زمینه درمان سرطان کمک کننده باشد.

**واژگان کلیدی:** آپوپتوزیس، استرپتومایسس، فرآورده های طبیعی، لوسمی میلوییدی مزمن

## مقدمه

آپوپتوزیس (Apoptosis) یا مرگ برنامه ریزی شده سلولی که با ویژگی‌هایی همانند چروکیدگی شدن سلول، تشکیل اجسام آپوپتوتیک و قطعه قطعه شدن DNA کروموزومی شناخته می‌شود نقش مهمی در رشد جنینی و حفظ همئوستازی بدن دارد (۱). نقص در فرآیند آپوپتوزیس علت بسیاری از بیماری‌ها از جمله سرطان است (۲). بنابراین به نظر می‌رسد القای آپوپتوزیس در سلول‌های سرطانی روشی مناسب برای درمان سرطان باشد (۳). در سال‌های اخیر تلاش‌های فراوانی برای یافتن ترکیبات جدید، به ویژه از فرآورده‌های طبیعی که خاصیت ضد سرطانی خود را از طریق القای آپوپتوزیس در سلول‌های سرطانی مختلف اعمال می‌کنند صورت گرفته است (۴). برخی از این مواد همانند تاکسول (Taxol)، اتوپوزاید (Etoposide) و سیس پلاتین (Cisplatin) از گیاهان بدست می‌آیند و دارای کاربردهای بالینی می‌باشند (۵). علاوه بر این، ترکیبات ضد سرطان مختلفی نیز وجود دارند که توسط باکتری‌های جنس اکتینومیست (Actinomycete) تولید می‌شوند (۶). اکتینومیست‌ها باکتری‌های گرم مثبت و ساپروفیتی هستند که به طور گسترده‌ای در خاک و محیط‌های آبی پراکنده‌اند (۷). اعضای جنس اکتینومیست به ویژه استرپتومایسس‌ها تولید کننده بیش از نیمی از متابولیت‌های ثانویه فعال بیولوژیک می‌باشند (۸). این باکتری‌ها ظاهری شبیه به قارچ دارند و میزان G+C در DNA ژنومی آنها ۷۸-۶۹ درصد می‌باشد (۹). تاکنون ترکیبات متعددی از باکتری‌های جنس استرپتومایسس جدا سازی شده است که باعث مهار رشد و القای آپوپتوزیس در رده‌های مختلف سلول‌های سرطانی از جمله Hep3B (سرطان کبد انسانی)، HeLa (سرطان گردن رحم) و NB4 (لوسمی پرئولوسیتیک حاد) شده است (۱۰-۱۲). به منظور یافتن ترکیبات ضدسرطان جدید، در مطالعه حاضر، متابولیت‌های محلول در اتر باکتری بومی ایران به نام *Streptomyces sp. ABRIINW 111* (ایزوله ۱۱۱) جداسازی شد و پس از بررسی و مشاهده خاصیت آنتی باکتریال قوی آن، خاصیت ضدسرطانی این متابولیت‌ها با استفاده از رده سلولی K562 لوسمی میلویدی مزمن انسانی مورد بررسی قرار گرفت. لوسمی میلویدی مزمن (Chronic myeloid leukemia-) بیماری کلونال سلول‌های بنیادی چند توان است که حاصل جابجایی دو طرفه کروموزومی بین کروموزوم‌های ۹ و ۲۲ می‌باشد (۱۳). این جابجایی کروموزومی باعث به وجود آمدن ژن

هیبرید BCR-ABL می‌شود که پروتئین p210<sup>Bcr-Abl</sup> را کد می‌کند و فعالیت تیروزین کینازی این پروتئین باعث تکثیر بی‌رویه این سلول‌ها و نقص در فرآیند آپوپتوزیس می‌گردد (۱۴). با وجود توسعه داروهای موثری همانند ایماتینیب مسیلات (STI571 یا Gleevec) که باعث القای آپوپتوزیس در سلول‌های BCR-ABL مثبت می‌شود، مقاومت دارویی یکی از مشکلات اساسی در درمان این بیماران بوده و هنوز درمان قطعی برای این بیماری گزارش نشده است (۱۵ و ۱۶). از این رو، سلول‌های K562 به عنوان مدل فاز حاد بیماری CML انتخاب (۱۷ و ۱۸) و اثرات ضدسرطانی متابولیت‌های محلول در اتر باکتری استرپتومایسس ایزوله ۱۱۱ در این سلول‌ها مورد بررسی قرار گرفت.

## مواد و روش‌ها

**جداسازی و کشت اکتینومیست‌ها:** نمونه‌های خاک از مناطق مختلف استان همدان جمع آوری و به منظور جداسازی اکتینومیست‌ها، رقت‌های مختلف تهیه شده از نمونه‌های خاک به مدت ۷ روز در محیط کشت ترکیبی استارچ-کازئین آگار (SCA) (International Streptomyces project) (medium) (مرک، آلمان) در انکوباتور با دمای ۲۹ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. پس از گذشت هفت روز، کلنی‌های اکتینومیست که دارای ویژگی‌هایی مانند رنگ سفید و ظاهری خشک و گچی بر روی محیط کشت بوده و بویی شبیه به خاک داشتند انتخاب و به پلیت جدید حاوی محیط کشت SCA منتقل و به مدت ۵ روز در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد کشت داده شد. تک کلنی‌های مورد نظر به محیط کشت yeast International (ISP2) extract- malt extract agar (project medium) (مرک، آلمان) که به طور اختصاصی برای کشت استرپتومایسس‌ها بکار می‌رود انتقال یافته و به مدت ۳ تا ۴ روز در انکوباتور شیکردار کشت داده شد. از کلنی‌های جداسازی شده استوک تهیه شده و در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (۱۹).

**بررسی خاصیت آنتی باکتریال:** نمونه‌های خالص جدا شده از خاک به منظور بررسی خاصیت آنتی باکتریال آنها در محیط کشت SCA کشت داده شد و میکروارگانیسم‌های *E. Coli* ATCC 1399، *K. pneumoniae* ATCC 1290، *S. flexneri* ATCC 1234، *B. cereus* ATCC 1431، *Y. enterocolitica* ATCC 35669 و *S. aureus* ATCC 29213 (ATCC) بررسی شدند.

**آماده سازی و تهیه غلظت های مختلف متابولیت:** حلال اتر در دمای اتاق تبخیر و پودر خشک بدست آمده در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شد. به منظور تهیه غلظت های مختلف، پودر حاصل در حلال دی متیل سولفوکساید (DMSO) (سیناژن، تهران) حل شده و غلظت های مختلف از آن (۱۰ تا ۵۰۰۰ نانوگرم بر میلی لیتر) تهیه گردید.

**کشت سلول:** رده سلولی K562 از انستیتو پاستور ایران تهیه و در محیط کشت RPMI 1640 (بیوسرا، انگلستان) که با سرم جنین گاوی (Fetal bovine serum) (بیوسرا، انگلستان) ۱۰ درصد و آنتی بیوتیک های استرپتومایسین (۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) و پنی سیلین (۱۰۰ واحد بر میلی لیتر) (سیناژن، تهران) غنی شده بود، کشت داده شد. سلول ها در مدت کشت سلولی در شرایط دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، رطوبت ۹۵ درصد و CO<sub>2</sub> پنج درصد نگهداری شد.

**بررسی رشد و زیستایی سلولی:** به منظور بررسی اثر متابولیت های محلول در اتر ایزوله ۱۱۱ بر رشد و زیستایی سلول های K562، تعداد ۱۰<sup>۴</sup> × ۲ سلول در فاز رشد لگاریتمی در ظروف ۹۶ چاهکی (SPL life science، کره جنوبی) کشت داده شد. سپس سلول ها با غلظت های مختلف متابولیت ها برای فواصل زمانی ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تیمار شد. اثرات متابولیت ها بر رشد و زیستایی سلول های K562 با استفاده از آزمون دفع رنگ تربیان بلو (سیگما، آمریکا) و لام هموسایتومتر بررسی شد. به این صورت که با گذشت هر بازه زمانی تعداد سلول های موجود در هر چاهک شمارش گردید. این آزمایش سه بار به طور مستقل تکرار شد.

**مطالعه ریخت شناسی سلول های تیمار شده با متابولیت ها:** تغییرات ریخت شناسی سلول های تیمار شده با متابولیت های محلول در اتر و سلول های تیمار نشده (کنترل) با استفاده از میکروسکوپ نوری معکوس (المپیوس، ژاپن) مورد ارزیابی قرار گرفت.

**آزمون قطعه قطعه شدن DNA** به منظور بررسی قطعه قطعه شدن DNA و تشخیص آپوتوزیس از الکتروفورز ژل آگارز استفاده شد. برای این منظور تعداد ۵ × ۱۰<sup>۵</sup> سلول با غلظت ۳ میکروگرم بر میلی لیتر متابولیت ها و برای مدت زمان ۴۸ ساعت تیمار شد. پس از سانتریفیوژ و شستشوی سلول ها با بافر فسفات، ۲۰ میکرولیتر بافر لیز کننده (20 mM EDTA

آمریکا) به پلیت ها اضافه شد. پلیت هایی که در آن تنها باکتری های جدا شده از خاک رشد می کرد از نظر خاصیت آنتی باکتریال مثبت تلقی شد. پس از جداسازی متابولیت های آنتی باکتریال، این متابولیت ها به دیسک های خالی انتقال یافته و فعالیت آنتی باکتریال آنها با اندازه گیری هاله عدم رشد در غربال ثانویه مورد ارزیابی قرار گرفت (۱۹).

**جداسازی متابولیت ها:** به منظور جداسازی متابولیت های آنتی باکتریال، مقداری از باکتری های خالص جدا شده از خاک به محیط کشت مولر هینتون برات (Muller Hinton Broth) اضافه شده و در انکوباتور شیکردار با دمای ۲۹ درجه سانتی گراد و دور حرکت rpm ۱۲۵ قرار گرفت و ۳۶ ساعت بعد میزان کدورت محیط کشت در طول موج ۶۰۰ نانومتر اندازه گیری شد. در مرحله بعد، ۱ میلی لیتر از سوسپانسیون حاصل به ظرف جدید حاوی محیط مولر هینتون برات انتقال یافته و همانند مرحله اول در انکوباتور شیکردار قرار گرفت. پس از ۳۶ ساعت، تمامی محیط کشت در دور rpm ۴۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. رسوب (بیومس) حاصل دور ریخته شده و مایع رویی از کاغذ صافی شماره ۱ عبور داده شد. فرآیند استخراج با استفاده از حلال آلی اتر انجام گرفت. این حلال به نسبت ۱:۱ به مایع حاصل اضافه شد و به مدت ۱ ساعت در انکوباتور شیکردار با دمای ۲۹ درجه سانتی گراد و دور حرکت rpm ۱۷۵ قرار گرفته و به شدت هم زده شد. مخلوط حاصل به دکانتور انتقال یافته و فاز مایع از فاز حلال جدا گردید. فاز حلال که حاوی ترکیبات آنتی باکتریال است در دمای ۳۴ درجه سانتی گراد و در فشار پایین تغلیظ شد (۱۹).

**کروماتوگرافی HPLC:** جهت بررسی کمی فراکشن های موجود در متابولیت های استخراج شده از روش HPLC (Highperformance liquid chromatography) (Knauer (Analytical)، ستون C18 (۴ × ۲۵۰ میلی متر)، دتکتور UV و طول موج ۲۱۵ نانومتر استفاده شد. به این صورت که پس از خشک شدن کامل حلال، متابولیت در استونیتریل HPLC grade حل شد. از حلال های متانول، آب و استونیتریل به نسبت (۵:۵۰:۴۵) به عنوان فاز شستشو استفاده شد و Flow rate دستگاه در ۱ میلی متر در دقیقه تنظیم گردید. نمونه تزریقی ۱ میکرولیتر در نظر گرفته شد و نمونه مذکور به مدت ۱۰ دقیقه در دستگاه مورد بررسی قرار گرفته و پیک های مربوطه توسط نرم افزار دستگاه رسم گردید (۱۹).

میزان ۱۵/۲ تا ۸۵/۷ درصد کاهش یافت. این متابولیت‌ها باعث مه‌ار رشد وابسته به زمان نیز در سلول‌های K562 تیمار شده شد. به عنوان مثال، تیمار سلول‌ها با غلظت ۱۰۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر و برای مدت زمان ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به ترتیب باعث کاهش ۴۰، ۵۰، ۶۲/۳ و ۷۰/۷ درصدی در رشد سلول‌های تیمار شده گردید. میزان IC<sub>50</sub> ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از تیمار با این متابولیت‌ها به ترتیب برابر ۱۰۰۰ و ۴۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر می‌باشد.

#### کاهش زیستایی سلول‌های K562 توسط متابولیت‌های محلول در اتر:

نتایج حاصل از تیمار سلول‌های K562 با متابولیت‌های محلول در اتر ایزوله ۱۱۱ نشان داد که این متابولیت‌ها باعث کاهش وابسته به غلظت و زمان در زیستایی این سلول‌ها می‌گردد. همانطور که در شکل ۲-ب و جدول ۲ نشان داده شده است در فاصله زمانی ۱۲ تا ۲۴ ساعت پس از تیمار با متابولیت‌های محلول در اتر و در غلظت‌های بالاتر از ۱۰۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر کاهش معنی‌داری در زیستایی این سلول‌ها مشاهده شد ( $P < 0.05$ ). این در حالی است که در بازه‌های زمانی بالاتر (۴۸ و ۷۲ ساعت) کاهش معنی‌داری در زیستایی سلول‌های تیمار شده از غلظت ۲۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر آغاز گردید. به عنوان مثال، تیمار سلول‌های K562 با غلظت ۲۰۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر متابولیت‌ها و برای مدت زمان ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت باعث کاهش زیستایی سلول‌ها به ترتیب به میزان ۲۰/۵، ۲۱/۷، ۲۵/۵ و ۴۰/۷ درصد گردید.

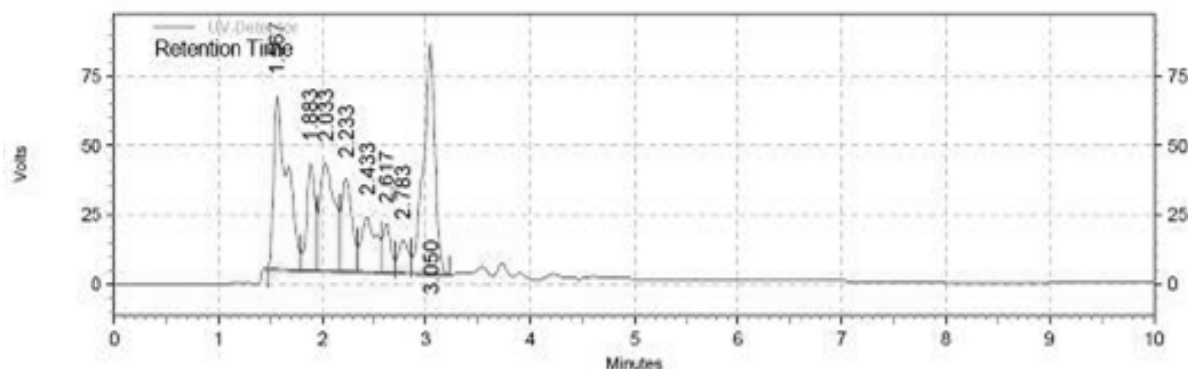
(مرک، آلمان) 100mM Tris, pH 8.0, 0.8% [W/V] SDS اضافه شد. سپس ۱۰ میکرولیتر از RNase A/T1 (فرمنتاس، آلمان) اضافه شده و به مدت حداقل ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. در نهایت مقدار ۱۰ میکرولیتر پروتئیناز K (فرمنتاس، آلمان) اضافه شده و به مدت یک شب در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. پس از افزودن ۵ میکرولیتر بافر لودینگ ۶x (۳۰ درصد گلیسرول، ۰/۲۵ درصد بروموفنول بلو) نمونه‌های DNA در ژل آگارز ۱/۵ درصد حاوی اتیدیوم بروماید و با ولتاژ ۳۵ ولت به مدت ۲ ساعت بارگذاری شد (۲۰).

**تجزیه و تحلیل آماری:** تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم‌افزار Microsoft Excel 2003، SPSS 14.0 و آزمون Student *t*-test انجام شد و داده‌های با ارزش  $P < 0.05$  معنی‌دار تلقی شد.

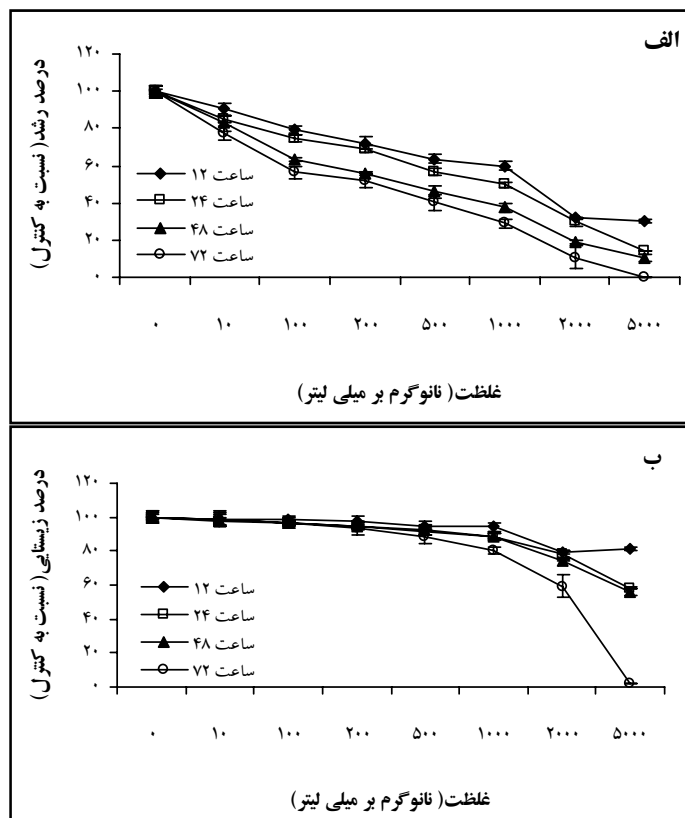
#### نتایج

#### مه‌ار رشد سلول‌های K562 توسط متابولیت‌های محلول در اتر:

متابولیت‌های محلول در اتر ایزوله ۱۱۱ (شکل ۱ فراکشن‌های موجود در متابولیت‌های جداسازی شده توسط حلال اتر را نشان می‌دهد) باعث مه‌ار رشد وابسته به غلظت و زمان در سلول‌های K562 شد. همانطور که در شکل ۲-الف و جدول ۱ نشان داده شده است، ۲۴ ساعت پس از تیمار سلول‌ها با غلظت‌های ۱۰ تا ۵۰۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر متابولیت‌ها، درصد رشد سلول‌ها به



شکل ۱: کروماتوگرام (HPLC) مربوط به متابولیت‌های محلول در اتر باکتری *Streptomyces sp. ABRIINW 111*



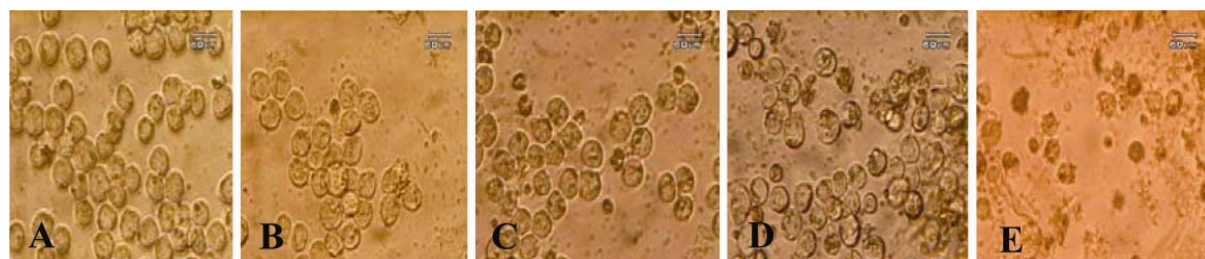
شکل ۲: اثرات متابولیت‌های محلول در اتر ایزوله ۱۱۱ بر رشد و زیستایی سلول‌های K562، سلول‌های K562 با غلظت‌های مختلف متابولیت‌ها و زمان‌های متفاوت تیمار شد و اثرات آن بر رشد (الف) و زیستایی (ب) سلول‌ها با استفاده از آزمون دفع رنگ تریپان بلو و شمارش سلولی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج به صورت میانگین  $\pm$  خطای استاندارد (SD) نمایش داده شده است.

جدول ۱: آنالیز آماری درصد رشد سلول‌های K562 تیمار شده با متابولیت‌های محلول در اتر ایزوله ۱۱۱ با استفاده از نرم افزار SPSS 14.0 و آزمون Student t-test مقادیر بصورت میانگین  $\pm$  خطای استاندارد (SD) نمایش شده است.

درصد رشد نسبت به کنترل				غلظت (ng/ml)
ساعت ۷۲	ساعت ۴۸	ساعت ۲۴	ساعت ۱۲	
۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	کنترل
۷۷/۶ $\pm$ ۳/۷ $P = ۰/۰۰۱$	۸۲/۷ $\pm$ ۴/۴۱ $P = ۰/۰۱۱$	۸۴/۸ $\pm$ ۱/۸۹ $P = ۰/۰۱۲$	۹۰/۲۳ $\pm$ ۳/۷۶ $P = ۰/۰۹۶$	۱۰
۵۶/۴ $\pm$ ۳/۰۹ $P = ۰/۰۰۵$	۶۲/۹ $\pm$ ۱ $P = ۰/۰۰۱$	۷۴/۹ $\pm$ ۱/۷۲ $P = ۰/۰۱۴$	۷۸/۹ $\pm$ ۲/۵۴ $P = ۰/۰۰۶$	۱۰۰
۵۲/۱ $\pm$ ۳/۸۳ $P = ۰/۰۰۶$	۵۵/۷ $\pm$ ۱/۱۶ $P = ۰/۰۰۲$	۶۸/۷ $\pm$ ۲/۰۲۹ $P = ۰/۰۰۸$	۷۲/۱ $\pm$ ۳/۴۱ $P = ۰/۰۰۵$	۲۰۰
۴۰/۱ $\pm$ ۴/۲ $P = ۰/۰۰۱$	۴۶/۲ $\pm$ ۳/۲۷ $P = ۰/۰۰۱$	۵۶/۷ $\pm$ ۲/۰۷ $P = ۰/۰۰۲$	۶۳/۵ $\pm$ ۲/۴۳ $P = ۰/۰۰۷$	۵۰۰
۲۹/۲ $\pm$ ۲/۳۵ $P = ۰/۰۰۳$	۳۷/۶ $\pm$ ۲/۳ $P = ۰/۰۰۲$	۴۹/۹ $\pm$ ۱/۳۹ $P = ۰/۰۰۹$	۵۹/۸ $\pm$ ۲/۶۸ $P = ۰/۰۱۴$	۱۰۰۰
۱۰/۷ $\pm$ ۶/۵۴ $P = ۰/۰۰۳$	۱۹ $\pm$ ۰/۷۶ $P = ۰/۰۰۲$	۲۹/۸ $\pm$ ۲ $P = ۰/۰۰۲$	۳۱/۷ $\pm$ ۰/۷۲ $P = ۰/۰۰۱$	۲۰۰۰
۰/۲۳ $\pm$ ۰/۱۷ $P = ۰/۰۰۱$	۱۰/۳ $\pm$ ۱/۹۵ $P = ۰/۰۰۱$	۱۴/۳ $\pm$ ۰/۲۷ $P = ۰/۰۰۱$	۳۰/۴ $\pm$ ۰/۹۷ $P = ۰/۰۰۴$	۵۰۰۰

جدول ۲: آنالیز آماری درصد زیستایی سلول‌های K562 تیمار شده با متابولیت‌های محلول در اتر ایزوله ۱۱۱ با استفاده از نرم افزار SPSS 14.0 و آزمون Student t-test مقادیر بصورت میانگین  $\pm$  خطای استاندارد (SD) نمایش شده است.

درصد زیستایی نسبت به کنترل				غلظت (ng/ml)
۷۲ ساعت	۴۸ ساعت	۲۴ ساعت	۱۲ ساعت	
۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	کنترل
$98/2 \pm 3/7$ $P = 0/11^*$	$98/9 \pm 4/4$ $P = 0/19^*$	$97/3 \pm 1/89$ $P = 0/19^*$	$98/5 \pm 3/76$ $P = 0/49^*$	۱۰
$96/1 \pm 3$ $P = 0/13^*$	$96/6 \pm 1$ $P = 0/17^*$	$96/1 \pm 1/72$ $P = 0/14^*$	$98/3 \pm 2/54$ $P = 0/31^*$	۱۰۰
$93/3 \pm 3/8$ $P = 0/04$	$94/2 \pm 1/1$ $P = 0/41$	$94/9 \pm 2$ $P = 0/95^*$	$97/6 \pm 3/41$ $P = 0/22^*$	۲۰۰
$88/5 \pm 4/2$ $P = 0/02$	$92/3 \pm 3/2$ $P = 0/24$	$91/8 \pm 2$ $P = 0/1^*$	$95 \pm 2/43$ $P = 0/19^*$	۵۰۰
$80/2 \pm 2/3$ $P = 0/04$	$88/3 \pm 2/3$ $P = 0/34$	$88/6 \pm 1/39$ $P = 0/23$	$94/1 \pm 2/68$ $P = 0/53^*$	۱۰۰۰
$59/3 \pm 6/5$ $P = 0/022$	$74/5 \pm 0/76$ $P = 0/47$	$78/3 \pm 2$ $P = 0/03$	$79/5 \pm 0/72$ $P = 0/13$	۲۰۰۰
$2/2 \pm 0/17$ $P = 0/28$	$56/1 \pm 1/9$ $P = 0/03$	$58/2 \pm 0/27$ $P = 0/03$	$80/9 \pm 0/97$ $P = 0/16$	۵۰۰۰



شکل ۳: تغییرات ریخت‌شناسی سلول‌های K562 تیمار شده با متابولیت‌های محلول در اتر ایزوله ۱۱۱. سلول‌ها با غلظت‌های ۱۰ - ۵۰۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر متابولیت‌ها و به مدت ۴۸ ساعت تیمار شد (A: سلول‌های کنترل، B: غلظت ۱۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر، C: غلظت ۲۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر، D: غلظت ۱۰۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر و E: غلظت ۵۰۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر را نشان می‌دهد) و تغییرات ریخت‌شناسی سلول‌ها با استفاده از میکروسکوپ نوری (بزرگنمایی ۴۰x) مورد بررسی قرار گرفت. همان‌طور که مشاهده می‌شود با افزایش غلظت سلول‌های K562 از حالت کروی خارج شده و یکپارچگی غشای خود را از دست می‌دهند.

### تغییرات در شکل ظاهری سلول‌های K562 توسط متابولیت‌های محلول در اتر:

بررسی ریخت‌شناسی سلول‌های K562 تیمار شده و کنترل توسط میکروسکوپ نوری نشان داد که این متابولیت‌ها باعث ایجاد تغییرات ریخت‌شناسی مرتبط با آپوتوزیس در سلول‌های K562 شد. همان‌طور که در شکل ۳ نشان داده شده است، سلول‌های K562 تیمار شده یکپارچگی غشای خود را از دست داده و چروکیده شدند. این تغییرات ظاهری با تشکیل اجسام آپوتوتیک همراه بود. تغییرات در ظاهر سلول‌های K562 به صورت وابسته به غلظت و زمان افزایش یافت.

### القای آپوتوزیس در سلول‌های K562 توسط متابولیت‌های محلول در اتر:

به منظور اثبات وقوع آپوتوزیس در سلول‌های K562 از آزمون قطعه‌قطعه شدن DNA استفاده شد. نتایج حاصل از این آزمون نشان داد که تیمار سلول‌های K562 با غلظت ۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر متابولیت‌ها (۳۰۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر) و برای مدت ۴۸ ساعت باعث قطعه‌قطعه شدن و تغییر در الگوی DNA ژنومی گردید. همان‌طور که در شکل ۴ نشان داده شده است DNA ژنومی سلول‌های تیمار شده به صورت لکه (Smear) ضعیفی بر روی ژل الکتروفورز دیده می‌شود که این حالت در

سلول‌های کنترل مشاهده نشد. در برخی از سلول‌ها از جمله رده سلولی K562 الگوی کلاسیک نردبانی در ژل الکتروفورز دیده نشده و DNA آنها در اثر وقوع آپوپتوزیس به صورت لکه (Smear) مشاهده می‌گردد که این امر به دلیل نقص در عملکرد آنزیم CAD (Caspase- activated deoxyribonuclease) می‌باشد (۲۰ و ۲۱).



شکل ۴: اثرات متابولیت‌های محلول در اتر ایزوله ۱۱۱ بر قطعه قطعه شدن DNA در سلول‌های K562. سلول‌های K562 با غلظت ۳۰۰۰ نانوگرم (۳ میکروگرم بر میلی لیتر) و به مدت ۴۸ ساعت تیمار گردید و اثرات آن بر قطعه قطعه شدن DNA با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز مورد بررسی قرار گرفت.

### بحث

یافته‌های اخیر نشان می‌دهد که بسیاری از ترکیبات شیمی درمانی از طریق القای آپوپتوزیس منجر به مرگ سلول‌های سرطانی می‌گردند. از آنجایی که القای آپوپتوزیس روش مناسبی برای حذف سلول‌های سرطانی است و اغلب سلول‌های سرطانی دارای نقص در مکانیسم‌های آپوپتوزی خود می‌باشند بنابراین یافتن ترکیباتی که بتواند باعث القای آپوپتوزیس در سلول‌های سرطانی گردد یکی از اولویت‌های تحقیقاتی محسوب می‌گردد (۸). لذا اهمیت مطالعه حاضر در بررسی اثرات مهار رشدی و توان القای آپوپتوزیس متابولیت‌های محلول در اتر ایزوله ۱۱۱ در سلول‌های K562 لوسمی میلوپیدی مزمن انسانی می‌باشد.

در مطالعه حاضر مشاهدات میکروسکوپ نوری و نتایج حاصل از آزمون قطعه قطعه شدن DNA نشان دهنده وقوع آپوپتوزیس در سلول‌های K562 تیمار شده با متابولیت‌های محلول در اتر می‌باشد. اخیراً متابولیت‌های مختلف القا کننده آپوپتوزیس از گونه‌های مختلف باکتری‌های استرپتومایسس بدست آمده است که در این میان می‌توان به متابولیت‌های PCC (Pure cytotoxic compound) و F3-2-5 اشاره کرد که از باکتری‌های *Streptomyces sp.* بدست می‌آیند و باعث القای آپوپتوزیس به ترتیب در رده‌های سلولی سرطان خون (HL-60)، K562، U937 و THP-1 (۸) و سلول‌های HeLa (سرطان گردن رحم انسان) می‌گردند (۱۱). PCC در غلظت ۳۰ نانوگرم بر میلی لیتر و در مدت زمان ۴۸ ساعت و از طریق فعال سازی کاسپاز ۳ و کاهش بیان پروتئین ضد آپوپتوزی Bcl-2 باعث القای آپوپتوزیس در رده‌های سلولی سرطان خون می‌گردد (۸). در سلول‌های HeLa که با غلظت ۸۰ میکرومولار متابولیت F3-2-5 و در بازه زمانی بالاتر از ۲۴ تیمار شده بود تراکم کروماتین، قطعه قطعه شدن DNA و وقوع آپوپتوز در سلول‌های تیمار شده مشاهده گردید (۱۱). در مطالعه حاضر نیز اثرات آپوپتوزی متابولیت‌های محلول در اتر ایزوله ۱۱۱ در سلول‌های K562 در غلظت ۳ میکروگرم بر میلی لیتر در مدت زمان ۴۸ ساعت مورد بررسی قرار گرفت که نتایج حاصل حاکی از قطعه قطعه شدن DNA ژنومی و ایجاد تغییرات ریخت شناسی مرتبط با آپوپتوزیس از جمله جمع شدگی سلول‌ها و ایجاد اجسام آپوپتوتیک در این سلول‌ها بود. با توجه به این اثرات، مطالعات بیشتر در جهت شناسایی مکانیسم‌های احتمالی القای آپوپتوزیس توسط متابولیت‌های محلول در اتر ایزوله ۱۱۱ در این رده سلولی ضروری به نظر می‌رسد. با توجه به اینکه سلول

تاکنون اثرات مهار رشدی متابولیت‌های حاصل از گونه‌های مختلف باکتری استرپتومایسس در رده‌های مختلف سلول‌های سرطانی مورد بررسی قرار گرفته است. به عنوان مثال، متابولیت استرپتوکوردین (Streptokordin) که از باکتری استرپتومایسس گونه KORDI-3238 بدست آمده باعث مهار رشد در چندین رده سلول انسانی از جمله MDA-MB-231 (سرطان سینه)، HCT-15 (سرطان کولون)، PC-3 (سرطان پروستات) و K562 (لوسمی میلوپیدی مزمن) شده است (۲۲). میزان IC<sub>50</sub> ۴۸ ساعت پس از تیمار سلول‌های فوق با این ترکیب به ترتیب برابر

7. Lakshmi D, Kannabiran K. A morphological, biochemical and biological studies of halophilic *Streptomyces* sp. Isolated from saltpan environment. *AJID*. 2009; 5(3): 200-206.
8. Jeong S, Han M, Jin C, Kim G, et al. Apoptosis induction of human leukemia cells by *Streptomyces* sp. SY-103 metabolites through activation of caspase-3 and inactivation of Akt. *Int J Mol Med*. 2010; 25(2): 31-40.
9. Anderson A, Wellington E. The taxonomy of *Streptomyces* and related genera. *IJSEM*. 2001; 51(3): 797- 814.
10. Dong Yeok S, Shin H, Kim G, Cheong J, et al. Streptochlorin isolated from streptomyces sp. induces apoptosis in human hepatocarcinoma cells through a reactive oxygen species-mediated mitochondrial pathway. *J Microbiol Biotechnol*. 2008; 18(11): 1862- 1867.
11. Lee C, Lim H, Moon S, Shin C, et al. Novel anticancer agent, benzylidihydroxyoctenone, isolated from *Streptomyces* sp. causes G1 cell cycle arrest and induces apoptosis of HeLa cells. *Cancer Sci*. 2007; 98(6): 795-802.
12. Zhang W, Ohnishi K, Yoshida H, Pan L, et al. Spicamycin and KRN5500 induce apoptosis in myeloid and lymphoid cell lines with down-regulation of bcl-2 expression and modulation of promyelocytic leukemia protein. *Jpn J Cancer Res*. 2000; 91: 604-611.
13. Singhal N, Bapsy P, Babu KG, George J. Chronic myeloid leukemia. *JAPI*. 2004; 52: 410-416.
14. Rosca A, Arion C, Colita A, Nedelcu L, et al. Chronic myelogenous leukemia prognosis and evolution. *Bulletin of the trasilvania university of brasov*. 2009; 2(51): 97-104.
15. Appleby N, Burke E, Curran T, Neary E. Chronic myeloid leukemia: molecular abnormalities and treatment options. *TSMJ*. 2005; 6: 45-51.
16. Cardama A, Kantarjian H, Cortes J. Mechanism of primary and secondary resistance to imatinib in chronic myeloid leukemia. *Cancer control*. 2009; 16(2): 122-131.
17. Moosavi MA, Yazdanparast R, Lotfi A. GTP induces S-phase cell-cycle arrest and inhibits DNA synthesis in K562 cells but not in normal human peripheral lymphocytes. *JBMB*. 2006; 39(5): 492-501.
18. Grosveld G, Verwoerd T, Agthoven T, Klein A, et al. The chronic myelocytic cell line K562 contains a breakpoint in bcr and produces a chimeric bcr/abl transcript. *Mol Cell Biol*. 1986; 6(2): 607- 616.

های K562 در واقع سلول‌هایی مقاوم به داروی ایماتینیب مسیلات (مهار کننده تیروزین کیناز Bcr- Abl که برای درمان بیماری CML بکار می رود) می باشند (۲۴) بنابراین تلاش برای یافتن ترکیباتی با قدرت القای آپوپتوزیس به ویژه از فرآورده های طبیعی ضروری به نظر می رسد و شناسایی متابولیت های محلول در اتر ایزوله ۱۱۱ به عنوان ترکیبات القا کننده آپوپتوزیس در این رده سلولی می تواند حائز اهمیت باشد.

### نتیجه گیری

به طور کلی، با توجه به نقایص به وجود آمده در فرآیند آپوپتوزیس در سلول های سرطانی و نیز وجود مقاومت دارویی در این سلول ها، شناسایی ترکیبات جدید القاء کننده آپوپتوزیس همانند متابولیت های محلول در اتر باکتری *Streptomyces* sp. ABRIINW 111 می تواند برای مطالعات بیشتر در زمینه درمان سرطان کمک کننده باشد.

### تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله مراتب تشکر و قدردانی صمیمانه خود را از امور پژوهشی دانشگاه تبریز و پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی شمال و شمال غرب کشور که هزینه ی قسمتی از طرح را تقبل فرموده اند، ابراز می دارند.

### منابع

1. Cho S, Choi E. Apoptotic signaling pathways: caspases and stress activated protein kinases. *JBMB*. 2002; 35(1): 24-27.
2. Han S, Kim Y, Kim T. Role of apoptotic and necrotic cell death under physiologic conditions. *BMB reports*. 2008; 41(1): 1-10.
3. Russo A, Terrasi M, Agnese V, Santini D, et al. Apoptosis: a relevant tool for anticancer therapy. *Ann Oncol*. 2006; 17(7): 115-123.
4. Hyewon S, Oh H, Lee C. Benzylidihydroxyoctenone, a novel nonsteroidal antiandrogen, shows differential apoptotic induction in prostate cancer cells in response to their androgen responsiveness. *J. Microbiol. Biotechnol*. 2011; 21(5): 540-544.
5. Taraphdar A, Roy M, Bhattacharya R. Natural products as inducers of apoptosis: Implication for cancer therapy and prevention. *Curr Sci*. 2001; 80(11): 1387-1396.
6. Lin X, Wen Y, Li M, Chen Z, et al. A new strain of *Streptomyces avermitilis* produces high yield of oligomycin A with potent anti- tumor activity on human cancer cell lines in vitro. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2009; 81: 839-845.



19. Sadigh Eteghad S. [Isolation & molecular identification of efficacious antibiotal secondary metabolites producer actinomycetes, against resistance Staphylococci clinical isolates]. DVM dissertation, Tabriz, Islamic azad Univ. 2010; [Persian].
20. Moosavi MA, Moasses S, Asadi M, Asvadi Kermani I. [Growth inhibitory and apoptotic effects of carbenoxolone in human leukemia K562 cell Line]. SJKUMS. 2011; 16(1): 27-37, [Persian].
21. Moosavi MA, Yazdanparast R, Sanati MH. The Cytotoxic and anti-proliferative effects of 3-hydrogenkwadaphnin in K562 and jurkat cells is reduced by guanosine. JBMB. 2005; 38(4): 391-398.
22. Jeong S, Shin H, Kim T, Lee H, et al. Streptokordin, a novel cytotoxic compound of the methylpyridine class from a marine- derived Streptomyces sp. KORDI-3238. Antibiot. 2006; 59(4): 234-240.
23. Sohda K, Nagai K, Yamori T, Suzuki K, et al. YM-216391, a novel cytotoxic cyclic peptide from Streptomyces nobilis. J Antibiot. 2005; 58(1): 27-31.
24. Barbosa C, Oliveira C, Nascimento F, Smith M, et al. Biphosphinic palladacycle complex mediates lysosomal-membrane permeabilization and cell death in K562 leukaemia cells. Eur J Pharmacol. 2006; 542: 37-47.

## **Growth Inhibition and Induction of Apoptosis by Ether Soluble Metabolites of *Streptomyces* sp. ABRIINW 111 in Human Myeloid Leukemia K562 Cell Line**

Moosavi MA<sup>1\*</sup>, Ghanbarvand F<sup>1</sup>, Dehnad AR<sup>2</sup>

1. Department of Zoology, Faculty of Natural Science, the University of Tabriz, Tabriz, Iran

2. Regional Agriculture Biotechnology, Research Institute of West and Northwest, Tabriz, Iran

\* Email corresponding author: moosav\_m@tabrizu.ac.ir

Received: 24 Oct. 2011

Accepted: 17 Jan. 2012

---

### **Abstract**

**Aim:** Since induction of apoptosis is an important strategy in cancer treatment, many attempts are in program to find new apoptotic inducer agents. Hence, ether soluble metabolites from Iranian native bacteria, *Streptomyces* sp. ABRIINW 111, were isolated and anti-cancer activity of these metabolites was studied using human chronic myeloid leukemia K562 cells.

**Materials and methods:** K562 cells were treated by various concentrations of these metabolites for 12- 72 h. Trypan blue exclusion test and DNA fragmentation assay were used to study growth inhibition and apoptosis occurrence, respectively.

**Results:** Ether soluble metabolites induced growth inhibition in K562 cells in a concentration- and time- dependent manner. IC50 values after 24 and 48 h treatment were 1000 and 400 ng/ml, respectively. Moreover, these metabolites caused significant decrease in K562 cells viability ( $P < 0.05$ ). Light microscopy and DNA fragmentation assay results showed apoptosis induction in treated cell.

**Conclusion:** According to apoptosis deficient and drug resistance in cancer cells, identification of new apoptosis inducers such as ether soluble metabolites could be helpful in more investigations in cancer treatment.

**Key words:** Apoptosis, Chronic myeloid leukemia, Natural products, *Streptomyces*