

## **Indole-3-carbinol induces G1 cell cycle arrest in pre-B acute lymphoblastic leukemia cell line**

Tavasoli B<sup>1</sup>, Ebrahimi S<sup>2</sup>, Manafi R<sup>2</sup>, Kiani F<sup>2</sup>, Safa M<sup>3\*</sup>, Kazemi A<sup>4</sup>

1. Master of Sciences in Hematology & Blood Banking, School of Allied Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
2. Master of Sciences in Hematology & Blood Banking, School of Allied Medical Sciences, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
3. Assistant Professor, Cellular and Molecular Research Center, Hematology & Blood Banking Department, Faculty of Allied Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
4. Professor, Hematology & Blood Banking Department, Faculty of Allied Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Received: 16 Feb 2014, Accepted: 2 Jul 2014

### **Abstract**

**Background:** Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is the most common type of cancer in children. Currently, chemotherapy is the most effective method of leukemia cancer treatment which has many side effects. New strategies in cancer therapy utilize compounds that specifically target aberrant signaling pathways in order to reduce toxic side effects. Indole-3-carbinol (I3C) found in vegetables has multiple anti-cancer properties because of its ability to modulate multiple cellular signaling pathways. In this study the molecular mechanism of the action of indole-3-carbinol on pre-B ALL cells was investigated.

**Materials and Methods:** In current study, NALM-6 cells were treated with different concentrations of I3C at specific times. Analysis of cellular DNA content was performed by flow cytometry for evaluation of cell cycle status. The protein expression of p21, p53 as well as c-Myc proteins was determined by Western blot in I3C-treated cells.

**Results:** Cell cycle histogram analysis showed that I3C significantly increased the percentage of G1 cells compared with non-treated cells (control) ( $p < 0.05$ ). The western blot analysis also indicated I3C significantly up regulated p21, p53 expression and down regulated c-Myc expression ( $p < 0.05$ ).

**Conclusion:** The G1 arrest induced by I3C is associated with down-regulation of c-Myc and up-regulation of p53 and its downstream target p21.

**Keywords:** G1 arrest, Indole-3-carbinol, Pre-B ALL

\*Corresponding Author:

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

Email: Safa.m@iums.ac.ir

## القای توقف سیکل سلولی در فاز G1 در رده سلولی لوسمی لنفوبلاستیک حاد پیش ساز لنفوسیت B توسط ایندول تری کرینول

بهناز توسلی<sup>۱</sup>، صابر ابراهیمی<sup>۲</sup>، ریما منافی<sup>۱</sup>، فاطمه کیانی<sup>۲</sup>، مجید صفا<sup>۳\*</sup>، احمد کاظمی<sup>۴</sup>

۱- کارشناس ارشد هماتولوژی، گروه هماتولوژی و بانک خون، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

۲- کارشناس ارشد هماتولوژی، گروه هماتولوژی و بانک خون، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

۳- استادیار، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، گروه هماتولوژی و بانک خون، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

۴- استاد، گروه هماتولوژی و بانک خون، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۹۲/۱۱/۲۷ تاریخ پذیرش: ۹۳/۴/۱۱

### چکیده

**زمینه و هدف:** لوسمی لنفوبلاستیک حاد شایع‌ترین بدخیمی در کودکان محسوب شده و مهم‌ترین روش درمانی آن شیمی درمانی می‌باشد. راهبردهای جدید سرطان درمانی به منظور کاهش اثرات جانبی داروهای شیمی درمانی به کارگیری ترکیباتی را پیشنهاد می‌کند که مسیرهای پیام دهی را در سلول‌های بدخیم هدف قرار دهند. ایندول تری کرینول به عنوان یک ترکیب گیاهی با هدف قرار دادن مسیرهای پیام دهی سلولی خاصیت ضد سرطانی خود را در انواع مختلفی از بدخیمی‌ها اعمال می‌کند. هدف از این مطالعه بررسی اثر ایندول تری کرینول بر رده سلولی لوسمی لنفوبلاستیک حاد پیش ساز سلول B می‌باشد.

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه تجربی سلول‌های NALM-6 با غلظت‌های مختلف ایندول تری کرینول در فواصل زمانی معین تیمار شدند. تأثیر ایندول تری کرینول بر سیکل سلولی، با رنگ آمیزی محتوای DNA با پروپیدوم ایداید و به کمک فلوسایتومتری مطالعه و تغییرات در بیان پروتئین‌های p21، p53 و c-Myc در سلول‌های تیمار شده با ایندول تری کرینول نیز با کمک تکنیک وسترن بلات بررسی شد. اختلاف بین گروه‌ها با آزمون تی زوجی مورد مطالعه قرار گرفت.

**یافته‌ها:** داده‌های سیکل سلولی افزایش معنی‌دار ( $p < 0.05$ ) جمعیت سلول‌های ناحیه G1 را در اثر مجاورت با ایندول تری کرینول در مقایسه با سلول‌های کنترل نشان داد. همچنین نتایج وسترن بلات نشان دهنده اثر ایندول تری کرینول در افزایش معنی‌دار ( $p < 0.05$ ) بیان پروتئین‌های p21 و p53 و کاهش بیان پروتئین c-Myc بود.

**نتیجه‌گیری:** ایندول تری کرینول می‌تواند با کاهش بیان پروتئین c-Myc و افزایش بیان پروتئین‌های p21 و p53 باعث ایجاد توقف در مرحله G1 چرخه سلولی در سلول‌های لوسمی لنفوبلاستیک حاد پیش ساز سلول B شود.

**واژگان کلیدی:** ایندول تری کرینول، توقف فاز G1، لوسمی لنفوبلاستیک حاد سلول B

\***نویسنده مسئول:** مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، گروه هماتولوژی و بانک خون، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی

ایران، تهران، ایران

Email: Safa.m@iums.ac.ir

## مقدمه

لوسمی لنفوبلاستیک حاد (Acute Lymphoblastic Leukaemia - ALL) سلول‌های پیش ساز لنفوئیدی را در سطوح تمایزی مختلف درگیر می‌کند. این گروه از لوسمی‌ها به ویژه لوسمی لنفوبلاستیک حاد پیش ساز سلول B (Pre-B ALL) عمدتاً در کودکان سنین ۵-۲ سال مشاهده می‌شود و شایع‌ترین بدخیمی در کودکان و بالغین جوان محسوب می‌شود. این لوسمی با روش‌های شیمی درمانی کنونی تا حدودی قابل درمان است اما در گروهی از بیماران عود بیماری رخ می‌دهد و برخی نیز به این شیوه درمانی مقاومت نشان می‌دهند (۴-۱). نتایج مطالعات در مورد بهبود شیوه‌های درمانی پیشنهاد می‌کند برای کاهش اثرات جانبی داروهای شیمی درمانی، از ترکیباتی که به طور ویژه مسیرهای پیام دهی مختل شده را در سلول‌های سرطانی تحت تأثیر قرار می‌دهند، استفاده شود (۵). ایندول تری کریبول (I3C) که هم‌چنین با اسامی دیگری از جمله تری ایندولیل کریبول و تری ایندولیل متانول نیز شناخته می‌شود، حاصل اتولیز یک گلوکوزینولات به نام گلوکوبراسیسن می‌باشد که در سبزیجاتی از جمله کلم، کلم پیچ و گل کلم یافت می‌شود. در شرایط بالینی نتایج تحقیقات نشان می‌دهد که این ترکیب می‌تواند جراحی‌های پیش سرطانی را در سرطان سرویکس برطرف کند، عملکرد سیستم ایمنی را تغییر دهد و باعث تعادل هورمونی شود. این ترکیب هم‌چنین به سم زدایی روده‌ها و کبد کمک می‌کند. 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 (۶، ۷). اثرات ضد سرطانی این ترکیب در مطالعات حیوانی و انسانی به اثبات رسیده است و از جمله مکانیسم‌های اثر I3C بر روی سلول‌های سرطانی مختلف مهار سیکل سلولی، القای آپوپتوز و کاهش مهاجم سلول‌های سرطانی (متاستاز) می‌باشد. I3C با تأثیر بر چندین مسیر پیام دهی داخل سلولی موجب مهار رشد سلول‌های سرطانی می‌شود (۱۱-۸). تکثیر و رشد سلول‌های یوکاریوتی به وسیله بیان و فعال شدن

گروهی از پروتئین‌های دخیل در چرخه سلولی از جمله سایکلین‌ها، کینازهای وابسته به سایکلین (CDKs) و مهار کننده‌های کیناز وابسته به سایکلین (CKIs) تنظیم می‌شود. پروتئین‌های خانواده CKI به وسیله پیام‌های داخل و خارج سلولی تنظیم می‌شوند، به عنوان مثال بیان پروتئین p21 به عنوان یک CKI توسط ژن سرکوب کننده توموری به نام p53 تنظیم می‌شود. القا توقف سیکل سلولی توسط p53 می‌تواند در هر یک از فازهای G1، S و G2 رخ دهد. ایجاد توقف سیکل سلولی توسط p53 در فازهای G1 و G2 فرصتی را برای سلول ایجاد می‌کند تا بتواند آسیب‌های وارده بر ژنوم را بازسازی کند. در پاسخ به استرس‌های سلولی، پروتئین p53 سطح پروتئین p21 و mRNA مربوط به آن را افزایش می‌دهد و بنابراین پروتئین p21 یک هدف پایین دست پروتئین p53 محسوب می‌شود (۱۲). افزایش پروتئین p21 منجر به توقف سیکل سلولی در فاز G1 از طریق اتصال به کمپلکس CyclinE/CDK2 می‌شود. مهار فعالیت کینازی کمپلکس CyclinE/CDK2 نیز از فسفوریلاسیون پروتئین Rb و به دنبال آن آزاد سازی پروتئین E2F و القای بیان ژن‌های لازم برای ورود به فاز S ممانعت می‌کند (۱۳). پروتئین c-Myc به عنوان یکی دیگر از کنترل کننده‌های چرخه سلولی برای پیشبرد سلول از فاز G1 به S نقش مهمی را ایفا می‌کند. این پروتئین از اتصال پروتئین p27، مهارکننده کیناز وابسته به سایکلین، به کمپلکس CyclinE/CDK2 جلوگیری کرده و منجر به افزایش فعالیت کینازی CDK2 می‌شود. این پروتئین‌کوژن با افزایش بیان سایکلین D3 و A و هم‌چنین با جلوگیری از بیان پروتئین‌های مهار چرخه سلولی شامل p21 و p27 باعث پیشروی چرخه سلولی می‌شود (۱۴، ۱۵). اگرچه اثرات ضد سرطانی I3C بر سلول‌های سرطانی پروستات، پستان، روده و سلول‌های اندوتلیال به خوبی مورد مطالعه قرار گرفته است (۱۸-۱۶) اما اثر و مکانیسم‌های مولکولی این ترکیب بر روی سلول‌های لوسمی لنفوبلاستیک پیش ساز سلول B به عنوان شایع‌ترین بدخیمی در کودکان، کمتر مورد بررسی قرار گرفته است. در این مطالعه چگونگی

عملکرد ایندول تری کریبول بر رده سلولی لوسمی لنفوبلاستیک حاد پیش ساز سلول B با بررسی مکانیسم‌های مولکولی آن مورد مطالعه قرار گرفته است.

## مواد و روش ها

در این مطالعه تجربی رده سلولی لوسمی لنفوبلاستیک حاد پیش ساز سلول B (NALM-6) از اینستیتو پاستور خریداری شد و در محیط کشت RPMI-1640 (گیکو - آمریکا) به همراه ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (گیکو - آمریکا)، ۱ درصد پنی سیلین - استرپتومایسین (۱۰۰ واحد بر میلی لیتر پنی سیلین و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر استرپتومایسین) (گیکو - آمریکا) در انکوباتور با رطوبت ۹۰ درصد، ۵ درصد CO<sub>2</sub> و دمای ۳۷ درجه سانتی گراد کشت داده شد. برای تهیه استوک اولیه I3C (سیگما - آمریکا) با غلظت ۱۰۰ میلی مولار، مقدار مشخص I3C در DMSO (مرک - آلمان) حل شد و سپس استوک کاربردی با غلظت ۲ میلی مولار آماده گردید و با فیلتر ۰/۲۲ میکرونی استریل شد.

## بررسی تغییرات سیکل سلولی در سلول‌های NALM-6 تحت تیمار با I3C:

پس از سه مرحله پاساژ، سلول‌ها شمارش شده و در هر یک از چاهک‌های پلیت‌های ۱۲ خانه‌ای (گریتر - آلمان) مقدار ۷ × ۱۰<sup>۵</sup> سلول با حجم نهایی ۲ میلی لیتر کشت داده شد. در چاهک‌های جداگانه با توجه به الگوی طراحی شده، غلظت‌های ۲۰، ۴۰ و ۶۰ میکرومولار از I3C با سلول‌ها مجاور شد. پس از گذشت ۲۴ ساعت سلول‌ها برای بررسی سیکل سلولی به وسیله رنگ آمیزی هسته‌ای با رنگ پروپیدیوم ایداید (سیگما - آمریکا)، برداشت شده و با بافر فسفات-سالیین (PBS) شستشو داده شدند. در ادامه برای تثبیت سلول‌ها ۲ میلی لیتر اتانول ۷۰ درجه سرد به آنها اضافه شد. سپس سلول‌ها به مدت یک شب در دمای ۲۰ - درجه سانتی گراد انکوبه شدند. پس از شستشوی سلول‌ها با بافر فسفات-سالیین سرد، طبق روش کار به سلول‌ها ۲۵۰ میکرولیتر بافر سترات و ۲۵۰ میکرولیتر بافر فسفات-سالیین

اضافه شد و سلول‌ها به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شدند. در نهایت به سلول‌ها ۵ میکرولیتر RNase A (سیگما - آمریکا) 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 هسته سلول‌ها با رنگ پروپیدیوم ایداید در سوسپانسیون‌های سلولی با استفاده از دستگاه فلوسایتومتر (BD FACSCalibur - آمریکا) مورد بررسی قرار گرفت.

## بررسی پروتئین‌های p21، p53 و c-Myc در سلول‌های NALM-6 مجاور شده با I3C:

برای بررسی تغییر در میزان بیان پروتئین‌ها از تکنیک وسترن بلات استفاده شد. به این منظور سلول‌ها به تعداد ۵ × ۱۰<sup>۶</sup> و با حجم نهایی ۵ میلی لیتر در فلاسک‌های فیلتردار ۲۵cm<sup>2</sup> کشت داده شدند و در ادامه با I3C در غلظت‌های ۲۰، ۴۰ و ۶۰ میکرومولار به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت مجاور شدند. گروهی از سلول‌ها نیز با غلظت ۰/۱ درصد DMSO تیمار شدند.

استخراج و جدا سازی پروتئین‌ها: سلول‌ها برداشت شده و با بافر فسفات-سالیین سرد شستشو داده شدند. به سلول‌ها مقدار مساوی از بافر لیز کننده سلولی (حاوی NP-40 ۱ درصد، SDS ۰/۵ درصد، Tris-HCl، EDTA (pH=۷/۴) ۱۰ میلی مولار، NaCl ۱۵۰ میلی مولار، PMSF ۵ میلی مولار، ۰/۵ درصد سدیم داکسی کولات، ۱۰۰ میکرومولار) به همراه مهارکننده پروتئاز و فسفاتاز (سیگما-آمریکا) اضافه شد نمونه‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد و با دور ۱۳۰۰۰ سانتریفیوژ شدند. محلول رویی برداشت شد و غلظت پروتئین‌ها با روش برادفورد مورد ارزیابی قرار گرفت. مقادیر معادل از نمونه‌های پروتئینی با استفاده از ۱۰ درصد SDS-PAGE براساس روش Laemmli جداسازی شدند.

وسترن بلات: انتقال باندهای جدا شده روی ژل به غشای نیتروسولولز (AmershamHybond-ECL) با استفاده از دستگاه Mini Trans - Blot Bio-Rad انجام شد. پس از اطمینان از انتقال باندهای پروتئینی به وسیله رنگ آمیزی

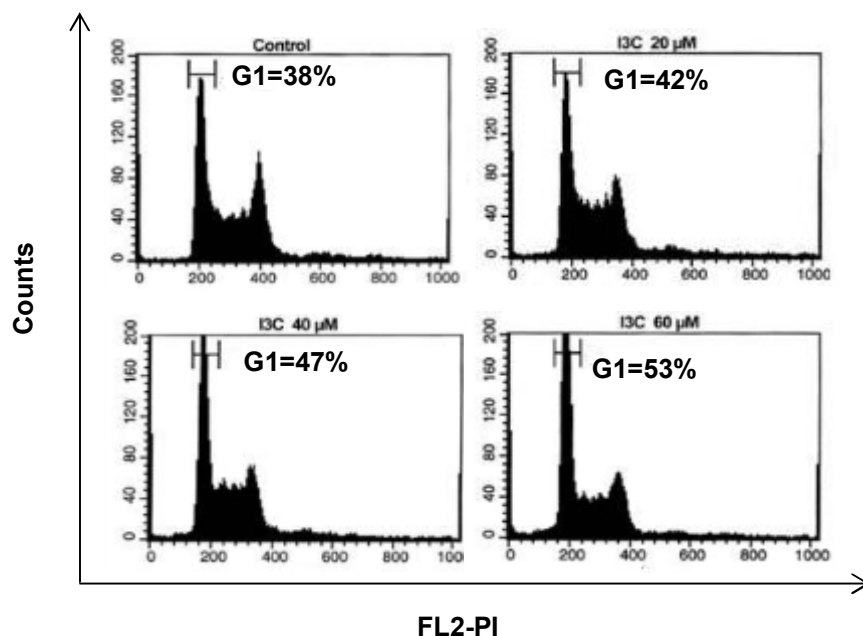
تفاوت بین گروه‌ها با استفاده از آزمون آماری تی زوجی مورد مطالعه قرار گرفت و سطح معنی‌داری نیز کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

### یافته‌ها

#### ایجاد وقفه در فاز G1 سیکل سلولی توسط I3C در سلول‌های NALM-6

در ابتدا برای بررسی اثر I3C در ایجاد وقفه در فاز G1 سیکل سلولی در سلول‌های NALM-6، سلول‌ها با غلظت‌های ۲۰، ۴۰ و ۶۰ میکرومولار I3C به مدت ۲۴ ساعت مجاور شدند. در ادامه رنگ آمیزی هسته‌ای پروپیدیوم ایداید (PI) برای بررسی سیکل سلولی انجام شد. در شکل ۱ هیستوگرام‌های سیکل سلولی نشان دهنده اثر غلظت‌های مختلف I3C در ایجاد وقفه در فاز G1 سیکل سلولی و افزایش تجمع سلول‌های NALM-6 در این ناحیه می‌باشد. با توجه به نمودار ۱ افزایش تعداد سلول‌ها در فاز G1 در اثر تیمار با I3C در غلظت ۴۰ و ۶۰ میکرومولار نسبت به نمونه کنترل معنی‌دار بوده ( $p < 0.05$ ) است.

پانسواس، غشا شسته شده و در ادامه در محلول بلاکینگ حاوی اسکیم میلک ۵ درصد در TBS-T (۰/۳ گرم تریس، ۲/۱۹ گرم NaCl، ۰/۲۵ میلی‌لیتر توین ۲۰) به مدت ۱ ساعت قرار داده شد. پس از شستشو با محلول TBS-T آنتی بادی اختصاصی اولیه مونوکلونال در حضور محلول بلاکینگ با غشاها به مدت یک شب در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد مجاور شد. آنتی بادی علیه اکتین به عنوان کنترل داخلی در نظر گرفته شد. پس از گذشت زمان مورد نظر و شستشوی غشا در سه مرحله با TBS-T آنتی بادی ثانویه (کونژوگه با هرس ردیش پراکسیداز) به مدت ۱ ساعت با غشا در دمای اتاق مجاور شد. در نهایت باندهای پروتئینی با روش کمی لومینسانس (Amersham ECL Advance Kit, GE Healthcare) قابل مشاهده شدند. در ادامه باندهای پروتئینی با نرم افزار ImageJ دانسیتومتری و بررسی شدند. در این مطالعه آنالیز داده‌ها با نرم افزار SPSS نسخه ۲۰ انجام شد. داده‌های مربوط به فلوسایتومتری و ایمنوبلاتینگ حاصل ۳ آزمایش جداگانه بوده و به صورت میانگین ± استاندارد خطای میانگین نشان داده شده است.

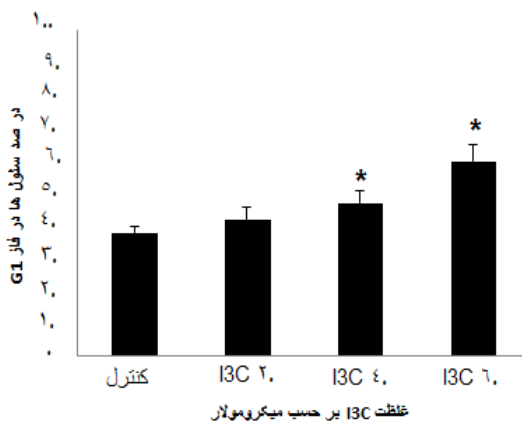


شکل ۱. هیستوگرام‌های سیکل سلولی برای بررسی اثر I3C بر القای توقف در فاز G1 در سلول‌های NALM-6

سلول‌ها در فاز G1 در اثر مجاورت با I3C در غلظت‌های مشخص شده، نسبت به نمونه کنترل افزایش یافته است.

با توجه به شکل ۱ در هیستوگرام‌های سیکل سلولی مربوط به یکی از ۳ آزمایش انجام شده تجمع

درصد سلول‌ها در فاز G1 در هر هیستوگرام مشخص می‌باشد.



نمودار ۱. بررسی افزایش درصد سلول‌های NALM-6 در فاز G1 پس از تیمار با غلظت‌های مختلف I3C در مقایسه با نمونه کنترل نتایج مربوط به ۳ مرتبه آزمایش به صورت میانگین ± انحراف معیار نشان داده شده است و  $p < 0.05$  معنی‌دار در نظر گرفته شده است.

همان‌طور که در نمودار ۱ مشخص شده افزایش سلول‌ها در ناحیه G1 در غلظت‌های ۴۰ و ۶۰ میکرومولار I3C در مقایسه با نمونه کنترل معنی‌دار بوده است.

جدول ۱. درصد سلول‌ها در فاز G1 پس از تیمار با I3C

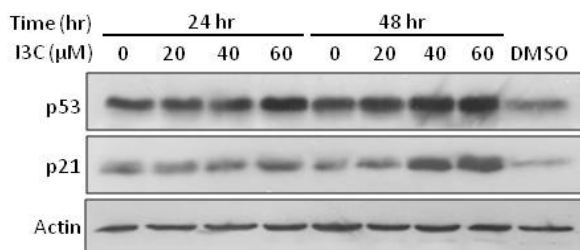
سلول‌های تیمار شده با غلظت‌های مختلف I3C (میکرومولار)	درصد سلول‌ها در فاز G1 میانگین ± انحراف معیار
کنترل	۳۸ ± ۲
I3C 20	۴۲ ± ۴
I3C 40	۴۷ ± ۴
I3C 60	۶۰ ± ۵

مقادیر مربوط به ۳ مرتبه آزمون فلوسایتومتری با رنگ آمیزی پروپیدیوم ایداید پس از تیمار سلول‌ها در غلظت‌های ۲۰، ۴۰، و ۶۰ میکرومولار I3C که به صورت میانگین ± انحراف معیار نشان داده شده است (جدول ۱).

### افزایش بیان پروتئین‌های p53 و p21 توسط I3C در سلول‌های NALM-6

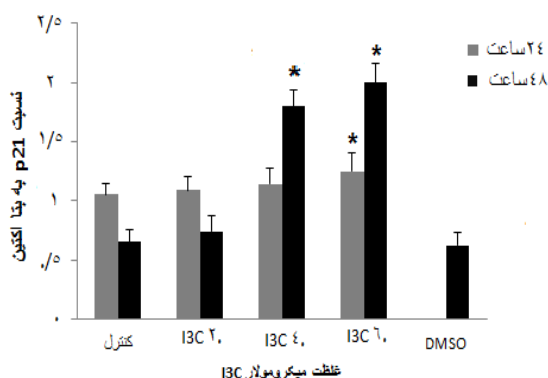
برای بررسی مکانیسم مولکولی I3C در ایجاد وقفه در فاز G1 سیکل سلولی و تاثیر آن بر پروتئین‌های

محوری کنترل کننده چرخه سلولی در سلول‌های NALM-6، سلول‌ها با غلظت‌های مشخص شده I3C به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت مجاور شدند. تکنیک وسترن بلات برای بررسی تغییرات پروتئین‌های ذکر شده مورد استفاده قرار گرفت. پروتئین اکتین به عنوان کنترل داخلی در نظر گرفته شد و DMSO نیز در غلظت ۰/۰۶ درصد با سلول‌های NALM-6 مجاور شد. نتایج وسترن بلات حاکی اثر I3C بر افزایش بیان دو پروتئین p53 و p21 بوده است (شکل ۲). همان‌طور که در نمودار ۲ مشخص است آنالیز دانسیتومتری باندهای مربوط به پروتئین p53 نشان می‌دهد I3C در غلظت ۶۰ میکرومولار پس از ۲۴ ساعت مجاورت با سلول‌های NALM-6 باعث افزایش معنی‌دار ( $p < 0.05$ ) در بیان پروتئین p53 شده است. این افزایش معنی‌دار هم‌چنین پس از ۴۸ ساعت مجاورت سلول‌ها با I3C در غلظت‌های ۴۰ و ۶۰ میکرومولار I3C مشهود است. در نمودار ۳ افزایش بیان معنی‌دار پروتئین p21 پس از ۲۴ ساعت تیمار سلول‌ها با I3C در غلظت ۶۰ میکرومولار و ۴۰ و ۶۰ میکرومولار پس از ۴۸ ساعت نشان داده شده است.



شکل ۲. نتایج وسترن بلات برای بررسی اثر I3C در غلظت‌های مشخص بر بیان پروتئین‌های p53 و p21 پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت مجاورت با سلول‌های NALM-6

با توجه به شکل ۲ (نتایج یکی از ۳ مرتبه آزمایش ایمنوبلاستینگ)، افزایش بیان پروتئین p53 در غلظت‌های ۴۰ و ۶۰ میکرومولار I3C پس از ۴۸ و در غلظت ۶۰ میکرومولار پس از ۲۴ ساعت مجاورت سلول‌های NALM-6 با I3C در مقایسه با نمونه کنترل مشهود است. هم‌چنین افزایش بیان پروتئین p21 پس از ۲۴ (در غلظت ۶۰ میکرومولار I3C) و ۴۸ ساعت (در غلظت‌های ۴۰ و ۶۰



نمودار ۳. آنالیز دانسیتومتري باندهای پروتئين p21 بعد از نرمال کردن در برابر بتا اکتين به عنوان کنترل داخلی. نتایج به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار نشان داده شده است و  $P < 0.05$  معنی دار در نظر گرفته شده است.

همان طور که در نمودار ۳ مشخص شده، افزایش بیان پروتئين p21 پس از ۴۸ ساعت مجاورت سلولها با I3C در غلظت‌ها ۴۰ و ۶۰ میکرومولار در غلظت ۶۰ میکرومولار پس از ۲۴ ساعت، نسبت به نمونه کنترل معنی دار بوده است.

**جدول ۳. داده های مربوط به بررسی دانسیتومتري پروتئين p21**

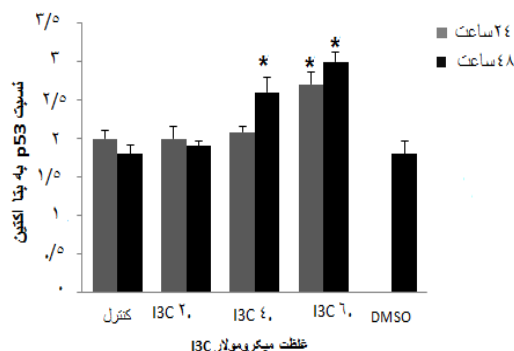
p21 / بتا اکتين (تیمار) ۴۸ ساعته	p21 / بتا اکتين (تیمار) ۲۴ ساعته	سلول های تیمار شده با غلظت های مختلف I3C (میکرومولار) و DMSO
میانگین $\pm$ انحراف معیار	میانگین $\pm$ انحراف معیار	
۰/۶۵ $\pm$ ۰/۱	۱/۰۵ $\pm$ ۰/۱	کنترل
۰/۶۸ $\pm$ ۰/۰۸	۱/۰۷ $\pm$ ۰/۱	I3C 20
۱/۸ $\pm$ ۰/۱۴	۱/۰۹ $\pm$ ۰/۰۸	I3C 40
۲ $\pm$ ۰/۱۲	۱/۲۵ $\pm$ ۰/۱۶	I3C 60
۰/۶۲ $\pm$ ۰/۱۲	DMSO (۰/۰۶ درصد)	

مقادیر به دست آمده از ۳ مرتبه آزمون ایمونوبلاستینگ بررسی بیان پروتئين p21 پس از تیمار سلولها در غلظت های ۲۰، ۴۰ و ۶۰ میکرومولار I3C که به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار نشان داده شده است (جدول ۳).

**القا کاهش بیان پروتئين c-Myc در سلول های NALM-6 در اثر مجاورت با I3C**

در ادامه برای بررسی دقیق تر مکانیسم مولکولی I3C در ایجاد وقفه در فاز G1 سیکل سلولی تغییرات

میکرومولار I3C) مشخص می باشد. تغییر در باند مربوط به پروتئين های مورد مطالعه در اثر DMSO ناچیز بوده است.



نمودار ۲. آنالیز دانسیتومتري باندهای پروتئين p53 بعد از نرمال کردن در برابر بتا اکتين به عنوان کنترل داخلی. نتایج به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار نشان داده شده است و  $p < 0.05$  معنی دار در نظر گرفته شده است

با توجه به نمودار ۲، افزایش بیان پروتئين p53 پس از ۴۸ ساعت مجاورت سلولها با I3C در غلظت های ۴۰ و ۶۰ میکرومولار در ۲۴ ساعت در غلظت ۶۰ میکرومولار نسبت به نمونه کنترل معنی دار بوده است.

**جدول ۲. مقادیر مربوط به بررسی دانسیتومتري باندهای p53**

سلول های تیمار شده با غلظت های مختلف I3C (میکرومولار) و DMSO	p53 / بتا اکتين (تیمار) ۲۴ ساعته	p53 / بتا اکتين (تیمار) ۴۸ ساعته
کنترل	۲ $\pm$ ۰/۱۱	۱/۸ $\pm$ ۰/۱۲
I3C 20	۲ $\pm$ ۰/۱۵	۱/۹ $\pm$ ۰/۰۷
I3C 40	۲/۰۸ $\pm$ ۰/۰۸	۲/۶ $\pm$ ۰/۰۲
I3C 60	۲/۷ $\pm$ ۰/۱۶	۳ $\pm$ ۰/۱۲
DMSO (۰/۰۶ درصد)	۱/۸ $\pm$ ۰/۱۵	

داده های مربوط به ۳ مرتبه آزمون ایمونوبلاستینگ برای بررسی بیان پروتئين p53 پس از تیمار سلولها در غلظت های ۲۰، ۴۰ و ۶۰ میکرومولار I3C که به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار نشان داده شده است (جدول ۲).

با توجه به نمودار ۴ کاهش بیان پروتئین c-Myc در غلظت ۶۰ میکرومولار I3C پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت مجاورت سلول‌های NALM-6 معنی‌دار بوده است.

جدول ۴. داده‌های مربوط به بررسی دانسیتومتری پروتئین-c-Myc

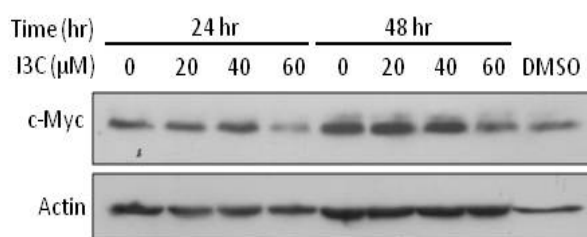
سلول‌های تیمار شده با غلظت‌های مختلف I3C (میکرومولار) و DMSO	c-Myc / بتا اکتین (تیمار ۲۴ ساعته) میانگین ± انحراف معیار	c-Myc / بتا اکتین (تیمار ۴۸ ساعته) میانگین ± انحراف معیار
کنترل	۰/۸۱ ± ۰/۰۹	۰/۸۸ ± ۰/۰۱
۲۰ I3C	۰/۷۹ ± ۰/۰۷	۰/۸۵ ± ۰/۰۶
۴۰ I3C	۰/۴۲ ± ۰/۰۱	۰/۵۵ ± ۰/۰۸
۶۰ I3C	۰/۸۲ ± ۰/۰۱۱	
DMSO (۰/۰۶ درصد)		

مقادیر به دست آمده از ۳ مرتبه آزمون ایمنوبلاتینگ جهت بررسی بیان پروتئین c-Myc پس از تیمار سلول‌ها در غلظت‌های ۲۰، ۴۰ و ۶۰ میکرومولار I3C که به صورت میانگین ± انحراف معیار نشان داده شده است (جدول ۴).

### بحث

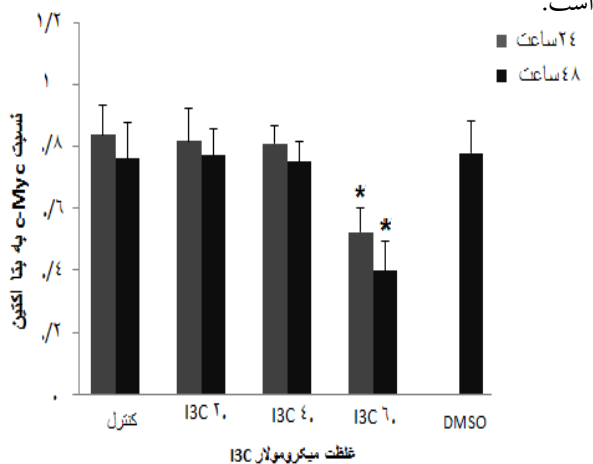
بررسی هیستوگرام سیکل سلولی در نمونه‌های تیمار شده با I3C در مطالعه حاضر (شکل ۱) نشان دهنده نقش این ترکیب در ایجاد وقفه در مرحله G1 چرخه سلولی در سلول‌های NALM-6 است. القا تجمع سلول‌ها در فاز G1 توسط I3C با بیشتر شدن غلظت این ترکیب مشخص‌تر می‌شود. افزایش سلول‌ها در فاز G1 در اثر مجاورت با I3C در مقایسه با نمونه کنترل در غلظت‌های عنوان شده معنی‌دار بوده است (نمودار ۱). در مطالعات مشابه اثر I3C در ایجاد توقف در فاز G1 سیکل سلولی در سلول‌های سرطان پستان شده است (۸، ۱۹). در مطالعه حاضر توقف در فاز G1 سیکل سلولی در سلول‌های لوسمی لنفوبلاستیک حاد پیش ساز لنفوسیت B، به عنوان شایع‌ترین بدخیمی در کودکان، توسط I3C نشان داده شد. به طور کلی I3C اثر ضد سرطانی خود را از طریق القای توقف در فاز G1 سیکل سلولی و

پروتئین c-Myc، به عنوان یک پروتئین کلیدی در پیشبرد فاز G1، نیز در سلول‌های لوسمی لنفوبلاستیک حاد پیش ساز لنفوسیت B مورد بررسی قرار گرفت. به این منظور سلول‌های NALM-6 با غلظت‌های ۲۰، ۴۰ و ۶۰ میکرومولار I3C به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت تیمار شدند. با توجه به نتایج به دست آمده، I3C به طور ویژه در غلظت ۶۰ میکرومولار در مقایسه با نمونه کنترل باعث کاهش بیان c-Myc شد (شکل ۳).



شکل ۳. نتایج یکی از ۳ مرتبه آزمون وسترن بلات برای بررسی اثر I3C در غلظت‌های مشخص بر بیان پروتئین c-Myc پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت مجاورت با سلول‌های NALM-6

همان گونه که در شکل ۳ مشاهده می‌شود، I3C در غلظت ۶۰ میکرومولار پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت مجاورت با سلول‌های NALM-6 باعث کاهش بیان c-Myc شده است.



نمودار ۴. آنالیز دانسیتومتری باندهای پروتئین c-Myc بعد از نرمال کردن در برابر بتا اکتین به عنوان کنترل داخلی. نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار نشان داده شده است و P < ۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شده است.



مختلف، مکانیسم‌های مولکولی دیگری را علاوه بر افزایش بیان p53 توسط این ترکیب مطرح می‌کند. یک گروه تحقیقاتی با بررسی اثر I3C بر روی سلول‌های سرطانی پروستات (PC-3) نشان دادند که I3C با افزایش بیان پروتئین‌های مهار چرخه سلولی مانند p21 و p27 و به دنبال آن مهار پروتئین‌های سایکلین D1 و E و کاهش فعالیت CDK6 باعث ایجاد توقف در مرحله G1 چرخه سلولی می‌شود. داده‌های این مطالعه نشان می‌دهد افزایش بیان پروتئین p21 در رده سلولی PC-3 که دارای پروتئین p53 جهش یافته هستند، به صورت غیر وابسته به p53 اتفاق می‌افتد. در این بررسی اتصال فاکتور رونویسی SP1 به پروموتور ژن p21 در اثر مجاورت سلول‌های PC-3 با I3C به عنوان عامل محرک تولید p21 مطرح شده است (۷). بنابراین I3C با القای بیان p21 و به دنبال آن مهار CDKها باعث توقف چرخه سلولی در مرحله G1 می‌شود. افزایش بیان پروتئین p53 به عنوان عامل مهم در کنترل p21 هدف I3C در سلول‌های سرطانی مختلف است اگرچه I3C قادر است با مکانیسم‌های مولکولی دیگری باعث افزایش بیان p21 شود. گرچه رده‌های سلولی مختلفی در مطالعات ذکر شده مورد استفاده قرار گرفته است اما تمامی نتایج نشان می‌دهند I3C با مهار پروتئین‌های لازم برای پیشروی چرخه سلولی و هم‌چنین با القا افزایش بیان پروتئین‌های مهار کننده چرخه سلولی از تکثیر سلول‌های سرطانی جلوگیری می‌کند و بنابر این I3C به عنوان یک ترکیب ضد سرطان محدود به رده سلولی خاص نیست. در مطالعه حاضر برای بررسی دقیق‌تر اثر I3C بر کنترل چرخه سلولی، تغییرات پروتئین c-Myc، به عنوان یک عامل کلیدی در پیشبرد چرخه سلولی، نیز مورد بررسی قرار گرفت. c-Myc از اتصال پروتئین مهاري p27 به کمپلکس CyclinE/CDK2 جلوگیری کرده و منجر به افزایش فعالیت کینازی CDK2 و پیشبرد چرخه سلولی می‌شود (۲۱). نتایج بررسی ایمونوبلاتینگ اثر I3C بر بیان پروتئین c-Myc (شکل ۳) در مطالعه حاضر بیان‌گر کاهش معنی‌دار بیان این پروتئین در اثر مجاورت سلول‌ها با I3C در غلظت ۶۰ میکرومولار (نمودار ۴)

افزایش آپوپتوز در سلول‌های سرطانی اعمال می‌کند. در واقع این ترکیب با دخالت در مکانیسم‌های مولکولی مختلف و تغییر در بیان ژن‌های متنوع درگیر در فرایندهای داخل سلولی می‌تواند از رشد و تکثیر سلول‌های سرطانی جلوگیری کند (۱۱). پروتئین p53 به عنوان یک عامل مهم در تنظیم پیشروی چرخه سلولی شناخته شده است. پروتئین p21 به عنوان مهارکننده کینازهای وابسته به سایکلین شناخته می‌شود و یک هدف پایین دست پروتئین p53 است (۱۲، ۱۳). بررسی نتایج وسترن بلات (شکل ۲) در مطالعه حاضر نشان می‌دهد که I3C باعث افزایش بیان پروتئین‌های p21 و p53 در سلول‌های NALM-6 شده و هم‌چنین تاثیر DMSO بر بیان این دو پروتئین ناچیز بوده است. همان‌طور که در نمودار ۲ و ۳ مشخص است افزایش بیان در پروتئین‌های p21 و p53 در غلظت‌های مشخص شده معنی‌دار بوده است. این بخش از داده‌ها مطابق با نتایج به دست آمده از مطالعه‌ای است که با بررسی اثر I3C بر سلول‌های سرطان پستان (MCF10A) نشان داد این ترکیب باعث القا بیان پروتئین p53 و به دنبال آن افزایش تولید پروتئین p21 به عنوان هدف پایین دستی p53 می‌شود. در این بررسی افزایش بیان p21 به عنوان مهار کننده CDK عامل القای توقف سیکل سلولی در مرحله G1 در سلول‌های MCF10A ذکر شده است (۸). عملکرد I3C از طریق افزایش بیان و هم‌چنین القای پایداری پروتئین سرکوبگر تومور p53 در سلول‌های سرطان پروستات نیز نشان داده شده است. نتیجه مطالعات سو و همکاران نشان داد مجاورت سلول‌های سرطان پروستات (LNCaP) با I3C باعث افزایش بیان پروتئین هسته‌ای p53 و هم‌چنین افزایش فسفریلاسیون و در نتیجه پایداری بیشتر آن می‌شود. سطح افزایش یافته p53 فعال با تحریک پروموتور ژن p21 باعث القای توقف سیکل سلولی در فاز G1 می‌شود به طوری که مهار تولید p53 با به کارگیری RNA کوچک مداخله کننده (siRNA) از توقف سیکل سلولی در اثر مجاورت سلول‌های LNCaP با I3C ممانعت می‌کند (۲۰). بررسی اثر مهاري I3C بر پیشروی چرخه سلولی در سلول‌های سرطانی

## منابع

1. Pui C-H, Robison LL, Look AT. Acute lymphoblastic leukaemia. *The Lancet*. 2008;371(9617):1030-43.
2. Pui C-H, Evans WE. Treatment of acute lymphoblastic leukemia. *New England Journal of Medicine*. 2006;354(2):166-78.
3. Mullighan CG, Su X, Zhang J, Radtke I, Phillips LA, Miller CB, et al. Deletion of IKZF1 and prognosis in acute lymphoblastic leukemia. *New England Journal of Medicine*. 2009;360(5):470-80.
4. Mokhberian, Mahjoubi F, Pourahmad R, Alivand M. Investigation of C1236T polymorphism in MDR1 gene in children with acute lymphoblastic leukemia. *Arak Medical University Journal*. 2013;16(79):76-83.
5. Shorey LE, Hagman AM, Williams DE, Ho E, Dashwood RH, Benninghoff AD. 3, 3'-Diindolylmethane induces G1 arrest and apoptosis in human acute T-cell lymphoblastic leukemia cells. *PloS one*. 2012;7(4):e34975-6.
6. Takada Y, Andreeff M, Aggarwal BB. Indole-3-carbinol suppresses NF- $\kappa$ B and I $\kappa$ B $\alpha$  kinase activation, causing inhibition of expression of NF- $\kappa$ B-regulated antiapoptotic and metastatic gene products and enhancement of apoptosis in myeloid and leukemia cells. *Blood*. 2005;106(2):641-9.
7. 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.
8. Brew CT, Aronchik I, Hsu JC, Sheen JH, Dickson RB, Bjeldanes LF, et al. Indole-3-carbinol activates the ATM signaling pathway independent of DNA damage to stabilize p53 and induce G1 arrest of human mammary epithelial cells. *International journal of cancer*. 2006;118(4):857-68.
9. Chung FL, Morse M, Ekland K, Xu Y. Inhibition of the Tobacco-Specific Nitrosamine-Induced Lung Tumorigenesis by Compounds Derived from Cruciferous Vegetables and Green Tea. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1993;686(1):186-201.
10. Kuang Y-F, Chen Y-H. Induction of apoptosis in a non-small cell human lung cancer

می‌باشد. در نتایج یک بررسی نشان داد شده به کارگیری siRNA با هدف قرار دادن c-Myc در سلول‌های تومور مغزی باعث توقف در مرحله G1 سیکل سلولی و مهار تکثیر سلول‌های بدخیم می‌شود (۲۲). با توجه به اثر I3C در کاهش بیان c-Myc در سلول‌های NALM-6 که در این مطالعه نشان داده شد می‌توان بیان کرد I3C علاوه بر القای بیان مهارکننده‌های سیکل سلولی مانند p53 و p21، با جلوگیری از بیان c-Myc باعث توقف سلول‌های لوسمی لنفوبلاستیک حاد پیش ساز لنفوسیت B در فاز G1 سیکل سلولی می‌شود. در این مطالعه نتایج حاصل از بررسی پروتئین‌ها با وسترن بلات تایید کننده نتایج فلوسایتومتری بوده و بیان کننده اثر I3C در القای توقف سیکل سلولی در سلول‌های لوسمی لنفوبلاستیک حاد پیش ساز لنفوسیت B است.

## نتیجه گیری

باتوجه به داده‌های به دست آمده از این مطالعه می‌توان بیان کرد I3C با کاهش بیان پروتئین c-Myc و افزایش بیان پروتئین‌های مهارتی p53 و p21 باعث ایجاد توقف در فاز G1 سیکل سلولی در سلول‌های لوسمی لنفوبلاستیک حاد پیش ساز سلول (NALM-6) می‌شود و از این طریق از تکثیر سلول‌های سرطانی جلوگیری می‌کند. بررسی اثر I3C بر نمونه‌های لوسمیک به دست آمده از بیماران جهت مقایسه با نتایج حاصل از این مطالعه کمک کننده خواهد بود. هم‌چنین نیاز به انجام تحقیقات تکمیلی برای بررسی دقیق‌تر مکانیسم مولکولی I3C احساس می‌شود.

## تقدیر و تشکر

این مقاله حاصل از نتایج طرح تحقیقاتی مصوب دانشگاه علوم پزشکی ایران به شماره ۱۶۰۶۰ می‌باشد. بدین وسیله از کارشناسان محترم مرکز تحقیقات سلولی و ملکولی دانشگاه علوم پزشکی ایران تشکر و قدردانی می‌شود.

cell line by isothiocyanates is associated with P53 and P21. Food and chemical toxicology. 2004;42(10):1711-8.

11. Souli E, Machluf M, Morgenstern A, Sabo E, Yannai S. Indole-3-carbinol (I3C) exhibits inhibitory and preventive effects on prostate tumors in mice. Food and chemical toxicology. 2008;46(3):863-70.

12. El-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, et al. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. Cell. 1993;75(4):817-25.

13. Bai L, Zhu W-G. p53: structure, function and therapeutic applications. J Cancer Mol. 2006;2(4):141-53.

14. Pérez-Roger I, Solomon D, Sewing A, Land H. Myc activation of cyclin E/Cdk2 kinase involves induction of cyclin E gene transcription and inhibition of p27 (Kip1) binding to newly formed complexes. Oncogene. 1997;14(20):2373-81.

15. Qi Y, Tu Y, Yang D, Chen Q, Xiao J, Chen Y, et al. Cyclin a but not cyclin D1 is essential for c-myc-modulated cell-cycle progression. Journal of cellular physiology. 2007;210(1):63-71.

16. Garcia HH, Brar GA, Nguyen DH, Bjeldanes LF, Firestone GL. Indole-3-carbinol (I3C) inhibits cyclin-dependent kinase-2 function in human breast cancer cells by regulating the size distribution, associated cyclin E forms, and subcellular localization of the CDK2 protein complex. Journal of Biological Chemistry. 2005;280(10):8756-64.

17. Howells LM, Neal CP, Brown MC, Berry DP, Manson MM. Indole-3-carbinol enhances

anti-proliferative, but not anti-invasive effects of oxaliplatin in colorectal cancer cell lines. Biochemical pharmacology. 2008;75(9):1774-82.

18. Sarkar FH, Li Y. Indole-3-carbinol and prostate cancer. The Journal of nutrition. 2004;134(12):3493S-8S.

19. Marconett CN, Sundar SN, Tseng M, Tin AS, Tran KQ, Mahuron KM, et al. Indole-3-carbinol downregulation of telomerase gene expression requires the inhibition of estrogen receptor-alpha and Sp1 transcription factor interactions within the hTERT promoter and mediates the G1 cell cycle arrest of human breast cancer cells. Carcinogenesis. 2011;32(9):1315-23.

20. Hsu JC, Dev A, Wing A, Brew CT, Bjeldanes LF, Firestone GL. Indole-3-carbinol mediated cell cycle arrest of LNCaP human prostate cancer cells requires the induced production of activated p53 tumor suppressor protein. Biochemical pharmacology. 2006; 72(12): 1714-23.

21. Miller DM, Thomas SD, Islam A, Muench D, Sedoris K. c-Myc and cancer metabolism. Clinical Cancer Research. 2012; 18(20):5546-53.

22. Von Bueren AO, Shalaby T, Oehler-Jänne C, Arnold L, Stearns D, Eberhart CG, et al. RNA interference-mediated c-MYC inhibition prevents cell growth and decreases sensitivity to radio-and chemotherapy in childhood medulloblastoma cells. BMC cancer. 2009; 9(1):10-11.