

Indole-3-carbinol enhances doxorubicin-induced apoptosis through suppression of NF- κ B in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia cell line NALM-6

Tavasoli B¹, Manafi R², Kiani F², Safa M^{3*}, Kazemi A⁴

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

2. M. Sc in Hematology & Blood Banking, School of Allied Medicine, 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: 3 Aug 2014, Accepted: 12 Nov 2014

Abstract

Background: Doxorubicin is a chemotherapeutic agent still in widespread use in hematologic malignancies. A side effect of anthracyclines such as doxorubicin is the activation of nuclear factor- κ B (NF- κ B), a potent inducer of antiapoptotic genes, which may blunt the therapeutic efficacy of the drugs. In this study, the effect of indole -3-carbinol (I3C) on the activation NF- κ B and the anti-apoptotic genes whose expression is regulated by NF- κ B was assessed in NALM-6 cells

Materials and Methods: NALM-6 cells were preincubated with various concentrations of I3C and then treated with doxorubicin. Cellular DNA content assay and Annexin V-FITC staining were performed by flowcytometry for evaluation of apoptosis. For assessing the effect of I3C on the expression of XIAP, survivin, and nuclear p65 proteins, NALM-6 cells were pretreated with I3C and then incubated with doxorubicin. Whole-cell and nuclear extracts were prepared for Western blot analysis. A paired t - test was conducted to evaluate the results

Results: DNA histogram analysis of NALM-6 cells indicates a combination of I3C with doxorubicin significantly escalated the percentages of sub-G1 population cells compared with doxorubicin -only treated group (P 0.05). Annexin V-FITC staining also showed that cotreatment of NALM-6 cells with I3C and doxorubicin significantly increased the proportion of Annexin-V positive cells in comparison with the doxorubicin treated cells (P 0.05). The western blot analysis indicated I3C significantly inhibits both doxorubicin -induced nuclear translocation of p65 and the expression of doxorubicin-induced NF- κ B target

Conclusion: Our results indicated that using natural non-toxic inhibitors of NF- κ B such as I3C in combination with anthracyclines might be a rational combination therapy for BCP-ALL cells in which NF- κ B is constitutively active.

Keywords: Doxorubicin, I3C, NF- κ B, Pre-B acute Lymphoblastic Leukemia

*Corresponding Author:

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

Email: safam@iums.ac.ir

افزایش القاء آپوپتوز ناشی از دوکسوروبیسین توسط ایندول تری کرینول با مهار مسیر پیام دهی فاکتور هسته‌ای کاپا-B در رده سلولی لوسمی لنفوبلاستیک حاد پیش ساز سلول B (NALM-6)

بهناز توسلی^۱، ریما منافی^۲، فاطمه کیانی^۲، مجید صفا^{۳*}، احمد کاظمی^۴

- ۱- کارشناس ارشد هماتولوژی و بانک خون، گروه هماتولوژی و بانک خون، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران
- ۲- کارشناس ارشد هماتولوژی و بانک خون، گروه هماتولوژی و بانک خون، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
- ۳- استادیار، 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: ۹۳/۵/۱۲ تاریخ پذیرش: ۹۳/۸/۲۱

چکیده

زمینه و هدف: دوکسوروبیسین از خانواده آنتراسایکلین‌ها به طور گسترده برای درمان بدخیمی‌های خونی استفاده می‌شود. یکی از اثرات جانبی این داروها، فعال شدن مسیر پیام دهی فاکتور هسته‌ای کاپا-B (NF-κB) می‌باشد. NF-κB با افزایش بیان ژن‌های بقاء سلولی باعث کاهش پاسخ مورد انتظار می‌شود. در این مطالعه اثر ایندول تری کرینول به عنوان مهار کننده NF-κB بر تنظیم این فاکتور هسته‌ای و بیان ژن‌های هدف آن XIAP و Survivin در سلول‌های لوسمی لنفوبلاستیک حاد پیش ساز سلول B (BCP- ALL) بررسی شده است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی سلول‌های NALM-6 با غلظت‌های مختلف ایندول تری کرینول تیمار و سپس با دوکسوروبیسین ۱۲۵ نانو مولار مجاور شدند. میزان آپوپتوز با رنگ آمیزی پروپیدیوم دید و انکسین-V به کمک تکنیک فلوسیتومتری تعیین شد. تغییرات در پروتئین‌های p65، XIAP و Survivin در سلول‌های مجاور شده با ایندول تری کرینول و دوکسوروبیسین به کمک وسترن بلات مطالعه و بررسی داده‌ها با آزمون تی زوجی انجام شد.

یافته‌ها: ایندول تری کرینول باعث افزایش معنی‌دار ($p < 0.05$) آپوپتوز در سلول‌های NALM-6 تحت تیمار با دوکسوروبیسین و ایندول تری کرینول در مقایسه با سلول‌هایی که تنها با دوکسوروبیسین مجاور شده بودند، می‌شود. همچنین اثر مهارتی ایندول تری کرینول بر تجمع هسته‌ای p65 و جلوگیری از افزایش بیان XIAP و Survivin القاء شده با دوکسوروبیسین به صورت معنی‌دار ($p < 0.05$) مشهود می‌باشد.

نتیجه‌گیری: ایندول تری کرینول به عنوان یک ترکیب طبیعی می‌تواند باعث افزایش اثربخشی داروهای خانواده آنتراسایکلین از طریق مهار مسیر NF-κB شود. این درمان ترکیبی می‌تواند در بهبود BCP- ALL با مسیر فعال NF-κB مفید واقع شود.

واژگان کلیدی: ایندول تری کرینول، دوکسوروبیسین، لوسمی لنفوبلاستیک حاد، NF-κB

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

Email: safa.m@iums.ac.ir

مقدمه

فاکتور هسته‌ای کاپا-B (NF-κB) فعال کننده عمده پاسخ‌های ایمنی و التهابی است. این فاکتور رونویسی در پستانداران دارای پنج عضو می‌باشد که مهم‌ترین آنها p65 یا RelA می‌باشد. هتروداایمرهای متشکل از p65/RelA و p50 در اکثر سلول‌ها وجود داشته و جهت القاء رونویسی ژن‌های هدف عمل می‌کنند (۱، ۲). در اغلب سلول‌ها NF-κB به طور عمده در سیتوپلاسم توسط پروتئین مهار کننده فاکتور هسته‌ای کاپا (IκBα)، به صورت غیر فعال قرار دارد. هنگامی که یک محرک مانند انواع سایتوکاین‌های پیش التهابی از جمله فاکتور نکروز دهنده تومور (Tumor Necrosis Factor-TNF)، اینترلوکین یک (Interleukin1-IL-1) و یا دیگر محرک‌ها نظیر لیپوپلی ساکارید باکتری، سلول را تحت تاثیر قرار دهند یک کمپلکس آنزیمی به نام IKK مهار کننده را فسفریله می‌کند که در ادامه توسط پروتئازوم تجزیه می‌شود. حذف مهار کننده باعث رها شدن فاکتور هسته‌ای کاپا و جایگزینی آن در هسته می‌شود. NF-κB با تاثیر بر گروهی از ژن‌ها در رشد، بقا و القاء پاسخ‌های ایمنی سلول دخالت می‌کند (۳-۵). هم‌چنین این فاکتور رونویسی در سلول‌های سرطانی توسط انواع داروهای شیمی درمانی و رادیوتراپی فعال شده و در بسیاری از موارد این پاسخ سلولی باعث کاهش توانایی پروسه درمان در القاء مرگ سلول‌های سرطانی می‌شود (۱، ۶، ۷). یکی از رایج‌ترین گروه داروهای مورد استفاده که در مقیاس وسیع در انواع سرطان‌ها به ویژه بدخیمی‌های هماتولوژیک کاربرد دارد، خانواده داروهای آنتراسایکلین می‌باشد که در این میان دوکسوروبیسین به طور گسترده مورد استفاده قرار می‌گیرد. چندین مکانیسم برای اعمال خاصیت سایتوتوکسیک این دارو در نظر گرفته می‌شود که مهم‌ترین آنها آسیب به DNA می‌باشد. دوکسوروبیسین با پایداری اتصال کمپلکس آنزیم توپوایزومراز II به رشته‌های DNA از اتصال مجدد رشته‌های شکسته شده جلوگیری می‌کند. آسیب به DNA به عنوان یک محرک سلولی باعث فعال شدن پروتئین پیش آپوپتوزی p53 می‌شود (۲، ۸، ۹). در

کنار فعال شدن آپوپتوز و القاء مرگ در سلول‌های سرطانی، کمپلکس IKK باعث تجزیه مهار کننده NF-κB و انتقال این فاکتور رونویسی به هسته می‌شود. F-κB پس از فعال شدن به سکانس‌های مشخصی از DNA در ژن‌های هدف متصل می‌شود و رونویسی بیش از ۴۰۰ ژن دخیل در تنظیم ایمنی، رشد، التهاب، سرطان‌زایی و آپوپتوز را تنظیم می‌کند (۱۲-۱۰). همان‌طور که پیش از این نیز اشاره شد، القاء بیان پروتئین‌های مهار کننده آپوپتوز به دنبال فعال شدن فاکتور هسته‌ای کاپا-B در نتیجه تاثیر ترکیبات شیمی درمانی و رادیوتراپی باعث کاهش نتایج درمان و به بیان دیگر القاء مقاومت به این داروها می‌شود. از آنجایی که هدف اصلی شیمی درمانی مرگ سلولی در سلول‌های بدخیم است، گمان می‌رود مهار مسیر پیام دهی فاکتور هسته‌ای کاپا-B بتواند باعث بهبود نتایج شیمی درمانی شود. مهار کننده‌های شیمیایی متعددی جهت جلوگیری از فعال شدن مسیر NF-κB با تأثیر مستقیم بر کمپلکس آنزیمی IKK و یا دخالت در عملکرد پروتئازوم به صورت کلینیکی و آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفته و منجر به القاء آپوپتوز و جلوگیری از رشد سلول‌های سرطانی شده‌اند. اما پیش از آن که این ترکیبات مورد استفاده بالینی قرار گیرند مطالعات بیشتری جهت بررسی مکانیسم دقیق عملکرد و هم‌چنین ارزیابی توکسیسته مرتبط با آنها نیاز است (۱۳، ۱۴). نتایج مطالعات متعدد در مورد اثر ایندول تری کرینول (Indole-3-Carbinol-I3C) به عنوان یک مکمل غذایی که در سبزیجات جنس براسیکا مانند کلم وجود دارد بر مسیر پیام دهی NF-κB، نشان دهنده مهار NF-κB توسط I3C و القاء آپوپتوز در سلول‌های سرطانی می‌باشد. خاصیت ضد سرطانی این ترکیب در بررسی‌های انسانی و حیوانی به خوبی ثابت شده است (۱۵، ۱۶). لوسمی لنفوبلاستیک حاد پیش ساز سلول B شایع‌ترین بدخیمی در کودکان است. با توجه به روش‌های شیمی درمانی کنونی حدود ۸۰ درصد این بیماران درمان می‌شوند اما در صدی از این بیماران از عوارض شیمی درمانی به مدت طولانی رنج می‌برند و در گروهی نیز بیماری دوباره عود می‌کند. لذا استفاده از

بافر فسفات-سالین (PBS) شستشو داده شدند. در ادامه برای تثبیت به سلول‌ها ۲ میلی‌لیتر اتانول ۷۰ درصد سرد اضافه شد سپس سلول‌ها به مدت یک شب (overnight) در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد 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 RNase A (سیگما-آمریکا) و ۵۰ میکرولیتر پروپیدیوم ایداید (۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) 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 (۱۹).

برای بررسی دقیق‌تر 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 دوکسوروبیسین 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 ضافه شد و سلول‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در تاریکی در دمای اتاق انکوبه شدند. بررسی سلول‌ها با استفاده از دستگاه فلوسیتومتر (BD FACSCalibur - آمریکا) با طول موج تحریک ۴۸۸ نانومتر و طول موج بازتابش ۵۱۸ نانومتر (FL-1) برای تعیین فلورسین FITC یا Fluorescein انجام گرفت (۲۰).

بررسی اثر I3C بر تجمع هسته‌ای p65 در سلول‌های NALM-6 تیمار شده با دوکسوروبیسین: برای بررسی تغییر در تجمع هسته‌ای p65 از تکنیک وسترن بلات استفاده شد. به این منظور سلول‌ها به تعداد $10^6 \times 5$ و با

روش‌هایی که دوز داروی شیمی درمانی را کاهش دهد و سلول‌های بدخیم را به طور موثر تری دچار آپوپتوز کند یکی از اهداف سرطان درمانی است (۱۷، ۱۸). در این مطالعه مکانیسم اثر I3C در افزایش القاء آپوپتوز در همراهی با دوکسوروبیسین بر رده سلولی لوسمی لنفوبلاستیک حاد پیش ساز سلول B (NALM-6) مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی رده سلولی لوسمی لنفوبلاستیک حاد پیش ساز سلول B (NALM-6) از انیستیتو 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 (۱۰۰U/ml پنی سیلین و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر استرپتومایسین) (گیکو-آمریکا) در انکوباتور با رطوبت ۹۰ درصد، CO₂ ۵ درصد و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد 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 تاثیر I3C بر القاء آپوپتوز در سلول‌های NALM-6 تحت تیمار با دوکسوروبیسین: در هر یک از چاهک‌های پلیت‌های ۱۲ خانه‌ای (گرینر-آلمان) مقدار $10^5 \times 7$ سلول با حجم نهایی ۲ میلی لیتر کشت داده شد. سپس غلظت‌های ۲۰، ۴۰ و ۶۰ میکرومولار از I3C با سلول‌ها مجاور شد. پس از گذشت ۱ ساعت به سلول‌های ۳ چاهک که پیش از این با I3C تیمار شده بودند، داروی دوکسوروبیسین با غلظت ۱۲۵ نانو مولار اضافه شد. لازم به ذکر است برای بررسی اثر دوکسوروبیسین 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

(ترکیبات بیشتر ذکر شده است) اضافه شد و در ادامه نمونه‌ها بر روی یخ به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شدند و پس از آن به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و با دور ۱۳۰۰۰ سانتریفیوژ شدند. محلول رویی در هر دو بخش (پروتئین‌های هسته‌ای و تام سلولی) برداشت شده و غلظت پروتئین‌ها با روش برد فورد مورد ارزیابی قرار گرفت. مقادیر معادل از نمونه‌های پروتئینی با استفاده از ۱۰ درصد SDS-PAGE براساس روش Laemmli جداسازی شدند. انتقال باندهای جدا شده روی ژل به غشای نیتروسولونز (Amersham Hybond-ECL) با استفاده از دستگاه Mini Trans – Blot Bio-Rad انجام شد. پس از اطمینان از انتقال باندهای پروتئینی به وسیله رنگ آمیزی 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 (over night) در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد مجاور شد. آنتی بادی علیه اکتین (برای پروتئین تام سلولی) و لامین B1 (برای پروتئین‌های هسته‌ای) به عنوان loading control در نظر گرفته شدند. 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 (۲۱). 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 ایمنوبلاکینگ حاصل ۳ آزمایش جداگانه بوده و به صورت میانگین \pm استاندارد خطای میانگین نشان داده شده است. تفاوت بین گروه‌ها با استفاده از آزمون آماری تی زوجی

حجم نهایی ۵ میلی‌لیتر در فلاسک‌های فیلتردار ۲۵ سانتی متر مربع کشت داده شدند و با I3C ۶۰ میکرو مولار به مدت ۱ ساعت مجاور شدند. در ادامه گروهی از سلول‌ها با دوکسوروبیسین ۱۲۵ نانومولار به مدت ۴ مجاور شدند. هم‌چنین گروهی از سلول‌ها نیز تنها با دوکسوروبیسین تیمار شدند. پس از گذشت زمان مشخص به منظور جداسازی پروتئین‌های هسته‌ای سلول‌ها برداشت شده و با بافر فسفات-سالین سرد شستشو داده شدند. به سلول‌ها ۵۰ میکرو لیتر بافر هایپوتونیک (حاوی ۲۰ میلی مولار Tris-HCl (pH= ۷/۴)، ۱۰ میلی مولار NaCl و ۳ میلی مولار MgCl₂) اضافه شده و به مدت ۱۵ دقیقه روی یخ انکوبه شدند. پس از اضافه کردن دترجنت (۱۰ درصد NP40) و سانتریفیوژ (۳۰ ثانیه با شتاب ۱۴۰۰۰ g و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد) به رسوبات سلول‌ها مقدار مساوی از بافر لیز کننده سلولی (حاوی NP-40 ۱ درصد، SDS ۰/۵ درصد، Tris-HCl (pH=۷/۴) ۱۰ میلی مولار، NaCl ۱۵۰ میلی مولار، EDTA ۵ میلی مولار، سدیم داکسی کولات ۰/۵ درصد، PMSF ۱۰۰ میکرومولار) به همراه مهارکننده پروتئازو فسفاتاز (سیگما - آمریکا) اضافه شد و در ادامه نمونه‌ها بر روی یخ به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شدند در نهایت به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و با دور ۱۳۰۰۰ سانتریفیوژ شدند.

بررسی اثر I3C در بیان پروتئین‌های هدف-NF- κ B، XIAP و Survivin در سلول‌های NALM-6 مجاور شده با دوکسوروبیسین: برای بررسی تغییر در میزان بیان پروتئین‌ها نیز از تکنیک وسترن بلات استفاده شد به این منظور سلول‌ها به تعداد $10^6 \times 5$ و با حجم نهایی ۵ میلی‌لیتر در فلاسک‌های فیلتردار ۲۵ سانتی‌متر مربع کشت داده شدند و در ادامه با I3C در غلظت‌های ۶۰ میکرو مولار به مدت ۱ ساعت و سپس با دوکسوروبیسین ۱۲۵ نانومولار در مدت زمان‌های مختلف (۶، ۱۲، ۲۴) مجاور شدند. پس از گذشت زمان‌های مشخص سلول‌ها برداشت شده و با بافر فسفات-سالین سرد شستشو داده شدند. به منظور جداسازی پروتئین تام سلولی، به سلول‌ها مقدار مساوی از بافر لیز کننده سلولی

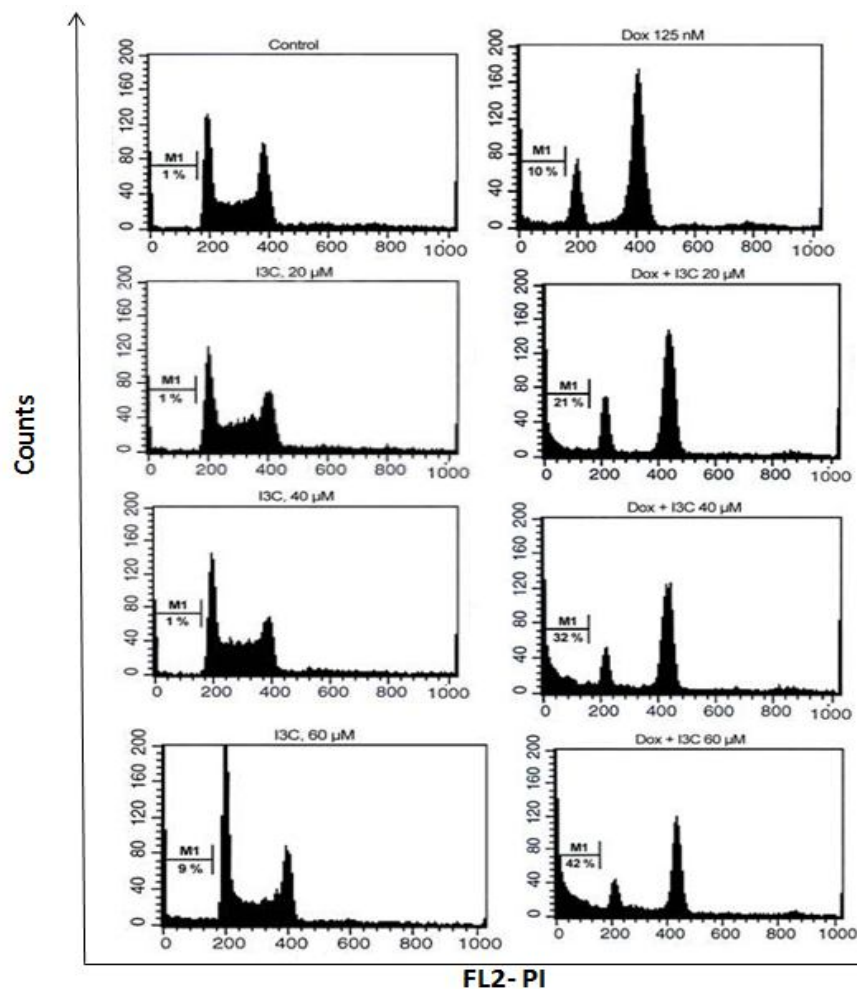
و سپس با غلظت ۱۲۵ نانومولار دوکسوروبیسین مجاور شدند. رنگ آمیزی هسته‌ای پروپیدیوم یدید (PI) به منظور بررسی جمعیت سلول‌های آپپتوتیک در ناحیه تحت G1 انجام شد و با فلوسایتومتری مورد مطالعه قرار گرفت. در هیستوگرام‌های سیکل سلولی (شکل ۱) درصد سلول‌های آپپتوتیک (ناحیه تحت G1) با نماد M1 مشخص شده است.

مورد مطالعه قرار گرفت و سطح معنی‌داری نیز کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

اثر سینرژیستی I3C بر القاء آپپتوز در سلول‌های NALM-6 تیمار شده با دوکسوروبیسین

برای ارزیابی تاثیر I3C در افزایش القاء آپپتوز در همراهی با دوکسوروبیسین، سلول‌های NALM-6 ابتدا با غلظت‌های مختلف (۲۰، ۴۰ و ۶۰ میکرومولار) I3C تیمار



شکل ۱. یک نمونه از هیستوگرام‌های سیکل سلولی حاصل از ۳ مرتبه آزمون فلوسایتومتری با رنگ آمیزی هسته‌ای پروپیدیوم یدید (PI). M1 نشان دهنده درصد سلول‌های آپپتوتیک است.

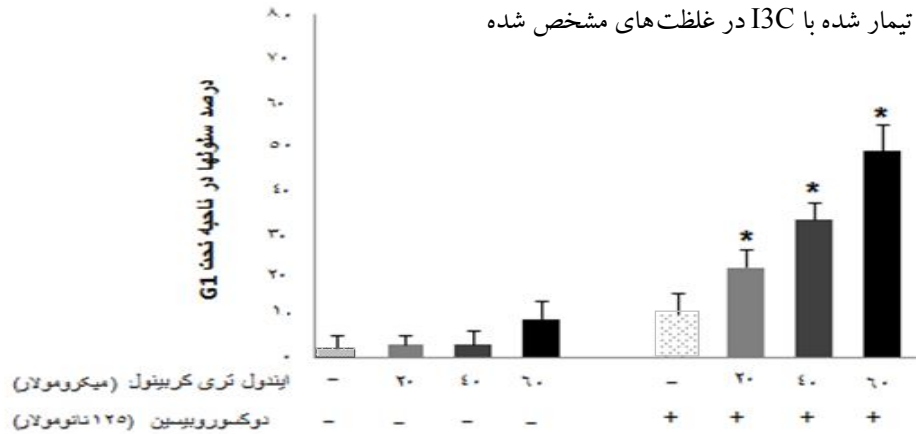
نانومولار در مقایسه با سلول‌هایی که تنها با دوکسوروبیسین ۱۲۵ نانومولار مجاور شده‌اند، افزایش یافته است. افزایش درصد سلول‌های آپپتوتیک در اثر مجاورت با I3C در

همان‌گونه که در شکل ۱ مشاهده می‌شود، جمعیت سلول‌های آپپتوتیک در هیستوگرام‌های مربوط به سلول‌های NALM-6 تیمار شده با I3C در غلظت‌های مختلف (۲۰، ۴۰ و ۶۰ میکرومولار) و دوکسوروبیسین ۱۲۵

به همراه دوکسوروبیسین در مقایسه با سلول‌های تیمار شده با دوکسوروبیسین به تنهایی معنی‌دار ($p < 0.05$) بوده است.

سلول‌های تحت تیمار با دوکسوروبیسین در تمامی غلظت‌ها معنی‌دار بوده ($p < 0.05$) است (نمودار ۱).

با توجه به نمودار و جدول ۱، درصد مرگ سلولی در سلول‌های تیمار شده با I3C در غلظت‌های مشخص شده



نمودار ۱. درصد مرگ سلولی با رنگ آمیزی هسته‌ای پروپیدیوم یدید (PI). نتایج به صورت میانگین \pm خطای استاندارد میانگین نشان داده شده است و $P < 0.05$ معنی‌دار در نظر گرفته شده است.

مجاورت با دوکسوروبیسین رنگ آمیزی AnnexinV - FITC انجام شد و میزان آپوپتوز مورد بررسی قرار گرفت. همان‌طور که در شکل ۲ نشان داده شده است در مقایسه با نمونه‌ای که تنها با دوکسوروبیسین مجاور شده تیمار سلول‌ها با I3C و دوکسوروبیسین باعث افزایش سلول‌های آپوپتوتیک (سلول‌های رنگ شده با انکسین) شده است (شکل ۲).

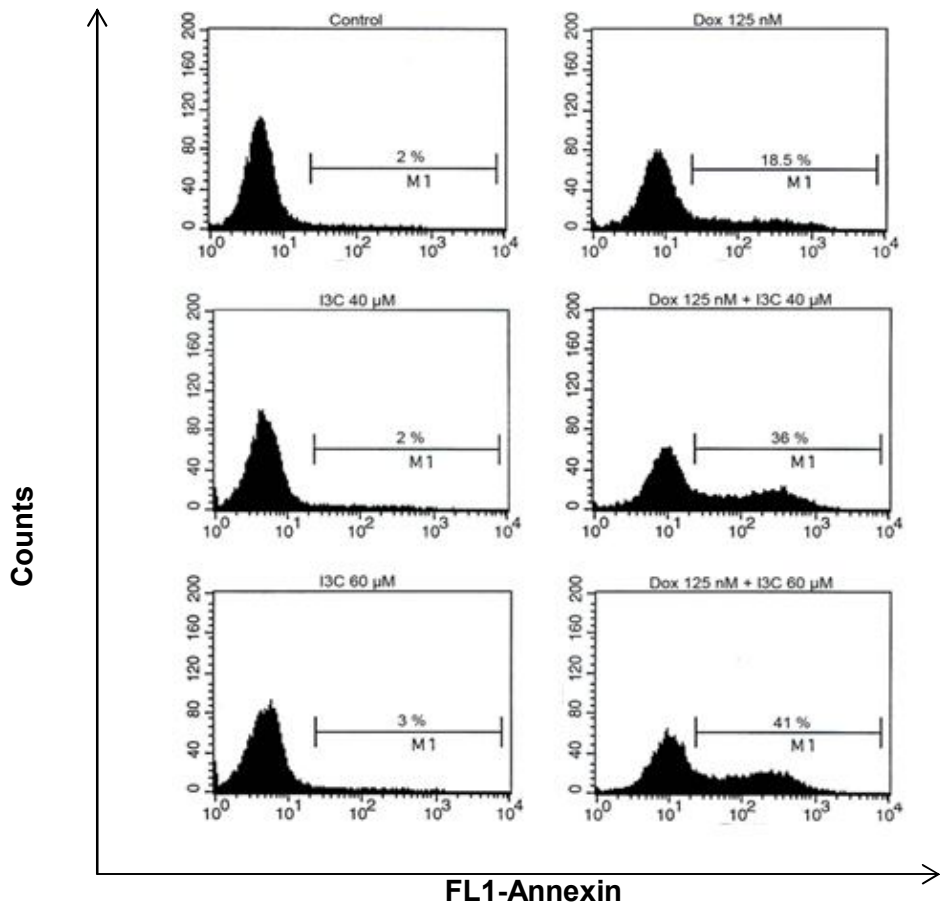
همان‌گونه که در شکل ۲ مشاهده می‌شود، درصد سلول‌های آپوپتوتیک در نمونه‌های تیمار شده با I3C در غلظت‌های ۴۰ و ۶۰ میکرومولار و دوکسوروبیسین ۱۲۵ نانومولار بیشتر از سلول‌هایی است که تنها با دوکسوروبیسین مجاور شده‌اند. افزایش درصد سلول‌های آپوپتوتیک در اثر مجاورت با I3C در مقایسه با دوکسوروبیسین به تنهایی معنی‌دار ($p < 0.05$) بوده است (نمودار ۲).

جدول ۱. درصد سلول‌ها در ناحیه تحت G1

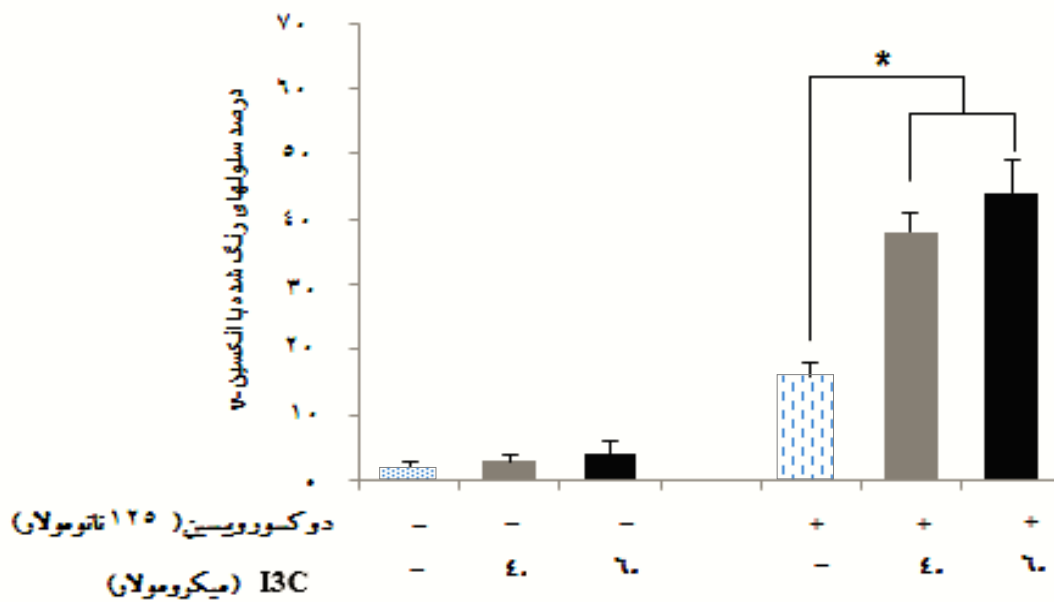
درصد سلول‌های آپوپتوتیک (ناحیه تحت G1)	سلول‌های تیمار شده با I3C (میکرومولار) و دوکسوروبیسین (۱۲۵ نانومولار)
میانگین \pm خطای استاندارد میانگین	میانگین \pm خطای استاندارد میانگین
۲ \pm ۳	کنترل
۱۰ \pm ۵	دوکسوروبیسین
۳ \pm ۲	I3C ۲۰
۲۱ \pm ۴	دوکسوروبیسین + I3C ۲۰
۳ \pm ۳	I3C ۴۰
۳۲ \pm ۴	دوکسوروبیسین + I3C ۴۰
۹ \pm ۴	I3C ۶۰
۴۸ \pm ۶	دوکسوروبیسین + I3C ۶۰

مقادیر مربوط به ۳ مرتبه آزمون فلوسایتومتري با رنگ آمیزی پروپیدیوم یدید پس از تیمار سلول‌ها در غلظت‌های ۲۰، ۴۰ و ۶۰ میکرومولار I3C به تنهایی و هم‌چنین در همراهی با دوکسوروبیسین ۱۲۵ نانومولار به منظور بررسی تاثیر I3C بر القاء آپوپتوز. مقادیر به صورت میانگین \pm خطای استاندارد میانگین نشان داده شده است.

در ادامه به منظور بررسی دقیق‌تر اثر I3C بر القاء آپوپتوز، پس از تیمار سلول‌ها با غلظت‌های مختلف I3C و



شکل ۲. نمونه ای از هیستوگرام میزان آپوپتوز با استفاده از رنگ آمیزی انکسین-V. درصد سلول‌های آپوپتوتیک با نماد M1 مشخص شده است.



نمودار ۲. درصد مرگ سلولی با رنگ آمیزی انکسین-V. نتایج به صورت میانگین ± خطای استاندارد میانگین نشان داده شده است و P < 0.05 معنی دار در نظر گرفته شده است.

مهارانتقال هسته‌ای p65 توسط I3C

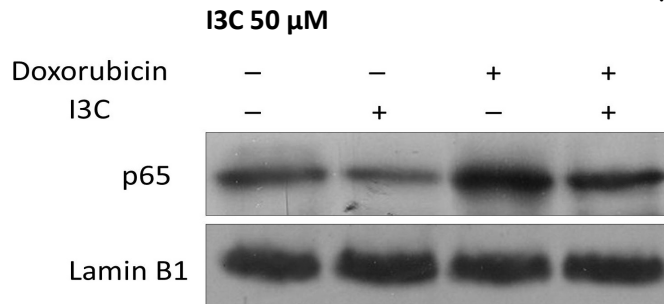
برای بررسی تأثیر I3C بر انتقال هسته‌ای p65 توسط تکنیک وسترن بلات، ابتدا سلول‌ها با I3C با غلظت ۶۰ میکرومولار به مدت ۱ ساعت تیمار شدند و سپس با دوکسوروبیسین ۱۲۵ نانومولار برای ۴ ساعت مجاور شدند. نتایج وسترن بلات با مقایسه باند p65 در نمونه کنترل نشان دهنده افزایش تجمع این پروتئین به عنوان بخشی از کمپلکس NF-κB در هسته به دنبال مجاورت سلول‌ها با دوکسوروبیسین و کاهش انتقال هسته‌ای آن در حضور I3C بود (شکل ۳). بررسی دانسیتومتری باندهای پروتئین p65 نشان داد کاهش تجمع هسته‌ای این پروتئین به دنبال مجاورت سلول‌ها با I3C در مقایسه با نمونه‌ای که با دوکسوروبیسین مجاور شده است معنی‌دار ($p < 0.05$) می‌باشد (نمودار ۳).

با توجه به نمودار و جدول 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 معنی‌دار ($p < 0.05$) بوده است.

جدول ۲. درصد سلول‌ها آپوپتوتیک (رنگ شده با انکسین-V)

درصد سلول‌های رنگ شده	دوکسوروبیسین ۱۲۵	درصد سلول‌های رنگ شده نانومولار و ایندول تری کریبنول (میکرومولار)	با انکسین-V میانگین ±خطای استاندارد میانگین
۲±۱	کنترل		
۳±۱	ایندول تری کریبنول ۴۰		
۴±۲	ایندول تری کریبنول ۶۰		
۱۶±۲	دوکسوروبیسین		
۳۸±۳	دوکسوروبیسین + ایندول تری کریبنول ۴۰		
۴۴±۵	دوکسوروبیسین + ایندول تری کریبنول ۶۰		

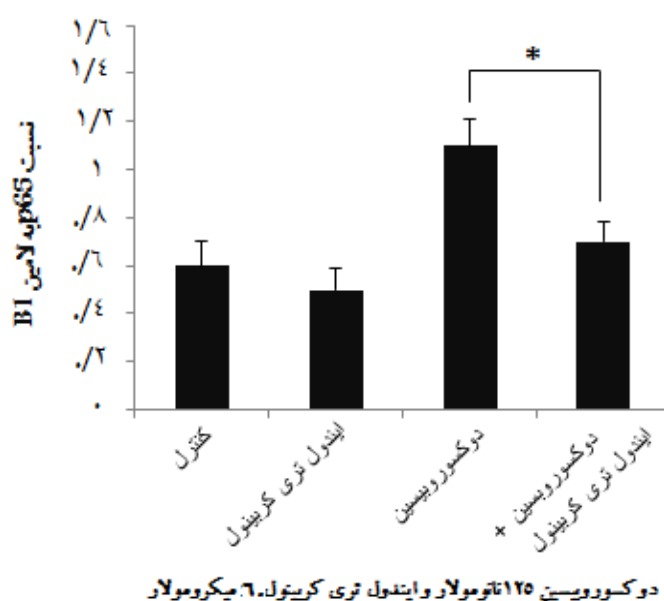
مقادیر مربوط به ۳ مرتبه آزمون فلوسایتومتری با رنگ آمیزی انکسین پس از تیمار سلول‌ها در غلظت‌های ۴۰ و ۶۰ میکرومولار I3C به تنهایی و همچنین در همراهی با دوکسوروبیسین ۱۲۵ نانومولار به منظور بررسی تأثیر I3C بر القاء آپوپتوز. مقادیر به صورت میانگین ±خطای استاندارد میانگین نشان داده شده است.



شکل ۳. باندهای پروتئین p65 در حضور و عدم حضور I3C در سلول‌های مجاور شده با دوکسوروبیسین

مقایسه با نمونه کنترل افزایش یافته است این در حالی است که I3C از تجمع القاء شده این پروتئین در اثر دوکسوروبیسین، جلوگیری کرده است.

با توجه به شکل ۳ که نتیجه یکی از ۳ مرتبه آزمایش ایمنو بلاستینگ است، تجمع پروتئین p65 در هسته به دنبال مجاورت سلول‌های NALM-6 با دوکسوروبیسین در



نمودار ۳. آنالیز دانسیتومتری باندهای پروتئین p65 بعد از نرمال کردن در برابر لامین B1 به عنوان کنترل داخلی. نتایج به صورت میانگین \pm خطای استاندارد میانگین نشان داده شده است و $P < 0.05$ معنی دار در نظر گرفته شده است.

کاهش بیان پروتئین‌های ضد آپوپتوز XIAP و Survivin توسط I3C

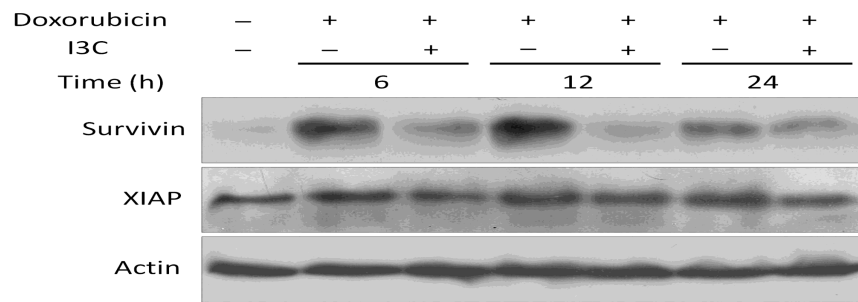
به منظور بررسی اثر I3C بر بیان پروتئین‌های ضد آپوپتوز XIAP و Survivin که هدف مسیر پیام دهی NF- κ B هستند، سلول‌ها با I3C ۶۰ میکرومولار به مدت ۱ ساعت و سپس با دوکسوروبیسین ۱۲۵ نانومولار در مدت زمان‌های مختلف (۶، ۱۲ و ۲۴) مجاور شدند. گروهی از سلول‌ها نیز تنها با غلظت مشابه دوکسوروبیسین تیمار شدند. در ادامه تغییرات این پروتئین‌ها به کمک تکنیک وسترن بلات بررسی و آنالیز دانسیتومتری باندهای مربوطه انجام شد. همان طور که در شکل ۴ مشخص است، دوکسوروبیسین باعث افزایش بیان XIAP و Survivin در سلول‌های NALM-6 می‌شود اما همراهی I3C با دوکسوروبیسین از بیان این پروتئین‌ها جلوگیری می‌کند.

با توجه به نمودار و جدول ۳، دوکسوروبیسین در مقایسه با نمونه کنترل باعث افزایش تجمع هسته‌ای p65 در سلول‌های NALM-6 شده است اما مجاورت سلول‌ها با I3C در سلول‌های تحت تیمار با دوکسوروبیسین کاهش معنی‌دار در تجمع هسته‌ای p65 را القاء نموده است.

جدول ۳. مقادیر مربوط به بررسی دانسیتومتری باندهای p65

سلول‌های تیمار شده با دوکسوروبیسین و ایندول تری کریبینول	نسبت p65 به لامین B1 میانگین \pm خطای استاندارد میانگین
کنترل	۰/۶ \pm ۰/۱
ایندول تری کریبینول	۰/۵ \pm ۰/۰۹
دوکسوروبیسین	۱/۱ \pm ۰/۱۱
دوکسوروبیسین و ایندول تری کریبینول	۰/۷ \pm ۰/۰۸

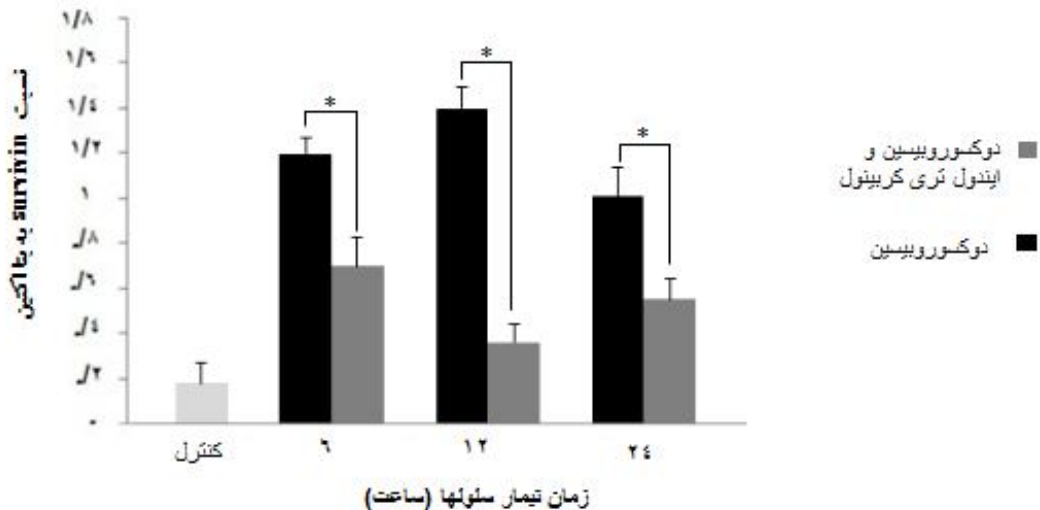
داده‌های مربوط به ۳ مرتبه آزمون ایمنوبلاتینگ به منظور بررسی تغییرات در تجمع هسته‌ای p65 در سلول‌های تحت تیمار با دوکسوروبیسین و I3C در مقایسه با گروهی که تنها با دوکسوروبیسین مجاور شده است. مقادیر مربوطه به صورت میانگین \pm خطای استاندارد میانگین نشان داده شده است.



شکل ۴. نتایج مربوط به یکی از ۳ مرتبه آزمون ایمنوبلاتینگ برای بررسی تغییرات در بیان پروتئین Survivin و XIAP در حضور و عدم حضور I3C در سلول‌های مجاور شده با دوکسوروبیسین

بیان XIAP به طور ویژه در زمان‌های ۶ و ۲۴ ساعت مشخص است.

با توجه به شکل ۴، I3C از افزایش بیان القاء شده Survivin توسط دوکسوروبیسین در زمان‌های مختلف جلوگیری کرده است. هم چنین اثر I3C در جلوگیری از



نمودار ۴. آنالیز دانسیتومتری باندهای پروتئین Survivin بعد از نرمال کردن در برابر بتا اکتین به عنوان کنترل داخلی نتایج به صورت میانگین \pm خطای استاندارد میانگین نشان داده شده است و $p < 0.05$ معنی‌دار در نظر گرفته شده است.

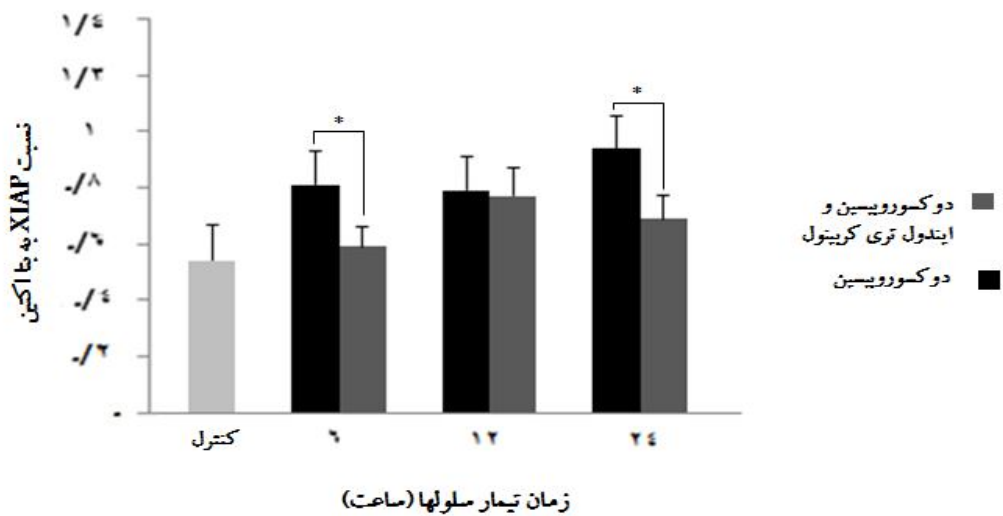
دوکسوروبیسین تیمار شده‌اند باعث کاهش معنی‌دار بیان پروتئین Survivin شده است.

با توجه به نمودار و جدول ۴ مجاورت سلول‌های NALM-6 تحت تیمار با دوکسوروبیسین با I3C در تمامی زمان‌های مشخص در مقایسه با سلول‌هایی که تنها با

جدول ۴. مقادیر مربوط به بررسی دانسیتومتری باندهای پروتئین Survivin

سلول‌های تیمار شده با دوکسوروبیسین و ایندول تری کریبول	Survivin / بتا اکتین (۶ ساعت تیمار) میانگین \pm خطای استاندارد میانگین	Survivin / بتا اکتین (۱۲ ساعت تیمار) میانگین \pm خطای استاندارد میانگین	Survivin / بتا اکتین (۲۴ ساعت تیمار) میانگین \pm خطای استاندارد میانگین
سلول‌های تیمار شده با دوکسوروبیسین	۰/۷۲ \pm ۰/۰۷	۰/۷۴ \pm ۰/۰۱	۰/۷۰ \pm ۰/۱۳
سلول‌های تیمار شده با دوکسوروبیسین و ایندول تری کریبول	۰/۷۰ \pm ۰/۰۹	۰/۳۶ \pm ۰/۱۳	۰/۵۵ \pm ۰/۰۸
کنترل	۰/۱۸ \pm ۰/۰۹		

مقادیر مربوط به ۳ مرتبه آزمون ایمنوبلاتینگ به منظور بررسی اثر I3C در بیان پروتئین Survivin در سلول‌های تیمار شده با دوکسوروبیسین در مقایسه با سلول‌های مجاور شده با دوکسوروبیسین به تنهایی. مقادیر مربوطه به صورت میانگین \pm خطای استاندارد میانگین نشان داده شده است.



نمودار ۵. آنالیز دانسیتومتری باندهای پروتئین XIAP بعد از نرمال کردن در برابر بتا اکتین به عنوان کنترل داخلی. نتایج به صورت میانگین \pm خطای استاندارد میانگین نشان داده شده است و $p < 0.05$ معنی دار در نظر گرفته شده است.

با توجه به نمودار و جدول ۵ نیز I3C باعث کاهش معنی دار بیان پروتئین XIAP شده با دوکسوروبیسین در زمان‌های ۶ و ۲۴ ساعت شده است.

جدول ۵. مقادیر مربوط به بررسی دانسیتومتری باندهای پروتئین XIAP

سلول‌های تیمار شده با دوکسوروبیسین و ایندول تری کریبول	XIAP / بتا اکتین (۶ ساعت تیمار) میانگین \pm خطای استاندارد میانگین	XIAP / بتا اکتین (۱۲ ساعت تیمار) میانگین \pm خطای استاندارد میانگین	XIAP / بتا اکتین (۲۴ ساعت تیمار) میانگین \pm خطای استاندارد میانگین
سلول‌های تیمار شده با دوکسوروبیسین	0.82 ± 0.01	0.78 ± 0.01	0.95 ± 0.01
سلول‌های تیمار شده با دوکسوروبیسین و ایندول تری کریبول	0.6 ± 0.07	0.78 ± 0.01	0.7 ± 0.08
کنترل	0.55 ± 0.01		

مقادیر ۳ مرتبه آزمون ایموبلایزینگ به منظور بررسی اثر I3C در بیان پروتئین XIAP در سلول‌های تحت تیمار با دوکسوروبیسین در مقایسه با سلول‌های مجاور شده با دوکسوروبیسین به تنهایی. مقادیر مربوطه به صورت میانگین \pm خطای استاندارد میانگین نشان داده شده است.

بحث

حساسیت سلول‌های سرطانی به داروهای رایج شیمی درمانی بود (۲۲). همان‌طور که پیش از این اشاره شد به دنبال مجاورت سلول‌ها با دوکسوروبیسین علاوه بر القاء آپوپتوز در سلول‌های بدخیم، هترو دایمرهایی متشکل از اعضای NF- κ B به هسته منتقل می‌شوند تا به عنوان یک فاکتور رونویسی عمل کنند. با توجه به شکل ۳ افزایش تجمع جزء p65 در اثر دوکسوروبیسین در مقایسه با نمونه کنترل نشان می‌دهد دوکسوروبیسین در سلول‌های NALM-6 فعال

در مطالعه حاضر بررسی فلوسایتومتری نشان می‌دهد I3C باعث افزایش معنی دار القاء آپوپتوز در سلول‌های تحت تیمار با دوکسوروبیسین شده است (نمودار ۱ و ۲). تاثیر I3C بر افزایش میزان آپوپتوز پیش از این در مطالعه هاردینگ و همکاران با بررسی اثر ترکیبی I3C و بورتزومب بر سلول‌های سرطان تخمدان نشان داده شده بود. نتایج این بررسی بیان کننده خاصیت I3C در افزایش

عنوان عضوی از خانواده پروتئین‌های مهار کننده آپوپتوز (IAP)، کلید تنظیمی میتوز و مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده است. این پروتئین با جلوگیری از فعال شدن کاسپاز ۳، ۷ و ۸ از بروز آپوپتوز در هر دو مسیر داخل و خارج سلولی جلوگیری می‌کند. بررسی سطح بیان این پروتئین یک فاکتور مهم پیش‌بینی کننده برای تعیین میزان پاسخ دهی به شیمی درمانی و رادیوتراپی در انواع گسترده‌ای از سرطان‌ها است به طوری که افزایش آن بیان‌گر کاهش میزان پاسخ دهی به درمان محسوب می‌شود (۲۵). در مطالعه حاضر بررسی اثر I3C بر بیان پروتئین Survivin در سلول‌های NALM-6 تیمار شده با دوکسوروبیسین نشان داد، داروی دوکسوروبیسین در مقایسه با نمونه کنترل باعث القاء بیان Survivin در این سلول‌ها می‌شود که می‌تواند نشان دهنده فعال شدن مسیر NF-κB در اثر دوکسوروبیسین باشد، اما تیمار سلول‌ها با I3C از بیان القاء شده Survivin توسط دوکسوروبیسین جلوگیری می‌کند (شکل ۴). بررسی دانسیتومتری باندهای پروتئین Survivin نشان دهنده معنی‌دار بودن کاهش بیان این پروتئین در اثر I3C در مقایسه با دوکسوروبیسین در زمان‌های مختلف تیمار می‌باشد (نمودار ۴). در مطالعه مشابه ناکامورا و همکاران به بررسی اثر ترکیبی I3C و جنیستین (genistein) به عنوان دو ترکیبات طبیعی بر لاین سلولی HT-29 (سلول‌های سرطان کولون انسانی) پرداخته‌اند، نتایج این بررسی نشان می‌دهد کاهش بیان پروتئین‌های ضد آپوپتوز Survivin و XIAP از عوامل القاء کننده آپوپتوز توسط I3C می‌باشد (۲۶). به طور کلی کاهش بیان پروتئین ضد آپوپتوز Survivin در انواع سلول‌های بدخیم با افزایش آپوپتوز همراه بوده است (۲۷). XIAP از دیگر پروتئین‌های هدف NF-κB می‌باشد که مانند سایر اعضای این گروه عملکرد خود را از طریق مهار آنزیم‌های محوری پروسه آپوپتوز یعنی کاسپازها و به طور ویژه کاسپازهای ۷، ۳ و هم‌چنین جلوگیری از فعالیت پروکاسپاز ۹ اعمال می‌کند. نتایج بررسی‌ها نشان می‌دهد که افزایش بیان این پروتئین باعث سرکوب القاء آپوپتوز با انواع داروهای شیمی درمانی

کننده مسیر NF-κB می‌باشد و در عین حال I3C در همراهی با دوکسوروبیسین از تجمع هسته‌ای p65 جلوگیری کرده است. آنالیز دانسیتومتری باندهای پروتئینی p65 نشان می‌دهد کاهش تجمع هسته‌ای این پروتئین در اثر I3C در مقایسه با سلول‌های مجاور شده با دوکسوروبیسین معنی‌دار ($p < 0.05$) بوده است (نمودار ۳). مطالعه مشابه با بررسی اثر I3C بر سلول‌های Jurkat نشان داد مجاورت این سلول‌ها با TNF باعث فعال شدن مسیر پیام دهی NF-κB و انتقال p65 به هسته می‌شود اما تیمار سلول‌ها با I3C با الگوی وابسته به زمان از انتقال آن جلوگیری می‌کند. هم‌چنین نتایج این پژوهش در مورد چگونگی عملکرد I3C در مهار مسیر پیام دهی NF-κB نشان می‌دهد این ترکیب از طریق جلوگیری از فعالیت کمپلکس IKK مانع تجزیه IκBα (مهار کننده NF-κB) و به دنبال آن انتقال جز p65 به هسته می‌شود (۲۳). در مطالعه دیگری هاوئز و همکاران با بررسی اثر I3C بر مهار مسیر پیام دهی NF-κB در رده سلولی سرطان سینه (MDA-MB468) نشان دادند I3C باعث کاهش اتصال p65 به DNA سلول‌های مورد مطالعه و مهار عملکرد NF-κB می‌شود که نتیجه آن القاء آپوپتوز در این سلول‌ها می‌باشد، این در حالی است که تأثیری بر فعالیت کمپلکس IKK ندارد (۲۴). با مقایسه نتایج این دو مطالعه می‌توان بیان کرد تفاوت در مکانیسم فعالیت NF-κB که به صورت ذاتی در سلول‌های MDA-MB468 فعال است با نحوه عملکرد آن پس از تحریک با عوامل خارج سلولی مثل TNF، علت متفاوت بودن مکانیسم مهار I3C بر مسیر پیام دهی NF-κB می‌باشد و بنابراین I3C را می‌توان به عنوان مهارکننده فعالیت NF-κB در انواع مختلف سلول‌های بدخیم در نظر گرفت گرچه ممکن است مکانیسم عملکرد آن متفاوت باشد. به دنبال فعال شدن مسیر NF-κB توسط محرک‌های مختلف و انتقال آن به هسته، این فاکتور رونویسی به نقاط مشخصی در پروموتور ژن‌های هدف متصل می‌شود و بیان آنها را تحت تأثیر قرار می‌دهد. از جمله مهم‌ترین پروتئین‌های هدف NF-κB می‌توان به XIAP و Survivin اشاره کرد. Survivin به

رایج شیمی درمانی به علت فعال شدن مسیر پیام دهی NF- κ B و کاهش پاسخ مورد انتظار، مهم ترین چالش پیش روی این پروسه درمانی محسوب می شود. با توجه به نتایج مطالعه انجام شده می توان عنوان کرد I3C به عنوان یک مکمل غذایی، با تقویت اثر دوکسوروبیسین به عنوان یک داروی رایج شیمی درمانی سبب افزایش القاء آپوپتوز در سلول های لوسمی لنفوبلاستیک حاد پیش ساز سلول B می شود. مطالعات بیشتر جهت بررسی دقیق مکانیسم این ترکیب و تعیین دوز مورد استفاده جهت کاربرد I3C در مطالعات بالینی برای بیماران دریافت کننده رژیم های شیمی درمانی خانواده آنتراسیکلین ها مورد نیاز است.

تشکر و قدردانی

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

منابع

1. Orłowski RZ, Baldwin AS Jr. NF-kappaB as a therapeutic target in cancer. *Trends Mol Med.* 2002; 8(8):385-9.
2. Janssens S, Tschopp J. Signals from within: the DNA-damage-induced NF- κ B response. *Cell Death & Differentiation.* 2006;13(5):773-84.
3. Hayden MS, Ghosh S. NF- κ B, the first quarter-century: remarkable progress and outstanding questions. *Genes & development.* 2012; 26(3):203-34.
4. Abbott DW, Yang Y, Hutt JE, Madhavarapu S, Kelliher MA, Cantley LC. Coordinated regulation of Toll-like receptor and NOD2 signaling by K63-linked polyubiquitin chains. *Molecular and cellular biology.* 2007; 27(17):6012-25.
5. Agou F, Ye F, Goffinont S, Courtois G, Yamaoka S, Israël A, et al. NEMO trimerizes through its coiled-coil C-terminal domain. *Journal of Biological Chemistry.* 2002; 277(20):17464-75.

و محرک های مرگ سلولی می شود (۲۸). با توجه به نتایج به دست آمده در این مطالعه (شکل ۴) I3C از بیان XIAP القاء شده به دنبال مجاورت سلول ها با دوکسوروبیسین، جلوگیری می کند. آنالیز دانسیتومتری نشان می دهد I3C به صورت معنی دار باعث کاهش بیان XIAP پس از ۶ و ۲۴ ساعت مجاورت با سلول های NALM-6 تحت تیمار با دوکسوروبیسین می شود (نمودار ۵). چگونگی مکانیسم مهارت I3C بر بیان Survivin و XIAP در سلول های NALM-6 با در نظر گرفتن عملکرد آن در جلوگیری از تجمع هسته ای p65 (شکل ۳) می تواند ناشی از اثر مهارت I3C بر مسیر پیام دهی NF- κ B و در نتیجه جلوگیری از بیان پروتئین های هدف ضد آپوپتوز آن باشد. همان گونه که در نمودار ۱ و ۲ نشان داده شده است، تفاوت معنی داری بین میزان آپوپتوز در سلول های مجاور شده با I3C و دوکسوروبیسین در مقایسه با نمونه ای که تنها با دوکسوروبیسین مجاور شده است وجود دارد. در مطالعه مشابهی نشان داده شد تحریک سلول های Jurkat به واسطه TNF باعث فعال شدن مسیر پیام دهی NF- κ B می گردد و تیمار کردن سلول ها با I3C منجر به کاهش بیان پروتئین های هدف NF- κ B دخیل در بقاء سلول مانند Bcl-2 می شود (۲۳). هم چنین داده های حاصل از بررسی اثر I3C در همراهی با لیگاند القاء کننده آپوپتوز وابسته به فاکتور نکروز دهنده تومور (TRAIL) به عنوان فعال کننده مسیر NF- κ B بر رده سلولی سرطان پروستات (LNCaP) نشان گر خاصیت I3C در افزایش القاء آپوپتوز در این سلول ها می باشد (۲۹). بنابر نتایج به دست آمده در این مطالعه، I3C می تواند از انتقال هسته ای القاء شده p65 توسط دوکسوروبیسین و به دنبال آن بیان پروتئین های هدف NF- κ B شامل Survivin و XIAP جلوگیری کند و در نتیجه باعث افزایش القاء آپوپتوز در سلول های لوسمی لنفوبلاستیک حاد پیش ساز لنفوسیت B تحت تیمار با دوکسوروبیسین شود.

نتیجه گیری

از آنجا که هدف اصلی شیمی درمانی القاء آپوپتوز در سلول های سرطانی می باشد، مقاومت به داروهای

6. Agou F, Traincard F, Vinolo E, Courtois G, Yamaoka S, Israël A, et al. The trimerization domain of NEMO is composed of the interacting C-terminal CC2 and LZ coiled-coil subdomains. *Journal of Biological Chemistry*. 2004; 279(27):27861-9.
7. Baldwin Jr AS. The NF- κ B and I κ B proteins: new discoveries and insights. *Annual review of immunology*. 1996;14(1):649-81.
8. Baldwin AS. Control of oncogenesis and cancer therapy resistance by the transcription factor NF- κ B. *Journal of Clinical Investigation*. 2001; 107(3):241-6.
9. Li N, Karn M. Is NF- κ B the sensor of oxidative stress? *The FASEB Journal*. 1999; 13(10):1137-43.
10. Lawrence T. The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2009; 1(6):a001651-2.
11. Bottero V, Busuttill V, Loubat A, Magné N, Fischel J-L, Milano G, et al. Activation of nuclear factor κ B through the IKK complex by the topoisomerase poisons SN38 and doxorubicin A brake to apoptosis in HeLa human carcinoma cells. *Cancer research*. 2001;61(21):7785-91.
12. Andela VB, Schwarz EM, Puzas JE, O'Keefe RJ, Rosier RN. Tumor metastasis and the reciprocal regulation of prometastatic and antimetastatic factors by nuclear factor κ B. *Cancer research*. 2000; 60(23):6557-62.
13. Huang S, Pettaway CA, Uehara H, Bucana CD, Fidler IJ. Blockade of NF-kappaB activity in human prostate cancer cells is associated with suppression of angiogenesis, invasion, and metastasis. *Oncogene*. 2001; 20(31):4188-97.
14. Gilmore TD, Garbati MR. Inhibition of NF- κ B signaling as a strategy in disease therapy. *NF- κ B in Health and Disease*: Springer; 2011. p. 245-63.
15. Ahmad A, Sakr WA, Rahman K. Role of nuclear factor-kappa B signaling in anticancer properties of indole compounds. *Journal of Experimental & Clinical Medicine*. 2011;3(2):55-62.
16. Ahmad A, A Sakr W, Wahidur Rahman K. Anticancer properties of indole compounds: mechanism of apoptosis induction and role in chemotherapy. *Current drug targets*. 2010; 11(6): 652-66.
17. Horibe K. Treatment strategy for childhood acute lymphoblastic leukemia. *Rinsho ketsueki*. 2012; 53:1538-48.
18. Eghbali A, Akhondzadeh A, Rafiee M, Dorre F. Evaluation of the role of alendronate in prevention of steroid-induced osteopenia in ALL and NHL in children. *AMUJ*. 2013; 16(73): 1-7.
19. Riccardi C, Nicoletti I. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nature protocols*. 2006; 1(3):1458-61.
20. Koopman G, Reutelingsperger C, Kuijten G, Keehnen R, Pals S, Van Oers M. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood*. 1994; 84(5):1415-20.
21. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1979; 76(9):4350-4.
22. Taylor-Harding B, Agadjanian H, Nassanian H, Kwon S, Guo X, Miller C, et al. Indole-3-carbinol synergistically sensitises ovarian cancer cells to bortezomib treatment. *British journal of cancer*. 2011; 106(2):333-43.
23. Takada Y, Andreeff M, Aggarwal BB. Indole-3-carbinol suppresses NF- κ B and I κ B α kinase activation, causing inhibition of expression of NF- κ B-regulated antiapoptotic and metastatic gene products and enhancement of apoptosis in myeloid and leukemia cells. *Blood*. 2005; 106(2):641-9.
24. Howells LM, Gallacher-Horley B, Houghton CE, Manson MM, Hudson EA. Indole-3-carbinol inhibits protein kinase B/Akt and induces apoptosis in the human breast tumor cell line MDA MB468 but not in the nontumorigenic HBL100 line. *Molecular cancer therapeutics*. 2002; 1: 1161-72.
25. Virrey JJ, Guan S, Li W, Schönthal AH, Chen TC, Hofman FM. Increased survivin expression confers chemoresistance to tumor-associated endothelial cells. *The American journal of pathology*. 2008;173(2):575-85.
26. Nakamura Y, Yogosawa S, Izutani Y, Watanabe H, Otsuji E, Sakai T. A combination of indol-3-carbinol and genistein synergistically

induces apoptosis in human colon cancer HT-29 cells by inhibiting Akt phosphorylation and progression of autophagy. *Mol Cancer*. 2009; 8(100): 1476-4598.

27. Mita AC, Mita MM, Nawrocki ST, Giles FJ. Survivin: key regulator of mitosis and apoptosis and novel target for cancer therapeutics. *Clinical Cancer Research*. 2008;14(16):5000-5.

28. Schimmer AD, Dalili S. Targeting the IAP family of caspase inhibitors as an emerging therapeutic strategy. *ASH Education Program Book*. 2005;2005(1):215-9.

29. Jeon K-I, Rih J-K, Kim HJ, Lee YJ, Cho C-H, Goldberg ID, et al. Pretreatment of indole-3-carbinol augments TRAIL-induced apoptosis in a prostate cancer cell line, LNCaP. *FEBS letters*. 2003; 544(1): 246-51.