

## اثر هسپرتین بر القای آپوپتوز و نکروز در لاین سلولی لنفوبلاستیک Jurkat Cells

معین شیرزاد<sup>۱</sup>، اسفندیار حیدریان<sup>۲</sup>، بتول پورقیصری<sup>۳</sup>، نعمت‌اله امینی سرشنیزی<sup>۴</sup>، زهرا سورانی<sup>۵</sup>، پژمان بشکار<sup>۶</sup>

### چکیده

#### سابقه و هدف

لوسمی لنفوبلاستیک حاد (ALL)، یک اختلال نئوپلاستیک و یک بدخیمی شایع در کودکان است. آپوپتوز، مرگ برنامه‌ریزی شده و فیزیولوژیک سلولی بوده که جهت هموستاز بافت‌ها ضروری می‌باشد. در برخی از سرطان‌ها، ناکارآمدی در این پروسه باعث پیشرفت سرطان می‌گردد. این پروسه می‌تواند توسط عوامل مختلف درمانی از جمله شیمی درمانی القا شود. هسپرتین یک فلاونوئید در آب میوه‌هایی هم چون پرتقال و میوه‌های درون سرخ بوده و بر اساس تحقیقات آپوپتوز را در سلول‌های پانکراس انسان تحریک می‌کند. هم چنین به عنوان فعال‌کننده NOTCH-1 و سرکوبگر تومور کارسینوئید می‌باشد.

#### مواد و روش‌ها

این مطالعه از نوع بنیادی - کاربردی بود. لاین سلولی مورد استفاده در این مطالعه، Jurkat cell (C121)، در محیط مکمل RPMI1640 با ۱۰٪ سرم جنینی گاو (FBS) و پنی سیلین / استرپتومایسین کشت داده شد. میزان رشد و بقای سلولی با غلظت‌های مختلف هسپرتین توسط کیت MTS بررسی گردید. میزان مرگ سلولی توسط رنگ آمیزی تریپان‌بلو و هم چنین توسط کیت آپوپتوزیس و با دستگاه فلوسایتمتری (Partec) مورد بررسی قرار گرفت.

#### یافته‌ها

رده سلول‌های لنفوبلاستیک (C121) در مواجهه با غلظت‌های مختلف هسپرتین (محلول شده در ۱٪ DMSO) تحت تاثیر قرار گرفته و غلظت ۲۰۰  $\mu\text{M}$  دارو در زمان ۴۸ ساعت به عنوان غلظت مهاري یا IC50 گزارش شد. نوع مرگ القایی توسط این دارو با استفاده از بررسی مورفولوژیک و نیز فلوسیتومتری به صورت آپوپتوز بوده است.

#### نتیجه‌گیری

با توجه به این که هسپرتین توانایی القای آپوپتوز را دارد و هم چنین باعث کاهش فعالیت سلولی می‌شود، به نظر می‌رسد داروی مناسبی برای مهار رشد سلول‌های توموری باشد.

**کلمات کلیدی:** لوسمی لنفوبلاستیک حاد، هسپرتین، Jurkat Cells، آپوپتوز

تاریخ دریافت: ۹۳/۵/۲۷

تاریخ پذیرش: ۹۳/۱۲/۹

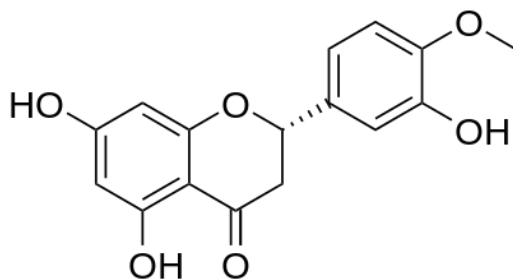
- ۱- دانشجوی کارشناسی ارشد بیوشیمی بالینی - دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد - شهرکرد - ایران
- ۲- PhD بیوشیمی - استاد مرکز تحقیقات سلولی مولکولی - دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد - شهرکرد - ایران
- ۳- PhD هماتولوژی - دانشیار دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد - شهرکرد - ایران
- ۴- دانشجوی کارشناسی ارشد زیست‌شناسی سلولی و مولکولی - دانشکده علوم دانشگاه محقق اردبیلی - اردبیل - ایران
- ۵- دانشجوی کارشناسی ارشد ایمنی‌شناسی - دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد - شهرکرد - ایران
- ۶- مؤلف مسؤول: دانشجوی PhD هماتولوژی - مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد - شهرکرد - ایران - صندوق پستی: ۱۱۵۷-۱۴۶۶۵

**مقدمه**

امروزه سرطان با بیش از ۱۰ میلیون مورد جدید و بیش از ۶ میلیون مرگ ناشی از آن هر ساله در سراسر جهان یکی از مهم‌ترین دلایل مرگ و میر محسوب می‌گردد. پیش‌بینی می‌شود که تا سال ۲۰۲۰، هر ساله ۱۵ میلیون مورد جدید و ۱۰ میلیون مرگ در اثر سرطان داشته باشیم. سرطان‌های خون یا لوسمی‌ها حدود ۸٪ از کل سرطان‌های جمعیت انسان را شامل می‌شوند و به عنوان پنجمین سرطان شایع جهان محسوب می‌گردند (۱). لوسمی لنفوبلاستیک حاد (ALL)، یک اختلال نئوپلاستیک لنفوسیتی می‌باشد (۲). این بیماری یک بدخیمی شایع در کودکان است (۳). به طوری که این بیماری به سرطان کودکان نیز معروف است. شیوع این بیماری در جنس مذکر بیشتر از جنس مؤنث است (۴). ALL اغلب با یک توده توموری همراه با پیشرفت سریع بیماری می‌باشد (۵). در حدود ۳۰٪ از موارد ALL در همان سال اول عود می‌کنند و سرانجام منجر به مرگ می‌گردد (۶). دو عامل ممکن است مقاومت سلول‌های لوسمی نابالغ را به داروهای شیمی درمانی متداول بیشتر کند. یکی این که گمان می‌رود که درصد بالایی از سلول‌های پیش‌ساز لوسمی، به صورت خاموش می‌باشند و این فاز خاموشی باعث کاهش حساسیت آن‌ها نسبت به داروهای اختصاصی سیکل سلولی می‌شود و دیگری، سلول‌های نابالغ خصوصیات سلول‌های بنیادی را با خود دارند که ممکن است باعث افزایش بیان ژن‌های انتقالی چند دارویی همانند MPR-1 یا P-gp شود (۷). این خاصیت منجر به پاکسازی سریع داروهای سایتوتوکسیک می‌گردد (۷).

اخیراً از جهت اثرات سایتوتوکسیک و نیز باز دارنده سرطان مورد توجه قرار گرفته‌اند (۹). آپوتوز یک مرگ برنامه‌ریزی شده می‌باشد که بدون ایجاد التهاب باعث هموستاز بافت‌ها می‌گردد. نقص در این برنامه می‌تواند باعث ایجاد سرطان و یا در برخی سرطان‌ها، باعث پیشرفت آن گردد.

یکی از اهداف درمان‌های ضد سرطان و دارویی، القای آپوتوز در سلول‌هاست (۱۰). گیاهان منبع بسیار مهمی از محصولات طبیعی و فعالی هستند که از نظر ساختاری و خواص بیولوژیکی، وسعت و تنوع بسیاری دارند. آن‌ها نقش قابل توجهی را در طب سنتی کشورهای مختلف ایفا می‌کنند. در سال‌های اخیر پیشگیری از سرطان و بیماری‌های قلبی و عروقی با خوردن میوه، سبزیجات و گیاهان غنی از آنتی‌اکسیدان‌های تازه و طبیعی همراه شده است (۱۱). هسپرتین (Hesperitin) یک فلاونوئید است که در آب میوه‌هایی هم چون پرتقال و میوه‌های درون سرخ یافت می‌گردد (شکل ۱).



شکل ۱: ساختار شیمیایی آنتی‌اکسیدان هسپرتین

تحقیقات نشان داده است که هسپرتین آپوتوز را در سلول‌های پانکراس انسان تحریک می‌کند، هم چنین به عنوان فعال‌کننده NOTCH-1 (افزایش دهنده تمایز سلول‌های اجدادی) و سرکوبگر تومورهای کارسینوئید می‌باشد (۱۲، ۱۳). آنتی‌اکسیدان‌ها توانایی بالایی در پاکسازی رادیکال‌های آزاد و هم چنین دارای فعالیت‌های ضد سرطانی هم چون ازدیاد سلولی، مهار رگ‌زایی، مهار پیام درون سلولی و تحریک آنزیم‌های درگیر در ترمیم DNA دارند (۱۴). هسپرتین فعالیت آنزیمی مرتبط با دفاع

علی‌رغم پیشرفت خوب و موفقیت در درمان، در تعدادی از کودکان بیماری عود کرده و نهایتاً باعث از پا درآمدن بیمار می‌شود (۸). داروهای سایتوتوکسیک مورد استفاده در درمان هر چند موفقیت‌های قابل توجهی در سیر پیشرفت درمان ایجاد کرده‌اند اما عوارض جانبی آن‌ها از قبیل عوارض قلبی، کلیوی، سرکوب خونسازی و سیستم ایمنی هم چنان از علل مهم مرگ و میر بیماران به حساب می‌آید. ترکیبات مشتق از گیاهان که همواره از منابع مهم دارویی در درمان بیماری‌های مختلف محسوب می‌شوند،

زنده با شمارش مستقیم سلول‌های زنده و مرده محاسبه می‌شود. درصد سلول‌های زنده برابر است با تعداد سلول‌های زنده به تعداد کل سلول‌ها (Hogberg j 1981)، Moldeus). در این روش پس از جدا کردن سلول‌ها، ۵۰ μL سوسپانسیون سلولی را با ۵۰ μL محلول تریپان بلو مخلوط نموده و توسط هموسیتمتر (لام نتوبار) مورد شمارش قرار گرفت.

#### تیمار سلول‌ها:

پس از شمارش سلولی، میزان ۱۰۰۰۰ سلول را در هر خانه از پلیت ۹۶ خانه قرار داریم. آنتی‌اکسیدان هسپرتین در ۱٪ DMSO حل گردید. پس از ۲۴ ساعت انکوبه شدن در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، ۵٪ CO<sub>2</sub> و رطوبت کافی، سلول‌ها را با غلظت‌های مختلف هسپرتین (۰ تا ۱۰۰۰ میکرومولار) مواجهه کرده و در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در انکوباتور قرار گرفتند.

#### آزمایش MTS (بررسی میزان زیستایی سلول‌ها):

بعد از گذشت زمان ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت از درمان، سلول‌ها با ۲۰ میکرولیتر محلول MTS به مدت ۳ ساعت انکوبه شدند. (3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-MTS)-2H - (4-sulphophenyl) - 2 - carboxymethoxyphenyl tetrazolium)، میزان حیات سلولی را بررسی می‌کند. معرف واکنشگر، ترکیبی از MTS و فنازین متوسولفات (PMS) جفت شده با الکترون می‌باشد.

حاصل این واکنش احیا (کاهشی)، تولید فومارازان است و این واکنش در سلول‌هایی که آنزیم‌های میتوکندریایی فعال دارند، اتفاق می‌افتد (سلول‌های زنده). پس از ۳ ساعت انکوبه شدن در تاریکی (محلول MTS به نور حساس می‌باشد) جذب نوری در طول موج ۴۹۰ تا ۶۳۰ نانومتر توسط الایزای ریدر (stat fax-2100 awarenes) خوانده شده است. میزان سلول‌های زنده در هر چاهک محاسبه شده و نسبت به گروه کنترل (تیمار نشده) بررسی گردید و غلظت IC<sub>50</sub> مشخص شد، که در این غلظت ۵۰٪ سلول‌ها زنده می‌باشند و این درصد بقای سلولی (Viability) است.

آنتی‌اکسیدانی سلول‌ها را افزایش می‌دهد و نیز فعالیت ضد سرطانی بالقوه‌ای مثل عامل ضد رگزایی در سلول‌های MES (Embryonic stem cells) را نشان می‌دهد (۱۵). وقتی که سلول‌های MCF-7 با هسپرتین برای ۴۸ تا ۷۲ ساعت درمان شده بودند، توقف سیکل سلولی در فاز G1 مشاهده شده بود (۱۶). هم چنین هسپرتین فلاونوئیدی از دسته کوئرستین‌ها (Quercetin) بوده که در تومورهای پوستی نقش پروموتور و القاکننده آپوپتوز را دارد (۱۷).

#### مواد و روش‌ها

این مطالعه از نوع بنیادی- کاربردی بود که بر روی رده سلول‌های لوسمی لنفوبلاستیک (Jurkat) انجام پذیرفت.

#### تهیه مواد:

محیط کشت RPMI1640، پنی‌سیلین، استرپتومایسین، دی‌متیل سولفوکساید (DMSO)، تریپان بلو و آنتی‌اکسیدان هسپرتین از شرکت سیگما تهیه شدند. سرم جنینی گاو (Fetal Bovine Serum) از شرکت گیبکو (آمریکا)، MTS از شرکت مرک و پلیت‌های ۹۶ و ۶ خانه و فلاسک‌های کشت از شرکت جت بایوفیول خریداری گردید. کیت رنگ‌آمیزی Annexin/PI از شرکت BD آمریکا خریداری شد.

#### کشت سلولی:

رده سلولی لنفوبلاستیک C121 یا jurkat cell از انستیتو پاستور ایران خریداری شد و در محیط RPMI1640 با FBS ۱۰٪ و PEN/STREP و در فلاسک T۲۵ و TV۵ کشت داده شدند. پس از کشت، سلول‌ها در انکوباتور CO<sub>2</sub> دار (۵٪) با رطوبت کافی (۹۸٪) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

#### شمارش سلولی:

برای شمارش سلول‌ها پس از رشد ۸۰ درصدی، سلول‌ها جمع‌آوری شده و با رنگ‌آمیزی توسط تریپان بلو (سیگما)، درصد سلول‌های زنده تعیین شدند. سلول‌های زنده نسبت به ورود رنگ نفوذناپذیر بوده و حال آن که سلول‌های مرده رنگ را جذب می‌نمایند. درصد سلول‌های

بررسی آپوپتوز:

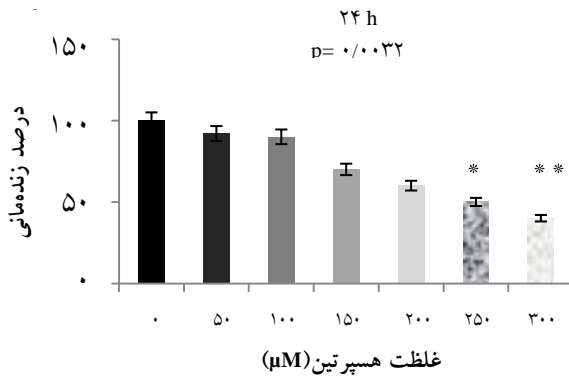
برای بررسی آپوپتوز، پس از شمارش، میزان ۲۰۰۰۰۰ سلول به هر چاهک از پلیت ۶ خانه منتقل شد. پس از ۲۴ ساعت در انکوباتور، سلول‌ها تحت درمان با غلظت‌های نزدیک به IC50 از آنتی‌اکسیدان هسپرتین قرار گرفته و مجدداً به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور نگهداری شدند. سپس سلول‌ها را جمع‌آوری کرده و با سانتیفریژ کردن محلول رویی را دور ریخته و رسوب را براساس کیت آپوپتوز (بیوساینس BD) با binding buffer به صورت سوسپانسیون درآوردیم. به میزان ۱۰۰۰۰۰ سلول را به دو لوله برده و به یکی FITC/PI افزوده و دیگری بدون FITC/PI به عنوان کنترل منفی به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی قرار داده شد. سپس توسط دستگاه فلوسیتومتری (Cyflow Partec Germany) مورد بررسی قرار گرفتند. با استفاده از رنگ Annexin/PI سلول‌ها از نظر وجود فسفاتیدیل سرین در سطح (آپوپتوز) و نفوذپذیری سلولی به رنگ PI (propidium Iodide) (نکروز) به کمک فلوسایتومتری بررسی شدند. اساس این روش بر این مبنا است که در طی آپوپتوز، فسفاتیدیل سرین از سطح داخلی به سطح خارجی غشای سلول منتقل می‌شود و آنکسین به فسفاتیدیل سرین در سطح خارجی متصل می‌گردد و توسط دستگاه تشخیص داده می‌شود. PI در طول موج ۴۸۸ نانومتر تهییج و در موج ۶۱۷ نانومتر، بازتابش دارد. FITC (Fluorescein Isothiocyanat) در طول موج ۴۸۸ نانومتر تهییج و در طول موج ۵۱۹ نانومتر بازتابش دارد. هر غلظت حداقل ۴ مرتبه تکرار گردید و نتایج به صورت Mean ± SD گزارش شد. داده‌ها با استفاده از آزمون آماری ANOVA یا آزمون Kruskal-Wallis و با کمک نرم‌افزار SPSS ۱۷ (آمریکا، ۵/۰۱، V. ۷) GraphPad Prism مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

یافته‌ها

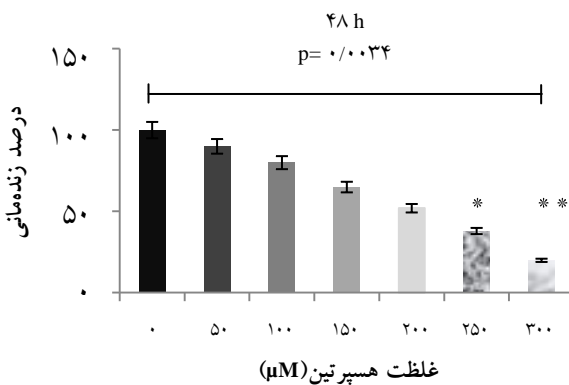
اثر آنتی‌اکسیدان هسپرتین بر فعالیت تکثیر رده سلولی لنفوبلاستیک JURKAT:

سلول‌های JURKAT در مجاورت غلظت‌های مختلف از آنتی‌اکسیدان هسپرتین قرار گرفتند. در بررسی MTS،

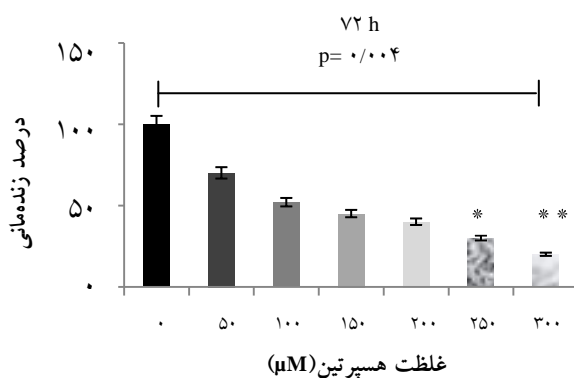
کریستال‌های زرد رنگ MTS توسط آنزیم سوکسینات دهیدروژناز (از آنزیم‌های چرخه تنفسی میتوکندری) احیا شده و موجب تشکیل کریستال‌های ارغوانی رنگ می‌شود.



نمودار ۱: اثر آنتی‌اکسیدان هسپرتین بر فعالیت تکثیر رده سلولی لنفوبلاستیک JURKAT بعد از ۲۴ ساعت (p = p value)



نمودار ۲: اثر آنتی‌اکسیدان هسپرتین بر فعالیت تکثیر رده سلولی لنفوبلاستیک JURKAT بعد از ۴۸ ساعت (p = p value)



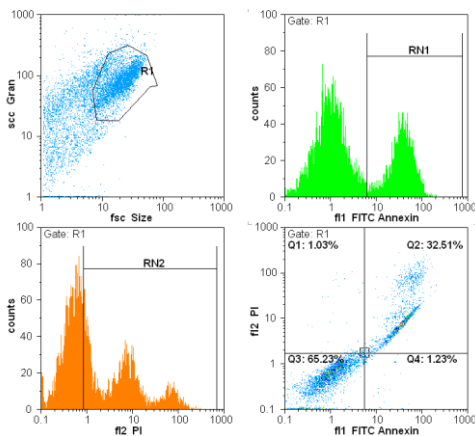
نمودار ۳: اثر آنتی‌اکسیدان هسپرتین بر فعالیت تکثیر رده سلولی لنفوبلاستیک JURKAT بعد از ۷۲ ساعت (p = p value)

۲۵۰ میکرومول، از بین رفته‌اند و یا به عبارت دیگر ۵۰٪ بقای سلولی داشته‌ایم (IC50). بدین معنی که در غلظت IC50، سلول نسبت به کنترل (غلظت صفر) ۵۰٪ سلول زنده دارد. هم چنین یک اثر سایتوتوکسیک وابسته به دوز و زمان نشان داده شده است (نمودارهای ۱-۳).

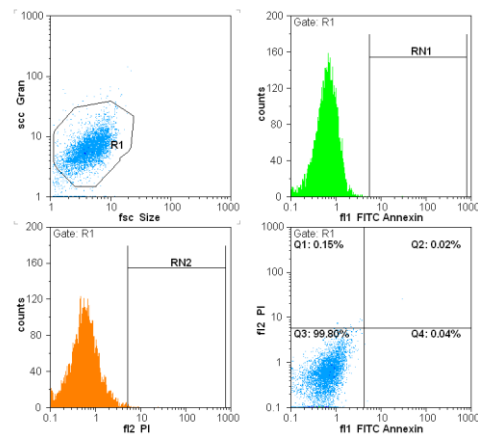
میزان رنگ تولید شده با تعداد سلول‌های زنده رابطه مستقیم دارد. در این مطالعه مشاهده شد که پس از درمان سلول‌های سرطانی با هسپریتین در غلظت‌های مختلف (۰-۱۰۰۰ μM) و ۲۴ و ۴۸ و ۷۲ ساعت به ترتیب در غلظت ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۸

جدول ۱: میانگین و انحراف معیار آزمایش MTT assay در ساعت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ (Mean ± SD)

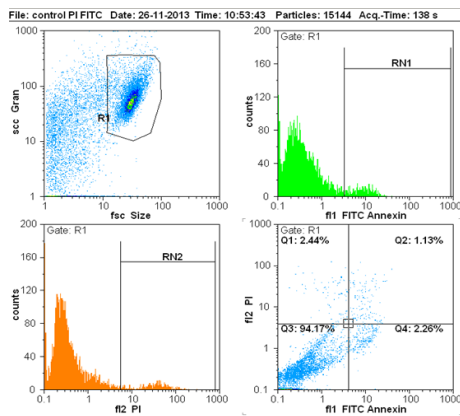
غلظت	۰	۵۰	۱۰۰	۱۵۰	۲۰۰	۲۵۰	۳۰۰
ساعت ۲۴	۱۰۰ ± ۰	۹۳ ± ۲	۸۷/۶۷ ± ۳/۰۵۵	۷۲ ± ۴	۶۰/۶۷ ± ۳/۵۱	۵۰ ± ۴/۵۸	۳۸/۶۷ ± ۵/۵
ساعت ۴۸	۱۰۰ ± ۰	۸۸/۳۳ ± ۵/۵	۷۴ ± ۶/۵۵	۶۱/۶۷ ± ۶/۰۲	۵۱/۶ ± ۶/۵	۳۴ ± ۶/۵	۲۰/۳۳ ± ۶/۱۱
ساعت ۷۲	۱۰۰ ± ۰	۷۴ ± ۶/۵	۵۳/۳۳ ± ۷/۵	۴۲/۶۷ ± ۶/۵	۳۵/۳۳ ± ۴/۵۰۹	۲۵ ± ۷	۱۳/۳۳ ± ۵/۵۰



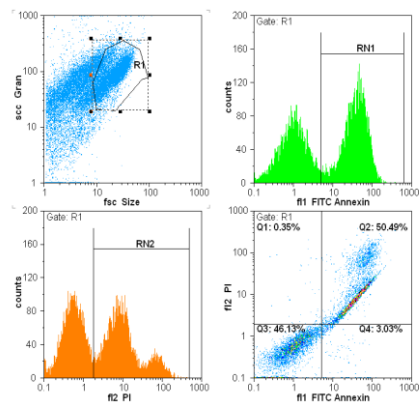
شکل ۳: تاثیر غلظت ۱۵۰ میکرومولار بر سلول‌های Jurkat



شکل ۲: سلول‌های Jurkat بدون رنگ FITC و PI



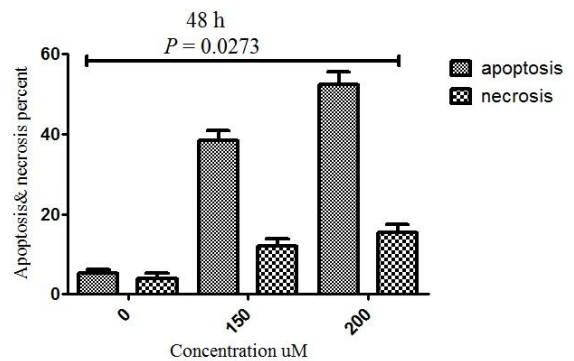
شکل ۵: تاثیر غلظت ۰ میکرومولار بر سلول‌های Jurkat



شکل ۴: تاثیر غلظت ۲۰۰ میکرومولار بر سلول‌های Jurkat

بررسی آپوپتوز در رده سلولی لنفوبلاستیک:

برای بررسی اثر آپوپتوزی هسپرتین در رده سلولی لنفوبلاستیک، از دستگاه فلوسایتمتری استفاده گردید. سلول‌ها پس از ۴۸ ساعت درمان با این آنتی‌اکسیدان، با رنگ Annexin/PI رنگ‌آمیزی گردیدند. مطابق با تاثیر ضد تکثیر که توسط MTS نشان داده شده است، در بررسی آپوپتوز نیز هسپرتین در غلظت‌های مختلف (نزدیک به IC50) بر روی سلول مؤثر بوده و توانسته آپوپتوز را القا کند. برای تجزیه و تحلیل اطلاعات به دست آمده از دستگاه فلوسایتمتری از برنامه Flow-max استفاده گردید. (شکل‌های ۵-۲) (نمودار ۴).



نمودار ۴: اثر آنتی‌اکسیدان هسپرتین بر القای آپوپتوز رده سلولی لنفوبلاستیک JURKAT بعد از ۴۸ ساعت

### بحث

شیمی درمانی به عنوان درمان اصلی برای بیشتر سرطان‌ها در نظر گرفته می‌شود، اما به علت اثرات جانبی فراوان این نوع درمان، تلاش‌های اخیر بیشتر بر روی ترکیبات طبیعی برای جلوگیری از گسترش سرطان صورت می‌گیرد.

در این مطالعه اثر آنتی‌اکسیدان هسپرتین بر فعالیت تکثیر سلول‌های لنفوبلاستیک (C515) مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس نتایج به دست آمده از آزمایش MTS، هسپرتین در غلظت ۲۰۰ μM موجب کاهش معناداری در میزان تکثیر سلول (تیمار شده) نسبت به گروه کنترل شد. این بررسی نشان داد که غلظت بالای ۲۰۰ μM آنتی‌اکسیدان هسپرتین دارای اثرات مشخص سیتوتوکسیک

در *in vitro* می‌باشد. در روش MTS، شدت رنگ ایجاد شده با سلول‌هایی که دارای میتوکندری فعال می‌باشند، متناسب است. مطالعه انجام شده توسط ویل کوکس و همکاران در همین راستا نیز نشان‌دهنده این بود که هسپرتین ترشح apoB هپاتوسیت‌ها را در غلظت ۲۰۰ میکرومولار به طور معناداری کاهش می‌دهد (۱۸). در مطالعه‌های دیگر غلظت‌های مختلفی از این ترکیب استفاده شد که این موضوع به دلیل تفاوت در نوع سلول‌ها و هم چنین شرایط انجام آزمایش می‌باشد. در بررسی دیگری اثر آپوپتوزی هسپرتین بر روی سلول‌های سرطانی رحم، مشاهده گردید که این آنتی‌اکسیدان در غلظت ۶۵۰ میکرومولار، حدود ۵۰٪ سلول‌ها را متوقف نموده است. آلشایو و همکارانش نیز در این مطالعه گزارش کردند که این ترکیب دارای اثرات ضد سرطانی از طریق کاهش توانایی سلول‌های زنده (Viability) و القای آپوپتوز می‌باشد (۱۹). در مطالعه دیگری بر روی سلول‌های PC-3 پروستات، هسپرتین در غلظت ۴۰ میکرومولار باعث از بین رفتن ۵۰٪ (IC50) سلول‌ها گردیده است (۲۰).

آپوپتوزیس، اتوفازی و نکروز انواعی از مرگ سلولی محسوب می‌شوند و در میان این سه مسیر مرگ سلولی، آپوپتوزیس بهترین مسیر مرگ سلولی می‌باشد (۲۱). در صورتی که این فرآیند مختل شود، باعث ایجاد سرطان یا دیگر اختلالات می‌گردد. بیش از ۴۰٪ از نوپلاسماها در سیستم آپوپتوزی دچار اختلال می‌شوند که منجر به ازیاد سلولی غیر نرمال می‌گردد (۲۲). از این رو، تنظیم آپوپتوز در درمان سرطان با اهمیت است (۲۳). در مطالعه حاضر برای اثبات القای آپوپتوز توسط هسپرتین در لاین سلولی لوسمی لنفوبلاستیک حاد (C515)، از آنالیز فلوسایتمتری استفاده شد و مشخص گردید که با افزایش غلظت دارو، میزان سلول‌های آپوپتوز شده (آنکسین مثبت و PI منفی) افزایش می‌یابد. بدین صورت که در غلظت ۲۰۰ μM، حدود ۵۰٪ آپوپتوز نسبت به گروه کنترل مشاهده گردید. این نتایج در تایید MTS به ما نشان می‌دهد که سلول‌هایی که در روش MTS تحت تاثیر هسپرتین بوده‌اند، دچار آپوپتوز شده‌اند و این آنتی‌اکسیدان بر روی این رده سلولی در شرایط آزمایشگاهی مؤثر می‌باشد. مطالعه‌ای بر روی

قبلی و مطالعه ما می‌باشد (۲۹). هم چنین مطالعه‌های دیگر نشان دادند که هسپرتین بیان GLUT1، GLUT4 را در سلول‌های سرطانی پستان کاهش می‌دهد که موجب کاهش جذب گلوکز می‌گردد. پس این آنتی‌اکسیدان می‌تواند از یاد سلول‌های سرطانی را کاهش دهد که در نتیجه موجب اختلال در جذب گلوکز باشد (۳۰).

علاوه بر مطالعه‌های *In vitro*، در بررسی هسپرتین بر روی رت‌ها مشخص گردید که این آنتی‌اکسیدان به طور قابل توجهی میزان آپوپتوز را افزایش می‌دهد. طی مطالعه دیگری سلوکوک کارا و همکارانش گزارش نمودند که هسپرتین به دلیل دارا بودن خاصیت آنتی‌آپوپتوزی مانع صدمات ناشی از ایسکمی در بافت چشم موش می‌شود که با مطالعه ما از نظر القای آپوپتوز متفاوت است. آن‌ها ذکر نمودند که این دارو در بیماری‌های ایسکمیک می‌تواند مفید باشد. مطالعه‌های کامل تری جهت بررسی این تناقض لازم است، اما احتمالاً مسیر القا در این سلول‌ها متفاوت باشد (۳۱). هم چنین عدن و همکارش در یک مطالعه دیگر با تاثیر هسپرتین بر روی لاین سلولی پرومیلوسیتیک گزارش نمودند که این ترکیب باعث کاهش سلول‌ها از طریق القای آپوپتوز می‌شود (۳۲).

### نتیجه‌گیری

گرچه مطالعه‌ها در زمینه اثرات آپوپتوزی محدود می‌باشد، اما با توجه به نتایج حاصل گردیده از این مطالعه به نظر می‌رسد این آنتی‌اکسیدان در درمان بدخیمی‌های لنفوسیتی از طریق القای آپوپتوز مفید باشد، گرچه پیشنهاد می‌شود مطالعه‌هایی در *In vivo* نیز صورت پذیرد تا با اطمینان بیشتری این موضوع تایید شود.

### تشکر و قدردانی

از کلیه همکاران محترم در مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد که ما را در انجام این مطالعه یاری نمودند تشکر می‌کنیم.

آرتريت در رده سلولی مایع مفصلی فیروبلاست مانند FLS، نشان داده است که هسپرتین آپوپتوز را در محیط *in vitro* تحریک می‌نماید. این یافته توسط رنگ‌آمیزی هوخست و بررسی مورفولوژی که با بی‌نظمی در شکل، چروکیدگی هسته و تراکم شدن کروماتین همراه بود و نیز رنگ آمیزی Annexin V-FITC/PI و آنالیز فلوسایتومتری تایید گردید (۲۴). اما در مطالعه‌ای دیگر مشخص گردید که هسپرتین درصد سلول‌های آپوپتوز شده را در سلول‌های H9C2 تحریک شده با LPS کاهش می‌دهد. آن‌ها یافتند که هسپرتین از طریق افزایش بیان Bcl-2 و کاهش بیان Bax و از طریق مسیر JNK، خواص آنتی‌آپوپتوزی خود را آشکار می‌کند (۲۵). این یافته با یافته‌های اکثر مطالعه‌ها که اثر آپوپتوزی این ترکیب را اثبات نمودند، مغایرت دارد. مطالعه سیواگامی و همکاران نیز تاثیر هسپرتین بر روی لاین سلولی HT-29 سرطان کولورکتال را ثابت کردند. آن‌ها دریافتند که این آنتی‌اکسیدان آپوپتوز را توسط فعال کردن BAX و سیتوکروم C و هم چنین مهار BCL-2، تحریک می‌کند (۲۶). در مطالعه حاضر تنها القا و میزان آپوپتوز و نه مسیر آن بررسی گردیده است.

جیونگ چوی و همکارانش دریافتند که هسپرتین در سلول‌های MCF-7 سرطان پستان موجب توقف چرخه سلولی در مرحله G1 می‌گردد (۱۶). هم چنین در مطالعه‌ای دیگر نشان داده شده است که هسپرتین که از هسپریدین (شکل گلیکوزیدی) متابولیزه می‌گردد، سلول‌ها را از آسیب به DNA محافظت می‌کند (۲۷). به علاوه اثرات ضد التهابی هسپرتین بررسی گردید و نتایج بدین صورت بود که این ترکیب بیان سیتوکاین‌های التهابی را کاهش می‌دهد و آن‌ها از این آنتی‌اکسیدان در درمان آسم استفاده نمودند (۲۸). اما جیونگ سوک چوی و همکاران نشان دادند که هسپرتین و اپی گالوکات‌ه چین گالات (Epigallocatechin gallate) در سلول‌های اندوتلیال مواجه شده با LDL نقش آنتی‌آپوپتوزی دارند که این اطلاعات برخلاف مطالعه‌های

## References :

- 1- Zand AM, Imani S, Saadati M, Borna H, Ziaei R, Honari H. Effect of age, gender and blood group on different types of leukemia. *Kowsar Medical Journal* 2010; 15(2): 111-4. [Article in Farsi]
- 2- Graux C, Cools J, Michaux L, Vandenberghe P, Hagemeyer A. Cytogenetics and molecular genetics of T-cell acute lymphoblastic leukemia: from thymocyte to lymphoblast. *Leukemia* 2006; 20(9): 1496-510.
- 3- Ebinger M, Witte K-E, Ahlers J, Schäfer I, André M, Kerst G, *et al.* High frequency of immature cells at diagnosis predicts high minimal residual disease level in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res* 2010; 34(9): 1139-42.
- 4- Van Vlierberghe P, Ferrando A. The molecular basis of T cell acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Invest* 2012; 122(10): 3398-406.
- 5- Van Vlierberghe P, van Grotel M, Beverloo HB, Lee C, Helgason T, Buijs-Gladdines J, *et al.* The cryptic chromosomal deletion del (11)(p12p13) as a new activation mechanism of LMO2 in pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2006; 108(10): 3520-9.
- 6- Pui CH. Acute lymphoblastic leukemia: introduction. *Semin Hematol* 2009; 46(1): 1-2.
- 7- de Figueiredo-Pontes LL, Pintão MCT, Oliveira LC, Dalmazzo LF, Jácomo RH, Garcia AB, *et al.* Determination of P-glycoprotein, MDR-related protein 1, breast cancer resistance protein, and lung-resistance protein expression in leukemic stem cells of acute myeloid leukemia. *Cytometry B Clin Cytom* 2008; 74(3): 163-8.
- 8- Sengupta TK, Leclerc GM, Hsieh-Kinser TT, Leclerc GJ, Singh I, Barredo JC. Cytotoxic effect of 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-4-ribofuranoside (AICAR) on childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL) cells: implication for targeted therapy. *Mol Cancer* 2007; 6: 46.
- 9- Shashi B, Jaswant S, Madhusudana RJ, Kumar SA, Nabi QG. A novel lignan composition from *Cedrus deodara* induces apoptosis and early nitric oxide generation in human leukemia Molt-4 and HL-60 cells. *Nitric Oxide* 2006; 14(1): 72-88.
- 10- Denicourt C, Dowdy SF. Medicine. Targeting apoptotic pathways in cancer cells. *Science* 2004; 305(5689): 1411-3.
- 11- Choi EJ. Hesperetin induced G1-phase cell cycle arrest in human breast cancer MCF-7 cells: involvement of CDK4 and p21. *Nutr Cancer* 2007; 59(1): 115-9.
- 12- Wallner L, Dai J, Escara-Wilke J, Zhang J, Yao Z, Lu Y, *et al.* Inhibition of interleukin-6 with CNT0328, an anti-interleukin-6 monoclonal antibody, inhibits conversion of androgen-dependent prostate cancer to an androgen-independent phenotype in orchietomized mice. *Cancer Res* 2006; 66(6): 3087-95.
- 13- Zarebczan B, Pinchot SN, Kunnimalaiyaan M, Chen H. Hesperetin, a potential therapy for carcinoid cancer. *Am J Surg* 2011; 201(3): 329-32.
- 14- Yoshida H, Takamura N, Shuto T, Ogata K, Tokunaga J, Kawai K, *et al.* The citrus flavonoids hesperetin and naringenin block the lipolytic actions of TNF-alpha in mouse adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 394(3): 728-32.
- 15- Choi EJ, Kim GD, Chee K-M, Kim G-H. Effects of hesperetin on vessel structure formation in mouse embryonic stem (mES) cells. *Nutrition* 2006; 22(9): 947-51.
- 16- Ye L, Chan FL, Chen S, Leung LK. The citrus flavonone hesperetin inhibits growth of aromatase-expressing MCF-7 tumor in ovariectomized athymic mice. *J Nutr Biochem* 2012; 23(10): 1230-7.
- 17- Chinembiri TN, du Plessis LH, Gerber M, Hamman JH, du Plessis J. Review of natural compounds for potential skin cancer treatment. *Molecules* 2014; 19(8): 11679-721.
- 18- Wilcox LJ, Borradaile NM, de Dreu LE, Huff MW. Secretion of hepatocyte apoB is inhibited by the flavonoids, naringenin and hesperetin, via reduced activity and expression of ACAT2 and MTP. *J Lipid Res* 2001; 42(5): 725-34.
- 19- Alshatwi AA, Ramesh E, Periasamy V, Subash-Babu P. The apoptotic effect of hesperetin on human cervical cancer cells is mediated through cell cycle arrest, death receptor, and mitochondrial pathways. *Fundam Clin Pharmacol* 2013; 27(6): 581-92.
- 20- Sambantham S, Radha M, Paramasivam A, Anandan B, Malathi R, Chandra SR, *et al.* Molecular mechanism underlying hesperetin-induced apoptosis by in silico analysis and in prostate cancer PC-3 cells. *Asian Pac J Cancer Prev* 2013; 14(7): 4347-52.
- 21- Leist M, Jäättelä M. Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; 2(8): 589-98.
- 22- Pommier Y, Sordet O, Antony S, Hayward RL, Kohn KW. Apoptosis defects and chemotherapy resistance: molecular interaction maps and networks. *Oncogene* 2004; 23(16): 2934-49.
- 23- Fulda S. Evasion of apoptosis as a cellular stress response in cancer. *Int J Cell Biol* 2010; 2010: 370835.
- 24- Li R, Cai L, Xie Xf, Peng L, Li J. 7,3'-dimethoxy hesperetin induces apoptosis of fibroblast-like synoviocytes in rats with adjuvant arthritis through caspase 3 activation. *Phytother Res* 2010; 24(12): 1850-6.
- 25- Yang Z, Liu Y, Deng W, Dai J, Li F, Yuan Y, *et al.* Hesperetin attenuates mitochondria-dependent apoptosis in lipopolysaccharide-induced H9C2 cardiomyocytes. *Mol Med Rep* 2014; 9(5): 1941-6.
- 26- Sivagami G, Vinothkumar R, Preethy CP, Riyasdeen A, Akbarsha MA, Menon VP, *et al.* Role of hesperetin (a natural flavonoid) and its analogue on apoptosis in HT-29 human colon adenocarcinoma cell line—A comparative study. *Food Chem Toxicol* 2012; 50(3): 660-71.
- 27- Kalpana K, Devipriya N, Srinivasan M, Menon VP. Investigation of the radioprotective efficacy of hesperidin against gamma-radiation induced cellular damage in cultured human peripheral blood lymphocytes. *Mutat Res* 2009; 676(1-2): 54-61.
- 28- Yang YL, Hsu HT, Wang KH, Han CY, Chen CM, Chen CM, *et al.* Hesperetin-7,3'-O-dimethylether selectively inhibits phosphodiesterase 4 and effectively suppresses ovalbumin - induced airway

- hyperresponsiveness with a high therapeutic ratio. *J Biomed Sci* 2011; 18: 84.
- 29- Choi JS, Choi YJ, Shin SY, Li J, Kang SW, Bae JY, *et al.* Dietary flavonoids differentially reduce oxidized LDL-induced apoptosis in human endothelial cells: role of MAPK-and JAK/STAT-signaling. *J Nutr* 2008; 138(6): 983-90.
- 30- Yang Y, Wolfram J, Boom K, Fang X, Shen H, Ferrari M. Hesperetin impairs glucose uptake and inhibits proliferation of breast cancer cells. *Cell Biochem Funct* 2013; 31(5): 374-9.
- 31- Kara S, Gencer B, Karaca T, Tufan HA, Arikan S, Ersan I, *et al.* Protective Effect of Hesperetin and Naringenin against Apoptosis in Ischemia/Reperfusion-Induced Retinal Injury in Rats. *ScientificWorldJournal* 2014; 2014: 797824.
- 32- Gokbulut AA, Baran Y. Cytotoxic and apoptotic effects of fisetin, hesperin and vitexinon acute promyelocytic leukemia cells. *Leuk Res* 2014; 38(Suppl 1): S46.

*Original Article*

## **The effect of hesperetin in the induction of apoptosis and necrosis in lymphoblastic cell line Jurkat**

**Shirzad M.<sup>1</sup>, Heidarian E.<sup>2</sup>, Poorgheisari B.<sup>1</sup>, Amini Sarteshnizi N.A.<sup>3</sup>, Soorani Z.<sup>1</sup>, Beshkar P.<sup>4,2</sup>**

<sup>1</sup>Shahrekord University Of Medical Sciences, Shahrekord, Iran

<sup>2</sup>Cellular & Molecular Research Center, Shahrekord University Of Medical Sciences, Shahrekord, Iran

<sup>3</sup>Faculty Of Basic Science, University Of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran

<sup>4</sup>Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine, Tehran, Iran

### **Abstract**

#### **Background and Objectives**

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is a neoplastic disorder and a common malignancy in children. Apoptosis is a normal physiological process which occurs during the maintenance of tissue hemostasis. The defect in this process leads to the development of cancer. It can be induced by a variety of treatments, such as cytotoxic chemotherapy. Hesperetin, a flavonoid isolated from the red fruits, has been examined with regard to the inhibition of proliferation and induction of apoptosis in pancreatic cells. Hesperetin also activates NOTCH-1 and tumor suppressor in carcinoid tumor.

#### **Materials and Methods**

In this fundamental-applied research, the cell lines of C121 (Jurkat cell) were cultured in RPMI supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and Penicilin/streptomycin. The growth and survival of cells with various concentrations of hesperetin was evaluated by MTS kit. The amount of cell death by trypan blue staining and flow cytometry as well as by apoptosis kit (Partec) was examined.

#### **Results**

Lymphoblastic cell lines (C121) in exposure to different concentrations of hesperetin were affected and MM 200 drug concentration at 48 hours was reported as inhibitory concentration or IC50. The mode of cell death induced by hesperetin was found to be apoptosis, as judged by the morphologic alteration of the cells and by Annexin v conjugated with FITC and flow cytometric analysis.

#### **Conclusions**

Since hesperetin can induce apoptosis and reduce cell activity, it seems appropriate to be able to inhibit the growth of tumor cells.

**Key words:** Leukemia, Acute Lymphoblastic, hesperetin, Jurkat Cells, Apoptosis

Received: 18 Aug 2014

Accepted: 28 Feb 2015

*Correspondence:* Beshkar P., PhD Student of Hematology. Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine and Cellular and Molecular Research Center, Shahrekord University of Medical Sciences.

Postal Code: 8813833435, Shahrekord, Iran. Tel: (+98381) 3335652-4; Fax: (+98381) 3334911

E-mail: beshkarpezhman@yahoo.com