مقاله پژوهشی

ارمغان دانش، مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی یاسوج
دوره ۱۸، شماره۱۱، اسفند۱۳۹۲(شماره پی در پی۸۳)

تأثیر دو گونه دافنه، بتولین و بتولینیک اسید بر فعالیت آلکالین فسفاتاز در دو رده سلول سرطانی K562 و MCF-7

اسماعیل پناهی‌کوخدان[۱]، منیژه میان آبادی[۱]*، هیبت الله صادقی‌منصورخانی[۲]، مهناز خلفی [۳]

[۱]گروه زیست شناسی، دانشگاه گلستان، گرگان، ایران، [۲]مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، یاسوج ، ایران، [۳] گروه آمار، دانشگاه گلستان، گرگان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۴/۳۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۸/۱۸

چکیده

زمینه و هدف: تغییر فعالیت آلکالین فسفاتاز، یکی از علایم مهم در بسیاری از بیماری‌ها می‌باشد. هدف این مطالعه بررسی تأثیر دو گونه دافنه، بتولین و بتولینیک اسید بر فعالیت آلکالین فسفاتاز در دو رده سلول K562 و MCF-7 بود.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی، تعداد 10^6 سلول از دو رده سلول سرطانی K562 و MCF-7 در ظروف کشت سلولی در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد دی اکسید کربن با دوزهای نزدیک به IC50 مواد گیاهی تیمار شد. میزان بقای سلول‌ها، فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز داخل و خارج سلولی و میزان پروتئین کل در هر تیمار بررسی گردید. داده‌ها با آزمون‌های آماری آنالیز واریانس چند متغیره‌ای تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: فعالیت آلکالین فسفاتاز داخل سلولی رفتار متفاوتی نسبت به فعالیت آلکالین فسفاتاز خارج سلولی نشان داد($p<0/01$). بیشترین افزایش درصد فعالیت آلکالین فسفاتاز داخل سلولی در دو رده K562 و MCF-7 مربوط به تیمار با دافنه ماکروناتا به ترتیب ۳۳۹ و ۲۳۶ درصد بود. در حالی که، کمترین کاهش فعالیت آلکالین فسفاتاز خارج سلولی مربوط به اثر بتولین در دو رده سلولی K562 و MCF-7 به ترتیب ۳/۴ و ۵/۶ درصد نسبت به گروه کنترل مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: افزایش غیره منتظره فعالیت آلکالین فسفاتاز داخل سلولی تحت اثر دوگونه دافنه، ماده خالص بتولین و بتولینیک اسید می‌تواند ناشی از تغییر در ترکیب اجزای غشای پلاسمایی و افزایش پروتئین‌های متصل نشده به غشاء یا ایجاد شکل فعال‌تر آلکالین فسفاتاز درون سلولی باشد.

واژه‌های کلیدی: دافنه الوئیده،دافنه ماکروناتا، آلکالین فسفاتاز، بتولین، بتولینیک اسید

***نویسنده مسؤل: دکتر منیژه میان آبادی**، گرگان، دانشگاه گلستان، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی

Email: m.mianabadi@gu.ac.ir

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

در بین انواع سرطان‌ها، لوسمی میلوئیدی مزمن یکی از شناخته شده‌ترین انواع لوسمی است که موجب ۳ درصد از مرگ‌های ناشی از سرطان در زنان و مردان می‌شود(۲ و۱). در حالی که سرطان پستان اولین سرطان شایع در زنان ۴۰ تا ۴۴ ساله می‌باشد و مسئول ۲۰ درصد از تمام مرگ‌های ناشی از سرطان است(۴ و۳). با توجه به آمارهای جهانی رو به رشد انواع سرطان‌ها، تلاش در جهت یافتن داروهایی با پتانسیل بالا که آثار سوء کمتری دارند ضروری به نظر می‌رسد(۵). استفاده از گیاهان در درمان سرطان سابقه‌ای طولانی دارد(۶). در میان خانواده‌های مختلف گیاهان دارویی، خانواده تیمه لئاسه به عنوان تیره حاوی ترکیبات دارویی موثرحائز اهمیت زیادی است. گونه‌های مختلف این تیره از زمان‌های گذشته برای درمان بیماری‌های روماتیسمی، درد مفاصل، بیماری‌های پوستی، برخی از سرطان‌ها و غیره مورد استفاده قرار می‌گرفت(۷). برای مثال در اروپا، آمریکای جنوبی و آسیای غربی از پوست و میوه گونه دافنه مازریوم در طب سنتی برای درمان زخم‌ها، روماتیسم، مسهل، داروی سقط جنین و از پوست آن برای درمان اگزما، حساسیت و دردهای عصبی استفاده می‌شد(۸). در واقع متابولیت‌های ثانویه‌ای که به وسیله گیاه ساخته می‌شود باعث اختصاصی شدن گونه‌های مختلف گیاهان می‌گردد که هر یک از این ترکیبات بیوشیمیایی دارای اثرات بیولوژیکی متفاوتی هستند. بتولین یک تری‌ترپن طبیعی و فراوان در گیاهان است، بتولین از ترکیبات تری‌ترپنوئیدی می‌باشد که علیه برخی از انواع سرطان مؤثرند(۱۰و۹). بتولین می‌تواند به بتولینیک اسید تبدیل گردد که از نظر زیستی فعال‌تر از بتولین است(۱۱).

آنزیم آلکالین فسفاتاز یک آنزیم غشایی متصل به فسفاتیدیل اینوزیتول است. فعالیت این آنزیم در برخی از انواع بیماری‌ها که منجر به اختلال در ساختمان غشای زیستی می‌گردد، تغییر می‌کند(۱۲). نشان داده شده است که سلول‌های سرطانی تحت تیمار عصاره گیاه دندروستیلر لزرتی و ماده خالص آن در کمتر از ۴۸ ساعت باعث افزایش قابل توجه فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز داخل سلولی می‌شود(۱۳). تحقیقات نشان داده است که آلکالین فسفاتاز با کاهش فعالیت برخی از پروتئین‌های غشاء پلاسمایی نقش مهمی در حساس کردن سلول های سرطانی به داروها ایفا می‌نماید(۱۴).

هدف این مطالعه بررسی تأثیر دو گونه دافنه، بتولین و بتولینیک اسید بر فعالیت آلکالین فسفاتاز در دو رده سلول K562 و MCF-7 بود.

روش بررسی

در این مطالعه تجربی، گیاه دافنه الوئیده و دافنه ماکروناتا در انتهای فصل بهار از استان کهگیلویه و بویراحمد جمع‌آوری شدند. گیاهان به دور از نور مستقیم خورشید خشک و نگهداری شد؛

Archive of SID

www.SID.ir

سپس برگ‌ها از ساقه جدا.و آسیاب شدند ودر دمای ۴ درجه سانتی‌گراد تا هنگام نیاز نگهداری گردید(۱۵).

مقدار ۵۰ گرم از گیاه دافنه الوئیده و دافنه ماکروناتا در ۸۰۰ میلی‌لیتر اتانول ۷۰ درصد به مدت ٤٨ ساعت خیسانده ودر دمای اتاق انکوبه شد. پس از این زمان، عصاره با استفاده از کاغذ واتمن صاف و این عمل ۲ بار تکرار شد و به عصاره قبلی اضافه شد. کل عصاره به وسیله دستگاه روتاری آواپریتور تغلیظ شد و سپس به وسیله فریزدرایر خشک و در یخچال ٤- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد(۱۶).

رده سلولی MCF-7 و K562 مهرماه ۱۳۹۱ از بانک سلولی ایران خریداری گردید و به آزمایشگاه کشت سلول مرکز تحقیقات سلولی مولکولی دانشگاه علوم پزشکی یاسوج انتقال یافت. سلول‌ها در محیط کشت RPMI-1640(جیبکو، آمریکا) غنی شده با سرم جنین گاوی (FBS) ۱۰درصد (جیبکو، آمریکا) و آنتی‌بیوتیک‌های استرپتومایسین(۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و (پنی سیلین ۱۰۰ واحد بر میلی‌لیتر)(جیبکو، آمریکا) در انکوباتور(ممرت، آلمان) با شرایط ۵ درصد دی اکسید کربن، دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۹۵ درصد کشت داده شد(۱۸و ۱۷). پس از ۴۸ ساعت محیط کشت تعویض و سلول‌ها پاساژ گردید. برای انجام آزمایش‌ها، پاساژ ۴ یا ۵ سلول‌ها پس از کشت سلولی و رسیدن به فاز تصاعدی رشد به کار گرفته شد. تعداد 10^6 سلول از هر رده در ظروف کشت سلول ریخته شد و بعد از گذشت ۲۴ ساعت با ۰/۵۱ میلی‌گرم وزن خشک بر میلی‌لیتر دافنه الوئیده ، ۰/۵۷ میلی‌گرم وزن خشک بر میلی‌لیتر دافنه ماکروناتا، ۵/۸ نانو مولار بتولین و ۷/۲ نانو مولار بتولینیک اسید تیمار شدند.

سلول‌ها در دو نوبت با بافر فسفات سالین شسته و سانتریفوژ شدند. به رسوب سلول‌ها ۱۵۰ میکرو لیتر بافر استخراج آنزیم آلکالین فسفاتاز (20 mM Tris–HCl, 1mM $MgCl_2$, 150 mM NaCl pH 8.0) اضافه گردید. علاوه بر این در دو نوبت و هر بار به مدت ۱۵ ثانیه محتوای هر اپندرف ورتکس شد. سپس بادور g۱۲۰۰۰به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شد و مایع رویی برای سنجش فعالیت آنزیمی مورد استفاده قرار گرفت(۱۳).

فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز بر اساس هیدرولیز آنزیمی۴ــ نیترو فنیل فسفات و تولید ۴ـ نیتروفنل تعیین شد. برای این منظور از کیت آلکالین فسفاتاز شرکت پارس آزمون تهران استفاده شد. مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره تهیه شده با ۹۰۰ میکرو لیتر از محلول سنجش مخلوط شد و یک دقیقه بعد جذب نوری آن در طول موج ۴۰۵ نانومترو با دستگاه اسپکتروفتومترتعیین گردید(۱۹). غلظت پروتئین داخل سلولی به روش لوری تعیین شد(۱۳).

برای بررسی تغییرات مورفولوژی دو پلیت کشت ۲۴ تایی که در هرخانه ۲ میلی‌لیتر محیط کشت کامل دارای ۱۰ درصد FBS و10^5سلول رده K562 و MCF-7 بود در نظر گرفته شد. پس از ۲۴ ساعت،

Archive of SID

www.SID.ir

سلول‌های هر دو رده سلول سرطان انسان با ۰/۵۱ میلی‌گرم وزن خشک بر میلی‌لیتر دافنه الوئیده، ۰/۵۷ میلی‌گرم وزن خشک بر میلی‌لیتر دافنه ماکروناتا، ۵/۸ نانومولار بتولین و ۷/۲ نانومولار بتولینیک اسید تیمار شدند. پس از گذشت ۴۸ ساعت، تغییرات مورفولوژی سلول‌ها با کمک میکروسکوپ فاز معکوس در بزرگنمایی ۲۰ بررسی شد.

تمامی داده‌ها حاصل سه بار تکرار از سه آزمایش مستقل بودند. داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزار SPSS و آزمون آماری تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها

فعالیت آلکالین فسفاتاز داخل سلولی بر اثر چهار تیمار مختلف نسبت به کنترل افزایش یافت. به این صورت که بیشترین افزایش در هر دو رده MCF-7 و K562 مربوط به عصاره گیاه دافنه ماکروناتا که به ترتیب ۲۳۶/۸۹ و ۳۳۹/۰۳ درصد بود و کمترین افزایش در هر دو رده MCF-7 و K562 مربوط به ماده خالص بتولینیک اسید به ترتیب ۲۱۱ و ۲۳۶/۰۹ درصد نسبت به گروه کنترل بود(نمودار ۱- A).

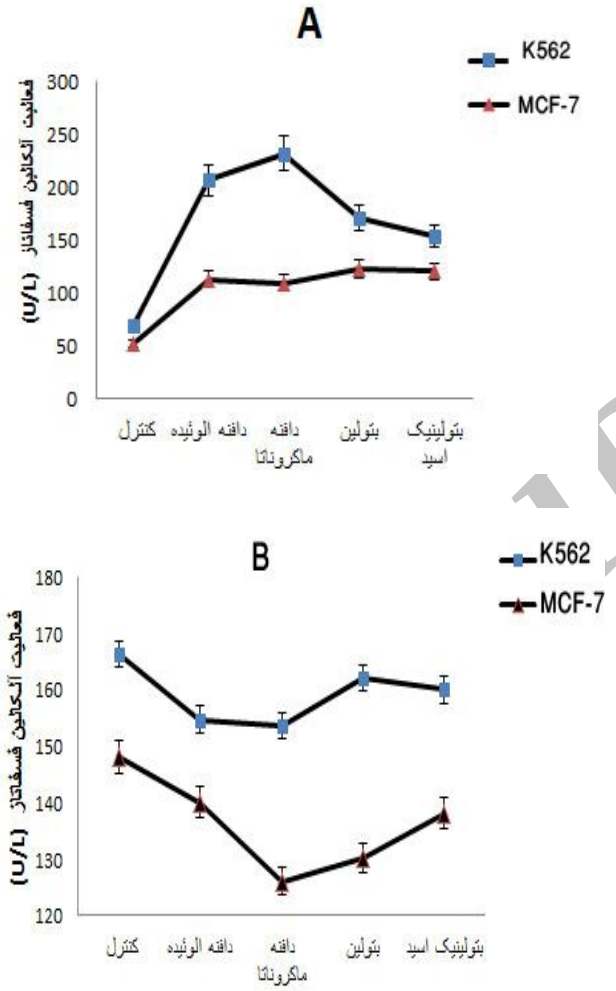
هم‌چنین نتایج نشان داد که فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز تحت اثر عصاره دوگونه دافنه الوئیده، دافنه ماکروناتا و دو ماده خالص بتولین و بتولینیک اسید درطول ۴۸ ساعت در دو رده سلولی نسبت به کنترل کاهش داشتند. بیشترین کاهش در هر دو رده MCF-7 وK562 برای دافنه ماکروناتا به ترتیب ۱۴/۸۷ و ۷/۶۱ درصد نسبت به گروه کنترل بود(نمودار ۱- B).

بر اساس نتایج حاصله، در دو رده سلولی MCF-7 و K562 (جدول ۱) بین فعالیت آلکالین فسفاتاز داخل سلولی و میزان پروتئین داخل سلولی همبستگی وجود دارد($p<0/01$). نتایج آنالیز واریانس چند متغیره طرح آشیانه‌ای(جدول ۲)، بر اساس مقدار آماره لاندای ویلکس در سطح کمتر از ۱ درصد تفاوت حداقل یکی از فعالیت‌های آلکالین فسفاتاز داخل سلولی، خارج سلولی و پروتئین داخل سلولی را در دو رده سلولی نشان می‌دهد. هم‌چنین نتایج بیانگر اختلاف معنی‌دار حداقل یکی از فعالیت‌ها در تیمارهای مربوط به رده‌های سلولی می‌باشد. در ادامه به دلیل معنی‌دار بودن آزمون‌های چند متغیره، نتایج تجزیه واریانس داده‌ها به تفکیک نشان داد که نتایج بیانگر اختلاف دو رده سلولی و اثر تیمار بر روی هر سه پارامتر می‌باشد(جدول۳).

سلول‌های سرطانی رده MCF-7 ۴۸ ساعت پس از تیمار با عصاره دوگونه دافنه از بستر خود جدا شدند و شکل سلول‌ها از دوکی به شکل کروی تبدیل گردیدند، این در حالی است که بتولین و بتولینیک اسید تغییرات کمتری بر مورفولوژی رده سلولیMCF-7 داشتند(تصویر ۱). عصاره گونه‌های دافنه باعث کشیده شدن سلول‌های رده K562 و هم‌چنین باعث ایجاد زوایدی در سطح سلول‌ها شد در صورتی که تغییرات در سلول‌های تیمار شده با بتولین به صورت تغییر در اندازه سلول نسبت به کنترل بود(تصویر ۲).

Archive of SID

www.SID.ir



نمودار ۱: مقایسه تغییرات آلکالین فسفاتاز داخل سلولی (A) و خارج سلولی (B) رده‌های سلول سرطانی بررسی شده تحت تیمار نسبت به گروه کنترل

جدول ۱: همبستگی بین فعالیت آلکالین فسفاتاز داخل سلولی، خارج سلولی و محتوای پروتئین داخل سلول در K562 و MCF-7.

متغیر	فعالیت آنزیم الکالین فسفاتاز داخل سلولی (در هر مورد مربوط به رده مربوط به خود)	فعالیت آنزیم الکالین فسفاتاز خارج سلولی (در هر مورد مربوط به رده مربوط به خود)	محتوای پروتئین داخل سلولی (در هر مورد مربوط به رده مربوط به خود)
فعالیت آلکالین فسفاتاز داخل سلول K562	۱	-۰/۸۸*	۰/۸۷*
فعالیت آلکالین فسفاتاز خارج سلول K562	_	۱	-۰/ ۸۵۵*
محتوای پروتئین داخل سلول K562	_		۱
فعالیت آلکالین فسفاتاز داخل سلول MCF-7	۱	-۰/۷۹۹*	۰/۵۱۱*
فعالیت آلکالین فسفاتاز خارج سلول MCF-7	_	۱	-۰/۱۶۳*
محتوای پروتئین داخل سلول MCF-7	_		۱

* اختلاف معنی‌دار نسبت به گروه کنترل کمتر از یک درصد

www.SID.ir

جدول ۲: آنالیز واریانس چند متغیره براساس آمار لاندای ویلکس به منظور اثر تیمارها و رده سلولی بر روی فعالیت آلکالین فسفاتاز داخل، خارج سلول و محتوای پروتئین داخل سلول

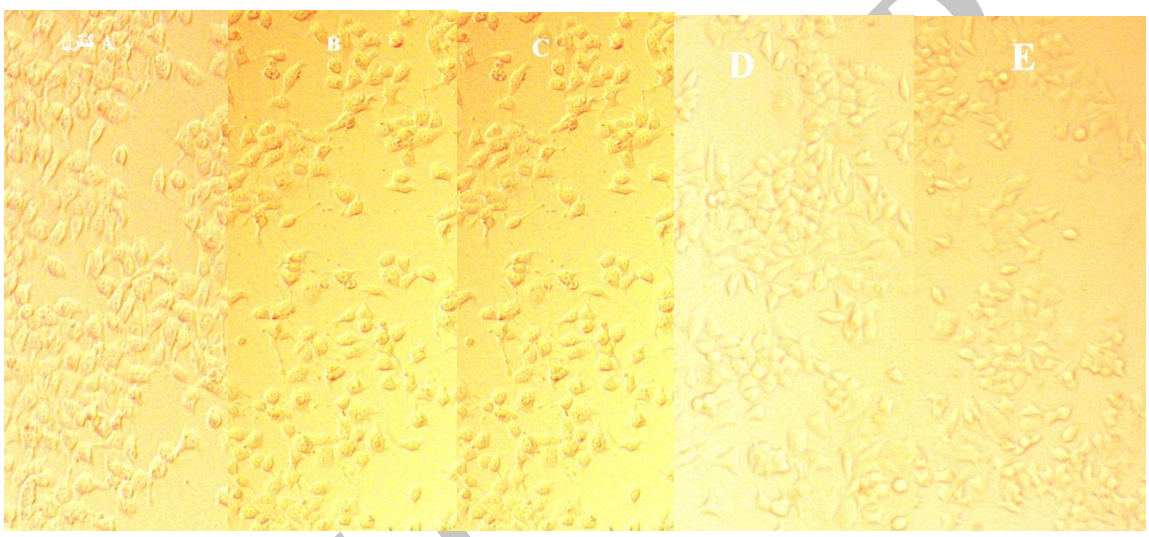
منبع تغییر	درجه آزادی اول	درجه آزادی دوم	مقدار F
رده سلولی	۳	۱۸	۲۱۳۶/۵۷*
تیمارهای سلولی(رده سلولی)	۲۴	۵۳	۴۶/۵۵*

*اختلاف معنی‌دار بین ردهای سلولی و تیمارهای سلولی کمتر از یک درصد

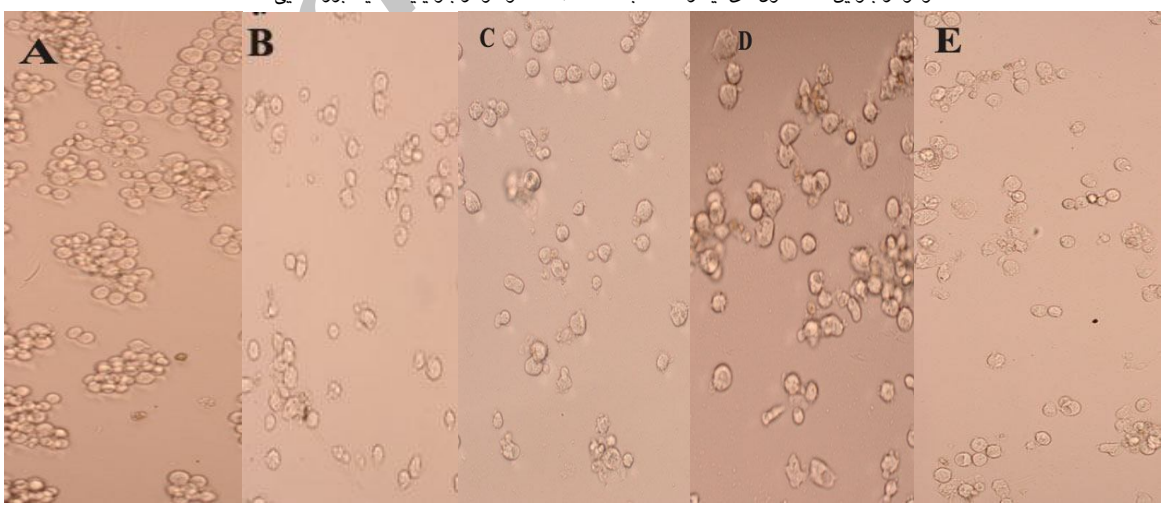
جدول ۳: تجزیه واریانس فعالیت آلکالین فسفاتاز داخل، خارج سلولی و محتوای پروتئین سلول (طرح آشیانه ای)

منبع تغییر	درجه آزادی	فعالیت آنزیم الکالین فسفاتاز داخل سلولی (میانگین مربع توان دوم)	فعالیت آنزیم الکالین فسفاتاز خارج سلولی (میانگین مربع توان دوم)	محتوای پروتئین داخل سلولی (میانگین مربع توان دوم)
تیمار های سلولی	۱	۱۱۷۰۵/۹۰۰*	۲۹۸۳۰/۵۳*	۴۰۱۸*
تیمارهای سلولی(رده سلولی سلولی)	۸	۷۱۴۴/۰۳*	۵۵۱/۲۸*	۱۰۳۹*

**اختلاف معنی‌دار بین ردهای سلولی و تیمارهای سلولی کمتر از یک درصد



تصویر۱: سلول‌های رده MCF-7 در زیر میکروسکوپ فاز معکوس ۲۴ ساعت پس از تیمار. A سلول‌های کنترل، B سلول‌های تیماره شده با ۰/۵۱ میلی گرم بر میلی لیتر گیاه دافنه الوئیده، C سلول‌های تیماره شده باغلظت ۰/۵۷ میلی گرم بر میلی‌لیتر دافنه ماکروناتا، D سلول‌های تیماره شده با غلظت ۸/۲ نانومولار بتولین، E سلول‌های تیماره شده با غلظت۲/ ۱۷ نانو مولار بتولینیک اسید. بزرگنمایی X ۲۰



شکل ۲:سلول‌های رده K562 در زیر میکروسکوپ فاز معکوس ۲۴ ساعت پس از تیمار. A سلول‌های کنترل، B سلول‌های تیماره شده با ۰/۵۱ میلی گرم بر میلی لیتر گیاه دافنه الوئیده، C سلول‌های تیماره شده باغلظت ۰/۵۷ میلی گرم بر میلی‌لیتر دافنه ماکروناتا، D سلول‌های تیماره شده با غلظت ۸/۲ نانومولار بتولین، E سلول‌های تیماره شده با غلظت۲/ ۱۷ نانو مولار بتولینیک اسید. بزرگنمایی X ۲۰

www.SID.ir

بحث

آلکالین فسفاتازها جزو آنزیم‌های غشایی می‌باشند و در تمام سلول‌های پروکاریوتی و یوکاریوتی وجود دارند(۲۰). این آنزیم‌ها در فرآیندهای مهمی از جمله؛ معدنی شدن استخوان‌ها، انتقال فسفات‌های معدنی از روده، تنظیم فسفوریلاسیون پروتئین‌ها، رشد و تمایز سلولی، آپوپتوز و جابجایی سلول‌ها در اوایل دوره جنینی نقش ایفا می‌کند(۲۱). بیان ژن‌های آلکالین فسفاتازها در انواعی از سرطان‌های انسان کمی زیاد می‌شود، ولی مکانیسم آن به خوبی روشن نشده است. هم‌چنین ثابت شده است که غلظت آنزیم‌های آلکالین فسفاتاز دربافت‌های مختلف، با تبادلات غشایی ارتباط مستقیم دارد. تحقیقات مختلف نشان داده‌اند که این آنزیم‌ها در تنظیم فعالیت پروتئین‌های مقاومت چند دارویی نقش مهمی بازی می‌کنند. پروتئین‌های مقاومت چند دارویی از جمله پروتئین‌های غشایی سلول‌ها هستند که در انتقال مواد به ویژه داروها به بیرون از سلول و ایجاد مقاومت سلولی نقش مهمی دارد(۲۲). دو ترکیب رتینوئیک اسید و دگزامتازون علاوه بر این که باعث مهار تکثیر سلول‌ها می‌شوند، سبب افزایش فعالیت آلکالین فسفاتاز نیز می‌گردند. بعضی از فلاونوئیدهای گیاهی نیز فعالیت و غلظت آنزیم‌های آلکالین فسفاتاز راافزایش می‌دهند. در بررسی خواص ضدتوموری عصاره گیاه دافنه الوئیده، دافنه ماکروناتا، ترکیبات بتولین و بتولینیک اسید دیده شد که غشای سلول‌های تیمار شده به نحوی تحت تأثیر این عوامل قرار می‌گیرند. مرفولوژی غشای سلولی نسبت به غشای سلول‌های کنترل تغییر می‌کند. علاوه بر موارد ذکر شده، سلول‌های K562 نسبت به بعضی از داروهای ضدسرطان مقاومت نشان می‌دهند. بر حسب مطالعات انجام شده تأثیر عصاره دو گونه دافنه، بتولین و بتولینیک اسید بر فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز در دو رده سلولی K562 و MCF-7 مورد مطالعه و بررسی قرار گرفتند.

این مطالعه نشان داد، فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز برون سلولی (آلکالین فسفاتاز ترشح شده از سلول‌ها) در سلول‌های تیمار شده با عصاره در مقایسه با سلول‌های کنترل مقداری کاهش یافته است. تحقیقات نشان دادند که افزایش سطح آلکالین فسفاتاز سرمی یکی از علایم بسیاری از سرطان‌ها از جمله سرطان کبد، تخمدان، پروستات و کولون است. نتایج نشان داد که مقدار پروتئین درون سلولی در سلول‌های رده MCF-7 و K562 تحت تیمار با عصاره خام دافنه ماکروناتا، دافنه اولوئیده، بتولین و بتولینیک اسید افزایش یافت. این افزایش می‌تواند یا به علت افزایش بیان ژن‌های مختلف داخل سلولی مربوط به پروتئین‌های مختلف باشد که ژن آلکالین فسفاتاز نیز می‌تواند یکی از آن‌ها باشد یا به علت تغییراتی در ساختمان فیزیکی و یا ترکیب اجزای غشای پلاسمایی باشد. یکی از این تغییرات می‌تواند حذف پیوند استری و جدا شدن پروتئین آلکالین فسفاتاز از غشاء باشد که در هر دو صورت افزایش مقدار پروتئین داخل سلولی و فعالیت آلکالین فسفاتاز محلول در درون سلول

Archive of SID

www.SID.ir

مشاهده خواهد شد(۲۱). چنانچه گفته شد با وجود این که سلول‌های K562 نسبت به تأثیر بعضی از ترکیبات ضد تومور از خود مقاومت نشان می‌دهند، در مقابل عصاره خام دافنه ماکروناتا، دافنه اولوئیده، بتولین و بتولینیک اسید حساس می‌باشند. فسفریله شدن P-گلیکو پروتئین‌ها باعث افزایش فعالیت این پروتئین‌های غشایی می‌شود که در نتیجه با افزایش خروج داروها از سلول باعث افزایش مقاومت سلولی شوند(۲۳). به احتمال زیادعصاره‌های دافنه، بتولین و بتولینیک‌اسید با افزایش فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز باعث دفسفریله شدنP-گلیکوپروتئین‌ها و افزایش حساسیت سلول‌ها می‌شوند.

نتیجه‌گیری

با توجه به تغییرات غشایی سلول‌های تحت تیمار که منجر به افزایش فعالیت آلکالین فسفاتاز داخل سلولی شدند، این افزایش سبب حساس شدن سلول‌های سرطانی می‌شود و از آنجا که سلول‌های سرطانی تحت تیمار با عصاره خام گیاهان مورد بررسی و مواد خالص گیاهی کاهش تولید آلکالین فسفاتاز خارج سلولی را نشان دادند. بنابراین می‌توان گفت این تیمارها احتمالاً منجر به بهبود نسبی سلول‌های سرطانی شده‌اند.

تقدیر و تشکر

نویسندگان مقاله مراتب تشکر و قدردانی خود را از معاونت پژوهشی دانشگاه گلستان به خاطر حمایت مالی بخشی از این پژوهش و مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی یاسوج که مراحل انجام این پژوهش در این مرکز انجام پذیرفت ابراز می‌دارند.

Archive of SID

www.SID.ir

REFERENCES

1.Deininger M, Goldman J, Melo J. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. Blood 2000; 96: 3343-56.
2.Wong S, McLaughlin J, Cheng D. Cell context-specific effects of the BCR-ABL oncogene monitored in hematopoietic progenitors. Blood 2003;101: 4088-97.
3.Chin Y-W, Balunas MJ, Balunas MJ, Chai HB, Kinghorn AD. Drug discovery from natural sources. AAPS J 2006; 8: 239-53.
4.Irigaray P, Newby JA, Clapp R, Hardell L, Howard V, Montagnier L, et al. Lifestyle-related factors and environmental agents causing cancer: an overview. Biomed Pharmacother 2007;61:640-58.
5.Valley AW, Balmer CM. Pharmacotherapy a pathophysiologic approach. 7th ed. New York: The McGraw-Hill Companies ; 2008; 2085-2348.
6.Hartwell G, Bellizzi R. Clinical investigation of in vivo endodontically treated mandibular and maxillary molars. Journal of Endodontics 1982; 8: 555-7.
7.Kasai R, Lee KHH. Antitumor agent 40.Genkawaphnin a potent anti-leukemic diterpene from Daphne genkawa. Phytochem 1981; 20(232): 977-80.
8.Sadeghiriz A, Yazdanparast R. Plasma membrane homing of tissue nonspecific alkaline phosphatase under the influence of 3-hydrogenkwadaphnin, an antiproliferative agent from Dendrostellera lessertii. Acta Biochimica Polonica 2007; 54: 323-9.
9.Abe F, Iwase Y, Yamauchi T, Kinjok K, Yaga S. Daphnane diterpenoids from the bark of Winstromia etusa. Phytochem 1997; 44: 643-6.
10.Mullauer FB, Kessler JH, Medema JP. Betulinic acid induces cytochrome c release and apoptosis in a bax/bak- independent, permeability transition pore dependent fashion. Apoptosis 2009; 14: 191-202.
11.Mullauer BHK, Medema1 J. Betulin Is a Potent Anti-Tumor Agent that Is Enhanced by Cholesterol. Plosone 2009; 4: e5361.
12.Chang TC, Wang JK, Hung MW, Chiao CH, Tsai LC, Chang GG. Regulation of the expression of alkaline phosphatase in a human breast cancer cell line. Biochemical Journal 1994; 303: 199–205.
13.Sadeghi H, Yazdanparast R. Effect of Dendrostellera lessertii on the intracellular alkaline phosphatase activity of four human cancer cell lines. Journal of Ethnopharmacology 2003; 86: 11–4.
14.Eriksson HJ, Somsen GW, Hinrichs WL, Frijlink HW, de Jong GJ. Characterization of human placental alkaline phosphatase by activity and protein assays, capillary electrophoresis and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. Journal of chromatography B, Biomedical Sciences and Applications 2001; 755: 311-9.
15.Hedayati M, Yazdanparast R, Fasihi H, Azizi F. Anti-tumor activity of Daphne mucronata extract and its effects on TNF-α-receptors and TNF- α release in cultured human monocytes. Pharmeceutical Biol 2003; 41: 194-8.
16.Pourmorad F, Hosinimehr SJ, SHahabimajd N. Anti oxidant activity, phenol and flavonoid content. Afrecan Jornal Of Chemistry And Biotechnology 2006; 5: 1142-5.
17.Yoshida M, Feng W, Saijo N, Ikekawa T. Antitumor activity of daphnane-type diterpene gnidimacrin isolated from Stellera chamaejasme L. International Journal of Cancer 1996; 66: 268–73.
18.Mianabadi M, Yazdanparast R. The Effect of Gnidilatimonoein from Daphne mucronata, on the Adhesive Property of Human Platelets. Iranian Biomedical Journal 2004; 8 (3): 143-7.
19.Chang YC, James RB. Electronic and optical properties of HgI2. Physical Review B, Condensed Matter 1992; 46: 15040-5.
20.Tsai LC, Hung MW, Chen YH, Su WC, Chang GG, Chang TC. Expression and regulation of alkaline phosphatases in human breast cancer MCF-7 cells. European Journal Of Biochemistry / FEBS 2000;267:1330-9.
21.Van Hoof VO, Van Oosterom AT, Lepoutre LG, De Broe ME. Alkaline phosphatase isoenzyme patterns in malignant disease. Clinical Chemistry 1992; 38: 2546-51.
22.Calhau C, Martel F, Hipolito-Reis C, Azevedo I. Effect of P-glycoprotein modulators on alkaline phosphatase activity in cultured rat hepatocytes. Cellular physiology and biochemistry. International Journal Of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, And Pharmacology 2000; 10: 195-202.
23.Talalay, P., Fahey, J.W., Holtzclaw, W.D., Prestera, T., Zhang, Y., 1995. Chemoprotection against cancer by phase 2 enzyme induction. Toxicology letters 82-83, 173-179

Archive of SID

www.SID.ir

Armaghane-danesh, Yasuj University of Medical Sciences Journal (YUMSJ)

Original Article

The Effects of Two Species of Daphne, Betulin and Betulinic Acid on Alkaline Phosphatase Activity in Two Human Cancer Cell lines, K562 and MCF-7

Panahi Kokhdan E[1], Mianabadi M[1*], Sadeghi H[2], Khalafi M[3]

[1] Department of Biology, Golestan University, Gorgan, Iran, [2]Cellular and Molecular Research Center, Yasuj University of Medical Science, Yasuj, Iran ,[3] Department of Statistics, Golestan University, Gorgan, Iran

Received:21 July 2013 Accepted: 9 Nov 2013

Abstract

Background & aim: Changes of alkaline phosphatase activity is one of the symptoms of many diseases. The aim of this study was to evaluate the effect of two types of Daphne, Betulin and Betulinic acid, on alkaline phosphatase activity in K562 and MCF-7 cell lines, respectively.

Methods: In this study, 10^6 cancer cell lines of K562 and MCF-7 were cultured in presence of 5% carbon dioxide at 37 ° C. at doses near the IC50. The viability of cells, inside and outside alkaline phosphatase activity and the amount of total protein in each treatment were studied. The collected data was analyzed with a multivariate analysis of variance (Nested Design) and Dunnett test.

Results: The intracellular alkaline phosphatase activity of the cells showed different behavior compared to the extracellular alkaline phosphatase activity ($p< 0.01$). The highest increase of alkaline phosphatase activity in two cell lines (K562 and MCF-7) were 339% and 236% which was related to the treatment by macronata daphne.

Conclusion: Unexpected increase in intracellular alkaline phosphatase activity in *D. mucronata*, *D. oleides*, Betulin, and Betulinic acid treatment may be due to changes in the composition of plasma membrane component and an increase the non-connected membrane of the protein which is due to the creation of more active proteins.

Keywords: Daphne mucronata, Daphne oleoides, *A*lkaline Phosphatase, Betulinic Acid, Betulin

Corresponding Author: Mianabadi M, Department of Biology, Faculty of Science, Golestan University, Golestan, Iran
Email: m.mianabadi@gu.ac.ir

Archive of SID