

## اثرات سایتوتوکسیک و آپوپتوتیک هورمون ملاتونین در رده سلول‌های لوسمیک NB4

مهدیه مهرپوری<sup>۱</sup> (Ph.D)، رامین یوسف‌پور<sup>۲</sup> (M.Sc)، آوا صفراوغلی‌آذر<sup>۲</sup> (M.Sc)، داوود بشاش<sup>۳\*</sup> (Ph.D)

۱- کمیته پژوهشی دانشجویان، گروه هماتولوژی و بانک خون، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

۲- گروه هماتولوژی و بانک خون، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۸/۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۱/۱

d.bashash@sbmu.ac.ir

\* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۱-۲۲۷۱۷۵۰۴

### چکیده

هدف: سمیت بالا و عوارض جانبی داروهای شیمی‌درمانی از عوامل محدودکننده مصرف این عوامل می‌باشند، لذا جستجو برای یافتن داروهای جدید با سمیت کم‌تر و کارآیی بیش‌تر ادامه دارد. ملاتونین، محصول اصلی غده پینه‌آل، نه تنها نقش مهمی در تنظیم ریتم شبانه‌روزی ایفا می‌کند، بلکه هم‌چنین اثرات آنتی‌پرولیفراتیو و آپوپتوزی را در طیف گسترده‌ای از تومورها اعمال می‌نماید. هدف از این مطالعه بررسی تاثیر داروی ملاتونین در کاهش بقا و القای آپوپتوز در سلول‌های NB4 (مشتمل شده از لوسمی پرومیلوسیتیک حاد) است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، جهت ارزیابی اثرات سایتوتوکسیک ملاتونین، سلول‌های NB4 با غلظت‌های مختلف دارو (۱، ۰/۵، ۲ میلی‌مولار) تیمار شدند. سپس فعالیت متابولیک سلول‌ها، القا آپوپتوز، میزان فعالیت کاسپاز ۳، تولید ROS و هم‌چنین بیان ژن‌های مرتبط با آپوپتوز به ترتیب از طریق تست‌های MTT assay، رنگ‌آمیزی Annexin-V/PI، کیت ارزیابی فعالیت کاسپاز ۳، کیت ارزیابی ROS سلولی و RQ-PCR مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج حاصل نشان داد که ملاتونین منجر به کاهش فعالیت متابولیک سلول‌های NB4 به صورت وابسته به دوز و زمان می‌گردد ( $P < 0/05$ ). هم‌چنین، نتایج بیانگر آن است که احتمالاً تاثیر ضد لوسمیک ملاتونین از طریق القاء فعالیت کاسپاز ۳، افزایش سطح داخل سلولی ROS و تغییر سطح بیان ژن‌های Bcl-2، Survivin و Bax صورت می‌گیرد ( $P < 0/05$ ).

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان داد که ملاتونین دارای اثرات سایتوتوکسیک در سلول‌های NB4 بوده و به عنوان یک داروی کاندید امیدبخش در درمان APL مطرح می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: ملاتونین، آپوپتوز، سرطان خون پرومیلوسیتی حاد

### مقدمه

دارو به صورت گسترده برای درمان بیماران APL به‌کار گرفته شد. علی‌رغم درمان درصد بالایی از بیماران با این دارو، محدودیت‌هایی از قبیل سندروم رتینوئیک اسید و ایجاد مقاومت به دارو در بیماران درمان شده به عنوان چالش‌های درمان با ATRA باقی ماند [۶]. هر چند درمان با آرسنیک تری‌اکسید (AS2O3) یکی از استراتژی‌های درمانی در بیماران مقاوم به ATRA است؛ اما در کنار اثربخشی مطلوب این دارو، سمیت و عوارض جانبی از عوامل محدودکننده برای مصرف آن می‌باشند [۷]. لذا جستجو برای شناسایی عوامل درمانی که برای تومور سمیت داشته باشند و در عین حال عوارض جانبی پایینی داشته باشند ادامه دارد. در این بین استفاده از عواملی که برای درمان سایر بیماری‌ها استفاده می‌شوند یک استراتژی درمانی حائز اهمیت خواهد بود؛ زیرا در این حالت سمیت و کینتیک دارو به خوبی شناخته شده و می‌تواند به سرعت وارد فاز درمانی بشود.

لوسمی پرومیلوسیتی حاد (APL) با تشکیل ۵-۱۰ درصد از موارد لوسمی‌های میلوئیدی حاد، یکی از شناخته شده‌ترین انواع بدخیمی‌های هماتولوژیک به‌شمار می‌رود که بیش‌ترین شیوع را در بین جوانان دارد [۱، ۲]. طی سال‌های اخیر بررسی‌های مولکولی و آزمایشگاهی گوناگون طیف وسیعی از ناهنجاری‌های ژنتیکی مرتبط با این بیماری را شناسایی کرده‌اند [۳]. در این بین می‌توان از جابه‌جایی بین دو کروموزوم ۱۵ و ۱۷ نام برد که در ۹۷ درصد موارد APL یافت شده و با ایجاد ژن ترکیبی PML/RAR $\alpha$  و پروتئین کایمریک PML/RAR $\alpha$  همراه است [۴]. با این وجود، تلاش‌ها برای یافتن دیگر سازوکارهای دخیل در پاتوژنز و هم‌چنین مکانیسم‌های مقاومت به درمان با داروهای شیمی‌درمانی هم‌چنان ادامه دارد [۵]. با شناسایی نقش داروی ATRA در درمان بیماران APL، این

از جمله این عوامل درمانی می‌توان به ملاتونین (N استیل ۵ متوکسی تریپتامین) اشاره کرد که مشتق اسید آمینه تریپتوفان بوده و توسط غده پینه‌آل و سایر ارگان‌ها نظیر شبکیه، مغز استخوان و تیموس تولید می‌شود [۹،۸]. ملاتونین نه تنها از واسطه‌های اصلی برای تنظیم ریتم شبانه‌روزی است، بلکه در تعدیل سیستم ایمنی، پیشگیری از التهاب، زدودن رادیکال‌های آزاد و گشاد شدن عروق نقش دارد [۱۱،۱۰]. هم‌چنین، پژوهش‌های مختلف صورت گرفته نشان داده‌اند که ملاتونین دارای اثرات ضد تکثیر و پیش‌آپوتوزی در طیف وسیعی از تومورهای توپیر بوده و به عنوان یک عامل ضد توموری امیدبخش مطرح می‌باشد. در این راستا مطالعات انجام شده نشان داده‌اند که تجویز ملاتونین در سرطان‌های پستان و پروستات با مهار تکثیر سلولی و در نتیجه فواید درمانی همراه می‌باشد [۱۳،۱۲]. از سویی دیگر، بررسی‌های صورت گرفته روی سلول‌های سرطانی پستان نشان داده است که ملاتونین با افزایش ژن‌های پیش‌آپوتوزی و کاهش ژن‌های آنتی‌آپوتوزی می‌تواند اثر داروهای شیمی‌درمانی مورد استفاده را تقویت نماید [۱۴]. اخیراً نیز در مطالعه‌ای نشان داده شد که ملاتونین قادر است از طریق القای توقف در چرخه‌ی سلولی و تحریک مسیرهای آپوتوزی رشد سلول‌های سرطانی معده را مهار نماید [۱۵]. با توجه به این‌که بدخیمی‌های خونی از عوامل اصلی مرگ‌ومیر در سراسر جهان هستند، مطالعه اثر ملاتونین در این بیماری‌ها می‌تواند در ارتقای روش‌های درمانی موجود کمک‌کننده باشد. در این راستا مطالعاتی که تاکنون انجام گرفته است نشان داده‌اند که ملاتونین دارای خاصیت درمانی و اثرات محافظتی علیه تعدادی از بدخیمی‌های خونی لنفوییدی از جمله CLL و لنفوم‌ها می‌باشد، اگر چه مکانیسم اثر آن به خوبی شناخته نشده است [۱۶]. در این مطالعه سلول‌های NB4 به‌عنوان مدلی از لوسمی پرومیلوسیتیک حاد با داروی ملاتونین تیمار شدند و تاثیر این دارو بر فعالیت متابولیک، آپوتوز و بیان ژنی سلول‌ها ارزیابی شد.

بررسی فعالیت متابولیک سلول‌ها با آزمون **assay MTT** برای ارزیابی تاثیر داروی ملاتونین بر فعالیت متابولیک سلول‌های NB4، تعداد ۵۰۰۰ سلول به هر چاهک پلیت ۹۶ خانه‌ای حاوی و فاقد دارو اضافه گردید و به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در انکوباتور CO<sub>2</sub> دار انکوبه گردید. محلول MTT در غلظت ۵mg/ml به هر چاهک اضافه گردید و به مدت ۳ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه قرار گرفت. سپس پلیت مذکور با دور ۱۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ گردید و پس از خالی کردن محلول رویی ۱۰۰ میکرولیتر محلول DMSO به هر چاهک اضافه گردید. در ادامه، جذب نوری هر چاهک با استفاده از دستگاه ELISA reader در طول موج ۵۷۰ نانومتر قرائت گردید. از آن‌جا که آزمون MTT وابستگی مستقیم به طیف رنگی ایجاد شده بر پایه روش رنگ‌سنجی نوری دارد، عدم توجه به جزئیات ابتدایی در روش‌های رنگ‌سنجی می‌تواند منجر به ایجاد خطا شود. از این موارد می‌توان تفاوت در تعداد سلول‌هایی که در مرحله ابتدایی در هر چاهک قرار داده می‌شود، میزان تقسیم سلول‌ها، افزوده نشدن یکسان محلول MTT به همه‌ی چاهک‌ها و به جای ماندن اثر انگشت در سطوح زیرین چاهک‌ها را نام برد.

بررسی شاخص آپوتوز با استفاده از رنگ‌آمیزی **Annexin V/PI**. به منظور تاثیر دارو بر القاء مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده، سلول‌های NB4 در هر چاهک پلیت ۱۲ خانه‌ای ریخته شد و به مدت ۲۴ ساعت با غلظت‌های مختلف داروی ملاتونین تیمار گردید. پس از شست‌وشوی سلول‌ها با استفاده از بافر فسفات سالین (PBS) و افزودن معرف‌های **Annexin V-FITC** (Roche، آلمان)، **PI** (Roche، آلمان) و بافر انکوباسیون، نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در تاریکی و در دمای ۴ سانتی‌گراد انکوبه شدند. سپس سلول‌ها با استفاده از دستگاه

از جمله این عوامل درمانی می‌توان به ملاتونین (N استیل ۵ متوکسی تریپتامین) اشاره کرد که مشتق اسید آمینه تریپتوفان بوده و توسط غده پینه‌آل و سایر ارگان‌ها نظیر شبکیه، مغز استخوان و تیموس تولید می‌شود [۹،۸]. ملاتونین نه تنها از واسطه‌های اصلی برای تنظیم ریتم شبانه‌روزی است، بلکه در تعدیل سیستم ایمنی، پیشگیری از التهاب، زدودن رادیکال‌های آزاد و گشاد شدن عروق نقش دارد [۱۱،۱۰]. هم‌چنین، پژوهش‌های مختلف صورت گرفته نشان داده‌اند که ملاتونین دارای اثرات ضد تکثیر و پیش‌آپوتوزی در طیف وسیعی از تومورهای توپیر بوده و به عنوان یک عامل ضد توموری امیدبخش مطرح می‌باشد. در این راستا مطالعات انجام شده نشان داده‌اند که تجویز ملاتونین در سرطان‌های پستان و پروستات با مهار تکثیر سلولی و در نتیجه فواید درمانی همراه می‌باشد [۱۳،۱۲]. از سویی دیگر، بررسی‌های صورت گرفته روی سلول‌های سرطانی پستان نشان داده است که ملاتونین با افزایش ژن‌های پیش‌آپوتوزی و کاهش ژن‌های آنتی‌آپوتوزی می‌تواند اثر داروهای شیمی‌درمانی مورد استفاده را تقویت نماید [۱۴]. اخیراً نیز در مطالعه‌ای نشان داده شد که ملاتونین قادر است از طریق القای توقف در چرخه‌ی سلولی و تحریک مسیرهای آپوتوزی رشد سلول‌های سرطانی معده را مهار نماید [۱۵]. با توجه به این‌که بدخیمی‌های خونی از عوامل اصلی مرگ‌ومیر در سراسر جهان هستند، مطالعه اثر ملاتونین در این بیماری‌ها می‌تواند در ارتقای روش‌های درمانی موجود کمک‌کننده باشد. در این راستا مطالعاتی که تاکنون انجام گرفته است نشان داده‌اند که ملاتونین دارای خاصیت درمانی و اثرات محافظتی علیه تعدادی از بدخیمی‌های خونی لنفوییدی از جمله CLL و لنفوم‌ها می‌باشد، اگر چه مکانیسم اثر آن به خوبی شناخته نشده است [۱۶]. در این مطالعه سلول‌های NB4 به‌عنوان مدلی از لوسمی پرومیلوسیتیک حاد با داروی ملاتونین تیمار شدند و تاثیر این دارو بر فعالیت متابولیک، آپوتوز و بیان ژنی سلول‌ها ارزیابی شد.

## مواد و روش‌ها

کشت و تیمار سلولی NB4 با ملاتونین. در این مطالعه تجربی، سلول‌های NB4 (مشتق از لوسمی پرومیلوسیتی حاد) (انستیتوپاستور) در محیط کشت RPMI1640 همراه با ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (FBS)، ۱۰۰U/ml پنی‌سیلین و ۱۰۰µg/ml استرپتومایسین کشت داده شدند و در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و فشار دی‌اکسیدکربن ۵ درصد نگهداری شدند. جهت اطمینان از صحت سلول‌های NB4، mRNA ژن ترکیبی PML/RARα با استفاده از تکنیک

cDNA (TAKARA, ژاپن) استفاده شد. جهت سنتز cDNA نمونه‌ها مطابق با دستورالعمل کیت به مدت ۱۵ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۱۵ ثانیه در ۸۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. باید بدانیم که کیفیت RNA استخراج شده می‌تواند بر بازده و عملکرد آزمون RQ-PCR (Real Time Quantitative RT-PCR) تأثیر بگذارد. بنابراین در صورتی که RNA استخراج شده فاقد کیفیت مطلوب بوده و یا از خلوص خوبی برخوردار نباشد قادر است روی کارایی RQ-PCR اثر منفی اعمال نماید.

بررسی کمی بیان ژن‌های **Bcl-2**، **surviving** و **Bax** دخیل در آپوپتوز. برای بررسی کمی بیان ژن‌های **Bcl-2**، **survivin** و **Bax** از روش RQ-PCR استفاده گردید. برای هر واکنش ۱۰ میکرومولار SYBR green master mix (Amplicon)، ۲ میکرومولار cDNA، ۰/۵ میکرومولار از هر یک از پرایمرها و ۷ میکرومولار آب مقطر فاقد نوکلئاز استفاده گردید. شرایط دمایی مورد استفاده شامل یک مرحله فعال‌سازی اولیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و در ادامه ۴۰ سیکل برای واسرشت (۵ ثانیه، ۹۵ درجه سانتی‌گراد) و مرحله اتصال/بازآرایی توام (۲۰ ثانیه، ۶۰ درجه) می‌باشد. به منظور ارزیابی اختصاصیت محلول تکثیر یافته، منحنی ذوب مورد بررسی قرار گرفت. در انتها و برای محاسبه نسبی تعداد نسخه mRNA تکثیر شده از فرمول  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  استفاده گردید. توالی پرایمرهای مورد استفاده جهت انجام آزمون در جدول ۱ آورده شده است. از نکات مهمی که لازم است رعایت شود تا خطای مثبت کاذب حین انجام RQ-PCR به حداقل برسد استفاده از یک کنترل منفی فاقد RNA یا cDNA می‌باشد تا آلودگی احتمالی شناسایی گردد. بعلاوه تکثیر یک ژن رفرنس اجازه می‌دهد تا ژن‌های مورد بررسی نسبت به آن‌ها نرمال شده و ارزیابی شوند. البته متغیرهای نظیر پیپت کردن نامناسب مواد واکنش، ناپایداری مواد اولیه مورد استفاده و هم‌چنین تغییرات در شدت نور تولید شده پتانسیل بالایی برای ایجاد تغییر در نتایج این روش دارند. آنالیز آماری. تمامی آزمایشات به شکل سه آزمون مستقل انجام و مقادیر گزارش شده به شکل  $mean \pm SD$  قید شدند. هم‌چنین برای محاسبات آماری از روش Paired Student's t-test و نرم‌افزار SPSS 21 و GraphPad Prism7 استفاده گردید و  $P < 0/05$  به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

فلوسایتومتر (PartecPasIII, آلمان) بررسی شدند و نتایج حاصل با استفاده از نرم‌افزار FloMax 2.3 مورد آنالیز قرار گرفت.

ارزیابی فعالیت آنزیماتیک کاسپاز ۳. برای ارزیابی تاثیر دارو بر فعالیت کاسپاز ۳ از کیت ارزیابی کاسپاز ۳ (Sigma, آمریکا) استفاده شد. اساس این ارزیابی شناسایی رنگ مولکول p-NA است که به انتهای سوبسترای اختصاصی کاسپاز متصل است. به صورت خلاصه، سلول‌ها با غلظت‌های مختلف داروی ملاتونین به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور  $CO_2$  دار انکوبه گردیدند. سپس پلیت مذکور با دور ۶۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ و محلول رویی خالی شد. متعاقباً پلت سلولی حاصل، لیز و مجدداً پلیت با دور ۲۰۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ گردید. در ادامه ۵ میکروگرم از سوپرناتانت با ۸۵ میکرولیتر بافر و ۱۰ میکرولیتر از سوبسترای کاسپاز ۳ در یک پلیت ۹۶ خانه‌ای به مدت ۲ ساعت در انکوباتور  $CO_2$  دار انکوبه گردید. در ادامه، جذب نوری هر چاهک با استفاده از دستگاه ELISA reader در طول موج ۴۰۵ نانومتر قرائت گردید. شکسته شدن سوبسترا به واسطه‌ی کاسپاز ۳ با آزاد شدن p-NA همراه است که در طول موج ۴۰۵ نانومتر قرائت می‌گردد.

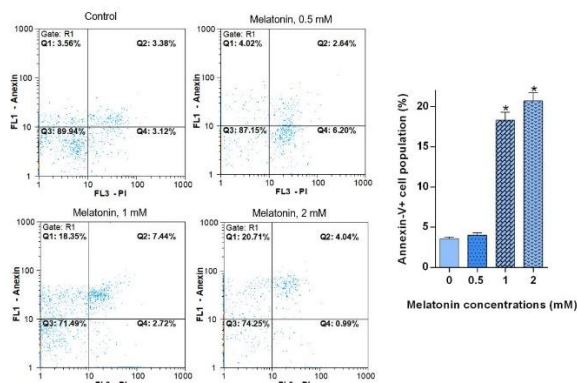
بررسی تجمع گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) داخل سلولی برای ارزیابی تولید گونه‌های فعال اکسیژن داخل سلولی از کیت ارزیابی ROS سلولی که شامل DCFH-DA (Invitrogen, نیوزلند) است استفاده گردید. DCFH-DA توسط سلول‌ها جذب شده و به واسطه‌ی استراز غیراختصاصی شکسته و DCFH را ایجاد می‌کند که به واسطه‌ی ROS اکسید و DCF را ایجاد می‌کند که شدیداً دارای خاصیت فلورسنت است. برای این منظور، بعد از انکوباسیون سلول‌ها با غلظت‌های مورد نظر ملاتونین برای مدت ۲۴ ساعت، سلول‌ها با DCFH-DA مواجه و برای ۳۰ دقیقه در انکوباتور  $CO_2$  دار انکوبه شدند. در ادامه، سلول‌ها دوبار شسته و در بافر PBS شناور شدند. در نهایت شدت فلورسنت نمونه‌ها با اسپکتروفتومتر در طول موج تحریکی ۴۸۵ نانومتر و طول موج نشری ۵۳۰ نانومتر سنجیده شد و میزان ROS نسبت به گروه کنترل محاسبه گردید.

استخراج RNA و سنتز cDNA. پس از تیمار سلول‌ها با دوزهای ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌مولار ملاتونین و گذشت ۲۴ ساعت، استخراج RNA از سلول‌های تیمار شده و هم‌چنین نمونه کنترل با استفاده از محلول ترایزول انجام پذیرفت. کمیّت و درصد خلوص RNA استخراج شده به روش اسپکتروفتومتری و با استفاده از دستگاه NanodropND2000 ارزیابی شد. برای انجام واکنش رونویسی معکوس از کیت سنتز

جدول ۱. توالی آغازگرهای مورد استفاده در آزمون Real Time Quantitative RT-PCR

ژن	آغازگر مستقیم (5'-3')	آغازگر معکوس (5'-3')	سایز (bp)
HPRT	TGGACAGGACTGAACGTCTTG	CCAGCAGGTCAGCAAAGAATTTA	۱۱۱
Bcl-2	CGGTGGGGTCATGTGTGTG	CGGTTCAAGTACTCAGTCATCC	۲۴۹
Survivin	CCAGATGACGACCCCATAGAG	TTGTTGGTTTCCTTTGCAATTTT	۱۵۲
Bax	CGAGAGGTCTTTTTCCGAGTG	GTGGGCGTCCCAAAGTAGG	۲۴۲

ملاتونین باعث فعال شدن آپوپتوز می‌شود، سلول‌ها پس از تیمار با هورمون، از نظر درصد سلول‌های Annexin-V و Annexin-V/PI توسط فلوسایتومتری مورد بررسی قرار گرفتند. همان‌طور که انتظار می‌رفت، نتایج حاصل نشان داد که ملاتونین به صورت وابسته به دوز منجر به القاء آپوپتوز در سلول‌های NB4 می‌شود. تیمار سلول‌ها با این دارو با افزایش جمعیت سلول‌های Annexin-V مثبت همراه است. همان‌طور که در شکل ۲ نشان داده شده است کم‌ترین و بیش‌ترین میزان آپوپتوز سلولی در غلظت‌های ۰/۵ و ۲ میلی‌مولار از داروی ملاتونین حاصل شده است.

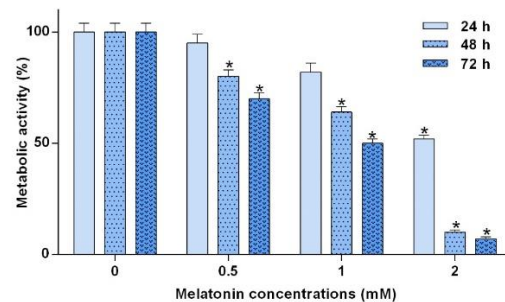


شکل ۲. بررسی درصد جمعیت سلول‌های آپوپتیک پس از تیمار با ملاتونین. سلول‌ها در محیط کامل با دوزهای مختلف داروی ملاتونین برای مدت زمان ۲۴ ساعت انکوبه شدند و سپس رنگ آمیزی Annexin-V/PI برای آن‌ها انجام شد. همان‌طور که مشاهده می‌شود تیمار سلول‌های NB4 با این مهارکننده باعث افزایش درصد جمعیت سلول‌های Annexin-V مثبت به صورت وابسته به دوز می‌شود. میانگین و انحراف معیار نتایج حاصل از سه ران کاری مختلف (mean ± SD) محاسبه و \*،  $P < 0.05$  نشان‌گر معنادار بودن از نظر آماری در مقایسه با نمونه کنترل بود.

ملاتونین منجر به افزایش فعالیت آنزیماتیک کاسپاز ۳ در سلول‌های NB4 می‌شود. کاسپازها خانواده‌ای از پروتئازهای سیستمین-آسپاراتات هستند که نقش کلیدی در تنظیم و اجرای مرگ سلولی آپوپتوتیک ایفا می‌کنند [۱۷]. در این مطالعه به منظور آگاهی از این‌که آیا داروی ملاتونین قادر است با فعال شدن مسیر کاسپاز ۳ همراه باشد، اثر داروی ملاتونین بر فعالیت آنزیماتیک کاسپاز ۳ اندازه‌گیری شد. برای این منظور، سلول‌ها با غلظت‌های مورد نظر از داروی ملاتونین به مدت ۲۴

## نتایج

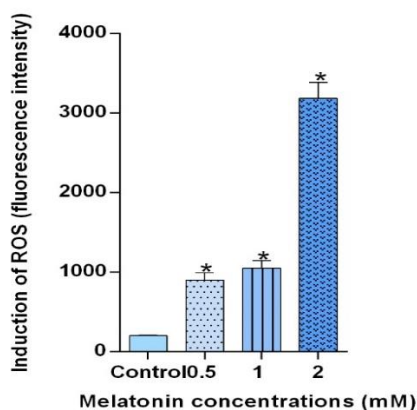
ملاتونین فعالیت متابولیک سلول‌های NB4 را به صورت وابسته به دوز و زمان کاهش می‌دهد. برای ارزیابی این‌که آیا ملاتونین قادر است میزان فعالیت متابولیک را در سلول‌های لوسمی پرومیلوسیتی حاد کاهش دهد، سلول‌های NB4 با دوزهای افزایش‌دهی ملاتونین تیمار شدند و میزان فعالیت متابولیک آن‌ها با استفاده از آزمون MTT مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج حاصل نشان داد که ملاتونین فعالیت متابولیک سلول‌های NB4 را به صورت وابسته به دوز کاهش می‌دهد. همان‌طور که در شکل ۱ نشان داده شده است متعاقب ۲۴ ساعت تیمار دارویی، دوزهای ۰/۵ و ۱ میلی‌مولار ملاتونین تاثیر چندانی بر فعالیت متابولیک سلولی ندارند، در حالی‌که دوز ۲ میلی‌مولار به طور موثری منجر به مرگ سلول‌های NB4 طی این زمان می‌شود. بعلاوه نتایج اثر غلظت‌های مختلف ملاتونین در زمان‌های ۴۸ و ۷۲ ساعت نشان داد که این دارو به صورت وابسته به زمان فعالیت متابولیک سلول‌های NB4 را کاهش می‌دهد که بیش‌ترین اثر مهاری در غلظت ۲ میلی‌مولار رخ می‌دهد.



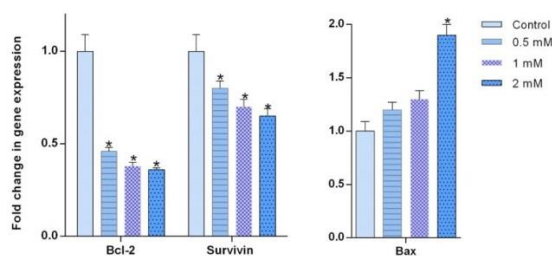
شکل ۱. بررسی تاثیر داروی ملاتونین بر فعالیت متابولیک سلول‌های NB4. سلول‌ها در محیط کامل با دوزهای مختلف داروی ملاتونین برای مدت زمان ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت انکوبه شدند و سپس آزمون MTT برای آن‌ها انجام شد. میزان  $IC_{50}$  در مطالعه صورت پذیرفته حدود ۱ میلی‌مولار در طی ۴۸ ساعت تخمین زده می‌شود. میانگین و انحراف معیار نتایج حاصل از سه ران کاری مختلف (mean ± SD) محاسبه و \*،  $P < 0.05$  نشان‌گر معنادار بودن از نظر آماری در مقایسه با نمونه کنترل بود.

ملاتونین منجر به القای آپوپتوز در سلول‌های NB4 می‌شود. برای ارزیابی این‌که آیا تیمار سلول‌های NB4 با

آپوتوز دو مکانیسم مختلف دارد که شامل مسیر درون سلولی و برون سلولی می باشد. در مسیر درون سلولی تعادل بین فاکتورهای پیش آپوتوزی و آنتی آپوتوزی از اهمیت به سزایی برخوردار است [۱۸]. لذا در این مطالعه اثر داروی ملاتونین بر بیان mRNA ژن های آنتی آپوتوزی Bcl-2 و survivin و ژن پیش آپوتوزی Bax به صورت کمی و با استفاده از تکنیک RQ-PCR مورد بررسی قرار گرفت. نتایج به دست آمده نشان داد متعاقب ۲۴ ساعت تیمار سلول های NB4 با داروی ملاتونین، بیان ژن های Bcl-2 و survivin به صورت وابسته به دوز کاهش و بیان ژن Bax نیز به صورت وابسته به دوز افزایش می یابد (شکل ۵). نتایج حاصل نمایانگر به هم خوردن توازن بین پروتئین های پیش آپوتوزی و آنتی آپوتوزی می باشد که برآیند آن در جهت پیشروی مرگ سلولی آپوتوتیک می باشد.

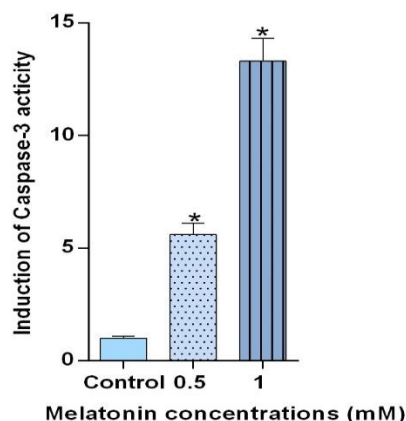


شکل ۴. بررسی تجمع گونه های فعال اکسیژن (ROS) داخل سلولی پس از تیمار با ملاتونین. سلول ها با غلظت های ۰/۵، ۱ و ۲ میلی مولار از داروی ملاتونین به مدت ۲۴ ساعت انکوبه گردیدند و سپس میزان تجمع ROS داخلی سلولی با استفاده از کیت ارزیابی ROS سلولی بررسی شد. نتایج نشان داد که ملاتونین قادر است به صورت وابسته به دوز میزان ROS را در داخل سلول ها افزایش دهد. میانگین و انحراف معیار نتایج حاصل از سه ران کاری مختلف (mean ± SD) محاسبه و \*،  $P < 0.05$  نشان گر معنادار بودن از نظر آماری در مقایسه با نمونه کنترل بود.



شکل ۵. تاثیر ملاتونین در تغییر فعالیت رونویسی ژن های Bcl-2، survivin و Bax در سلول های NB4. سلول های NB4 با غلظت های ۰/۵، ۱ و ۲ میلی مولار از دارو به مدت ۲۴ ساعت تیمار و پس از ساخت cDNA از تکنیک qRT-PCR محاسبه شد. نتایج حاصل نشان داد متعاقب تیمار سلول ها با داروی ملاتونین، بیان ژن های Bcl-2 و survivin به صورت وابسته به دوز کاهش و بیان ژن Bax نیز

ساعت تیمار شده و میزان تغییر در فعالیت آنزیم کاسپاز ۳ اندازه گیری شد. پس از ۲۴ ساعت از تیمار دارویی سلول ها، ملاتونین به صورت وابسته به دوز و به ترتیب در دوزهای ۰/۵ و ۱ میلی مولار منجر به الفاء آنزیم کاسپاز ۳ به میزان ۵/۶ و ۱۳/۳ برابر شد (شکل ۳).



شکل ۳. بررسی فعالیت آنزیماتیک کاسپاز ۳ پس از تیمار با ملاتونین. سلول ها با غلظت های مورد نظر از داروی ملاتونین به مدت ۲۴ ساعت انکوبه گردیدند و سپس میزان تغییر در فعالیت آنزیم کاسپاز ۳ با اندازه گیری غلظت p-NA آزاد شده اندازه گیری شد. ملاتونین در دوزهای ۰/۵ و ۱ میلی مولار به ترتیب منجر به الفاء آنزیم کاسپاز ۳ به میزان ۵/۶ و ۱۳/۳ برابر شد. میانگین و انحراف معیار نتایج حاصل از سه ران کاری مختلف (mean ± SD) محاسبه و \*،  $P < 0.05$  نشان گر معنادار بودن از نظر آماری در مقایسه با نمونه کنترل بود.

ملاتونین تجمع گونه های فعال اکسیژن (ROS) را در سلول های NB4 القا می کند. ROS در تنظیم فیزیولوژی سلول نقش دارد؛ اما تجمع ROS در سلول ها می تواند منجر به الفاء مرگ سلولی شود. از آن جا که دارو ها ممکن است از طریق الفاء تولید ROS مسیر آپوتوز را تحریک کنند، لذا تصمیم گرفته شد تا در این مطالعه میزان تجمع ROS داخلی سلولی ارزیابی شود. برای این منظور متعاقب تیمار ۲۴ ساعته سلول های NB4 با غلظت های ۰/۵، ۱ و ۲ میلی مولار داروی ملاتونین، میزان ROS داخل سلولی ارزیابی شد. همان طور که در شکل ۴ مشاهده می شود ملاتونین قادر است به صورت وابسته به دوز میزان ROS را در داخل سلول ها افزایش دهد که سازگار با آپوتوز افزایش یافته در این سلول ها به صورت وابسته به دوز می باشد.

ملاتونین رونویسی ژن های Bcl-2 و survivin را کاهش و رونویسی ژن Bax را افزایش می دهد. فعال شدن مسیر آپوتوز اهمیت زیادی در بدخیمی ها دارد؛ به طوری که بیان تغییر یافته فاکتورهای آنتی آپوتوزی و پیش آپوتوزی می تواند با عود و یا رفتار تهاجمی در بدخیمی ها همراه باشد.



میلی مولار می تواند میزان رشد و زندهمانی سلول های ردهی HL-60 را کاهش دهد. به علاوه این گروه نشان دادند که ترکیب این دارو با سایر عوامل شیمی درمانی نظیر ATRA قادر است اثرات آن ها را تقویت کند [۲۷].

یکی از مکانیسم هایی که با کمک آن ها، دارو هایی با خاصیت ضد سرطان، می توانند منجر به کاهش بقاء سلول های سرطانی شود، تاثیر گذاری این داروها بر مسیر های آپوپتوتیک است. هنگامی که تعادل بین ژن های پیش برنده آپوپتوز و مهارکننده آن در سلولی برهم خورد، مسیر های آپوپتوتیک می توانند فعال و یا مهار شوند. پژوهش های زیادی نشان داده اند که دارو های شیمی درمانی با تاثیر گذاری بر ژن های خانواده پروتئین های Bcl-2 منجر به فعال شدن مسیر های آپوپتوزی در سلول های سرطانی می شوند. در واقع، بیان کاهش یافته ژن های آنتی آپوپتوتیک نظیر Bcl-2 و survivin در کنار بیان افزایش یافته ژن های پیش آپوپتوتیک نظیر Bax می تواند با فعال کردن پروتئین های نظیر کاسپاز منجر به القا آپوپتوز در انواع گوناگونی از سرطان ها شود [۲۸]. در این مطالعه، نتایج به دست آمده نشان داد که هورمون ملاتونین احتمالاً از طریق کاهش بیان ژن های مهارکننده آپوپتوز هم چون Bcl-2 و survivin همراه با افزایش بیان ژن Bax، ژن پیش برنده آپوپتوز، منجر به القاء آپوپتوز در سلول های مشتق شده از لو سمی پرومیلوسیتیک حاد شده است. هم چنین، ما دریافتیم که تیمار سلول های لو سمیک با این هورمون منجر به افزایش فعالیت آنزیماتیک کاسپاز ۳ نیز می شود. در همین راستا، مطالعه دیگری روی سلول های HL-60 نشان داده است که ملاتونین نه تنها از طریق کاهش بیان پروتئین آنتی آپوپتوتیک Bcl-2 سبب القای مرگ در سلول های HL-60 می شود، بلکه افزایش بیان پروتئین پیش آپوپتوتیک Bax نیز می تواند به عنوان مکانیسم دیگر دخیل در سایتوتوکسیسیته این دارو مطرح باشد [۲۹].

آپوپتوز یکی از پیچیده ترین سیستم های تنظیمی در سلول ها می باشد که طیف وسیعی از مداخلات داخلی در تنظیم آن دخالت دارند. این مسیر، توسط بسیاری از ژن ها، محصولات درون سلولی و هم چنین سیگنال های خارجی کنترل می شود. در بین تمامی تنظیم کننده های آپوپتوز، ROS، یک محصول حیاتی میتوکندریایی، نسبت به سایرین از اهمیت بیشتری برخوردار است. مطالعات گذشته نشان می دهند که ROS در حد متعادل، نمی تواند به سلول آسیبی بزند ولی چنانچه میزان تولید آن در درون سلول افزایش پیدا کند، با تاثیر گذاری روی ژن Bax و افزایش بیان آن، منجر به القاء آپوپتوز در سلول هدف می شود. این خاصیت، توسط بسیاری

به صورت وابسته به دوز افزایش می یابد. میانگین و انحراف معیار نتایج حاصل از سه ران کاری مختلف (mean ± SD) محاسبه و \*، (P < 0.05) نشانگر معنادار بودن از نظر آماری در مقایسه با نمونه کنترل بود.

## بحث و نتیجه گیری

ملاتونین فاکتوری اساسی در بدن است که تولید آن با سلامتی و کاهش کارسینوژنز در انسان ها و حیوانات همراه است [۱۹-۲۱]. ارزیابی های اپیدمیولوژیکی نشان می دهند که اختلال در ملاتونین ممکن است خطر ابتلا به تئوپلاسم های خونی را افزایش دهد. فرضیه ای مطرح شد مبنی بر این که کاهش تولید شبانه ملاتونین ممکن است خطر ابتلا به سرطان را در برخی بیماران توضیح دهد؛ زیرا اختلال در ساعت بیولوژیک بدن یکی از عواملی است که افراد را مستعد ابتلا به تئوپلاسم های خونی می کند. علاوه بر شیفتهای کاری شبانه ممکن است ترشح نرمال ملاتونین را مختل کرده و خطر ابتلا به تومور های میلوئیدی و لنفوم را افزایش دهد [۲۲، ۲۳]. مطالعه ای توسط Rana و همکارانش انجام گرفت که نشان داد سطوح پلاسمایی ملاتونین در بیماران مبتلا به لو سمی لنفوسیتی مزمن در مقایسه با افراد سالم با کاهش معنی داری همراه است و این کاهش در افرادی با شیفته کاری شبانه چشمگیرتر است [۲۴]. در مطالعه ای که توسط Parent و همکارانش انجام شد میزان ابتلا به لنفوم های غیرهوجکین در افرادی که در شیفته شب کار می کردند به میزان قابل توجهی بیشتر از افرادی بود که شیفته شب نداشتند [۲۵]. بنابراین این مطالعات مطرح می کنند که ترشح مختل ملاتونین یک فاکتور مهم در ابتلا به تئوپلاسم های خونی می باشد و ممکن است ملاتونین در جهت درمان بیماران مبتلا به بدخیمی مفید واقع شود. لذا در این مطالعه ما اثر ملاتونین را روی سلول های لو سمی پرومیلوسیتیک حاد مورد بررسی قرار دادیم.

نتایج به دست آمده از این مطالعه نشان می دهند که تیمار سلول های NB4 با ملاتونین با کاهش فعالیت متابولیک سلول ها به صورت وابسته به دوز و زمان همراه اند. علی رغم این که دوز های پایین ملاتونین در بازه ی زمانی کوتاه اثرات مهارکنندگی قابل توجهی نداشتند، با افزایش دوز و زمان تیمار سلول ها با دارو، فعالیت متابولیک سلول ها با کاهش چشمگیری همراه بود. در این راستا Nooshinfar و همکارانش مشخص کردند که ملاتونین قادر است زندهمانی و فعالیت متابولیک را در ردهی سلولی سرطان پستان MCF-7 کاهش دهد و به عنوان یک داروی مفید در کنار سایر عوامل شیمی درمانی نظیر آرسنیک تری اکسید مورد استفاده قرار بگیرد [۲۶]. در مطالعه ی دیگری که توسط Krestinina و همکارانش انجام شد، مشخص گردید که ملاتونین در غلظت ۱

یزشکی شهید بهشتی برای حمایت مالی از این مطالعه قدردانی می‌شود.

### منابع

- [1] Tallman MS, Altman JK. How I treat acute promyelocytic leukemia. *Blood* 2009; 114: 5126-5135.
- [2] Ferrara F, Schiffer CA. Acute myeloid leukaemia in adults. *The Lancet* 2013; 381: 484-495.
- [3] Rogaia D, Grignani F, Nicoletti I, Pelicci P. The acute promyelocytic leukemia-specific PML/RAR alpha fusion protein reduces the frequency of commitment to apoptosis upon growth factor deprivation of GM-CSF-dependent myeloid cells. *Leukemia* 1995; 9: 1467-1472.
- [4] Rowley J, Golomb H, Dougherty C. 15/17 translocation, a consistent chromosomal change in acute promyelocytic leukaemia. *The Lancet* 1977; 309: 549-550.
- [5] Wu J, Wong WW-L, Khosravi F, Minden MD, Penn LZ. Blocking the Raf/MEK/ERK pathway sensitizes acute myelogenous leukemia cells to lovastatin-induced apoptosis. *Cancer Res* 2004; 64: 6461-6468.
- [6] Pedersen-Bjergaard J, Andersen MK, Christiansen DH, Nerlov C. Genetic pathways in therapy-related myelodysplasia and acute myeloid leukemia. *Blood* 2002; 99: 1909-1912.
- [7] Antman KH. Introduction: the history of arsenic trioxide in cancer therapy. *The Oncologist* 2001; 6: 1-2.
- [8] Claustrat B, Brun J, Chazot G. The basic physiology and pathophysiology of melatonin. *Sleep Med Rev* 2005; 9: 11-24.
- [9] Srinivasan V, Spence DW, Pandi-Perumal SR, Trakht I, Cardinali DP. Therapeutic actions of melatonin in cancer: possible mechanisms. *Integr Cancer Ther* 2008; 7: 189-203.
- [10] Bonnefont-Rousselot D, Collin F. Melatonin: action as antioxidant and potential applications in human disease and aging. *Toxicology* 2010; 278: 55-67.
- [11] Reiter RJ, Tan DX, Fuentes-Broto L. Melatonin: a multitasking molecule. *Progress in brain research*. Elsevier 2010; 127-151.
- [12] Dauchy RT, Xiang S, Mao L, Brimer S, Wren MA, Yuan L, et al. Circadian and melatonin disruption by exposure to light at night drives intrinsic resistance to tamoxifen therapy in breast cancer. *Cancer Res* 2014; 74: 4099-4110.
- [13] Sainz RM, Mayo JC, Tan DX, León J, Manchester L, Reiter RJ. Melatonin reduces prostate cancer cell growth leading to neuroendocrine differentiation via a receptor and PKA independent mechanism. *The Prostate* 2005; 63: 29-43.
- [14] Alonso-González C, Menéndez-Menéndez J, González-González A, González A, Cos S, Martínez-Campa C. Melatonin enhances the apoptotic effects and modulates the changes in gene expression induced by docetaxel in MCF-7 human breast cancer cells. *Int J Oncol* 2018; 52: 560-570.
- [15] Song J, Ma S-J, Luo J-H, Zhang H, Wang R-X, Liu H et al. Melatonin induces the apoptosis and inhibits the proliferation of human gastric cancer cells via blockade of the AKT/MDM2 pathway. *Oncology reports* 2018; 39: 1975-83.
- [16] Li T, Yang Z, Jiang S, Di W, Ma Z, Hu W, et al. Melatonin: does it have utility in the treatment of hematological neoplasms? *Br J Pharmacol* 2018; 175: 3251-3262.
- [17] Lavrik IN, Golks A, Krammer PH. Caspases: pharmacological manipulation of cell death. *J Clin Invest* 2005; 115: 2665-2672.
- [18] Lee SH, Lee EH, Lee SH, Lee YM, Kim HD, Kim YZ. Epigenetic role of histone 3 lysine methyltransferase and demethylase in regulating apoptosis predicting the recurrence of atypical meningioma. *J Korean Med Sci* 2015; 30: 1157-1166.
- [19] Bonmati-Carrion MA, Arguelles-Prieto R, Martínez-Madrid MJ, Reiter R, Hardeland R, Rol MA, et al. Protecting the melatonin rhythm through circadian healthy light exposure. *Int J Mol Sci* 2014; 15: 23448-23500.
- [20] Tanaka T, Yasui Y, Tanaka M, Tanaka T, Oyama T, Rahman KW. Melatonin suppresses AOM/DSS-induced large bowel oncogenesis in rats. *Chem Biol Interact* 2009; 177: 128-136.
- [21] Sánchez-Barceló E, Mediavilla M, Tan D, Reiter RJ. Clinical uses of melatonin: evaluation of human trials. *Curr Med Chem* 2010; 17: 2070-2095.

از داروهای شیمی‌درمانی مورد استفاده قرار گرفته است. مطالعات نشان می‌دهند که برخی از داروهای شیمی‌درمانی هم‌چون دوکسوروبیسین، می‌توانند با تحریک افزایش تولید ROS منجر به القاء مرگ سلولی در سلول‌های سرطانی شوند. در این مطالعه هم‌راستا با افزایش بیان ژن Bax، نتایج حاصل نشان داد که احتمالاً ملاتونین نیز از طریق افزایش تولید ROS درون سلولی، منجر به افزایش ژن Bax می‌شود که این پروتئین پیش‌برنده آپوپتوز نیز از طریق شکستن کاسپاز ۳ منجر به القاء آپوپتوز در این رده سلولی لوسمی پرومیلوسیتیک حاد می‌شود. تولید ROS تو سط ملاتونین تنها به این یافته محدود نمی‌شود و مطالعات دیگر نیز نشان داده‌اند که در سلول‌های لوسمی لنفوبلاستیک حاد نیز ملاتونین از طریق تولید ROS منجر به القاء مرگ سلولی می‌شود [۳۰]. هم‌چنین، مطالعات دیگر صورت گرفته در سرطان سینه نیز نشان داده است که ملاتونین در این بدخیمی نیز از طریق افزایش ROS منجر به شکسته شدن کاسپاز ۳ و در نتیجه کاهش بقاء و تکثیر سلول‌های MCF-7 می‌شود [۲۶].

در مجموع، این مطالعه نشان می‌دهد که ملاتونین می‌تواند از طریق تغییر بیان ژن‌های مرتبط با آپوپتوز، فعال کردن کاسپاز، تجمع ROS داخل سلولی و در نهایت فعال کردن مسیر آپوپتوز اثرات سائتوتوکسیک خود را روی سلول‌های NB4 اعمال نماید. امید می‌رود با بررسی‌های آزمایشگاهی و کارآزمایی‌های بالینی بیش‌تری در زمینه سلامت و مکانیسم عمل دارو بتوان از ملاتونین به عنوان یک داروی مناسب برای درمان بیماران APL، چه به صورت منوتراپی و چه در ترکیب با سایر داروهای متداول استفاده نمود.  
محدودیت‌ها و پیشنهادات مطالعه:

یکی از محدودیت‌های مطالعه‌ی حاضر عدم ارزیابی پروتئین‌های Bcl-2، survivin و Bax به دلیل نبود امکانات وسترن بلاتینگ بود. پیشنهاد می‌شود که در مطالعات آینده متعاقب تیمار سلول‌ها با ملاتونین تغییرات در سطوح پروتئین‌های مذکور با استفاده از روش وسترن بلاتینگ مورد بررسی قرار گیرد. نتایج این مطالعه قابل تعمیم به سایر رده‌های سلولی نمی‌باشد و پیشنهاد می‌شود در تحقیقات آینده اثر این دارو بر رده‌های سلولی مختلف مورد ارزیابی قرار بگیرد.

### تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل طرح مصوب شورای پژوهشی کمیته پژوهشی دانشجویان دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی به شماره ثبت ۶۹۹۱۴/ص/۱۳۹۷ می‌باشد. از کمیته پژوهشی دانشجویان، و معاونت تحقیقات و فن‌آوری دانشگاه علوم

potential for breast cancer. *Biomed Pharmacother* 2016; 83: 456-465.

[27] Krestinina O, Fadeev R, Lomovsky A, Baburina Y, Kobyakova M, Akatov V. Melatonin Can Strengthen the Effect of Retinoic Acid in HL-60 Cells. *Int J Mol Sci* 2018; 19: 2873.

[28] Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 1998; 281: 1322-1326.

[29] Rubio S, Estévez F, Cabrera J, Reiter RJ, Loro J, Quintana J. Inhibition of proliferation and induction of apoptosis by melatonin in human myeloid HL-60 cells. *J Pineal Res* 2007; 42: 131-138.

[30] Büyükcavcı M, Özdemir Ö, Buck S, Stout M, Ravindranath Y, Savaşan S. Melatonin cytotoxicity in human leukemia cells: relation with its pro-oxidant effect. *Fundam Clin Pharmacol* 2006; 20: 73-79.

[22] Lahti TA, Partonen T, Kyrrönen P, Kauppinen T, Pukkala E. Night-time work predisposes to non-Hodgkin lymphoma. *Int J Cancer* 2008; 123: 2148-2151.

[23] Yong M, Nasterlack M, Messerer P, Oberlinner C, Lang S. A retrospective cohort study of shift work and risk of cancer-specific mortality in German male chemical workers. *Int Arch Occup Environ Health* 2014; 87: 175-183.

[24] Rana S, Shahid A, Ullah H, Mahmood S. Lack of association of the NPAS2 gene Ala394Thr polymorphism (rs2305160: G> A) with risk of chronic lymphocytic leukemia. *Asian Pac J Cancer Prev* 2014; 15: 7169-7174.

[25] Parent MÉ, El-Zein M, Rousseau MC, Pintos J, Siemiatycki J. Night work and the risk of cancer among men. *Am J Epidemiol* 2012; 176: 751-759.

[26] Nooshinfar E, Bashash D, Safaroghli-Azar A, Bayati S, Rezaei-Tavirani M, Ghaffari SH, et al. Melatonin promotes ATO-induced apoptosis in MCF-7 cells: Proposing novel therapeutic



## Cytotoxic and apoptotic effects of melatonin hormone on NB4 leukemic cells

Mahdieh Mehrpouri (Ph.D)<sup>1</sup>, Ramin Yousefpour (M.Sc)<sup>2</sup>, Ava Safaroghli-Azar (M.Sc)<sup>2</sup>, Davood Bashash (Ph.D)<sup>\*2</sup>  
1 - Student Research Committee, Department of Hematology and blood banking, School of Allied Medicine Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran  
2 - Dept. of Hematology and Blood banking, School of Allied Medical Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

\* Corresponding author. +98 21 22717504 d.bashash@sbmu.ac.ir

Received: 27 Oct 2019; Accepted: 21 Jan 2020

**Introduction:** Given to the fact that the high toxicity and side effects of chemotherapeutic drugs have limited their clinical use, it is not surprising that novel therapeutic drugs with less toxicity and more efficacy have entered into the novel protocols. Relatively, Melatonin, a main product of pineal gland, not only plays a key role in the regulation of circadian rhythm, but also exerts anti-proliferative and apoptotic effects on a wide range of tumors. The aim of this study was to evaluate the anti-proliferative and apoptotic effects of melatonin in acute promyelocytic leukemia-derived cell line NB4.

**Materials and Methods:** NB4 cells were exposed to the increasing concentrations of the melatonin drug (0.5, 1, and 2 mM). Subsequently, metabolic activity, induction of apoptosis, caspase-3 activity, ROS production and apoptosis-related target genes were investigated using MTT assay, Annexin-V/PI staining, caspase-3 activity kit, cellular ROS assay kit and RQ-PCR analysis, respectively.

**Results:** Our data delineated that melatonin resulted in the reduction of metabolic activity of NB4 cells in a dose- and time-dependent manner ( $P < 0.05$ ). Furthermore, melatonin increased the percentage of apoptotic cells ( $P < 0.05$ ) probably through induction of caspase-3 activity, increment in the intracellular level of ROS and alteration in the expression level of Bcl-2, survivin and Bax.

**Conclusion:** The results of this study clearly indicated the anti-leukemic effect of melatonin in NB4 cells and is a promising as a candidate drug in the treatment of APL.

**Keywords:** Melatonin, Apoptosis, Acute Promyelocytic Leukemia.