

## Evaluating the effect of lycopene on telomerase activity in the human leukemia cell line K562

Faezizadeh Z<sup>1\*</sup>, Mesbah-Namin SA<sup>2</sup>, Gharib A<sup>1</sup>, Saravani R<sup>3</sup>, Godarzi M<sup>4</sup>

1- Department of Laboratory Sciences, Faculty of Paramedicine, Islamic Azad University, Branch of Borujerd, Borujerd, I. R. Iran.

2- Department of Clinical Biochemistry, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, I. R. Iran.

3- Department of Clinical Biochemistry, Faculty of Medicine, University of Zahedan, I. R. Iran.

4- Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Branch of Borujerd, Borujerd, I. R. Iran.

Received April 8, 2012; Accepted July 11, 2012

### Abstract:

**Background:** Telomerase has been proposed as a novel and potentially selective target in cancer therapy. Many plant-derived products can induce apoptosis via telomerase inhibition. Lycopene (a carotenoid pigment) has been found to exhibit the various biological effects on different types of cancer cells, but its effect on telomerase activity has not been investigated. Therefore, this study aimed to examine the apoptosis-inducing effect of lycopene on human leukemia cell line K562, with particular emphasis on its effect on telomerase inhibition.

**Materials and Methods:** Anti-proliferative effect of lycopene at different doses (0-20 $\mu$ m) and time intervals (24-72 h) on K562 cells was evaluated using the 3-(4, 5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay. To measure apoptosis, the Hoechst 33342 staining method and flow cytometry were used. The telomerase activity was determined using the telomeric repeat amplification protocol (TRAP) and ELISA assay.

**Results:** The treatment of the K562 cells with lycopene dose-dependently resulted in a significant inhibition of cell growth and telomerase activity compared to the untreated cells. Furthermore, a positive correlation was found between telomerase inhibition and the induction of apoptosis in lycopene-treated K562 cells.

**Conclusion:** The results of this study suggest a novel mechanism in the anti-cancer activity of lycopene in human leukemia K562 cells and may provide a basis for the future development of anti-telomerase agents.

**Keywords:** K562 cells, Lycopene, Telomerase inhibition, Apoptosis, Survival

\* Corresponding Author.

Email: faezizadeh@gmail.com

Tel: 0098 916 965 6718

Fax: 0098 662 445 3013

Conflict of Interests: No

*Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences November, 2012; Vol. 16, No 5, Pages 398-405*

Please cite this article as: Faezizadeh Z, Mesbah-Namin SA, Gharib A, Saravani R, Godarzi M. Evaluating the effect of lycopene on telomerase activity in the human leukemia cell line K562. *Feyz* 2012; 16(5): 398-405.

## بررسی اثر لیکوپین بر میزان فعالیت آنزیم تلومراز در رده سلول لوسمی انسان K562

زهرا فائزی زاده<sup>۱\*</sup>، سید علیرضا مصباح نمین<sup>۲</sup>، امیر قریب<sup>۱</sup>، رامین سراوانی<sup>۳</sup>، مسعود گودرزی<sup>۴</sup>

خلاصه:

سابقه و هدف: آنزیم تلومراز به عنوان یک هدف ویژه و درمان جدید سرطان پیشنهاد گردیده است. بسیاری از ترکیبات گیاهی با مهار فعالیت آنزیم تلومراز می توانند باعث القا آپوپتوز شوند. لیکوپین یک کاروتنوئید است که اثرات بیولوژیکی مختلفی بر روی بسیاری از سلول های سرطانی نشان داده است، اما تاکنون اثر آن بر روی فعالیت آنزیم تلومراز بررسی نشده است. لذا، هدف از این مطالعه بررسی اثر لیکوپین در القا آپوپتوز با تاکید بر نقش آن در مهار فعالیت آنزیم تلومراز در رده سلول K562 می باشد.

مواد و روش ها: اثرات لیکوپین در جلوگیری از رشد و تکثیر در دوزهای مختلف (۰ تا ۲۰ میکرومولار) و در زمان های مختلف (۲۴ تا ۷۲ ساعت) به کمک تست MTT (دی متیل تiazول - دی فینل تترازولیم بروماید) تعیین گردید. برای اندازه گیری میزان آپوپتوز از رنگ آمیزی هوخست و تکنیک فلوسایتومتری استفاده شد. فعالیت آنزیم تلومراز نیز به روش TRAP-ELISA تعیین گردید. نتایج: سلول های K562 تیمار شده با لیکوپین در مقایسه با سلول های تیمار نشده کاهش معنی داری در رشد و فعالیت آنزیم تلومراز نشان دادند که به صورت وابسته به دوز بود. علاوه بر این، نتایج این مطالعه نشان داد که بین مهار فعالیت آنزیم تلومراز و القا آپوپتوز رابطه مستقیمی وجود دارد.

نتیجه گیری: این نتایج یک مکانیسم ضد سرطانی جدید از لیکوپین را نشان می دهد که ممکن است پایه ای برای تولید داروهای ضد تلومرازی در آینده باشد.

واژگان کلیدی: لوسمی انسانی، لیکوپین، مهار تلومراز، آپوپتوز، بقا

دو ماه نامه علمی - پژوهشی فیض، دوره شانزدهم، شماره ۵، آذر و دی ۱۳۹۱، صفحات ۴۰۵-۳۹۸

### مقدمه

تحقیقات نشان داده اند که مهار تلومراز منجر به کوتاه شدن طول تلومر شده و به دنبال آن آپوپتوز القاء می گردد [۱، ۲]. بنابراین تلومراز نه تنها یک مارکر برای تشخیص سرطان است، بلکه مهار آن ایده ای هدفمند برای تولید عوامل درمانی جدید است [۲، ۴]. بنابراین، محققان به دنبال کشف داروهای ضد سرطانی با خاصیت ضد تلومرازی هستند [۶-۴]. ترکیبات شیمیایی با فعالیت ضد تلومرازی، دارای اثرات جانبی بر روی سلول های طبیعی بدن نیز می باشند، بنابراین تحقیقات وسیعی در مورد ترکیبات گیاهی با خاصیت ضد تلومرازی انجام شده است. از جمله این ترکیبات گیاهی می توان به واگونین، کورکومین، سیلینین، گوسپیل، بوتین، ترکیبات پلی فنولیک چای سبز و عصاره جینسینگ اشاره نمود [۱۴-۷]. لیکوپین از نظر ساختمانی یک کاروتنوئید است که به طور عمده در گوجه فرنگی، هندوانه، گریپ فروت و زردآلو موجود می باشد. سال هاست که لیکوپین به عنوان یک داروی آنتی اکسیدان، ضد سرطان و ضد التهاب مورد توجه محققان قرار گرفته است. این ماده می تواند تکثیر سلول های سرطانی را در سلول های سرطانی با مکانیسم های مختلفی از جمله توقف چرخه سلولی، تاثیر بر روی برخی مسیرهای سیگنالینگ، مهار سایکلین D1 و تضعیف عملکرد فاکتور رشد شبه انسولین-۱ سرکوب نماید [۲۵-۱۵]. از آنجایی که سلول های K562 دارای فعالیت تلومرازی

تلومراز یک آنزیم DNA پلی مراز وابسته به RNA است که ردیف های تکراری تلومر TTAGGG را به انتهای کروموزوم های یوکاریوتیک اضافه می کند. از وظایف مهم تلومرها می توان به حفظ یکپارچگی کروموزومی، جلوگیری از اتصال انتهای کروموزوم ها به یکدیگر و جلوگیری از تخریب و بازآرایی کروموزوم ها اشاره نمود [۳-۱]. بر خلاف سلول های نرمال، سلول های سرطانی دارای فعالیت تلومرازی بالایی می باشند، به طوری که در ۹۰ درصد سلول های سرطانی از جمله رده سلول های لوسمی انسانی افزایش فعالیت تلومراز باعث نامیرایی و بدخیمی می شود [۷-۴].

<sup>۱</sup> مربی، گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد بروجرد

<sup>۲</sup> دانشیار، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس

<sup>۳</sup> استادیار، گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان

<sup>۴</sup> مربی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد بروجرد

\* نشانی نویسنده مسئول:

بروجرد، خیابان مدرس، ساختمان مرکزی دانشگاه آزاد اسلامی واحد بروجرد، گروه علوم آزمایشگاهی

تلفن: ۰۹۱۶ ۹۶۵۶۷۱۸

پست الکترونیک: faeizadeh@gmail.com

تاریخ دریافت: ۹۱/۱/۲۰ تاریخ پذیرش نهایی: ۹۱/۴/۲۱

بالایی هستند، هدف قرار دادن تلومراز در این سلول‌ها می‌تواند به‌عنوان یک استراتژی نوین درمانی مطرح گردد [۸،۳]. با توجه به اینکه در مورد اثر لیکوپین در مهار تلومراز در سلول‌های سرطانی تاکنون هیچ گونه گزارشی منتشر نشده است، لذا در این تحقیق به بررسی اثر لیکوپین در جلوگیری از رشد و تکثیر رده سلول لوسمی K562 با تاکید ویژه روی نقش آن در مهار فعالیت آنزیم تلومراز پرداخته می‌شود.

### مواد و روش‌ها

مواد

لیکوپین و تریپان بلو از شرکت سیگما خریداری شدند. کیت اندازه‌گیری فعالیت آنزیم تلومراز و کیت رنگ آمیزی Annexin/PI از شرکت Roche آلمان خریداری شد. محیط کشت سلولی RPMI 1640، آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین و استرپتومایسین و سرم جنینی گاوی (FBS) از شرکت گیبکو تهیه گردید. داروی Imatinib از شرکت Alexis Biochemicals آمریکا خریداری گردید.

### کشت رده سلولی K562 و تیمار سلول‌ها

رده سلول لوسمی انسان K562 از بانک سلولی انستیتو پاستور تهیه شد و مطابق روش Park و همکارانش کشت گردید [۸]. به‌طور خلاصه سلول‌ها در محیط کشت کامل RPMI-1640 حاوی ده درصد FBS غیرفعال و یک درصد آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین (۱۰۰۰۰ unit/ml) و استرپتومایسین (۱۰۰۰۰ µg/ml) کشت داده شدند و جهت رشد در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد، حاوی ۵ درصد دی‌اکسید کربن و ۹۵ درصد رطوبت قرار گرفتند. برای تهیه محلول استوک لیکوپین (۲ میلی‌مولار)، مقدار ۱/۰۷۳۸ میلی‌گرم لیکوپین در یک میلی‌لیتر حلال تتراهیدروفوران حل گردید. جهت تهیه غلظت‌های مورد آزمایش (۲/۵، ۵، ۱۰ و ۲۰ میکرومولار) محلول استوک به کمک محیط کشت کامل رقیق می‌گردید. در تمام آزمایشات سلول‌های تیمار نشده به‌عنوان کنترل منفی (گروه شاهد) در نظر گرفته شدند. اثر داروی Imatinib بر مهار رشد و تکثیر و همچنین اثرات ضد تلومرازی آن در سلول‌های K562 قبلاً گزارش شده است [۲۷،۲۶]. لذا در تمام آزمایشات انجام گرفته شده سلول‌های تیمار شده با غلظت یک میکرومولار Imatinib به‌عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شدند. به‌کمک تست MTT موثرترین غلظت Imatinib بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون، یک میکرومولار به‌دست آمد (اطلاعات نشان داده نشده است).

به‌دست آوردن اثر لیکوپین بر رشد و تکثیر سلول‌ها به کمک تست MTT پس از تیمار سلول‌ها با غلظت‌های مختلف لیکوپین (۰، ۲/۵، ۵، ۱۰ و ۲۰ میکرومولار) و انکوباسیون آنها در زمان‌های مختلف (۰-۷۲ ساعت) میزان رشد و تکثیر سلول‌ها به‌کمک روش Masmann مورد ارزیابی قرار گرفت. این روش بر اساس احیای نمک زرد MTT یا 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide به فورمازون نامحلول بنفش آبی رنگ است که این واکنش توسط میتوکندری سلول‌های زنده انجام می‌گیرد [۲۸]. به‌طور خلاصه، پس از پایان زمان انکوباسیون محلول MTT (۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در بافر PBS) به سلول‌ها اضافه شده و برای مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردیدند. پس از پایان انکوباسیون با افزودن حلال DMSO (۱۰۰ درصد) بلورهای نامحلول فورمازون حل شده و رنگ ارغوانی ایجاد گردید. شدت رنگ ایجاد شده با درصد زنده بودن سلول‌ها متناسب است. جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۷۰ نانومتر با استفاده از دستگاه ELISA reader اندازه‌گیری شد و درصد بقا سلولی (Viability) محاسبه گردید.

### رنگ‌آمیزی تریپان بلو برای شمارش سلول‌های زنده

این رنگ جزء رنگ‌هایی است که سلول‌های زنده قادر به مقاومت در برابر ورود آنها بوده، ولی در سلول‌های مرده، رنگ به راحتی به درون سلول راه یافته و در مورد تریپان بلو سیتوپلاسم سلول‌های مرده رنگ می‌گیرد که به کمک میکروسکوپ نوری قابل مشاهده است. جهت این آزمایش به ۲۰ میکرولیتر سوسپانسیون سلولی (سلول‌های تیمار شده با غلظت‌های مختلف لیکوپین، کنترل منفی و کنترل مثبت) مقدار ۲۰ میکرولیتر رنگ تریپان بلو (۰/۴ درصد) اضافه شد و بعد از ۵ دقیقه لام نئوبار تهیه گردید. در نهایت تعداد سلول‌های زنده در میلی‌لیتر محاسبه شد [۲۹].

### بررسی مورفولوژی هسته سلول‌های آپوپتوزی به روش فلورسنت

پس از تیمار سلول‌ها با غلظت‌های مختلف لیکوپین در طی ۲۴ ساعت سلول‌ها با بافر PBS شسته شدند و در محلول فرمالدئید یک درصد فیکس گردیدند. سپس به‌مدت ۲۰ دقیقه در متانول خالص قرار داده شدند. پس از سانتریفوژ متانول خارج گردید و سلول‌ها با بافر PBS شسته شدند. در نهایت محلول هوخست با غلظت نهایی ۰/۱۲ µg/ml به سلول‌ها اضافه شد و بعد از ۱۵ دقیقه مجدداً سلول‌ها با بافر PBS شسته شدند. سپس از نمونه‌ها اسلاید تهیه گردید و سلول‌ها از نظر نشانه‌های مورفو-لژیکی آپوپتوز توسط میکروسکوپ فلورسنت مورد بررسی قرار

#### آنالیز آماری

هر آزمایش ۳ بار تکرار گردید و نتایج به صورت  $\bar{X} \pm SD$  گزارش شد. داده‌ها با استفاده از آزمون آماری One Way ANOVA و با کمک نرم افزار SPSS مورد تجزیه و آنالیز قرار گرفت.

#### نتایج

نتایج حاصل از بررسی اثر لیکوپن بر رشد و تکثیر سلول‌های K562 تیمار سلول‌های K562 با غلظت‌های مختلف لیکوپن (۰، ۰/۵، ۱۰ و ۲۰ میکرومولار) در زمان‌های متفاوت (۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت) به کمک تست MTT نشان داد که با افزایش غلظت لیکوپن میزان رشد و تکثیر سلول‌های تیمار شده با لیکوپن کاهش می‌یابد. همان‌طور که در شکل شماره ۱ مشاهده می‌شود، میزان رشد سلول‌های تیمار شده با غلظت‌های متفاوت لیکوپن در مقایسه با گروه شاهد تفاوت معنی‌داری بعد از ۲۴ ساعت نشان می‌دهد ( $P=0/01$ ). درحالی‌که نتایج بدست آمده در ۲۴ ساعت در مقایسه با نتایج بدست آمده در ساعات ۴۸ و ۷۲ تفاوت معنی‌داری نشان نمی‌دهد ( $P=0/08$ ). بنابراین، زمان ۲۴ ساعت به‌عنوان موثرترین زمان اثر لیکوپن در نظر گرفته شد.

#### نتایج حاصل از رنگ‌آمیزی تریبان بلو

سلول‌ها پس از تیمار با غلظت‌های مختلف لیکوپن به کمک رنگ تریبان بلو رنگ‌آمیزی شدند و تعداد سلول‌های زنده در حضور غلظت‌های مختلف لیکوپن محاسبه گردید. نتایج در شکل شماره ۲ مشاهده می‌گردد. همان‌طور که در شکل مشاهده می‌شود با افزایش غلظت لیکوپن، تعداد سلول‌های زنده در مقایسه با گروه شاهد کاهش معنی‌داری یافته است ( $P=0/02$ ).

#### نتایج حاصل از رنگ‌آمیزی هوخست سلول‌های K562

بعد از تیمار سلول‌ها با غلظت‌های مختلف لیکوپن بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون سلول‌ها با رنگ هوخست رنگ‌آمیزی شدند و درصد سلول‌های آپوپتیک در هر اسلاید محاسبه شد. نتایج در شکل شماره ۳ نشان داده شده است. همان‌طور که در این شکل مشاهده می‌گردد، با افزایش غلظت لیکوپن، درصد سلول‌های آپوپتیک افزایش قابل ملاحظه‌ای می‌یابد ( $P=0/04$ )؛ به طوری‌که پس از تیمار سلول‌ها با غلظت ۲۰ میکرومولار لیکوپن درصد سلول‌های آپوپتوزی به حدود  $70/14 \pm 5/09$  درصد نسبت به گروه شاهد رسید.

گرفتند. سلول‌های آپوپتوزی با تغییرات مورفولوژیک هسته مانند قطعات کروماتین متراکم (ذرات شبیه دانه تسبیح) مشاهده گردیدند. درصد سلول‌های آپوپتوزی حداقل در ۳ اسلاید مجزا محاسبه گردید [۱۲۸].

#### بررسی وقوع آپوپتوز با روش فلوسایتومتری

با استفاده از کیت رنگ‌آمیزی AnnexinV/PI سلول‌ها از نظر وجود فسفاتیدیل سرین در سطح و نفوذپذیری سلولی به رنگ PI به کمک فلوسایتومتری بررسی شدند [۳۰]، که بر اساس دستور کار کیت مراحل رنگ‌آمیزی انجام گرفت.

#### اندازه‌گیری فعالیت تلومراز به کمک کیت PCR-ELISA

میزان فعالیت نسبی تلومراز در سلول‌های K562 تیمار شده با غلظت‌های مختلف لیکوپن، کنترل منفی و کنترل مثبت بر اساس دستور کار کیت اندازه‌گیری فعالیت تلومراز به روش PCR-ELISA انجام گرفت. به‌طور خلاصه با استفاده از معرف لیزات عصاره سلول به‌دست آمد. سپس عصاره سلول از نظر غلظت پروتئین مورد سنجش قرار گرفت [۳۱]. مقدار ۱ تا ۳ میکرولیتر عصاره سلولی (معادل ۰/۵ میکروگرم توتال پروتئین) در حضور پرایمرهای بیوتینه و نوکلئوتیدها به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شد و تکرارهای تلومری در انتهای این پرایمرها توسط آنزیم تلومراز موجود در عصاره سلولی ساخته شد. محصول تکرارهای تلومری به کمک واکنش PCR در حضور کنترل داخلی (IS) تکثیر یافت. محصول PCR پس از دناتورده شدن به دو بخش تقسیم گردید. به یک بخش پروب ویژه تکرارهای تلومری نشان‌دار شده با دیگوکسی‌ژنین و به بخش دیگر پروب ویژه کنترل داخلی نشان‌دار شده با دیگوکسی‌ژنین اضافه گردید. پس از هیبریداسیون محصول PCR با پروب‌های ویژه، هر کدام از بخش‌های مذکور به‌طور جداگانه به یکی از چاهک‌های ۹۶ خانه‌ای که با استرپتوآویدین پوشانده شده بودند، اضافه شد. محصول PCR بیوتینه به استرپتوآویدین ته چاهک اتصال یافت و سپس با استفاده از آنتی‌بادی بر علیه دیگوکسی‌ژنین کونژوگه با پراکسیداز شناسایی شد و در نهایت با اضافه کردن سوبسترای آنزیم (تترامتیل بنزیدین) محصول رنگی تشکیل گردید و جذب نوری آن با استفاده از دستگاه ELISA reader در طول موج ۴۵۰ نانومتر قرائت شد. میزان فعالیت تلومراز با شدت رنگ ایجاد شده متناسب بوده و بر اساس فرمول موجود در دستور کار کیت محاسبه گردید.

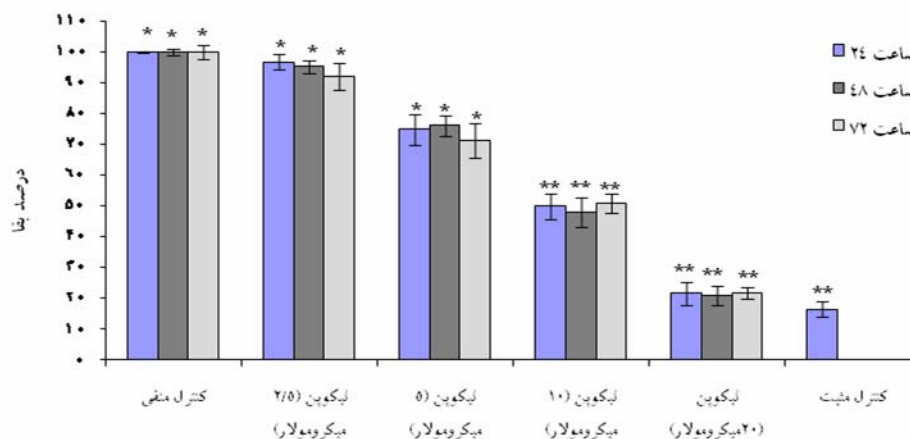
نتایج حاصل از فلوسایتومتری

در تایید نتایج به دست آمده از رنگ آمیزی هوخست، آنالیز فلوسایتومتری انجام گرفت. همان طور که در شکل شماره ۴ مشاهده می گردد با افزایش غلظت لیکوپین درصد سلول های زنده کاهش و درصد سلول های آپوپتوزی افزایش می یابد.

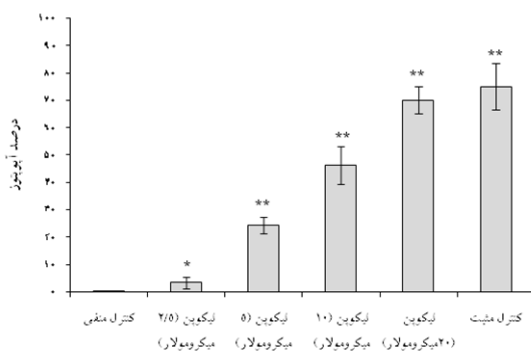
نتایج حاصل از اندازه گیری فعالیت تلومراز

بعد از تیمار سلول ها با غلظت های مختلف لیکوپین میزان

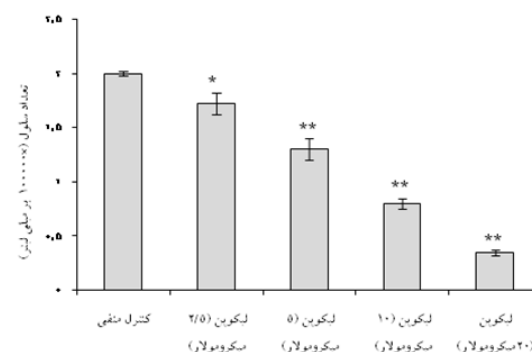
فعالیت نسبی تلومراز محاسبه گردید. همان طور که در شکل شماره ۵ مشاهده می گردد با افزایش غلظت لیکوپین، درصد فعالیت نسبی تلومراز در سلول های تیمار شده در مقایسه با سلول های شاهد کاهش قابل ملاحظه ای می یابد به طوری که پس از تیمار سلول ها با غلظت ۲۰ میکرومولار لیکوپین درصد فعالیت نسبی آنزیم تلومراز به حدود  $23/5 \pm 2/6$  درصد نسبت به گروه شاهد کاهش می یابد ( $P=0/001$ ).



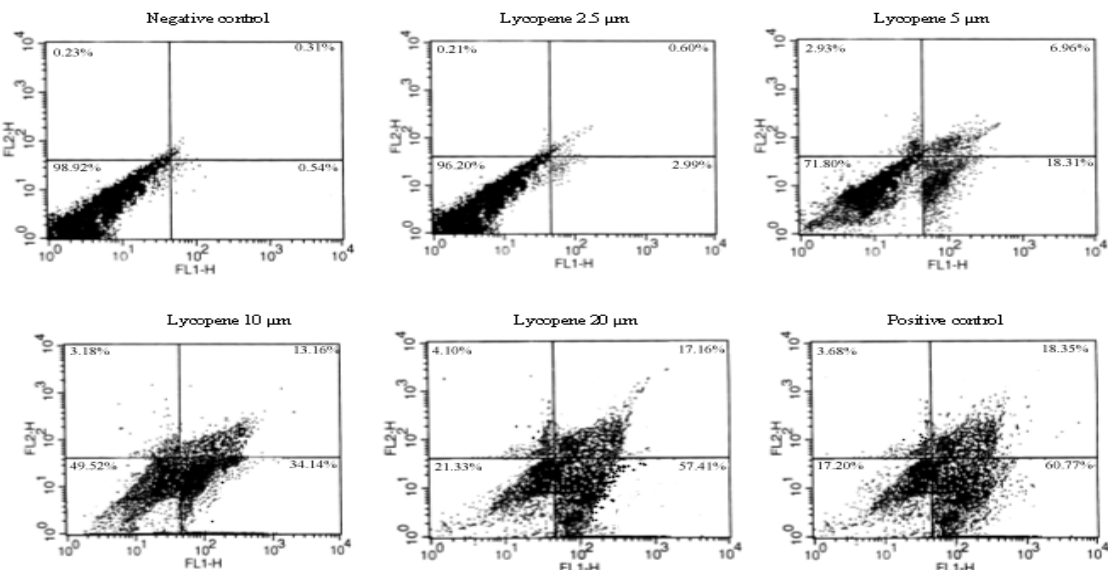
شکل شماره ۱- نتایج بررسی اثر غلظت های مختلف لیکوپین در زمان های متفاوت (۲۴، ۴۸، ۷۲ ساعت) بر رشد و تکثیر سلول های لوسمی K562 در مقایسه با گروه کنترل منفی به کمک تست MTT. [کنترل منفی سلول های تیمار نشده و کنترل مثبت سلول های تیمار شده با Imatinib می باشد ( $P < 0/001$  و  $P < 0/05$ )]



شکل شماره ۳- نتایج بررسی اثر غلظت های مختلف لیکوپین بر میزان آپوپتوز سلول های K562 بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون در حضور غلظت های متفاوت لیکوپین به کمک رنگ آمیزی هوخست H33342. کنترل منفی سلول های تیمار نشده و کنترل مثبت سلول های تیمار شده با Imatinib می باشد ( $P < 0/001$  و  $P < 0/05$ )

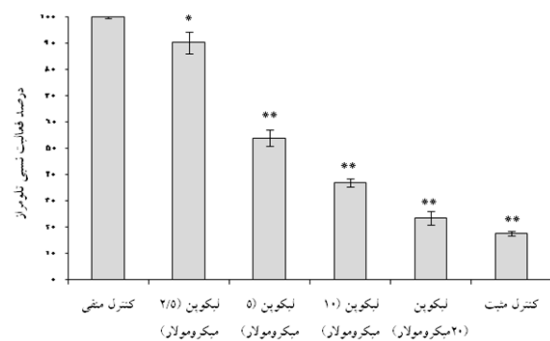


شکل شماره ۲- نتایج بررسی اثر غلظت های متفاوت لیکوپین بر تعداد سلول های K562 بعد از ۲۴ ساعت به کمک رنگ آمیزی تریپان بلو. کنترل منفی سلول های تیمار نشده و کنترل مثبت سلول های تیمار شده با Imatinib می باشد ( $P < 0/001$  و  $P < 0/05$ )



شکل شماره ۴- بررسی اثر غلظت‌های مختلف لیکوپن بر میزان آپوپتوز سلول‌های K562 بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون در حضور غلظت‌های متفاوت لیکوپن به کمک فلوسایتومتری. کنترل منفی سلول‌های تیمار نشده با لیکوپن و کنترل مثبت سلول‌های تیمار شده با Imatinib می‌باشد.

تلومراز می‌تواند به‌عنوان یک استراتژی درمانی نوید دهنده برای درمان سرطان پیشنهاد گردند. اگرچه به‌نظر می‌رسد که خواص ضد سرطانی لیکوپن مربوط به خواص آنتی‌اکسیدانی آن است، اما مطالعات نشان می‌دهند که مکانیسم‌های دیگری نیز ممکن است در این امر دخالت داشته باشند [۲۱، ۱۸]؛ که از جمله می‌توان به سرکوب چرخه سلولی و تعدیل مسیرهای سیگنالینگ اشاره نمود. مثلاً Hirsch و همکارانش نشان دادند که کاروتنوئیدها از جمله لیکوپن تکثیر سلول‌های سرطانی بدخیم را به‌وسیله مهار فعالیت ۱۷- بتا استرادیول سرکوب می‌نمایند [۲۰]. هم‌چنین Hwang و Bown نشان دادند که لیکوپن رشد سلول‌های سرطان پروستات انسانی LnCap را در فاز G2/M افزایش داده و در فاز S کاهش می‌دهد [۲۱]. تحقیقات انجام گرفته توسط Wang و Zhang نشان داد که لیکوپن می‌تواند در سلول‌های سرطان سینه MCF-7 باعث تضعیف عملکرد فاکتور رشد شبه انسولین-۱ (IGF-1) گردد و از پیشرفت فاز G0/G1 ممانعت نموده و نتیجه آن کاهش رشد سلول‌های سرطان سینه می‌باشد که یک مکانیسم جدید عملکرد لیکوپن را شرح می‌دهد [۲۲]. هم‌چنین، Kanagaraj و همکارانش شرح دادند که در سلول‌های سرطان پروستات لیکوپن می‌تواند سایکلین D1 را مهار کرده و نتیجه آن مهار پیشرفت فاز G0/G1 و القا آپوپتوز است [۲۳]. در رده سلول‌های سرطانی مورد مطالعه نظیر سلول‌های LNCap، PC-3، HT-29، HCT-116 و BEN اثرات لیکوپن از طریق کاهش بیان آنزیم HMG-CoA ردوکتاز و غیر فعال شدن مسیر سیگنالینگ Ras می‌باشد [۲۴]. هم‌چنین،



شکل شماره ۵- نتایج بررسی اثر لیکوپن بر میزان فعالیت نسبی تلومراز در سلول‌های K562 بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون در حضور غلظت‌های متفاوت لیکوپن به کمک رنگ‌آمیزی هوخست H33342. کنترل منفی سلول‌های تیمار نشده و کنترل مثبت سلول‌های تیمار شده با Imatinib می‌باشد ( $P < 0.05$  و  $P < 0.001$ ).

## بحث

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که لیکوپن می‌تواند رشد و تکثیر سلول‌های K562 را به‌صورت وابسته به دوز کاهش دهد. هم‌چنین، این تحقیق نشان داد که لیکوپن می‌تواند فعالیت آنزیم تلومراز را در رده سرطان لوسمی K562 مهار کند و بین مهار آنزیم تلومراز و القا آپوپتوز رابطه مستقیمی وجود دارد. ارتباط میان مهار تلومراز و القا آپوپتوز توسط ترکیبات طبیعی دیگر مانند ترکیبات پلی‌فنولیک چای سبز، کورکومین، گوسپیل، بوتین، سیلیبین، و اگونین و جینسینگ قبلاً گزارش شده است [۱۴-۷]. بنابراین، این ترکیبات و به‌ویژه لیکوپن، با هدف قرار دادن آنزیم

مطالعه قرار گيرد.

#### نتيجه گيرى

نتايج اين تحقيق نشان داد كه ليكوپن مى تواند در رده سلولى K562 خاصيت ضد تلومرازى داشته باشد، لذا مى توان آن را به عنوان يك كانديدای داروئى مؤثر در درمان لوسمى در كنار ساير داروهاى موجود استفاده قرار داد.

#### تشكر و قدردانى

اين مقاله حاصل از طرح پژوهشى بوده كه با حمايت مالى دانشگاه آزاد اسلامى واحد بروجرد به انجام رسيده است. بدین وسيله از مسئولين دانشگاه كه شرايط اجراى اين فعاليت پژوهشى را فراهم مى آورند، صميمانه تشكر و قدردانى مى گردد.

#### References:

- [1] Cheung AL, Deng W. Telomere dysfunction, genome instability and cancer. *Front Biosci* 2008; 13: 2075-90.
- [2] Phatak P, Burger AM. Telomerase and its potential for therapeutic intervention. *Br J Pharmacol* 2007; 152 (7): 1003-11.
- [3] Tian X, Chen B, Liu X. Telomere and Telomerase as Targets for Cancer Therapy. *Appl Biochem Biotechnol* 2010; 160 (5): 1460-72.
- [4] Parkinson EK, Minty F. Anticancer therapy targeting telomeres and telomerase: current status. *BioDrugs* 2007; 21(6): 375-85.
- [5] Harley CB. Telomerase and cancer therapeutics. *Nat Rev Cancer* 2008; 8(3): 167-79.
- [6] Nakajima A, Tauchi T, Sashida G, Sumi M, Abe K, Yamamoto K, et al. Telomerase inhibition enhances apoptosis in human acute leukemia cells possibility of antitelomerase therapy. *Leukemia* 2003; 17(3): 560-7.
- [7] Huang ST, Wang CY, Yang RC, Chu CJ, Wu HT, Pang JH. Wogonin, an active compound in *Scutellaria baicalensis*, induces apoptosis and reduces telomerase activity in the HL-60 leukemia cells. *Phytomedicine* 2010; 17 (1): 47-54.
- [8] Park SE, Park C, Kim SH, Hossain MA, Kim MY, Chung HY, et al. Korean red ginseng extract induces apoptosis and decreases telomerase activity in human leukemia cells. *J Ethnopharmacol* 2009; 121(2): 304-12.
- [9] Thelen P, Wuttke W, Jarry H, Grzmil M, Ringert RH. Inhibition of Telomerase Activity and Secretion of Prostate Specific Antigen by Silibinin in Prostate Cancer Cells. *J Urol* 2004; 171(5):

گزارش شده است كه يكي از مكانيسم‌هاى ضد سرطانى ليكوپن سر كوب پاسخ‌هاى التهاى است كه شامل مهار واسطه‌هاى پيش التهاى مانند كاهش ROS، مهار سنتز و رها شدن سيتوكاين‌هاى پيش التهاى، تغيير در بيان سيكلواكسيژناز و ليپواكسيژناز، تغيير سنتز ايكوزانوئيدها و تعديل مسيرهاى سيگنالينگ مى باشد [۲۵]. در اين مطالعه مشخص شد كه يكي ديگر از مكانيسم‌هاى اثر ليكوپن در مهار رشد و تكثير سلول‌هاى سرطانى مهار فعاليت آنزيم تلومراز است. طبق مطالعات انجام شده اثرات ضد تلومرازى تركيبات گياهى از طريق كاهش بيان ژن زير واحد كاتاليتيك آنزيم تلومراز (hTERT) مى باشد و سر كوب بيان اين ژن موجب كاهش بيوستنز و فعاليت آنزيم تلومراز خواهد شد [۱۴-۷]. احتمالاً ليكوپن نيز با همين مكانيسم اثرات ضد تلومرازى خود را اعمال مى نمايد؛ هر چند كه نياز است مكانيسم اثرات ضد تلومرازى آن در آينده در سلول‌هاى K562 و ساير رده‌هاى سلول سرطانى مورد

- 1934-8.
- [10] Wang X, Hao MW, Dong K, Lin F, Ren JH, Zhang HZ. Apoptosis Induction Effects of EGCG in Laryngeal Squamous Cell Carcinoma Cells through Telomerase Repression. *Arch Pharm Res* 2009; 32 (9): 1263-9.
- [11] Lin SC, Li WC, Shih JW, Hong KF, Pan YR, Lin JJ. The tea polyphenols EGCG and EGC repress mRNA expression of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) in carcinoma cells. *Cancer Lett* 2006; 236 (1): 80-8.
- [12] Chakraborty S, Ghosh U, Bhattacharya NP, Bhattacharya RK, Roy M. Inhibition of telomerase activity and induction of apoptosis by curcumin in K-562 cells. *Mutat Res* 2006; 596 (1-2): 81-90.
- [13] Moon DO, Kim MO, Choi YH, Lee HG, Kim ND, Kim GY. Gossypol suppresses telomerase activity in human leukemia cells via regulating hTERT. *FEBS Lett* 2008; 582 (23-24): 3367-73.
- [14] Moon DO, Kim MO, Lee JD, Choi YH, Kim GY. Butein suppresses c-Myc-dependent transcription and Akt-dependent phosphorylation of hTERT in human leukemia cells. *Cancer Lett* 2009; 286(2): 172-9.
- [15] Konijeti R, Henning S, Moro A, Sheikh A, Elashoff D, Shapiro A, et al. Chemoprevention of prostate cancer with lycopene in the TRAMP model. *Prostate* 2010; 70 (14): 1547-54.
- [16] Heber D. Colorful cancer prevention:  $\beta$  carotene, lycopene, and lung cancer. *Am J Clin Nutr* 2000; 72(4): 901-2.
- [17] Karas M, Amir H, Fishman D, Danilenko M, Segal S, Nahum A, et al. Lycopene interferes with

cell cycle progression and insulin-like growth factor I signaling in mammary cancer cells. *Nutr Cancer* 2000; 36(1): 101-11.

[18] Sahin K, Sahin N, Kucuk O. Lycopene and chemotherapy toxicity. *Nutr Cancer* 2010; 62(7): 988-95.

[19] Sharoni Y, Danilenko M, Levy J. Molecular Mechanisms for the Anticancer Activity of the Carotenoid Lycopene. *Drug Develop Res* 2000; 50 (3-4): 448-56.

[20] Hirsch K, Atzmon A, Danilenko M, Levy J, Sharoni Y. Lycopene and other carotenoids inhibit estrogenic activity of 17beta-estradiol and genistein in cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 2007; 104 (2): 221-30.

[21] Hwang ES, Bowen PE. Effects of lycopene and tomato paste extracts on DNA and lipid oxidation in LNCaP human prostate cancer cells. *Biofactors* 2005; 23(2): 97-105.

[22] Wang AH, Zhang LS. Effect of lycopene on the proliferation of MCF-7 and MDA-MB-231 cells. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 2007; 38(6): 958-60.

[23] Kanagaraj P, Vijayababu MR, Ravisankar B, Anbalagan J, Aruldas MM, Arunakaran J. Effect of lycopene on insulin-like growth factor-I, IGF binding protein-3 and IGF type-I receptor in prostate cancer cells. *J Cancer Res Clin Oncol* 2007; 133(6): 351-9.

[24] Palozza P, Colangelo M, Simone R, Catalano A, Boninsegna A, Lanza P, et al. Lycopene induces cell growth inhibition by altering mevalonate

pathway and Ras signaling in cancer cell lines. *Carcinogenesis* 2010; 31(10): 1813-21.

[25] Palozza P, Parrone N, Catalano A, Simone R. Tomato lycopene and inflammatory cascade: basic interactions and clinical implications. *Curr Med Chem* 2010; 17(23): 2547-63.

[26] Mor-Tzuntz R, Uziel O, Shpilberg O, Lahav J, Raanani P, Bakhanashvili M, Rabizadeh E, Zimra Y, Lahav M, Granot G. Effect of imatinib on the signal transduction cascade regulating telomerase activity in K562 (BCR-ABL-positive) cells sensitive and resistant to imatinib. *Exp Hematol* 2010; 38(1): 27-37.

[27] Chai JH, Zhang Y, Tan WH, Chng WJ, Li B, Wang X. Regulation of hTERT by BCR-ABL at multiple levels in K562 cells. *BMC Cancer* 2011; 11: 512-28.

[28] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Meth* 1983; 65 (1-2): 55-63.

[29] Sarma KD, Ray D, Antony A. Improved sensitivity of trypan blue dye exclusion assay with Ni<sup>2+</sup> or Co<sup>2+</sup> salts. *Cytotechnology* 2000; 32 (2): 93-5.

[30] Darzynkiewicz Z, Bedner E, Smolewski P. Flow cytometry in analysis of cell cycle and apoptosis. *Semin Hematol* 2001; 38 (2):179-93.

[31] Barford MM. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-54.