دوماهنامه طبّ جنوب
پژوهشکده زیست-پزشکی خلیج فارس
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر
سال هجدهم، شماره ۱، صفحه ۱۳۴ - ۱۲۵ (فروردین و اردیبهشت ۱۳۹۴)

ISMJ 2015; 18(1): 125-134

توقف سلول‌های سرطانی رده K562 در فاز G_0/G_1 چرخه سلولی توسط دو گونه از گیاهان تیره دافنه

منیژه میان‌آبادی [۱]، اسماعیل پناهی [۱]، هیبت‌الله صادقی [۲*]، عزیزالله جعفری [۳]

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

(دریافت مقاله: ۹۲/۱۲/۴- پذیرش مقاله: ۹۳/۲/۱۷)

چکیده

زمینه: امروزه از گیاهان خانواده دافنه (تیمه لئاسه) علیه میکروارگانیسم‌ها و سلول‌های سرطانی استفاده می‌شود. هدف از این مطالعه بررسی اثرات دو گونه دافنه و ترکیبات خالص شده بتولین و بتولینیک اسید موجود در این دو گونه بر ژنوم و چرخه سلولی سلول‌های رده K562 است.

مواد و روش‌ها: این مطالعه تجربی به‌صورت تصادفی با سه تکرار انجام گرفت. تعداد ۱۰۶ سلول رده K562 با عصاره گیاهان دافنه ماکروناتا، دافنه الوئیده و ترکیبات بتولین و بتولینیک اسیدی برای ۲۴ ساعت تیمار شدند. سپس، سلول‌ها توسط اتانول ۷۰ درصد تثبیت گردید و ۳۰ دقیقه قبل از آنالیز توسط دستگاه فلوسیتومتری با پروپدیوم یدید رنگ شد. جهت استخراج DNA سلول‌های سرطانی، از روش نمکی میلر با کمی تغییرات استفاده شد. داده‌ها با آزمون‌های آماری آنالیز واریانس و دانت توسط نرم‌افزار SPSS ویرایش ۱۶ تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: درصد توقف سلول‌های سرطانی در فاز G_0/G_1 تحت تیمار با دافنه ماکروناتا (۱/۱۶±۵۹/۱۱ درصد)، دافنه الوئیده (۱,۰۳±۵۸,۲۵ درصد)، ترکیبات بتولین (۰/۴۳±۵۱/۶۸ درصد) و بتولینیک اسید (۰/۳۱±۵۲/۰۵ درصد) نسبت به کنترل (۰/۲۳ ±۴۲/۹۴ درصد) افزایش نشان داد. این در حالی بود که بیشترین درصد سلول‌های کنترل در فار S (۰,۱۶±۵۱,۰۶) بودند. الکتروفورز ژنوم سلول‌های K562 نشان داد که باند DNA سلول‌های تحت تیمار گیاهی کشیده و ممتد و در کنترل بدون کشیدگی است. بیشترین حالت کشیدگی باند DNA در اثر بتولین و کمترین آن در تیمار دافنه ماکروناتا مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: داده‌ها نشان داد که مواد گیاهی دافنه باعث مهار چرخه سلولی در فاز G_1 و آسیب به DNA می‌گردند. در واقع این نتایج نشان می‌دهد که چندین عامل مؤثر در مواد گیاهی دافنه وجود دارند که به DNA آسیب می‌رسانند و در نهایت عبور سلول از نقطه کنترل، مهار و در غلظت‌های بالاتر مرگ سلولی تسهیل می‌گردد.

واژگان کلیدی: دافنه الوئیده، دافنه ماکروناتا، توقف چرخه سلولی، بتولین، بتولینیک اسید، فرگمانتاسیون DNA

* یاسوج، دانشگاه علوم پزشکی، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی

E-mail: sadeghi.ha@yums.ac.ir

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-02-14]

مقدمه

در طی هزاران سال، اهمیت دارویی گیاهان به‌خوبی اثبات شده‌است (۱ و ۲). تعدادی ازگیاهان خانواده دافنه یا تیمه لئاسه (Thymelaeaceae) در بین این گیاهان داروئی قرار گرفته‌اند. از این خانواده میتوان به جنس دافنه اشاره کرد که بیش از ۵۰ گونه گیاهی دارد.

گونه‌های مختلف گیاهان تیره دافنه در بسیاری از کشورها به‌ویژه آمریکای جنوبی، آسیا، اروپا و حوالی دریای مدیترانه انتشار دارند (۳). گونه‌های مختلف این تیره از زمان‌های گذشته برای درمان بیماری‌های روماتیسمی، درد مفاصل، بیماری‌های پوستی، برخی از انواع سرطان و غیره مورد استفاده قرار می‌گرفتند. در طب سنتی کشور ترکیه، از پوست و میوه گونه‌ای دافنه بنام مازریوم برای درمان زخم‌ها، روماتیسم و از بخش‌های هوایی گونه دیگری بنام دافنه الوئیده (Daphne oleides) برای درمان آرتریت و کمردرد استفاده می‌گردد (۴). در واقع، اثرات درمانی گیاهان به دلیل توانایی آن‌ها در تولید انواع مختلف متابولیت‌های ثانویه‌است. تاکنون ترکیبات مختلفی از گونه‌های مختلف گیاهان تیره دافنه استخراج، تخلیص و شناسایی شده است. بتولین (Betulin) یک تری‌ترپن طبیعی موجود در گیاهان جنس دافنه است، که خاصیت ضد توموری آن در برخی از انواع سرطان‌ها تأیید شده است. بتولین می‌تواند به بتولینیک اسید (Betulinic acid) تبدیل گردد که از نظر زیستی ترکیبی فعال‌تر از بتولین است. بتولینیک اسید یک تری‌ترپنوئید پنتاسیکلیک طبیعی است که دارای خواص ضد ویروسی، ضد التهاب و ضد مالاریا می‌باشد. همچنین اثبات شده که این ترکیب به‌طور بالقوه دارای خاصیت ضد سرطانی است (۵ و ۶).

لوسمی یکی از چهار سرطان شایع در جوامع بشری به‌ویژه در میان کودکان است. لوسمی میلوئیدی مزمن یکی از شناخته شده‌ترین انواع لوسمی است. بعد از گذشت چند سال، بیماری به سرعت پیشرفت می‌کند و به لوسمی حاد تبدیل می‌شود. حدودا سه درصد از مرگ ومیرهای ناشی از سرطان در زنان و مردان مبتلایان به سرطان لوسمی میلوئیدی مزمن است. (۷ و ۸). با توجه به اینکه سلول‌های سرطانی مدام در حال تکثیر هستند می‌توان گفت که میزان زیادی از این سلول‌ها در فاز S و مشغول سنتز DNA می‌باشند. اما وقتی به ماهیت سلول‌های طبیعی توجه شود انتظار می‌رود که درصد بسیار بالایی از این سلول‌ها در فازهای G_0/G_1 باشند زیرا یا نیازی به تکثیر دائم یعنی سنتز DNA آن‌ها نیست یا اینکه به‌طور موقت یا دائم وارد فاز استراحت G_0 شده‌اند و از سنتز DNA صرف‌نظر کرده‌اند. به هر حال درصد سلول‌ها در هر مرحله‌ای از چرخه سلولی به کمک دستگاه فلوسیتومتری قابل تشخیص است (۱۲-۹).

با توجه به اینکه یکی از روش‌های درمان سرطان‌ها جلوگیری از پیشرفت آن‌ها در فاز های مختلف چرخه سلولی و یا مرگ سلول‌های سرطانی است، هدف این مطالعه بررسی تأثیر عصاره دونوع گیاه از گونه دافنه بر رده سلول‌های سرطانی K562 می‌باشد. همچنین با توجه به اینکه بتولین و بتولینیک اسید از مشهورترین ترکیبات شناسایی شده در این خانواده گیاهی می‌باشد تأثیر این دو ترکیب بر مورفولوژی، چرخه سلولی و قطعه قطعه شدن DNA مورد ارزیابی قرارگرفت.

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-02-14]

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری گیاه

گیاهان دافنه الوئیده (Daphne oleides) و دافنه ماکروناتا (Daphne mucronata) در انتهای فصل بهار از دامنه‌های دنا در استان کهگیلویه و بویراحمد جمع‌آوری شد. اندام‌های هوایی آن‌ها در سایه به دور از نور مستقیم خورشید خشک شد. برگ‌ها از ساقه جدا و آسیاب و پودر گردید و تا هنگام استفاده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (۱۳ و ۱۴).

عصاره‌گیری الکلی

عصاره‌گیری به‌روش ماسراسیون انجام شد. به این صورت که ۵۰ گرم از پودر برگ گیاهان دافنه الوئیده و دافنه ماکروناتا بطور جداگانه در ۸۰۰ میلی‌لیتر اتانول ۷۰ درصد به‌مدت ۴۸ ساعت در دمای اتاق خیسانده و عصاره‌گیری انجام شد. این عمل سه بار تکرار گردید. عصاره به‌دست آمده توسط دستگاه تقطیر در خلاءتغلیظ و در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد انکوباتور خشک گردید. عصاره به‌دست آمده در آب مقطر استریل حل و توسط فیلتر ۰/۲ میکرون صاف و تا زمان نیاز فریز شد (۱۵). ترکیبات بتولین و بتولیک اسید نیزاز شرکت مرک خریداری گردید.

جهت بررسی توقف رشد سلول در فازهای مختلف چرخه سلولی در این آزمایش، از ظروف پتری استریل (۸ سانتی‌متری) استفاده شد. تعداد 5×10^5 سلول رده K562 که از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران خریداری شده بود پس از ۳ تا ۴ بار پاساژ سلول‌ها در ۸ میلی‌لیتر محیط کشت RPMI-1640 غنی شده با سرم جنین گاوی (FBS) ۱۰درصد و آنتی‌بیوتیک‌های استرپتومایسین (۱۰۰ میکرگرم بر میلی‌لیتر) و پنی‌سیلین ۱۰۰ (واحد بر میلی‌لیتر) در هر پتری ریخته شد. سپس به‌مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد CO_2 انکوبه گردید. بعد از این مدت سلول‌ها با دوزهای عصاره الکلی دافنه الوئیده ۰/۵۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)، دافنه ماکروناتا (۰/۵۷ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)، بتولین (۵/۸ نانومولار) و بتولینیک اسید (۷/۲ نانومولار) برای ۲۴ ساعت تیمار شدند (۱۴).

سپس، سلول‌ها با بافر فسفات سالین (۰/۸ گرم سدیم کلرید، ۰/۲ گرم پتاسیم کلرید، ۱/۴۴ گرم هیدروژن فسفات دی سدیم و ۰/۲۴ گرم دی‌هیدروژن فسفات پتاسیم) شسته شدند. سلول‌های هر پلیت در ۲۰۰ میکرولیتر بافر فسفات سالین سوسپانس گردید. برای تثبیت شدن سلول‌ها ۴ میلی‌لیتر اتانول ۷۰ درصد به آن اضافه شد. سلول‌ها به‌مدت ۲ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. در نهایت، نمونه‌ها برای نگهداری طولانی مدت تا زمان آنالیز به فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. نمونه‌های کنترل به همراه نمونه‌های گروه تیمار به مدت ۳۰ دقیقه با محلول ۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر پروپودیوم یدید (PI) حاوی ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر RNase تیمار و با دستگاه فلوسیتومتری مدل (BD FACSCalibur) آنالیز گردید. درصد سلول‌ها در فازهای G2/M ،S ،G2/M ،S ،G0/G1 با استفاده ار نرم‌افزارهای دستگاه محاسبه شدند (۹).

بررسی تغییرات مورفولوژی

برای بررسی تغییرات مورفولوژی، به هرخانه‌ی پلیت کشت ۲۴ خانه‌ای، ۲ میلی‌لیتر محیط کشت

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-02-14]

کامل RPMI ۱۶۴۰ حاوی ۱۰ درصد بافر فسفات سالین و ۱۰۵ سلول رده K562 اضافه شد. پس از ۲۴ ساعت، سلول‌ها با دوزهای مؤثری که قبلاً ذکر شد تیمار گردیدند. ۴۸ ساعت پس از تیمار، تغییرات مورفولوژی سلول‌ها با کمک میکروسکوپ فاز معکوس با بزرگ‌نمایی X_{40} بررسی شد (۱۶).

استخراج DNA

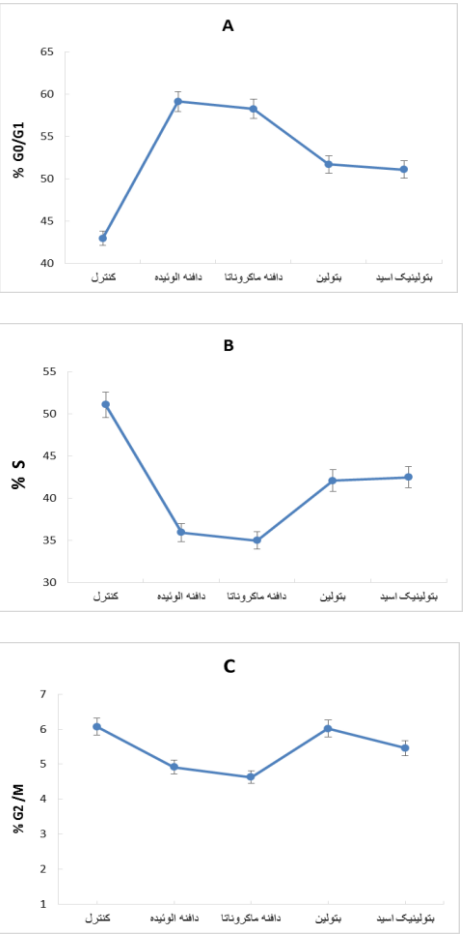
جهت استخراج DNA از سلول‌های سرطانی رده K562، از روش نمکی میلر با کمی تغییرات استفاده گردید. در این روش از دو بافر لیز کننده‌ی سلول (یک درصد Triton-X-100، MgCl2 یک مولار و Tris HCl نیم مولار با pH برابر هشت) و لیزکننده هسته (EDTA بیست و پنج صدم مولار، ده درصد SDS، Tris HCl نیم مولار با pH برابر هشت) استفاده شد (۱۷). ۵۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی حاوی ۱۰۶ سلول تیمار شده و کنترل در بافر فسفات سالین، به لوله اپندرف ۱/۵ میلی‌لیتری انتقال یافت. ۵۰۰ میکرولیتر از بافر لیزکننده‌ی سلول به سوسپانس سلولی اضافه و به‌مدت ۲ دقیقه در دمای محیط انکوبه شد. سپس به‌مدت ۲ دقیقه سانتریفوژ و مایع‌رویی آن خارج گردید. رسوب حاصل در ۳۰۰ میکرولیتر بافر لیز کننده هسته در دمای محیط انکوبه شد. به مخلوط حاصل ۱۲۰ میکرولیتر شش مولار نمک طعام اضافه و به آرامی ورتکس گردید. این امولسیون به‌مدت ۵ دقیقه با ۴۰۰۰ دور در ذقیقه سانتریفوژ شد و سه فاز مختلف در تیوب حاصل گردید. ۳۰۰ میکرولیتر از فاز رویی به تیوب دیگری منتقل شد. سپس ۶۰۰ میکرولیتر اتانول خالص به تیوب جدید اضافه شد. محتوای تیوب چند بار و به آرامی سر و ته شد، در این حالت DNA به‌صورت رشته‌هایی در هم رفته ظاهر می‌گردد. سپس این محلول به‌مدت ۵ دقیقه با ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. رسوب حاصل با اتانول ۷۰ درصد شستشو و سپس در ۵۰ میکرولیتر بافر نگهدارنده DNA حل گردید. وجود یا عدم وجود شکستگی در DNAی استخراج شده از سلول‌های تحت تیمار و کنترل توسط الکتروفورز روی ژل آگارز ۲ درصد تعیین شد (۱۸ و ۱۹). بعد از جمع‌آوری داده‌ها، تجزیه و تحلیل توسط نرم‌افزار آماری SPSS (SPSS Inc، Chicago، Il، USA) ویرایش ۱۶ با استفاده از آزمون‌های آماری آنالیز واریانس و دانت انجام شد.

یافته‌ها

بررسی توقف رشد سلولی

در این بررسی درصد سلول‌ها در هر کدام از فازهای سلولی در سلول‌های کنترل K562 (سلول‌های سرطانی) محاسبه و با سلول‌های تیمار شده مقایسه گردید. نتایج نشان داد که تیمارهای گیاهی موجب افزایش درصد سلول‌های موجود در فاز G_1 و کاهش درصد سلول‌ها در فاز S گردید. اما بر تعداد سلول‌ها در فاز G_2/M تأثیر چندانی نداشت (نمودار ۱ و جداول ۱ و ۲). به‌عبارت بهتر بیشتر سلول‌های تیمار شده در فاز G_0/G_1 چرخه سلولی متوقف شده بودند (شکل ۱). در این بین بیشترین افزایش درصد سلول‌ها در فاز G_0/G_1 مربوط به تیمار دافنه الوئیده و کمترین افزایش مربوط به بتولینیک اسید بود.

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-02-14]



نمودار ۱) تغییرات تعداد سلول‌های K562 در فازهای مختلف چرخه سلولی تحت تیمارها با عصاره دافنه الوئیده، دافنه ماکروناتا، بتولین و بتولینیک اسید. درصد سلول‌های موجود در فاز G_0/G_1 (**A**)، فاز **S** (**B**)، و از G_2/M (C) با کمک دستگاه فلوسیتومتری به‌دست آمد. تغییرات درصد سلول‌های تیمار شده در فاز $G_0/G1$ و **S** نسبت به کنترل در سطح کمتر از یک درصد، تفاوت معنی‌داری را نشان می‌دادند. اما در تعداد سلول‌های تیمار شده موجود در فاز G_2 نسبت به کنترل تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد.

جدول ۱) آنالیز واریانس چند متغیره براساس آماره لاندای ویلکس به منظور بررسی اثر تیمارها و رده سلولی بر روی فازهای مختلف چرخه سلولی در رده K562

منبع تغییر	درجه آزادی اول	درجه آزادی دوم	مقدار F
رده سلولی	۲۱	۱۲	0.011633**

**در سطح کمتر از ۱ درصد معنی‌دار است.

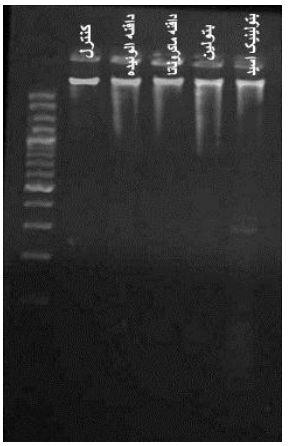
جدول ۲) آنالیز واریانس داده‌های مربوط به توقف سلول‌ها در فازهای مختلف رشد چرخه سلولی (طرح آشیانه‌ای)

منبع تغییر	درجه آزادی (دوم)	(میانگین مربع توان) فاز G_0 (دوم)	(میانگین مربع توان) فاز S (دوم)	میانگین مربع توان فاز G_2/M
تیمارهای سلولی	۴	۱۲۵/۰۱**	۱۱۰/۲۵**	۱/۲۵

**در سطح کمتر از ۱ درصد معنی‌دار است.

آزمون قطعه‌قطعه شدن DNA

برای بررسی اثر تیمارهای گیاهی بر تحریک آپوپتوز از آزمون بررسی قطعه قطعه شدن DNA استفاده شد. از الکتروفورز DNA سلول‌های K562 تیمار شده با گیاه دافنه الوئیده (۰/۴۷ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)، گیاه دافنه ماکروناتا (۰/۵۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)، بتولین (۳/۵ نانومولار) و بتولینیک اسید (۶/۲۵ نانو مولار) یک باند کشیده و امتداد یافته به‌دست آمد. اما DNA سلول‌های کنترل دارای باند تیز و بدون دنباله بود (شکل ۱).



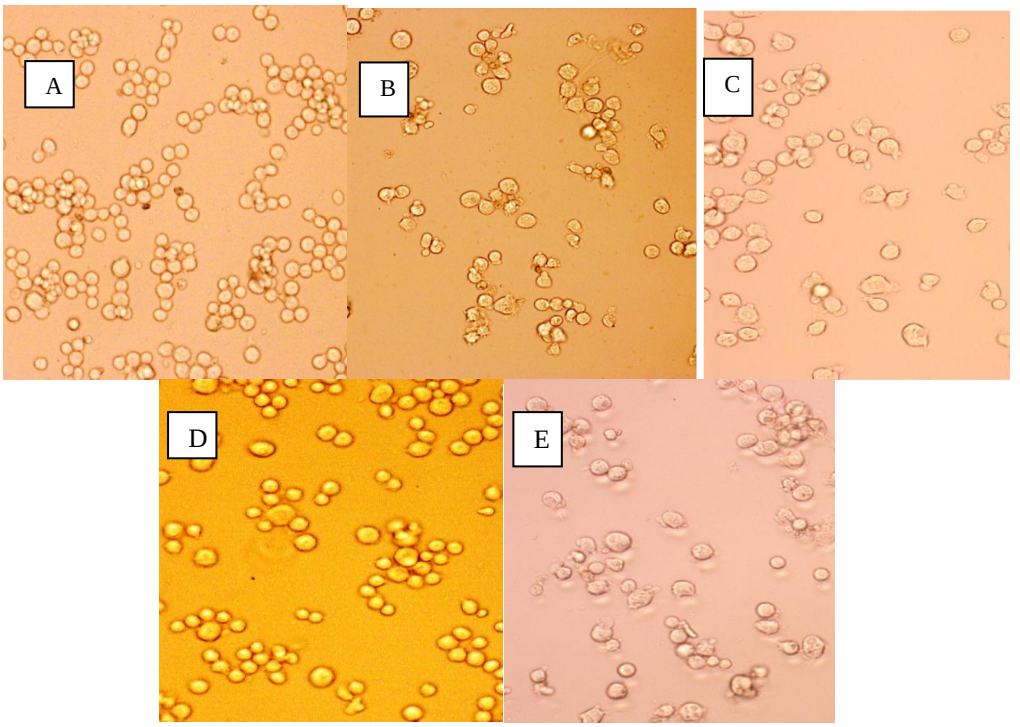
شکل ۱) ژل حاصل از الکتروفورز DNA سلول‌های رده K562 تحت تیمار عصاره دافنه الوئیده، دافنه ماکروناتا، بتولین و بتولینیک اسید

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-02-14]

لازم به‌ذکر است که قطعه قطعه شدن DNA در سلول‌های رده K562 تحت تیمار با مواد گیاهی حالت نردبانی متداول را نشان نداد. بیشترین شکست DNA مربوط به تیمار بتولین و کمترین کشیدگی در سلول‌های تیمار شده با دافنه ماکروناتا و بتولینیک اسید مشاهده شد.

بررسی تغییرات مورفولوژیکی سلول‌ها

مطالعه مورفولوژی سلول‌های سرطانی رده K562 نشان داد که ۲۴ ساعت تیمار با عصاره دو گونه دافنه باعث بزرگ شدن برخی از این سلول‌ها و ایجاد زوائد و برآمدگی‌هایی در سطح آن‌ها گردید. درصورتی‌که تغییرات در سلول‌های تیمار شده با بتولین و بتولینیک اسید تنها شامل تغییر در اندازه سلول‌ها نسبت به کنترل بود (شکل ۲).



شکل ۲) سلول‌های رده K562 در زیر میکروسکوپ فاز معکوس ۲۴ ساعت پس از تیمار. (A) سلول‌های کنترل (B) سلول‌های تیمار شده با غلظت ۰/۴۷ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بافت خشک گیاه دافنه الوئیده (C) سلول‌های تیمار شده با غلظت ۰/۵۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بافت خشک گیاه دافنه ماکروناتا (D) سلول‌های تیمار شده با غلظت ۳/۵ نانو مولار بتولین (E) سلول‌های تیمار شده با غلظت ۸/۵ نانو مولار بتولینیک اسید(عکس‌ها با میکروسکوپ فاز معکوس و بزرگ‌نمایی X۴۰ گرفته شد).

بحث

بسیاری از ترکیبات دافنان دی‌ترپنوئید و تری‌ترپنوئیدهای خالص شده از گیاهان تیره دافنه (از جمله جنکوادافنین، مرزین، جنیدیماکرین، بتولین و بتولینیک اسید) دارای خاصیت آنتی لوسمی هستند.

بعضی از ترکیبات ضدسرطان با مهار پیشرفت چرخه سلولی از تکثیر سلول‌های سرطانی جلوگیری می‌کنند. اما تأثیر بعضی دیگر از ترکیبات ضدسرطان وابسته به تحولات چرخه سلولی نمی‌باشد مثلاً ترکیب جنیدیماکرین که از گیاه دافنه استلرا به‌دست می‌آید با

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-02-14]

تأثیر بر پروتئین کیناز C و فعال کردن آن از تکثیر سلول-های سرطانی جلوگیری می‌کند. تأثیر جنیدیماکرین بر سلول‌ها در هر فازی از چرخه سلولی و حتی در فاز G_0 که جزء سلولی محسوب نمی‌شود صورت می‌گیرد (۲۰). برخی از ترکیبات مؤثر بر چرخه سلولی بر فاز خاصی از این چرخه تأثیر می‌گذارند. بعضی از ترکیبات آنتی‌متابولیت و مهار کننده‌های سنتز نوکلئوتیدها باعث توقف چرخه سلولی در فاز انتقالی G_1/S می‌شوند و بعضی نیز مانند مهارکننده‌های آنزیم‌های توپوایزومرازها چرخه سلولی را در نقطه کنترلی G_2/M مهار می‌کنند. به این ترکیبات ضد سرطان، عوامل اختصاصی مهارکننده چرخه سلولی می‌گویند (۲۱).

برای بررسی تأثیر عوامل ضد سرطان بر فازهای چرخه سلولی از تکنیک فلوسیتومتری استفاده شد. نتایج حاصل از بررسی سلول‌های سرطانی در فازهای مختلف چرخه سلولی نشان داد که بیش از ۵۱ درصد سلول‌ها در فاز S و حدود ۷ درصد در فاز G_2 هستند. از آنجا که سلول‌هایی که سنتز DNA را انجام می‌دهند بیشتر شده‌اند، مسلماً سلول‌هایی که به مرحله تقسیم می‌رسند نیز بیشتر خواهند بود. در سلول‌های سرطانی سرعت تکثیر زیاد است و سلول‌ها تمایلی برای ورود به مرحله G_0 ندارند. به عبارت دیگر، در سلول‌های سرطانی، تنظیم نقاط کنترل چرخه سلولی دچار اختلال می‌شود و در نتیجه درصد سلول‌ها، به‌ویژه سلول‌های موجود در فاز G_1/G_0 کاهش و درصد سلول‌های فاز S افزایش می‌یابند(۹).

در سلول‌های تیمار شده با ترکیبات بتولین و بتولینیک اسید و عصاره دافنه درصد سلول‌های موجود در فازهای G_1/G_0 نسبت به کنترل افزایش و درصد سلول‌های موجود در فاز S کاهش می‌یابد. چنانچه مشاهده می‌شود تغییرات موجود در فازهای G_2/M جزیی است. مثلاً تیمار سلول‌ها با دافنه اولوئیده باعث افزایش ۱۷درصدی سلول‌های فاز G_1/G_0 و کاهش ۱۵ درصدی سلول‌های موجود در فاز S چرخه سلولی می‌شود.

چنین تغییراتی برای سلول‌های تیمار شده با ترکیب بتولین و بتولینیک اسید نیز مشاهده گردید. بر اساس نتایج به‌دست آمده، عصاره خام دافنه ماکروناتا، دافنه الوئیده، بتولین و بتولینیک اسید باعث توقف چرخه سلولی در فاز G_1 می‌گردند.

با توجه به توضیحات ارائه شده و همچنین نتایج حاصل از آنالیز و بررسی‌های فلوسیتومتری مشخص گردید که عصاره خام دافنه ماکروناتا، دافنه الوئیده، ترکیبات بتولین و بتولینیک اسید نقش عوامل تأثیرگذار اختصاصی بر چرخه سلولی را ایفا می‌کنند. زیرا این عوامل فقط بر فاز G_1 چرخه سلولی تأثیر دارند و تغییرات مشاهده شده در فاز S به دلیل عدم ورود سلول‌ها به این فاز می‌باشد. نکته مهم اینکه کدام‌یک از عوامل مهم در فاز G_1 چرخه سلولی تحت تأثیر عصاره گیاهان، بتولین و بتولینیک‌اسید قرار گرفته است؟ با علم به اینکه عوامل مورد استفاده در شیمی درمانی ممکن است بیش از یک جایگاه تأثیر بر سلول‌ها داشته باشند و عوامل مورد استفاده در آزمایشات ما باعث توقف چرخه سلولی در فاز G_1 می‌شوند، درباره مکانیسم تأثیر عصاره دو گونه دافنه و ترکیبات بتولین و بتولینیک اسید احتمالات زیادی وجود دارد. در واقع، احتمال می‌رود که این عوامل با تأثیر بر فعالیت کمپلکس سیکلین‌ها وکیناز های وابسته مربوط به فاز G_1، سبب توقف چرخه سلولی در این فازگردند یا تیمار سلول‌ها با این عوامل به‌نحوی باعث کاهش پیش‌سازهای سنتز اسیدهای نوکلئیک شود. سومین احتمال اینکه، میان‌کنش مستقیم بتولین و بتولینیک اسید با DNA، موجب مهار سنتز DNA و RNA شده است (۲۲). به هرحال، نتایج

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-02-14]

این مطالعه نشان داد که تیمار سلول‌ها با ترکیبات گیاهی حاصل از دافنه منجر به شکستن زنجیره‌های DNA می‌شود و این فرایند جلوی پیشرفت سلول را از فاز G_1 به سمت S و G_2 می‌گیرد زیرا آسیب به مولکول DNA از جمله فاکتورهای محرک آپوپتوز است که با مطالعات مشابه همخوانی دارد (۹).

نتیجه‌گیری

بر اساس نتایج تحقیق حاضر، ترکیبات بتولین و بتولینیک اسید موجب توقف سلول‌ها در فاز S و G_1/G_0 چرخه سلولی و شکست‌های متعدد در رشته‌های DNA می‌شوند. اما عصاره خام دافنه ماکروناتا و دافنه الوئیده بیشترین اثر خود را در توقف سلول‌ها در مرحله G_1 چرخه سلولی دارند. این مشاهدات نشان‌گر آن است که در عصاره این گیاهان ترکیبات مؤثر دیگری نیز وجود دارند که می‌توانند رشد سلول‌های سرطانی را مهار نمایند.

سپاس و قدردانی

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 را ابراز می‌دارند.

References:

1.Mou X. Cancer prevention by astaxanthin, a natural carotenoid J Kyoto Pref Univ Med 2005; 114: 21-9.

2.Saleem TM, Chetty CM, Ramkanth S, et al. Hepatoprotective Herbs–a review. Int J Res Pharm Sci 2010; 1: 1-5.

3.H. Sadeghi, Yazdanparast R. Isolation and Structure Elucidation of a New Potent Anti-neoplastic Diterpene from Dendrostellera lessertii. Am J Chin Med 2005; 33: 831-7.

4.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 Biochim Pol 2007; 54: 323-9.

5.Mullauer FB, Kessler JH, Medema JP. Betulin Is a Potent Anti-Tumor Agent that Is Enhanced by Cholesterol. PloS one 2009; 4: e5361.

6.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.

7.Kemnitzer W, Drewe J, Jiang S, et al. Discovery of 4-aryl 4Hchromenes as a new series of apoptosis inducers using a cell-and caspase-based highthroughput screening assay. 4 structure-activity relationships of N-alkyl substituted pyrrole fused rings at the 7, 8-positions. J Med Chem 2008; 51: 417-23.

8.Deininger MW, Goldman JM, Melo JV. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. Blood 2000; 96: 3343-56.

9.Yazdanparast R, Sadeghi H. Nucleic acid synthesis in cancerous cells under the effect of gnidilatimonoein from Daphne mucronata. Life sciences 2004; 74: 1869–76.

10.Fleisig H, Wong J. Measuring cell cycle progression kinetics with metabolic labeling and flow cytometry. J Vis Exp 2012; 63: e4045.

11.Roccio M, Schmitter D, Knobloch M, et al. Predicting stem cell fate changes by differential cell cycle progression patterns. Development 2013; 140, 459-70.

12.Volotskova O, Hawley TS, Stepp MA, et al. Targeting the cancer cell cycle by cold atmospheric plasma. Sci Rep 2012; 2: 636.

13.Hedayati M, Yazdanparast R, Fasihi H, et al. 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.

14.Panahi kokhdan E, Mianabadi M, Sadeghi H, et al. The effects of two species of Daphne, betulin and betulinic acid on alkaline phosphatase activity in two human cancer cell

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-02-14]

line, K562 and MCF-7. Armaghan Danesh 2014; 18: 900-9.(Persian)
15.Pourmorad F, Hosseinimehr SJ, Shahabimajd N. Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants. Afr J Biotechnol 2006; 5: 1142-5.
16.Mianabadi M, Yazdanparast R. The anti-metastatic potency of gnidilatimonoein, from Daphne Mucronata, compared to two glycosylation Inhibitors: Castanospermine and Tunicamyci. DARU 2004, 12: 44-8.
17.Gustincich S, Manfioletti G, Del Sal G, et al. A fast method for high-quality genomic DNA extraction from whole human blood. Biotechniques 1991; 11, 298-300.
18.Reddy TC, Reddy DB, Aparna A, et al. Anti-leukemic effects of gallic acid on human leukemia K562 cells: Downregulation of COX-2, inhibition of BCR/ABL kinase and NF-κB inactivation. Toxicol In Vitro 2012; 26: 396–405.
19.Perchellet EM, Wang Y, Weber RL, et al. Synthetic 1,4-anthracenedione analogs induce cytochrome c release, caspase-9, -3, and -8 activities, poly(ADP-ribose) polymerase-1 cleavage and internucleosomal DNA fragmentation in HL-60 cells by a mechanism which involves caspase-2 activation but not Fas signaling. Biochem Pharmacol 2004; 67: 523-37.
20.Yoshida M, Feng W, Saijo N, et al. Antitumor activity of daphnane-type diterpene gnidimacrin isolated from Stellera chamaejasme L. Int J Cancer 1996; 66: 268-73.
21.Owa T, Yoshino H, Okauchi T, et al. Discovery of novel antitumor sulfonamides targeting G1 phase of the cell cycle. J Med Chem 1999; 42: 3789-99.
22.Valley AW, Balmer CM. Basic principles of cancer treatment and cancer chemotherapy. In DiPiro JT, Talbert RL, Yee GC, editors. Pharmacotherapy a pathophysiologic approach. 8th ed. New York: The McGraw-Hill, 2011, 2085-348.

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-02-14]

ISMJ 2015; 18(1): 125-134

Orginal Article

K562 cell cycle arrest in G0/G1 phase by two species of Daphne family

M. Mianabadi [1], E. Panahi [1], H. Sadeghi [2*], A. Jafari [3]

[1] Department of Biology, Faculty of Sciences, Golestan University, Gorgan – Iran

[2] Cellular and Molecular Research Center, Faculty of Medicine, Yasuj University of Medical Sciences, Yasuj – Iran

[3] Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Yasuj University, Yasuj - Iran

(Received 23 Feb, 2014 Accepted 7 May, 2014)

Abstract

Background: Nowadays, the plant of Daphne family (Thymelaeacea is used against microorganisms and cancerous cells. The purpose of this study was to investigate the effects of two Daphne species and purified betulin and betulinic acid on K562 genome and the cell cycle.

Materials and methods: This Study was conducted in a complementary randomized design with three replications. 106 K562 cells were treated with Daphne mucronata, Daphne oleides, betulin and betulinic acid for 24 hours. Then, cells were fixed in 70% ethanol and were stained with pripidium iodide 30 min before analysis by flow cytometery. To extract the DNA of cancer cells Miller saline method with little change was used. Data were analyzed with SPSS. version 16 by ANOVA and Dunnett.

Results: Percentage of cancer cells that were treated with Daphne mucronata (59.11±1.16%), Daphne oleides (58.25±1.03%), betulin (51.68±0.43%), and betulinic acid (52.05±0.31%) increased in the G0/G1 phase compared to the control (42.94±0.23%). While most percentage the control cells (51.06±0.16%) were present in S phaseElectrophoresis of genomic DNA of K562 cell lines revealed band boarding and smearing under the effect of plant material. However, a clear sharp band of DNA was seen in control samples. The lowest and highest smeared band was observed in treated cells with Betulin and Daphne mucronata, respectively.

Conclusion: Data showed that materials and compounds of Daphne, block cells in G1 phase and will cause damage to DNA. In fact, these results indicate that there are several effective factors in two species Daphne extract which damage DNA integrity and inhibit cell transfer from control point and can facilitate cell death at higher concentrations.

Key words: *Daphne oleoides, Daphne mucronata,* cell cycle arrest, Betulin, Betulinic acid, DNA fragmentation.

**Address for correspondence:* Cellular and Molecular Research Center, Faculty of Medicine, Yasuj university of Medical Sciences, Yasuj – Iran, E-mail: sadeghi.ha@yums.ac.ir

Website: http://bpums.ac.ir
Journal Address: http://ismj.bpums.ac.ir

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-02-14]