Effect of aqueous extract of *Origanum vulgare* on acute promyelocytic leukemia cell line (HL-60)

Ali Mohammadi-Gollou[1],Reza Mohammadzadeh[2],Mohsen Sagha[3],Mohammad Mohammadzadeh-Vardin[4]

1. MSc in Genetics, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, University of Maragheh, Maragheh, Iran. ORCID ID: 0000-0002-6629-3112

2. Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, University of Maragheh, Maragheh, Iran., (Corresponding Author), Tel: ‌41-37278900, Email: rmohammadzadeh82@gmail.com. ORCID ID: 0000-0002-7893-5151

3. Associate Professor, Research Laboratory for Embryology and Stem Cells, Department of Anatomical Sciences and Pathology, School of Medicine, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran. ORCID ID: 0000-0003-0290-5834

4. Assistant Professor, Research Laboratory for Embryology and Stem Cells, Department of Anatomical Sciences and Pathology, School of Medicine, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran., (Corresponding Author), Tel: +98-45-33513776, Email: m.mohammadzadeh@arums.ac.ir & hematologym@gmail.com. ORCID ID: 0000-0002-3570-6834

ABSTRACT

Background and Aim: Acute promyelocytic leukemia is a malignancy of myeloid cells that are associated with resistance to apoptosis and differentiation arrest in promyelocytes in the bone marrow. The aim of this study was to investigate the effect of *Origanum vulgare* aqueous extract on apoptosis induction in an acute promyelocytic leukemia cell line (HL-60).

Materials and Methods: The viability of HL-60 cells under treatment with various doses of *Origanum vulgare* extract was assessed by using a cell cytotoxic assay. Then, IC50 values were determined after 24, 48, and 72 hours. The expression of Caspase8, Caspase9, Bax, Bcl2, and Nrf2 genes were measured by real-time PCR assay and different stages of apoptosis and necrosis in HL-60 cells were investigated using acridine orange/ethidium bromide double staining. Finally, data were introduced into SPSS software and analyzed by one-way ANOVA.

Results: The results showed that *Origanum vulgare* extract decreased HL-60 cell survival and Caspase9, Caspase8, Bax, Bcl2, and Nrf2 gene expressions were changed after 72 hours of treatment with 1/5 of IC50 of *Origanum vulgare* extract. Also, morphological changes in the nucleus indicated apoptosis induction in HL-60 cells.

Conclusion: It seems that the aqueous extract of *Origanum vulgare* leaves can induce apoptosis in an acute promyelocytic leukemia cell line (HL-60) under experimental conditions.

Keywords: *Origanum vulgare*, Acute myeloid leukemia, Apoptosis, Plant extracts

Received: May 5, 2019 **Accepted:** July 27, 2020

How to cite the article: Ali Mohammadi-Gollou, Reza Mohammadzadeh, Mohsen Sagha, Mohammad Mohammadzadeh-Vardin. The Effect of Aqueous Extract of *Origanum vulgare* on Acute Promyelocytic Leukemia Cell Line (HL-60).SJKU 2021;25(6):10-20.

Copyright © 2018 the Author (s). Published by Kurdistan University of Medical Sciences. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Non Commercial License 4.0 (CCBYNC), where it is permissible to download, share, remix, transform, and buildup the work provided it is properly cited. The work cannot be used commercially without permission from the journal

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-21]

[DOI: 10.52547/sjku.25.6.10]

تاثیر عصاره آبی گیاه مرزنجوش بر رده‌ی سلولی لوسمی پرومیلوسیت حاد (HL-60)

علی محمدی گللو[۱]، رضا محمد زاده[۲]، محسن سقا[۳]، محمد محمدزاده وردین[۴]

۱. کارشناس ارشد ژنتیک، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مراغه، مراغه، ایران. کد ارکید: ۳۱۱۲-۶۶۲۹-۰۰۰۲-۰۰۰۰

۲. استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مراغه، مراغه، ایران. (نویسنده مسئول)، تلفن: ۰۴۱-۳۷۲۷۸۹۰۰، پست الکترونیک: rmohammadzadeh82@gmail.com ، کد ارکید: ۵۱۵۱-۷۸۹۳-۰۰۰۲-۰۰۰۰

۳. دانشیار، آزمایشگاه جنین‌شناسی و سلول‌های بنیادی، گروه علوم تشریحی و پاتولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران. کد ارکید: ۵۸۳۴-۰۲۹۰-۰۰۰۳-۰۰۰۰

۴. استادیار ، آزمایشگاه جنین‌شناسی و سلول‌های بنیادی، گروه علوم تشریحی و پاتولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران. (نویسنده مسئول)، تلفن ثابت: ۳۳۵۱۳۷۷۶-۰۴۵، پست الکترونیک m.mohammadzadeh@arums.ac.ir و hematologym@gmail.com، کد ارکید: ۶۸۳۴-۳۵۷۰-۰۰۰۲-۰۰۰۰

چکیده

زمینه و هدف: لوسمی پرومیلوسیت حاد (AML-M3) از بدخیمی‌های سلول‌های میلوئیدی است که با مقاومت به آپوپتوز و توقف تمایز در سلول‌های پرومیلوسیت در مغز استخوان همراه است. هدف از این مطالعه بررسی تأثیر عصاره آبی مرزنجوش بر القای آپوپتوز در رده‌ی سلولی لوسمی پرومیلوسیت حاد (HL-60) بود.

مواد و روش‌ها: قدرت بقای سلول‌های HL-60 تحت تیمار با غلظت‌های مختلف عصاره مرزنجوش با استفاده از تست سمیت سلولی مورد بررسی قرار گرفت و مقادیر IC50 در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت برای این سلول‌ها تعیین گردید. بیان ژن‌های Caspase8، Caspase9، Bax، Bcl-2 و Nrf2 با تست Real Time PCR سنجیده شده و مراحل آپوپتوز اولیه، آپوپتوز ثانویه و نکروز در سلول‌های HL-60 در اثر تیمار با عصاره مرزنجوش با استفاده از رنگ آمیزی آکریدین اورنج/ اتیدیوم بروماید مورد بررسی قرار گرفت. در نهایت داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS و آزمون آماری آنالیز واریانس یک طرفه تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: نتایج نشان داد، عصاره مرزنجوش باعث کاهش قدرت بقا در سلول‌های HL-60 شده و بیان ژن‌های Caspase9، Caspase9، Bax، Bcl-2 و Nrf2 در اثر تیمار با $\frac{۱}{۵}$ از IC50 ۷۲ ساعت عصاره مرزنجوش دچار تغییر شده است. همچنین تغییرات ریخت شناسی هسته حاکی از القای آپوپتوز در سلول‌های HL-60 می‌باشد.

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد عصاره آبی برگ گیاه مرزنجوش می‌تواند موجب القای آپوپتوز در رده‌ی سلولی لوسمی پرومیلوسیتیک حاد (HL-60) تحت شرایط آزمایشگاهی شود.

کلمات کلیدی: مرزنجوش، لوسمی میلوئیدی حاد، آپوپتوز، عصاره‌های گیاهی

وصول مقاله:۹۸/۲/۱۵ اصلاحیه نهایی:۹۹/۴/۸ پذیرش:۹۹/۵/۶

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-21]

[DOI: 10.52547/sjku.25.6.10]

مقدمه

لوسمی میلوئید حاد (Acute Myeloid Leukemia)، از بدخیمی‌های رده‌ی سلولی میلوئیدی است که با عوارض شدیدی همانند عفونت و خونریزی کشنده همراه است(۱). لوسمی پرومیلوسیت حاد (APL) یا AML-M3 از زیر نوع‌های لوسمی‌های میلوئیدی حاد است که اگرچه در رده-های سنی مختلفی بروز پیدا می‌کند؛ اما در بین کودکان بروز بیشتری دارد. میزان بروز این بیماری ۵ تا ۱۰ درصد از کودکان مبتلا به لوسمی میلوئیدی حاد در آمریکا را شامل می‌شود(۳, ۲). همچنین، لوسمی پرومیلوسیت حاد ۵ تا ۸ درصد از کل افراد مبتلا را به لوسمی میلوئیدی حاد را شامل می‌شود. برخلاف سایر انواع لوسمی‌های میلوئیدی حاد، لوسمی پرومیلوسیت حاد در صورت عدم تشخیص و درمان به موقع می‌تواند منجر به اختلال انعقادی خون و مرگ فرد مبتلا شود(۴).

توقف فرآیندهای آپوپتوز و تمایز سلول‌های میلوئیدی در افراد مبتلا به لوسمی پرومیلوسیت حاد موجب تجمع سلول های بلاستیک تمایز نیافته می‌شود. برای درمان این لوسمی القای تمایز و آپوپتوز در فازهای کلینیکی و آزمایشگاهی مورد مطالعه قرار گرفته است(۵). آپوپتوز به عنوان یکی از مهم‌ترین فرآیندهای کنترل کننده رشد و تکثیر سلول‌ها، به طور طبیعی در همه سلول‌ها امکان رخداد دارد. این فرایند در دو مسیر داخل سلولی و خارج سلولی اتفاق می‌افتد که با تغییر در بیان ژن‌های مسیر کاسپازی و میتوکندریایی و تغییر ریخت‌شناسی هسته سلول همراه است(۶). مقاومت به آپوپتوز و توقف تمایز در سلول‌های لوسمیک از مهم‌ترین مشخصه سرطانی شدن این سلول‌ها است. القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی می‌تواند راهی امیدوار کننده جهت درمان این بیماری با اثرات جانبی کمتر باشد(۷).

مرزنجوش با نام علمی *Origanum vulgare* گیاهی چند ساله است که در نواحی مدیترانه‌ای، اروپا و آسیای صغیر یافت می‌شود و دارای خاصیت آنتی اکسیدان قوی بوده و خواص ضد باکتریایی و سمیت سلولی آن نیز مطالعه شده است(۸). همچنین خاصیت‌های ضد قارچی، ضد جهشی، ضد گزایی، ضد انگلی و ضد دیابتی برای جنس‌های مختلف مرزنجوش مورد مطالعه قرار گرفته است(۹). در طی مطالعات متعدد قبلی به خوبی ثابت شده است که مرزنجوش بیشترین میزان خاصیت آنتی اکسیدانی در مقایسه با گیاهان مشابه را دارد(۱۱, ۱۰). قبلا نشان داده شده است که به‌طور جالب توجهی عصاره مرزنجوش در عین حفظ سلول‌های طبیعی، موجب القای آپوپتوز در سلول‌های سرطان کولون می‌شود که دلیل این امر تا کنون به روشنی مشخص نگردیده است(۱۲).

ما در این مطالعه، تأثیر عصاره مرزنجوش را بر کاهش قدرت بقا و القای آپوپتوز در رده‌ی سلولی HL-60 (رده‌ی مطالعاتی لوسمی پرومیلوسیت حاد) بررسی کرده‌ایم. بیان ژن‌های Caspase8، Nrf2، Caspase9 و Bcl-2 تحت تأثیر با عصاره تغییرات متفاوتی از خود نشان داده‌اند. Caspase8 به عنوان واسطه‌گر مسیر خارجی آپوپتوز و Caspase9 به‌عنوان واسطه‌گر مسیر داخلی، با نسبت‌های مختلفی در تیمار با عصاره مرزنجوش دچار تغییر بیان شده-اند. همچنین تست رنگ آمیزی آکریدین اورنج/اتیدیوم بروماید جهت تعیین مراحل مختلف آپوپتوز در رده‌ی سلولی HL-60 تحت تیمار با عصاره مرزنجوش بکار رفته است.

مواد و روش‌ها

تهیه‌ی عصاره‌ی آبی مرزنجوش:

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-21]

[DOI: 10.52547/sjku.25.6.10]

به منظور تهیه‌ی عصاره آبی گیاه، مقدار ۴ گرم از پودر برگ مرزنجوش خریداری شده از مرکز ملی ذخایر زیستی و ژنتیکی ایران (IBRC) در دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه در آب دو بار تقطیر جوشانده و دوبار با کاغذ صافی فیلتر گردید. سپس با استفاده از دستگاه فریز درایر (Christ، آلمان) از عصاره فریز شده در دمای ۳۰- درجه، پودر تهیه گردید. پودر حاصله به منظور انجام آزمایش‌ها در دمای ۳۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد(۱۳).

کشت سلولی:

سلول‌های HL-60 از انستیتو پاستور ایران خریداری گردیده و در محیط کشت RPMI 1640 (Biowest) با ۱۰ درصد (V/V) سرم جنین گاوی (FBS, Gibco) غیرفعال شده با گرما و یک درصد آنتی‌بیوتیک پنی سیلین- استرپتومایسین، در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوباتور حاوی ۵ درصد CO_2 کشت داده شد. با توجه به ماهیت شناور بودن سلول‌های HL-60، سلول‌ها پس از سانتریفیوژ به مدت ۷ دقیقه در دور ۳۰۰ جی، به تعداد ۱۰۰ هزار سلول در هر سی سی در حجم نهایی ۵ سی سی در فلاسک T25 (SPL) کشت داده شدند و هر سه روز یکبار پاساژ سلولی تکرار گردید(۱۴).

تست سمیت سلولی:

به منظور بررسی میزان بقای سلول‌ها بعد از تیمار با عصاره مرزنجوش از تست MTT استفاده شد. در این تست سلول ها در تعداد ۴۰۰۰۰ سلول در ول ۹۶ خانه با غلظت‌های مختلف از عصاره مرزنجوش تیمار شدند. بعد از گذشت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، سلول‌ها سانتریفیوژ شدند و مایع رویی پس از سانتریفیوژ برداشته شده و به هر چاهک از پلیت ۹۶ خانه، ۲۰۰ میکرولیتر DMSO اضافه گردید میزان جذب سلول‌ها در هر خانه با دستگاه میکروپلیت ریدر Biotek, (USA) در طول موج ۵۷۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. درصد بقای سلول‌ها در غلظت مهاری ۵۰ درصد (IC50) محاسبه و برای تست‌های بعدی مورد استفاده قرار گرفت(۱۵).

تست Real Time PCR

به منظور بررسی بیان ژن‌های مسیر آپوپتوز، سلول‌های HL-60 با مقدار $\frac{1}{5}$از IC50 عصاره مرزنجوش به مدت ۷۲ ساعت تیمار شدند. سپس RNA سلول‌ها توسط کیت RNX plus شرکت سیناکلون و بر اساس پروتکل شرکت سازنده، استخراج شد و در مرحله بعد، با استفاده از کیت سنتز cDNA شرکت Vivantis و با استفاده از دستگاه ترمال سایکلر (BioRad, Germany) از RNA استخراج شده، cDNA سنتز گردید. جهت سنتز cDNA، به۱۰۰۰نانوگرم بر میکرولیتر RNA، به ترتیب ۱ میکرولیتر Oligo dT و ۱میکرولیترdNTP mix افزوده شده با اضافه کردن ۱۰ میکرولیتر Nuclease Free Water حجم نهایی به ۲۰ میکرولیتر رسید. ابتدا انکوباسیون اولیه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انجام گرفته و سپس به مدت ۲ دقیقه روی یخ قرار داده شدند. بعد از گذشت این زمان، مقادیر ۰/۵ میکرولیتر Reverse Transcriptase RNasH، ۲ میکرولیتر Random Hexamer و ۷/۵ میکرولیتر Nuclease Free Water (از کیت Vivantis) به محلول واکنش اضافه گردید. مواد فوق با یکدیگر مخلوط شده و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. سپس جهت سنتز cDNA به مدت ۱ ساعت در معرض دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد قرار گرفته و پس از آن به مدت ۵ دقیقه در دمای ۸۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده‌شدند تا اثر آنزیم ترانس کریپتاز معکوس خنثی شود. سپس cDNA سنتز شده، در دمای ۲۰- درجه سانتی- گراد برای انجام آزمایش‌های بعدی نگهداری شد. جهت انجام واکنشReal Time PCR، بعد از تعیین دماهای بهینه واکنش، مقادیر ۱۲/۵ میکرولیتر Syber Blue (از کیت Sinaclon)، ۳۰۰ نانوگرم بر میکرولیتر cDNA، ۷/۵ میکرولیتر Nuclease Free Water و ۱ میکرولیتر از هرکدام از پرایمرهای Forward و Reverse با هم دیگر ترکیب شده و در حجم نهایی۲۵ میکرولیتر در دستگاه Real

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-21]

[DOI: 10.52547/sjku.25.6.10]

(Rosch, Germany) Time PCR قرار داده شدند تا واکنش ۳ مرحله‌ای PCR در ۴۰ چرخه انجام گیرد. ژن GAPDH نیز به عنوان کنترل داخلی در نظر گرفته‌شد(۲۲-۱۶). توالی پرایمرها در جدول شماره ۱ ارائه گردیده‌است. به منظور سنجش میزان تغییرات بیان ژن‌های مورد نظر از فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$ استفاده گردید. به طوری که مقادیر بیشتر از ۱ نشان دهنده افزایش و مقادیر کمتر از ۱ نشان دهنده کاهش بیان ژن مورد نظر است.

جدول۱. توالی پرایمرهای مورد استفاده در تست Real Time PCR.

ژن	پرایمر Forward	پرایمر Reverse	منابع
GAPDH	GTCGGAGTCAACGGATT	AAGCTTCCCGTTCTCAG	(۱۷)
Caspase8	TCCAAATGCAAACTGGATGA	TCCAAATGCAAACTGGATGA	(۱۸)
Caspase9	CTAGTTTGCCCACACCCAGT	GCATTAGCGACCCTAAGCAG	(۱۹)
Bax	CAGTTGAAGTTGCCGTCAGA	CAGTTGAAGTTGCCGTCAGA	(۲۰)
Bcl_2	CATGTGTGTGGAGAGCGTCAA	GCCGGTTCAGGTACTCAGTCA	(۲۱)
Nrf2	GCGACGGAAAGAGTATGAGCTGG	GTTGGCAGATCCACTGGTTTCTG	(۲۲)

رنگ آمیزی آکریدین اورنج/ اتیدیوم بروماید

سلول‌های HL-60 با غلظت‌های مختلف از عصاره مرزنجوش به مدت ۷۲ ساعت تیمار شدند. سپس، سلول‌ها سانتریفیوژ شده و با 1% PBS شستشو شدند. سلول‌های HL-60 با ۲۰۰ میکرولیتر آکریدین اورنج/ اتیدیوم بروماید (۱:۱) به مدت ۳ دقیقه در انکوباتور تیمار شده و با میکروسکوپ فاز کنتراست (Olympus،آلمان) عکس‌برداری شدند. بر اساس رنگ و ریخت‌شناسی هسته، سلول‌های با آپوپتوز اولیه، آپوپتوز ثانویه و نکروز از هم دیگر مشخص شدند(۲۳).

آنالیز آماری:

با توجه به توزیع نرمال بودن داده‌ها، از آزمون آماری آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون تعقیبی توکی به منظور آنالیز نتایج استفاده گردید. مقدار P کمتر از ۰/۰۵ معنی دار در نظر گرفته‌شد. به منظور تعیین مقدار IC50 از نرم-افزار ED50 نسخه ۱۰ استفاده شد و میزان معنی‌داری داده-ها با نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶، تعیین گردید. جهت رسم نمودارها از نرم‌افزار Excel استفاده شد.

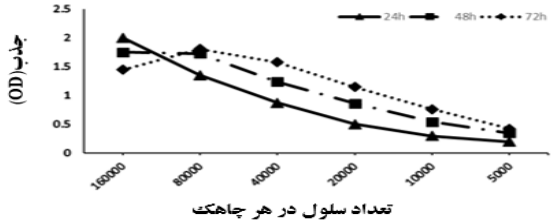
یافته‌ها

تعیین تعداد سلول بهینه جهت تست MTT

برای تعیین تعداد مناسب سلول‌ها جهت کشت در پلیت ۹۶ خانه، سلول‌های HL-60 در تعداد و حجم‌های مختلف و در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت کشت داده شدند. سپس با تست MTT تعداد مناسب جهت تست MTT تعیین گردید (نمودار۱). بیشترین تفاوت قابل توجه در تعداد ۴۰ هزار سلول در هر پلیت ۹۶ خانه‌ای در OD تست MTT مشاهده شد.

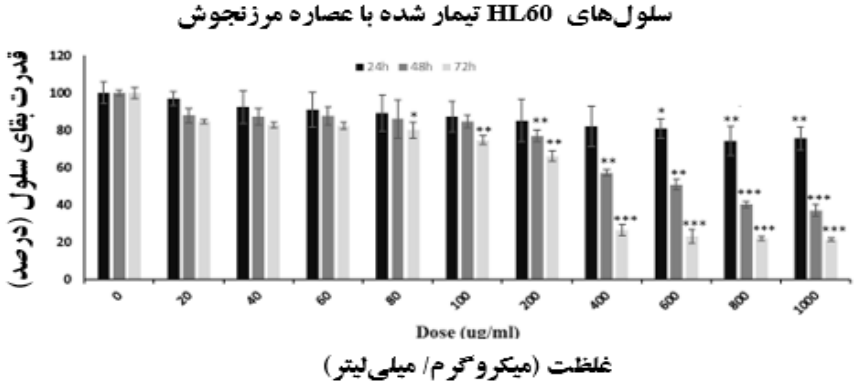
[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-21]

[DOI: 10.52547/sjku.25.6.10]



نمودار ۱. تعیین تعداد سلول‌ها جهت تست سمیت سلولی. تعداد سلول‌ها از ۵۰۰۰ تا ۱۶۰۰۰۰ سلول در هر میلی‌لیتر کشت داده و بعد از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، تست سمیت سلولی انجام شد. در تعداد ۴۰ هزار سلول در هر ول، بیشترین تفاوت در OD مشاهده می‌شود؛ بنابراین جهت ادامه آزمایش‌ها از این تعداد سلول برای کشت در هر ول استفاده گردید.

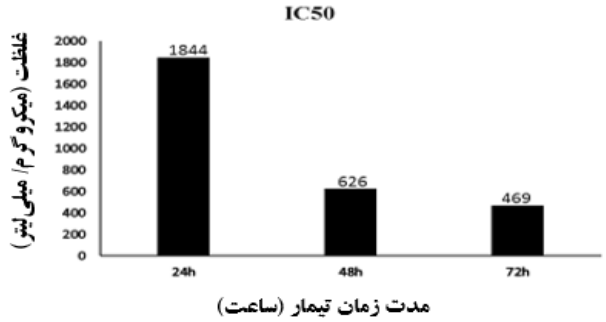
تأثیر عصاره مرزنجوش بر قدرت بقای سلول‌های HL-60 بعد از تیمار با عصاره مرزنجوش در غلظت‌های مختلف و به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، مقادیر مختلفی از IC50 را متناسب با زمان تیمار با عصاره مرزنجوش توسط آزمون MTT نشان می‌دهند. نمودار مرگ سلولی سلول‌های HL-60 یک فرآیند وابسته به دوز و زمان را برای سلول‌های تیمار شده توصیف می‌کند (نمودارهای ۲ و ۳).



نمودار۲. نمودار وابسته به غلظت و زمان قدرت بقای سلول‌های HL-60 در تیمار با غلظت‌های مختلف عصاره مرزنجوش. سلول‌های HL-60 با غلظت‌های مختلف از عصاره مرزنجوش به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تیمار شده‌اند. ۰/۰>P***، ۰/۰۱>P**، ۰/۰۵>P**

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-21]

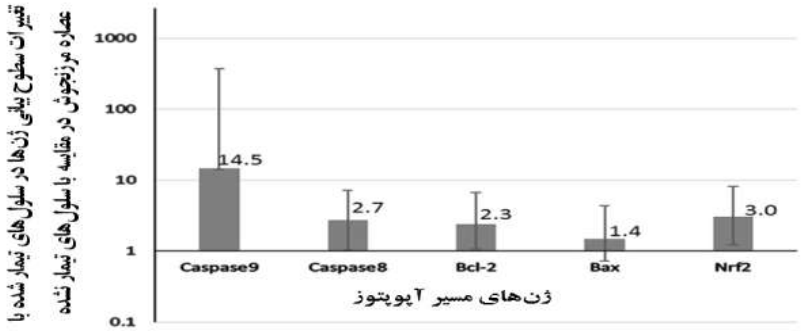
[DOI: 10.52547/sjku.25.6.10]



نمودار۳. مقادیر IC50 برای سلول‌های HL-60 بعد از تست سمیت سلولی. مقادیر IC50 بعد از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تیمار سلول‌ها با عصاره مرزنجوش، تعیین گردیده‌است.

بررسی بیان ژن‌های مسیر آپوپتوز:

بعد از تیمار سلول‌های HL-60 با مقدار $\frac{1}{5}$ از IC50 عصاره مرزنجوش به مدت ۷۲ ساعت، بیان ژن‌های Caspase8، Nrf2، Bcl-2 و Caspase9 مورد بررسی قرار گرفت. بعد از تعیین تغییرات Fold Change، مشخص شد که بیان ژن‌های Nrf2، Caspase8، Bcl2 و Caspase9 افزایش داشته‌است. مشاهدات فوق حاکی از القای احتمالی آپوپتوز در سلول‌های HL-60 توسط عصاره مرزنجوش است (نمودار۴).



نمودار۴. نمودار تغییرات Fold Change برای ژن‌های مسیر آپوپتوز در رده‌ی سلولی HL-60 تحت تیمار با عصاره مرزنجوش.

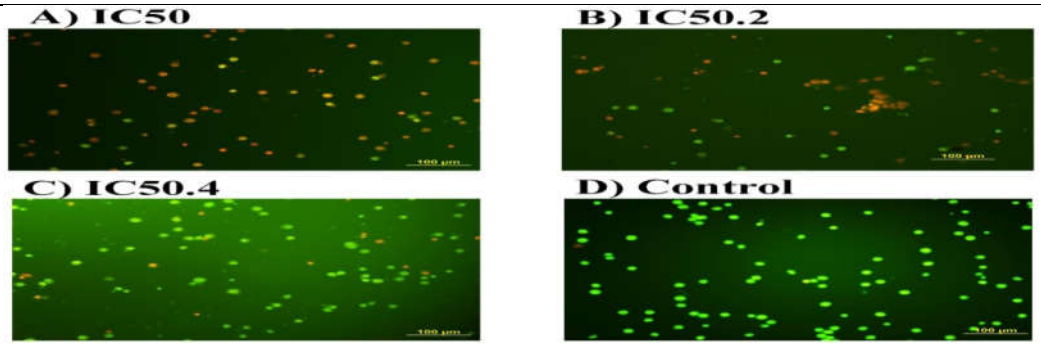
بیان ژن‌های Caspase8، Caspase9، Bax، Bcl-2 و Nrf2 بعد از تیمار سلول‌های HL-60 با IC50۱/۵ ۷۲ ساعت عصاره مرزنجوش مورد سنجش قرارگرفت. مقدار Mean معادل Fold change و مقادیر حداکثر و حداقل بیان بر اساس مقدار SD تعیین شده‌است. میزان بیان تمامی ژن‌ها در گروه تیمار شده با عصاره مرزنجوش در مقایسه با گروه کنترل بیشتر از ۱ است که نشان می‌دهد بیان آن‌ها تحت تأثیر عصاره مرزنجوش افزایش یافته‌است.

رنگ آمیزی سلول‌های HL-60 با آکریدین اورنج/ اتیدیوم بروماید:

سلول‌های HL-60 رنگ آمیزی شده با غلظت های دو برابر، برابر، نصف، یک چهارم و یک هشتم IC50، بعد از رنگ آمیزی با محلول آکریدین اورنج/ اتیدیوم بروماید، مورد بررسی قرار گرفتند. طبق مشاهدات عصاره مرزنجوش موجب القای آپوپتوز و نکروز در سلول‌های HL-60 شده‌اند. طبق انتظار با افزایش غلظت، مقدار آپوپتوز و نکروز در سلول‌ها افزایش یافته‌اند (شکل۱).

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-21]

[DOI: 10.52547/sjku.25.6.10]



شکل۱. رنگ آمیزی آکریدین اورنج/ اتیدیوم بروماید برای سلول‌های HL-60 در غلظت‌های مختلف مرزنجوش. مراحل آپوپتوز اولیه و ثانویه و نکروز در سلول‌های تیمار شده با مقادیر A) برابر، B) نصف و C) ۱/۴ از مقدار IC50 ۷۲ ساعته مرزنجوش با رنگ آمیزی آکریدین اورنج/ اتیدیوم بروماید نشان داده‌شد. در این رنگ آمیزی سلول‌ها ۴ دسته می‌شوند: سلول‌های یکنواخت سبز رنگ، سلول‌های سالم می‌باشند؛ سلول‌های سبز رنگ با هسته قطعه قطعه، در مرحله آپوپتوز اولیه می‌باشند؛ سلول‌های نارنجی رنگ با هسته قطعه قطعه، در مرحله آپوپتوز تأخیری و سلول‌های یکنواخت نارنجی رنگ، سلول‌های نکروتیک در نظر گرفته می‌شوند. در بخش A، سلول‌هایی با هسته نارنجی‌رنگ یکنواخت و قطعه قطعه زیادند که نشان دهنده نکروتیک و آپوپتوتیک تأخیری بودن سلول‌ها می‌باشند. در بخش B، علاوه از سلول‌های مرحله A، سلول‌های سبزرنگ با هسته قطعه قطعه زیاد مشخص شده‌اند که نشان می‌دهد از میزان آپوپتوز کاسته شده است. در بخش C، علاوه از سلول‌های نکروتیک و آپوپتوتیک، سلول‌های سالم نیز مشاهده می‌شوند. در بخش D، سلول‌های سبز رنگ یکنواخت نشان دهنده سالم بودن سلول‌ها است.

بحث

داروهای شیمی درمانی استفاده شونده در درمان لوسمی‌ها، مکانیسم‌های عمل متعددی دارند. توقف تکثیر و مهار مسیرهای پیام‌رسانی سلولی، القای آپوپتوز، تمایز و اتوفاژی از جمله این مکانیسم‌ها می‌باشند(۲۴). امروزه به طور مشخصی، تأثیر مخرب داروهای شیمی درمانی بر روی DNA، القای جهش و تشکیل اداکت‌های DNA در افراد تحت درمان به اثبات رسیده است. عدم عملکرد اختصاصی داروهای شیمی درمانی یکی از عواملی است که باعث بروز اثرات جانبی حین و پس از درمان نظیر عفونت، نقص سیستم ایمنی، بروز جهش‌های جدید و پان سیتوپنی در افراد مبتلا به سرطان است(۲۵). در پی رخداد توقف در فرایندهای طبیعی تمایز و آپوپتوز در افراد مبتلا به لوسمی پرومیلوسیت حاد، آرسنیک‌تری‌اکسید (ATO) به عنوان القاگر آپوپتوز و ATRA به عنوان القاگر تمایز در فاز کلینیکال به عنوان درمان لوسمی پرومیلوسیت حاد بکار برده می‌شوند(۲۶). افزایش سطوح استرس اکسیداتیو در سلول‌های سرطانی در طی القای آپوپتوز از ویژگی‌های داروهای استفاده شونده در درمان لوسمی پرومیلوسیت حاد می‌باشند(۲۷).

داروی ATO با القای آپوپتوز موجب مرگ سلول‌های سرطانی در افراد مبتلا به لوسمی پرومیلوسیت حاد می‌شود(۲۸). از سویی دیگر، ترکیبات آنتی اکسیدان می‌توانند موجب کاهش سطوح استرس اکسیداتیو سلولی شوند. یک مطالعه نشان داده است، رادیکال‌های آزاد اکسیژن نقش مهمی در آسیب و بروز جهش در سلول‌های عادی دارند(۲۹). بدین ترتیب یک روش القای مرگ سلولی بدون افزایش رادیکال‌های آزاد اکسیژن در سلول‌های سرطانی مطرح می‌شود که می‌تواند در راستای درمان با عوارض کمتر در افراد مبتلا به لوسمی پرومیلوسیت حاد مفید باشد. خاصیت بالای آنتی اکسیدانی گیاه مرزنجوش در طی مطالعات قبلی به روشنی مشخص شده است. عصاره مرزنجوش دارای ترکیبات آنتی اکسیدانی نظیر هیدروکربن‌های مونوترپن و ترکیبات فنلی است. کارواکرول و تیمول ترکیباتی هستند که بیشترین فراوانی را در عصاره این گیاه دارند(۳۰). مطالعات نشان داده‌اند که

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-21]

[DOI: 10.52547/sjku.25.6.10]

گیاه مرزنجوش خاصیت ضد توموری بالایی دارد. عصاره مرزنجوش به واسطه‌ی افزایش بیان ژن‌های PARP، Caspase8، Caspase3، Apaf-1 و Pro-Caspase9 موجب القای آپوپتوز در رده‌ی سلولی Caco-2 می‌شود(۱۲). عصاره مرزنجوش همچنین می‌تواند قدرت بقا را رده‌ی سلولی MDA-MB-231 کاهش داده و با افزایش بیان ژن p21 و افزایش توقف این سلول‌ها در فاز G2/M و Sub-G1، مهار میتوزی را در این سلول‌ها افزایش دهد. مرزنجوش در غلظت‌های بالا با کاهش بیان survivin و افزایش بیان PARP و TNF-α، Caspase8 و Caspase3 موجب القای آپوپتوز در مسیر داخل میتوکندریایی در سلول‌های MDA-MB-231 می‌شود همچنین، مرزنجوش در رده‌ی سلولی MCF-7 به میزان کمتر و در HT-29 به میزان بیشتر خاصیت سمیت سلولی داشته و موجب مهار تکثیر این سلول‌ها شده است. در رده‌ی سلولی HCT-116 نیز، عصاره مرزنجوش طی یک فرایند وابسته به زمان و غلظت، باعث کاهش بقای این سلول‌ها شده است(۳۳-۳۱). همچنین گزارش شده است که β-caryophyllene oxide به عنوان یک ترکیب استخراج شده از مرزنجوش می‌تواند با القای SHP-1 موجب کاهش بیان STAT3 و مهار فعالیت مسیرهای کینازی c-src و ak1/2 شده و تکثیر سلولی را در رده‌های سلولی مربوط به سرطان‌های سینه، پروستات و مالتیپل میلوما کاهش دهد(۳۴). در مطالعه Elshafie و همکاران نیز، مشخص شده است که مرزنجوش در سلول‌های سرطانی HepG2 در مقایسه با سلول‌های سالم HEK 293 میزان سمیت سلولی بالایی داشته است(۳۵).

نتیجه‌گیری

ما در این مطالعه شاهد تأثیر عصاره مرزنجوش در سلول‌های HL-60 بودیم. عصاره مرزنجوش در طی فرایند وابسته به غلظت و زمان موجب مهار سلول‌های HL-60 و افزایش میزان بیان ژن‌های مسیر آپوپتوز شده‌اند و رنگ آمیزی آکریدین اورنج/اتیدیوم بروماید حاکی از تغییر ریخت-شناسی هسته و القای آپوپتوز در سلول‌های HL-60 است. به نظر می‌رسد مطالعه مکانیسم‌های مولکولی القای مرگ سلولی در سلول‌های HL-60 به دنبال تیمار با عصاره مرزنجوش و انجام کار آزمایی‌های بالینی روی عصاره آبی این گیاه در غلظت‌های بهینه شده، بتواند منجر به معرفی دارویی مؤثر در درمان افراد مبتلا به لوسمی پرومیلوسیت حاد گردد.

تشکر و قدردانی

پژوهش فوق حاصل پایان نامه کارشناسی ارشد رشته زیست‌شناسی- ژنتیک مصوب ۱۴ آبان ماه سال ۱۳۹۵ گروه زیست‌شناسی سلولی مولکولی دانشگاه مراغه با کد ۲۵۴۴۸۴۳ است که در آزمایشگاه مرکزی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اردبیل انجام گرفته است. دانشگاه‌های مراغه و علوم پزشکی اردبیل حامی مالی این مقاله می‌باشند. نویسندگان این مقاله نهایت تشکر و قدردانی خود را از عوامل و کارکنان دانشکده پزشکی به‌ویژه مسئولین آزمایشگاه‌های مرکزی و سلولی مولکولی اعلام می‌دارند.

منابع

1. Döhner H, Estey E, Grimwade D, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. Blood. 2017;129(4):424-47.
2. Zhang L, Samad A, Pombo-de-Oliveira M, Scelo G, Smith M, Feusner , et al. Global characteristics of childhood acute promyelocytic leukemia. Blood Rev. 2015;29(2):101-25.
3. Deschler B, Lübbert M. Acute myeloid leukemia: epidemiology and etiology. Cancer. 2006;107(9):2099-107.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-21]

[DOI: 10.52547/sjku.25.6.10]

4. Adams , Nassiri M. Acute promyelocytic leukemia: a review and discussion of variant translocations. Arch Pathol Lab Med. 2015;139(10):1308-13.
5. Ablain , de The H. Revisiting the differentiation paradigm in acute promyelocytic leukemia. Blood. 2011;117(22):5795-802.
6. de Bruin EC, Medema P. Apoptosis and non-apoptotic deaths in cancer development and treatment response. Cancer Treat Rev. 2008;34(8):737-49.
7. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. Toxicol Pathol. 2007;35(4):495-516.
8. Silva N, Fernandes únior A. Biological properties of medicinal plants: a review of their antimicrobial activity. Venom Anim Toxins Incl Trop Dis. 2010;16(3):402-13.
9. Sarikurkcu C, Zengin G, Oskay M, Uysal S, Ceylan R, Aktumsek A. Composition, antioxidant, antimicrobial and enzyme inhibition activities of two *Origanum vulgare* subspecies (subsp. vulgare and subsp. hirtum) essential oils. Ind Crops Prod. 2015;70:178-84.
10. Mirzaee A, aberiHafashani H, Madani A. Antioxidant activities, total phenols and total Flavonoids assay of *Origanurm vulgare*, Teucrium polium and Thymus daensis. HM. 2012;15(4):285-94.
11. Matsuura H, Chii H, Asakawa C, Amano M, Yoshihara T, Mizutani . DPPH radical scavengers from dried leaves of oregano (*Origanum vulgare*). Biosci Biotechnol Biochem. 2003;67(11):2311-6.
12. Savini I, Arnone R, Catani MV, Avigliano L. *Origanum vulgare* induces apoptosis in human colon cancer caco2 cells. Nuter Cancer. 2009;61(3):381-9.
13. Moloudi MR, Hassanzadeh K, Rouhani S, Zandi F, Ahmadi A, Khalwatian P, et al. Effect of chloroformic extract of *Cichorium intybus* on liver function tests and serum level of TNF-α in obstructive cholestasis in rat. SKU. 2014;19(4):10-9.
14. Hassanzadeh K, Nikzaban M, Moloudi MR, Izadpanah E. Effect of selegiline on neural stem cells differentiation: a possible role for neurotrophic factors. Iran Basic Med Sci. 2015;18(6):549.
15. Banerdpongchai R, Kongtawelert P. Ethanolic extract of fermented Thunb induces human leukemic HL-60 and Molt-4 cell apoptosis via oxidative stress and a mitochondrial pathway. Asian Pac Cancer Prev. 2011;12(11):2871-4.
16. Shafie A, Moradi F, Izadpanah E, Mokarizadeh A, Moloudi MR, Nikzaban M, et al. Neuroprotection of donepezil against morphine-induced apoptosis is mediated through Toll-like receptors. Eur Pharmacol. 2015;764:292-7.
17. Nguyen PM, Dagley LF, Preaudet A, Lam N, Giam M, Fung KY, et al. Loss of Bcl-G, a Bcl-2 family member, augments the development of inflammation-associated colorectal cancer. Cell Death Differ. 2019:1-16.
18. Alp E, Yılmaz A, Önen İH, Menevşe ES. Effects of EF-24, RAD001, and paclitaxel on the expression profiles of apoptotic and anti-apoptotic genes. Cancer Res Ther. 2017; 13(2); 346-346.
19. Alharbi RA, Pandha HS, Simpson GR, Pettengell R, Poterlowicz K, Thompson A, et al. Inhibition of HOX/PBX dimer formation leads to necroptosis in acute myeloid leukemia cells. Oncotarget. 2017;8(52):89566.
20. Kandeil MA, Hassanin KM, Mohammed ET, Safwat GM, Mohamed DS. Wheat germ and vitamin E decrease BAX/BCL-2 ratio in rat kidney treated with gentamicin. Beni Suef Univ Basic Appl Sci. 2018;7(3):257-62.
21. Wu H, Wang Y, Chen T, Li Y, Wang H, Zhang L, et al. The N-terminal polypeptide derived from vMIP-II exerts its anti-tumor activity in human breast cancer by regulating lncRNA SPRY4-IT1. Bioscie Rep. 2018;38(5).
22. Zhaleh F, Amiri F, Mohammadzadeh-Vardin M, Bahadori M, Harati MD, Roudkenar MH, et al. Nuclear factor erythroid-2 related factor 2 overexpressed mesenchymal stem cells transplantation, improves renal function, decreases inuries markers and increases repair markers in glycerol-induced Acute kidney inury rats. Iran Basic Med Sci. 2016;19(3):323.
23. Hosseinzadeh Anvar L, Hosseini-Asl S, Mohammadzadeh-Vardin M, Sagha M. The telomerase activity of selenium-induced human umbilical cord mesenchymal stem cells is associated with different levels of c-Myc and p53 expression. DNA Cell Biol. 2017;36(1):34-41.
24. Ricci MS, Zong W-X. Chemotherapeutic approaches for targeting cell death pathways. Oncologist. 2006;11(4):342-57.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-21]

[DOI: 10.52547/sjku.25.6.10]

25. Cheung-Ong K, Giaever G, Nislow C. DNA-damaging agents in cancer chemotherapy: serendipity and chemical biology. Chem Bio. 2013;20(5):648-59.
26. Ng C-H, Chng W-. Recent advances in acute promyelocytic leukaemia. F1000Research. 2017;6:1273-1273.
27. Yokoyama C, Sueyoshi Y, Ema M, Mori Y, Takaishi K, Hisatomi H. Induction of oxidative stress by anticancer drugs in the presence and absence of cells. Oncol Lett. 2017;14(5):6066-70.
28. Alimoghaddam K. A review of arsenic trioxide and acute promyelocytic leukemia. Int Hematol Oncol Stem Cell Res. 2014;8(3):44.
29. Liu Z, Ren Z, Zhang , Chuang C-C, Kandaswamy E, Zhou T, et al. Role of ROS and nutritional antioxidants in human diseases. Front Physiol. 2018;9:477-477
30. Coccimiglio , Alipour M, iang Z-H, Gottardo C, Suntres Z. Antioxidant, antibacterial, and cytotoxic activities of the ethanolic *Origanum vulgare* extract and its maor constituents. Oxid Med Cell Longev. 2016;2016.
31. Al Dhaheri Y, Eid A, AbuQamar S, Attoub S, Khasawneh M, Aiche G, et al. Mitotic arrest and apoptosis in breast cancer cells induced by *Origanum maorana* extract: upregulation of TNF-α and downregulation of survivin and mutant p53. PLoS One. 2013;8(2):e56649.
32. Begnini KR, Nedel F, Lund RG, Carvalho PHdA, Rodrigues MRA, Beira FTA, et al. Composition and antiproliferative effect of essential oil of *Origanum vulgare* against tumor cell lines. Med Food. 2014;17(10):1129-33.
33. Grbović F, Stanković M, Ćurčić M, Đorđević N, Šeklić D, Topuzović M, et al. In vitro cytotoxic activity of *Origanum vulgare* L. on HCT-116 and MDA-MB-231 cell lines. Plants. 2013;2(3):371-8.
34. Kim C, Cho SK, Kapoor S, Kumar A, Vali S, Abbasi T, et al. β-caryophyllene oxide inhibits constitutive and inducible STAT3 signaling pathway through induction of the SHP-1 protein tyrosine phosphatase. Mol Carcinog. 2014;53(10):793-806.
35. Elshafie H, Armentano M, Carmosino M, Bufo S, De Feo V, Camele I. Cytotoxic activity of *Origanum vulgare* L. on hepatocellular carcinoma cell line HepG2 and evaluation of its biological activity. Molecules. 2017;22(9):1435.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-21]

[DOI: 10.52547/sjku.25.6.10]