Лейкемийн эсийн өсгөврийг саатуулах апигетрины үйлдлийн судалгаа

О.Эрдэнэзаяа[1,2*], О.Энхчимэг[3], А.Эгшиглэн[4], Б.Өлзийсайхан[4], Р.Номиунгэрэл[1], Д.Энхмаа[2,5], Э.Уугангэрэл[2,5]

[1]АШУҮИС, Био-АС, Анатомийн тэнхим
[2]АШУҮИС, Био-Анагаахын хүрээлэн
[3]Баянгол дүүргийн нэгдсэн эмнэлэг
[4]АШУҮИС, Био-АС
[5]АШУҮИС, Био-АС, Анагаахын химийн тэнхим
*Цахим шуудан: erdenezaya@mnums.edu.mn, Утас: 99169798

Түлхүүр үг:
RAW264.7
Урсгал эс тоолох
Апигенин-7-О-гликозид
Хавдрын эсрэг
Эсийн амьдрах чадвар

Товч утга:
Үндэслэл: Хавдрын эсрэг үйлдэлтэй бага молекулт нэгдлийн судалгаа хавдрын эсэд сонгомол нөлөөтэй эсэх, эсийг үхүүлж буй үхлийн төрөл, идэвхжүүлж буй дохио дамжилтын зам, бай молекул, үйлчлэх механизмийг тайлбарлах зэрэг олон үе шаттай хийдэг. Хавдрын эсрэг үйлдэлтэй ургамлын гаралтай нэгдлүүдээс флавоноид нь ялган авахад хялбар бөгөөд хоол хүнсэнд ихээр агуулагддаг. Түгээмэл тархсан флавоноидын төлөөлөгч апигетрин буюу апигенин-7-*О*-глюкозид нь ургамлын хоёрдогч метаболит бөгөөд өмнөх судалгаагаар хавдрын эсрэг сонгомол индекс 13.1 байсан. Лейкемийн эсийн өсгөврийг саатуулах сонгомол үйлдлийн механизм тодорхойгүй байгаа нь энэхүү судалгааны үндэслэл боллоо. **Зорилго:** Лейкемийн эсийн өсгөврийн саатуулах апигетрины үйлдлийг судлах. **Арга, аргачлал:** Эсийг апоптозоор үхүүлж буй эсэхийг урсгал эс тоолох аргаар, каспаз уургийн хориглогч ашиглан каспазын замын оролцоог үнэллээ. **Үр дүн:** Лейкемийн RAW264.7 эсийг 30 мкМ апигетринээр үйлчлэж 24, 48 цаг өсгөвөрлөсний дараа апоптозыг илрүүлэх Annexin V, PI цомгоор будаж урсгал эс тоолуураар шинжлэхэд апоптозид орсон эс илэрсэнгүй. Апигетринээр үйлчлэхээс 30 минутын өмнө панкаспаз ингибитор Z-VAD-аар үйлчилж 24 цаг өсгөвөрлөсний дараа МТТ урвалжаар амьд эсийн тоог харьцуулан шинжлэхэд апигетрины RAW264.7 эсийн өсгөврийг саатуулах үйлдлийг панкаспаз ингибитор бууруулахгүй байлаа. Эерэг хяналтын бүлэгт эсийг апоптозоор үхүүлдэг доксорубициныг ашигласан бөгөөд энэ бүлэг эсийн апоптоз илэрсэн төдийгүй каспаз ингибитор эсийн өсгөвөр саатуулах идэвхийг бууруулж байлаа. Иймд апигетрин цитотоксик бус харин цитостатик буюу эсийн мөчлөгийг саатуулах үйлдэлтэй байх магадлалтай. Цаашид апигетринээр үйлчилсэн RAW264.7 эс мөчлөгийн аль үед байгааг тодорхойлж, эсийн мөчлөгт оролцдог дохио дамжилтын замыг судлах шаардлагатай. **Дүгнэлт:** Апигетрин RAW264.7 лейкемийн эсийн өсгөврийг каспаз уургийн оролцоогүйгээр мөн апоптозын бус замаар саатуулж байна.

Үндэслэл: Хорт хавдрын эсрэг эмийн бодисын 60% нь ургамлын гаралтай байдаг бөгөөд сонгомлоор хавдрын эсийн өсөлтийг саатуулах эмийн бодис, ургамлын гаралтай бодисын судалгаа ихээхэн хийгдэж байна.[1,2] Хавдрын эсрэг үйлдэлтэй бага молекулт нэгдлийн судалгаа хавдрын эсэд сонгомол нөлөөтэй эсэх, эсийг үхүүлж буй үхлийн төрөл, идэвхжүүлж буй дохио дамжилтын зам, бай молекул, үйлчлэх механизмийг тайлбарлах зэрэг олон үе шаттай хийдэг.[3,4] Хавдрын эсрэг үйлдэлтэй ургамлын гаралтай нэгдлүүдээс флавоноид нь ялган авахад хялбар бөгөөд хоол хүнсэнд ихээр агуулагддаг.[5] Түгээмэл тархсан флавоноидын төлөөлөгч апигетрин буюу апигенин-7-*О*-глюкозид болон апигенин-6-*С*-глюкозид нь ургамлын хоёрдогч

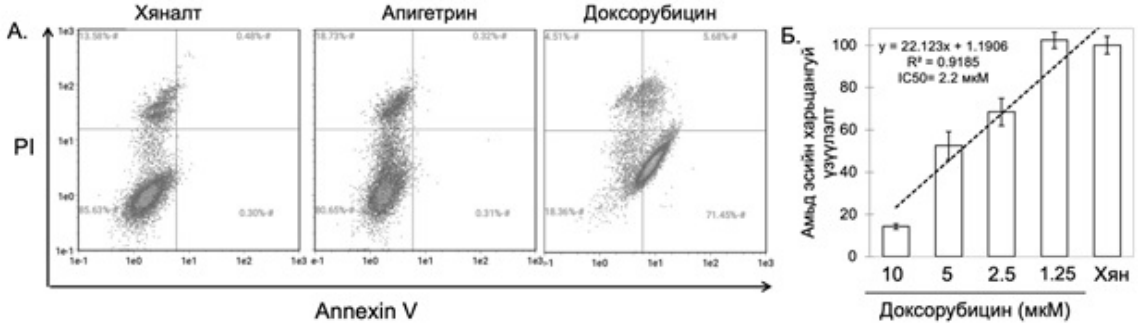
метаболит юм.[6] Бидний өмнөх судалгаагаар хавдрын эсрэг сонгомол индекс апигенин-6-*C*-глюкозидынх 2.85, апигетриных 13.1 байсан.[7] Сонгомол индекс хоёроос их байх нь хавдрын эсийн эсрэг сонгомол үйлдэлтэйг илтгэдэг.[8] Апигетрин ходоодны хорт хавдрын эсийг ROS/STAT3/JAK2 дохио дамжилтын замаар, умайн хүзүүний хорт хавдрын HeLa эсийг PTEN/PI3K/AKT дохио дамжилтын замыг идэвхжүүлж апоптозоор үхүүлдэг нь тогтоогдсон.[6,9] Харин лейкемийн эсийн өсгөврийг саатуулах сонгомол үйлдлийн механизм тодорхойгүй байгаа тул бид лейкемийн эсийн өсгөврийн саатуулах апигетрины үйлдлийг судлах зорилгоор эсийг апоптозоор үхүүлж буй эсэхийг урсгал эс тоолох аргаар, мөн каспаз уургийн хориглогч ашиглан каспазын замын оролцоог үнэллээ.

Зорилго: Лейкемийн эсийн өсгөврийн саатуулах апигетрины үйлдлийг судлах

Арга, аргачлал: Уг судалгааг АШУҮИС-ийн Судалгааны Ёс Зүйн хяналтын хорооны 2024.04.19-ний өдрийн хурлын №.2024/3-04 тоот зөвшөөрөл авснаар Био-Анагаахын хүрээлэнгийн Биологийн хими, Эсийн биологи, Иммунобиологийн лабораторийг түшиглэн харьцуулсан туршилт судалгааны аргаар хийж гүйцэтгэв. Био-Анагаахын хүрээлэнгийн эсийн санд хадгалагдаж буй RAW264.7 хулганын лейкемийн эсийг ашиглав. Апигетрингийг (B20984) Юаней Био-технологи (Shanghai, China), Annexin V-FITC/PI апоптоз илрүүлэх цомогийг (E-CK-A211) Elabscience (Houston, Texas, USA), Z-VAD-FMK ингибиторыг Ringen bio (Shanghai, China), MTT урвалжыг EKEAR (Shanghai, China) компаниудаас тус тус худалдан авав. RAW264.7 хулганын лейкемийн эсийг апигетринээр (30 мкМ) үйлчлэхээс 30 минутын өмнө каспаз ингибитороор (Z-VAD-FMK- 5 мкМ) үйлчилж 24 цаг өсгөвөрлөсний дараа MTT урвалжаар будаж амьд эсийн тоог үнэлж эсвэл Annexin V, PI будгийн цомгоор үйлдвэрлэгчийн зааврын дагуу будаж MACSQuant analyzer урсгал эс тоолох багажаар уншуулж эсийн үхлийн байдлыг үнэллээ. Эерэг хяналтын бүлэгийн эсийг доксорубицинээр үйлчилж апоптозоор үхүүлэв. Туршилтын бүлэг бүрийг 3-4 дээжид хийж статистикийн үндсэн параметрүүдийг тооцоолж хяналтын бүлэг ба туршилтын бүлэгт харьцуулан шинжлэв. Бүлэг хоорондын ялгааг Oneway ANOVA аргаар тооцсон ба $p<0.05$ үед статистик ач холбогдолтой гэж үзсэн.

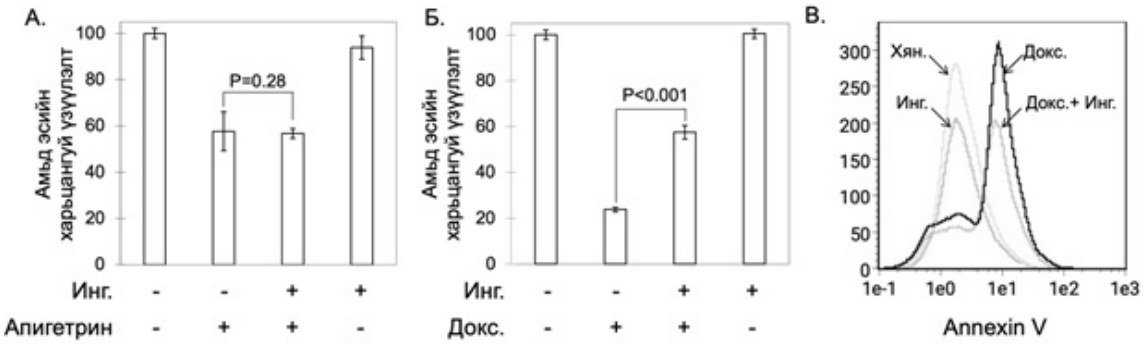
Үр дүн:

Лейкемийн эсэд үзүүлэх апигетрины нөлөөг урсгал эс тоолуураар шинжилсэн дүн: Хорт хавдрын хими эмчилгээний цитотоксик үйлчилгээтэй эмийн нэг доксорубицин нь хавдрын эсийг апоптозоор үхүүлдэг.[10] Иймд бид апигетрины RAW264.7 эсийн өсгөврийг саатуулах үйлдлийг доксорубициний апоптозоор үхүүлэх үйлдэлтэй харьцуулан үнэллээ (Зураг 1.). RAW264.7 эсийг доксорубицины дарааллаасан тунгаар үйлчилж MTT шинжилгээгээр эсийн өсгөврийг 50 саатуулах тунг (IC50=2.2 мкМ) тодорхойлсны дараа 2.5 мкМ доксорубицинээр эсийг үйлчилж урсгал эс тоолуураар эсийн үхлийг шинжиллээ. Ингэхэд Annexin V эерэг буюу эрт үеийн апоптозид орсон эс 71.45%, Annexin V болон PI давхар эерэг буюу хожуу апоптозид орсон эс 5.7% тоологдсон. Харин RAW264.7 эсийг 30 мкМ апигетринээр үйлчлэж 24, 48 цаг өсгөвөрлөсний дараа шинжлэхэд апоптозид орсон эс илэрсэнгүй. (Зураг 1)



Зураг 1. RAW264.7 эсэд үзүүлэх апигетрины нөлөөг урсгал эс тоолуураар шинжилсэн дүн.
А. RAW264.7 эсийг 30 мкМ апигетринээр үйлчлэж 48 цаг өсгөвөрлөсний дараа Annexin V, PI будгийн цомгоор будаж эсийн үхлийн байдлыг үнэллээ. Эерэг хяналтын бүлгийн эсийг 2.5 мкМ доксорубицинээр 24 цаг үйлчилсэн. Б. RAW264.7 эсийг доксорубицины дарааллаасан тунгаар үйлчилж MTT шинжилгээгээр эсийн өсгөврийг 50 саатуулах тунг (IC50) тодорхойлов.

Лейкемийн эсэд үзүүлэх апигетрины саатуулах үйлдэлд каспаз замын оролцоог шинжилсэн дүн: Эсийн хөтөлбөрт үхлийн апоптоз болон зарим төрөлд каспазын замын олон уураг оролцдог. Иймд бид панкаспаз ингибитор ашиглан апигетрины үйлдэлд каспазын зам оролцоотой эсэхийг үнэллээ (Зураг 2). Апигетринээр үйлчлэхээс 30 минутын өмнө панкаспаз ингибитор Z-VAD-аар үйлчилж 24 цаг өсгөвөрлөсний дараа MTT урвалжаар амьд эсийн тоог харьцуулан шинжлэхэд апигетрины RAW264.7 эсийн өсгөврийг саатуулах үйлдлийг панкаспаз ингибитор бууруулахгүй байлаа (Зураг 2А). Харин доксорубицины эс хордуулах үйлдлийг панкаспаз ингибитор багасгаж байгаа нь MTT шинжилгээ (Зураг 2Б) болон апоптозыг илрүүлэх урсгал эс тоолуурын аргаар батлагдлаа (Зураг 2В). Эдгээр үр дүн апигетрины RAW264.7 эсийн өсгөврийг саатуулах үйлдэлд каспаз уургууд оролцоогүйг илтгэж байна.



Зураг 2. RAW264.7 эсэд үзүүлэх апигетрины үйлдэлд каспаз хориглогчийн үзүүлэх нөлөө.
Апигетрин (А) эсвэл доксорубицин (Б) үйлчлэхээс 30 минутын өмнө каспаз ингибитороор (инг.) үйлчилж 24 цаг өсгөвөрлөсний дараа МТТ урвалжаар амьд эсийн тоог (А, Б), Annexin V, PI будгийн цомгоор апоптозыг илрүүлэв (В).

Хэлцэмж: Бидний өмнөх судалгаа апигетрин сонгомлоор хавдрын эсийн өсгөврийг саатуулж байгааг баталсан. Энэ удаагийн судалгаагаар бид RAW264.7 лейкемийн эсийн өсгөврийг саатуулах апигетрины үйлдлийг апоптозыг илрүүлэх цомог болон панкаспаз ингибитор ашиглан шинжиллээ.

Хавдрын эсрэг үйлдэлтэй ургамлын гаралтай флавнойдууд эсийн хөтөлбөрт үхлийг сэдээснээр эсийн өсгөврийг саатуулсан олон тооны судалгаа байдаг.[4,11,12] Мөн түүнчлэн апигетрин ходоодны хорт хавдрын эс, умайн хүзүүний хорт хавдрын HeLa эсийг апоптозоор үхүүлдэг нь тогтоогдсон.[6,9] Иймд бид апоптоз, некроптоз, пироптоз зэрэг эсийн хөтөлбөрт үхлийн дохио дамжилтын гол зам[13] болох каспаз замын оролцоог панкаспаз хориглогч ашиглан апигетрины үйлдлийг шинжилсэн. Гэвч апигетрины лейкемийн эсийг саатуулах үйлдэлд каспазын зам оролцоогүй болох нь энэхүү шинжилгээгээр тогтоогдлоо. Мөн эсийн мембраны дотор давхаргын фосфатидилсеринтэй холбогддог annexin V уургийг ашигласан апоптозыг илрүүлэх шинжилгээр[14] апигетрин RAW264.7 эсэд апоптоз өдөөдөггүй болох нь батлагдсан. Урсгал эс тоолох шинжилгээгээр PI эерэг буюу некрозид орсонг илтгэх эсийн тоо хяналтын бүлэг болон апигетринээр үйлчилсэн бүлэгт ижил хэмжээтэй илэрсэн. PI эерэг эсийг цонхлон эсийн хэмжээ, мөхлөгийн байдлыг шинжлэхэд жигд тархалттай байсан нь некрозоор үхсэн эс биш хуурамч эерэг эс байх магадлалтай байлаа. PI буюу пропидиум иодид нь нуклейн хүчилтэй холбогддог будаг бөгөөд эсийн бөөмийн мембран гэмтэж ДНХ ил гарсан үед эсвэл цитоплазмд РНХ-ийн түвшин өндөр байх үед PI эерэг эс тоологддог. Aja M нарын судалгаагаар зарим макрофаг эсүүд тухайлбал RAW264.7 эс тайван үедээ хуурамч PI эерэг будагдах тохиолдол байдгийг тэмдэглэжээ.[15]

RAW264.7 эсийн хоёр дахин олшрох хугацаа нь ойролцоогоор 11 цаг байдаг.[16] Бидний судалгаагаар апигетринээр 24, 48 цаг үйлчилсний дараа эсийн тоог хяналтын бүлэгтэй харьцуулахад эрс бага байсан тул эсийн мөчлөгийг саатуулах идэвх байж болохыг харуулж байна. Протеомын судалгааны үр дүнгээр апигетрин хүний лейкемийн HL-60 эсийг G2/M мөчлөгт саатуулж улмаар ялгаран хөгжлийг дэмждэгийг тогтоожээ.[17] Мөн апигетрин HepG2, Hep3B, AGS, HELA зэрэг өөр өөр эсэд G2/M мөчлөгт саатуулж өөр өөр замаар некроптоз, апоптоз, аутофаг үхэлд хүргэсэн судалгаа байна.[18-20] Иймд апигетрин цитотоксик бус харин цитостатик буюу эсийн мөчлөгийг саатуулснаар эс доторх дохио дамжилтанд нөлөөлж эсийн тавиланг эсийн төрлөөс хамаарч өөрчилдөг байх магадлалтай. Цаашид апигетринээр үйлчилсэн RAW264.7 эс мөчлөгийн аль үед байгааг тодорхойлж, эсийн мөчлөгт оролцдог дохио дамжилтын замыг судлах шаардлагатай.

Дүгнэлт: Апигетрин RAW264.7 лейкемийн эсийн өсгөврийг каспаз уургийн оролцоогүйгээр мөн апоптозын бус замаар саатуулж байна.

Ном зүй:

1. *Solowey E, Lichtenstein M, Sallon S, Paavilainen H, Solowey E, Lorberboum-Galski H. Evaluating medicinal plants for anticancer activity. ScientificWorldJournal. 2014;2014:721402.*
2. *Asma ST, Acaroz U, Imre K, et al. Natural Products/Bioactive Compounds as a Source of Anticancer Drugs. Cancers (Basel). 2022;14(24).*
3. *Peng F, Liao M, Qin R, et al. Regulated cell death (RCD) in cancer: key pathways and targeted therapies. Signal Transduction and Targeted Therapy. 2022;7(1):286.*
4. *Zhong L, Li Y, Xiong L, et al. Small molecules in targeted cancer therapy: advances, challenges, and future perspectives. Signal Transduction and Targeted Therapy. 2021;6(1):201.*
5. *Sak K. Cytotoxicity of dietary flavonoids on different human cancer types. Pharmacogn Rev. 2014;8(16):122-146.*
6. *Liu MM, Ma RH, Ni ZJ, et al. Apigenin 7-O-glucoside promotes cell apoptosis through the PTEN/PI3K/AKT pathway and inhibits cell migration in cervical cancer HeLa cells. Food Chem Toxicol. 2020;146:111843.*
7. *Энххишиг О, Эрдэнэзаяа О, Энхмаа Д, Одгэрэл Ц. Эсийн өсгөвөрт апигенин-7-О-глюкозид, апигенин-6-С- глюкозидын үзүүлэх нөлөөг судалсан дүн : : Анагаах ухааны магистрын зэрэг горилсон нэг сэдэвт бүтээл : Е 09120121 - Хавдар судлал. Улаанбаатар: [хэвлэлийн газар тодорхойгүй]; 2023.*
8. *Badisa RB, Darling-Reed SF, Joseph P, Cooperwood JS, Latinwo LM, Goodman CB. Selective cytotoxic activities of two novel synthetic drugs on human breast carcinoma MCF-7 cells. Anticancer Res. 2009;29(8):2993-2996.*
9. *Smiljkovic M, Stanisavljevic D, Stojkovic D, et al. Apigenin-7-O-glucoside versus apigenin: Insight into the modes of anticandidal and cytotoxic actions. Excli j. 2017;16:795-807.*
10. *Wang S, Konorev EA, Kotamraju S, Joseph J, Kalivendi S, Kalyanaraman B. Doxorubicin induces apoptosis in normal and tumor cells via distinctly different mechanisms. intermediacy of H(2)O(2)- and p53-dependent pathways. J Biol Chem. 2004;279(24):25535-25543.*
11. *Carneiro BA, El-Deiry WS. Targeting apoptosis in cancer therapy.*

Nat Rev Clin Oncol. 2020;17(7):395-417.
12. *Tong X, Tang R, Xiao M, et al. Targeting cell death pathways for cancer therapy: recent developments in necroptosis, pyroptosis, ferroptosis, and cuproptosis research. J Hematol Oncol. 2022;15(1):174.*
13. *Wang H, Liu M, Zeng X, Zheng Y, Wang Y, Zhou Y. Cell death affecting the progression of gastric cancer. Cell Death Discov. 2022;8(1):377.*
14. *Demchenko AP. Beyond annexin V: fluorescence response of cellular membranes to apoptosis. Cytotechnology. 2013;65(2):157-172.*
15. *Rieger AM, Hall BE, Luong le T, Schang LM, Barreda DR. Conventional apoptosis assays using propidium iodide generate a significant number of false positives that prevent accurate assessment of cell death. J Immunol Methods. 2010;358(1-2):81-92.*
16. *Sakagami H, Kishino K, Amano O, et al. Cell death induced by nutritional starvation in mouse macrophage-like RAW264.7 cells. Anticancer Res. 2009;29(1):343-347.*
17. *Nakazaki E, Tsolmon S, Han J, Isoda H. Proteomic study of granulocytic differentiation induced by apigenin 7-glucoside in human promyelocytic leukemia HL-60 cells. Eur J Nutr. 2013;52(1):25-35.*
18. *Bhosale PB, Kim HH, Abusaliya A, et al. Inhibition of Cell Proliferation and Cell Death by Apigetrin through Death Receptor-Mediated Pathway in Hepatocellular Cancer Cells. Biomolecules. 2023;13(7).*
19. *Kim SM, Vetrivel P, Ha SE, Kim HH, Kim JA, Kim GS. Apigetrin induces extrinsic apoptosis, autophagy and G2/M phase cell cycle arrest through PI3K/AKT/mTOR pathway in AGS human gastric cancer cell. J Nutr Biochem. 2020;83:108427.*
20. *Bhosale PB, Abusaliya A, Kim HH, et al. Apigetrin Promotes TNFα-Induced Apoptosis, Necroptosis, G2/M Phase Cell Cycle Arrest, and ROS Generation through Inhibition of NF-κB Pathway in Hep3B Liver Cancer Cells. Cells. 2022;11(17).*

Study on the anticancer effect of apigenin on leukemia cells

Erdenezaya O[1,2], Enkhkhishig O[3], Egshiglen A[4], Ulziisaikhan B[4], Nomiungerel R[1], Enkhmaa D[2,5], Uugangerel E[2,5]*

[1]Department of Anatomy, School of Biomedicine, MNUMS
[2]Institute of Biomedical Sciences, MNUMS
[3]General Hospital of Bayangol District
[4]School of Biomedicine, MNUMS
[5]Department of Medical Chemistry, School of Biomedicine, MNUMS
**E-mail: erdenezaya@mnums.edu.mn, Tel: +976-99169798*

Background: The study of small-molecule compounds with antitumor activity involves several crucial steps. These include determining their selective effects on cancer cells, understanding the type of cell death they induce, identifying the activated signaling pathways, pinpointing the target molecules, and elucidating the mechanisms of action. Among the plant-derived compounds with anticancer properties, flavonoids are notable for their ease of isolation and their abundance in food. Apigetrin, a representative flavonoid, is a secondary metabolite found in plants, and our previous study indicated that its anticancer selectivity index was 13.1. However, the specific mechanism by which apigetrin inhibits leukemia cell growth remains unclear.

Aim: To study of the inhibitory action of apigenin on leukemia cell culture

Materials and Methods: In this study, we evaluated the apoptosis of cells using flow cytometry and investigated the involvement of the caspase pathway through the use of pancaspase inhibitors to explore the effects of apigetrin on leukemia cell growth.

Results: After incubating leukemia RAW264.7 cells with 30 μM apigetrin for 24 and 48 hours, we did not detect any apoptosis through Annexin V and PI staining by flow cytometry. We compared the number of viable cells using the MTT assay after 24-hour treatment of apigetrin with or without pretreatment of Z-VAD, a pancaspase inhibitor, for 30 minutes. The results indicated that the pancaspase inhibitor did not reduce the inhibitory effect of apigetrin on the growth of RAW264.7 cells. In contrast, the positive control group, treated with doxorubicin—which induces apoptosis—showed not only significant apoptosis but also a reduction of the pancaspase inhibitor on the cell growth inhibition. Therefore, these data suggested that apigetrin likely has a cytostatic effect or inhibits the cell cycle rather than being cytotoxic. Future research should focus on determining which stage of the cell cycle RAW264.7 cells treated with apigetrin are in, as well as studying the signaling pathways involved in the cell cycle.

Conclusion: Apigetrin inhibits the proliferation of RAW264.7 leukemia cells in a caspase-independent and non-apoptotic manner.

Keywords: RAW264.7, Flow cytometry, Apigenin-7-O-glycoside, Anticancer, Cell viability