

Toxicity Effect of Bromoacetic Acid on MCF7 Breast Cancer Cell Line and Analysis of Expression of Apoptosis-Associated Genes

Bahman Jahromi E¹, Jafaarnejad L², Vahdani M², Zolghadri S^{1*}

¹Department of Biology, Jahrom Branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran

²Msc Student, Department of Biology, Jahrom Branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran

Receive: 12/8/2019

Accepted: 1/3/2020

*Corresponding Author:
szjahromi@yahoo.com

Ethics Approval:
Not applicable

Abstract

Introduction: Cancer, the uncontrolled division of cells, occurs because of environmental factors and genetic disorders. Breast cancer is the most common cancer and the second leading cause of cancer death in women. Four categories of key genes, including oncogenes, tumor suppressor genes, repairing genes, and programmed– cell death genes, contribute to cancer development. Bromoacetic acid is a chemical compound that is produced both artificially and by bacterial fermentation.

Methods: To investigate the effectiveness of bromoacetic acid in inhibiting the MCF7 cell line proliferation, the MTT assay was done and the expression of genes responsible for the regulation of apoptosis, including *BAK*, *CASP3*, *CASP8*, and *BIM*, was measured after 24, 48, and 72 hours of cell treatment with 2.5 µg/ml of bromoacetic acid using real–time PCR.

Results: The results of the gene expression assays showed that bromoacetic acid treatment increased the expression of key genes *BAK*, *CASP3*, and *CASP8*. However, the expression of *BIM* decreased at all three time points compared with controls.

Conclusion: bromoacetic acid can induce cell death via intrinsic and extrinsic apoptosis pathways.

Keywords: Breast Cancer, Gene Expression, Bromoacetic Acid

اثر سایتوتوکسیک برومواستیک اسید بر رده سلول سرطانی MCF7 و آنالیز بیان ژن‌های مرتبط با آپاپتوز

عنایت الله بهمن جهرمی^۱، لیلا جعفرنژاد^۲، مینا وحدانی^۲، سمانه ذوالقدری^{۱*}

^۱ گروه زیست‌شناسی، واحد جهرم، دانشگاه آزاد اسلامی، جهرم، فارس، ایران

^۲ دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، فارس، ایران

چکیده

تاریخ ارسال: ۹۸/۵/۲۳

تاریخ پذیرش: ۹۸/۱۲/۱۱

* نویسنده مسئول:

szjahromi@yahoo.com

مقدمه: سرطان، تقسیم غیرقابل کنترل سلول‌ها، در اثر عوامل محیطی و اختلال‌های ژنتیکی بوجود می‌آید. سرطان پستان معمول‌ترین سرطان در سراسر جهان، شایع‌ترین سرطان و دومین سرطان کشنده و عامل اصلی مرگ و میر در زنان است. چهار دسته از ژن‌های کلیدی شامل ژن‌های توده‌زا (آنکوژن‌ها)، ژن‌های مهارکننده توموری، ژن‌های ترمیم‌کننده و ژن‌های مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی در پیشرفت سرطان نقش دارند. برومواستیک اسید (Bromoacetic acid) یک ترکیب شیمیایی است که هم به‌طور مصنوعی و هم از طریق تخمیر باکتریایی، تولید می‌شود.

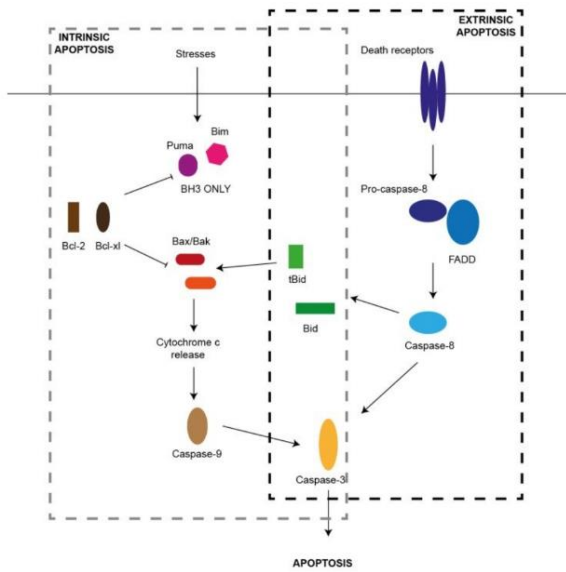
روش بررسی: برای بررسی اثر برومواستیک اسید بر ممانعت از تکثیر رده سلول سرطانی MCF7، تست سنجش سمیت سلولی و الگوی بیان ژن‌های شاخص در تنظیم آپوپتوز شامل *BAK*، *CASP3*، *CASP8*، *BIM* تحت غلظت ۲/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر برومواستیک اسید در سه زمان ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در زمان واقعی اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: نتایج بررسی الگوی بیان ژن نشان داد تحت تیمار برومواستیک اسید، میزان بیان ژن‌های شاخص *BAK*، *CASP8*، *CASP3* در زمان ۲۴، ۴۸ و ۷۲ افزایش می‌یابد. این در حالی است که بیان ژن *BIM* نسبت به کنترل در هر سه زمان کاهش می‌یابد.

نتیجه‌گیری: برومواستیک اسید مرگ سلولی را از طریق مسیرهای درونی و بیرونی آپاپتوز القا می‌کند.

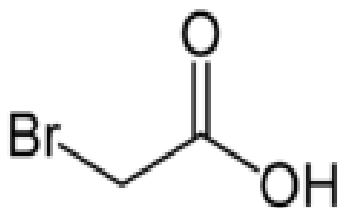
واژه‌های کلیدی: سرطان پستان، بیان ژن، برومواستیک اسید

القای صدمه میتوکندریایی و فشرده شدن هسته سلول منتقل می‌شود و به دنبال آن ضدآپوپتیک‌ها به نام *Bcl2* و پروآپوپتیک *Bak* برای رها شدن سیتوکروم C فعال می‌شوند (۲۰). رها شدن سیتوکروم C از میتوکندری منجر به شروع شدن آبشارهای فعالیت کاسپاز می‌شود. کاسپاز ۸ و ۹ باعث فعال شدن کاسپاز ۳ شده و این کاسپاز قابلیت برش پروتئین *FRAP* را دارا است. پروتئین برش خورده *FRAP* مانع از تعمیر صدمات وارد شده به DNA می‌شود و در نتیجه آپوپتوز القا می‌شود (۲۱).



شکل ۱: مسیرهای داخلی و بیرونی آپاپتوز (۲۸)

برومواستیک اسید (Bromoacetic acid)، مشتق نمکی استیک اسید، یک ترکیب شیمیایی با شناسه پاب کم ۶۲۲۷ است. شکل ظاهری این ترکیب، بلورهای جامد سفید تا زرد روشن است (شکل ۲). در این تحقیق، برومو استیک اسید به عنوان یک اسید چرب کوتاه زنجیر نمکی جهت بررسی خواص ضدسرطان احتمالی از طریق بررسی بیان ژن‌های دخیل در سرطان انتخاب گردید تا در صورت دستیابی به نتایج مطلوب مشتقاتی از این ترکیب جهت ارزیابی اثرات ضدسرطانی طراحی و سنتز شوند.



شکل ۲: ساختار شیمیایی برومواستیک اسید

مقدمه

توانایی سلول‌های سرطانی در مقاومت در برابر مرگ سلولی امروزه به عنوان یک معضل بزرگ به شمار می‌آید. بر اساس مطالعاتی که محققان مختلف انجام داده‌اند استیک اسید توانایی بسیار خوبی در ایجاد مرگ سلولی در سلول‌های مختلف سرطانی را دارد (۱، ۲).

هرچند مکانیسم ملکولی دقیقی که این ملکول منجر به مرگ سلولی می‌شود، هنوز ناشناخته است اما نتایج تحقیقات نشان می‌دهد این ملکول ضمن ایجاد استرس اکسیداتیو با القای فرایند آپاپتوز منجر به مرگ و میر سلولی می‌شود. همچنین اثرات بالقوه ضد سرطانی استیک اسید در مدل‌های حیوانی، آن را به تنهایی و یا در همراهی با داروهای ضدسرطانی به عنوان یک ملکول امیدوار کننده معرفی می‌کند (۳).

آپوپتوز یا مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی و پدیده‌ای فیزیولوژیکی- بیوشیمیایی است که به طور طبیعی در سلول رخ می‌دهد و عمدتاً در مراحل ابتدایی توسط تغییرات مورفولوژیکی از جمله فشرده شدن کروماتین، قطعه قطعه شدن هسته با حضور اجسام آپوپتیک مشخصه‌یابی می‌شود. همچنین توسط سیگنال‌های درگیر در واکنش‌های میتوکندریایی و گیرنده‌های مرگ که باعث فعال نمودن کاسپاز می‌شود مشخصه‌یابی می‌شود (۴).

ژن‌های زیادی در کنترل مرگ برنامه‌ریزی شده نقش مهم ایفا می‌کنند از جمله *Bim*, *Bcl-XL*, *p53*, *Bcl-2* و *Mcl-1* (۵-۱۱). همچنین بسیاری از فاکتورها در تنظیم پروسه آپوپتوز نقش دارد که از آن جمله می‌توان به گیرنده *Bax*, *FAC* و کاسپازها اشاره نمود که به عنوان فاکتورهای پیش آپوپتیک (پروآپوپتیک) هستند (۱۲-۱۶).

آپوپتوز توسط دو مسیر *intrinsic* (هدایت شده توسط میتوکندری) و *extrinsic* (هدایت شده توسط گیرنده‌های مرگ سلولی) انجام می‌شود (شکل ۱). کاسپاز ۸ از طریق مسیر دوم و کاسپاز ۹ از طریق مسیرهای وابسته به میتوکندری فعال می‌شوند. کاسپاز ۸ فعال شده می‌تواند دو نوع سیگنال آپوپتیک مختلف را فعال نماید که به طور مستقیم باعث فعال شدن کاسپاز ۳ و برش پروتئین *Bid* می‌شود (۱۷-۱۹). *Bid* یک پیش ماده مستقیم کاسپاز ۸ در مسیر مذکور است. پس از برش توسط کاسپاز ۸، *Bid* به غشای بیرونی میتوکندری برای

مواد و روش‌ها

این مطالعه تجربی آزمایشگاهی از اردیبهشت تا بهمن ۹۷ در آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشگاه علوم پزشکی فسا انجام شد. در این مطالعه از رده سلولی *MCF7* برای ارزیابی خواص ضد سرطانی ترکیب برومواستیک اسید به شرح زیر استفاده گردید.

کشت سلولی: رده سلولی *MCF7* از دانشگاه علوم پزشکی فسا به صورت فلاسک ۲۵ سی سی تهیه شد. پس از جابه‌جایی برای جلوگیری از عدم صدمه به سلول‌ها، به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور با مشخصات ۳۷ درجه سانتی‌گراد، ۵٪ CO₂، رطوبت بالای ۸۰٪ قرار گرفت تا از عدم آلودگی اطمینان حاصل شود. سپس روز بعد محیط کشت درون فلاسک‌ها را زیر هود (Aura 2000 M.A.C) در شرایط استریل (ضد عفونی کردن با الکل ۷۰٪ و نور UV) تعویض شد و تا رسیدن سلول‌ها به حداکثر رشد (۷۰٪ پوشش درون فلاسک)، به‌طور مرتب به سلول موجود در فلاسک محیط کشت مذکور (DMEM + ۱۰٪ FBS) اضافه شد. پس از این‌که سلول‌ها به حداکثر رشد رسیدند، میزان رشد سلول را با شمارش توسط لام نئوبار با استفاده از میکروسکوپ واژگون مورد بررسی قرار گرفت. به منظور نگهداری سلول و استفاده در مراحل بعدی کار سلول‌ها را پاساژ داده و در محیط کشت همراه با DMSO فریز شد.

تست MTT: برای تست سنجش سمیت سلولی ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت حاوی تعداد ۱۰^۴ سلول در پلیت ۹۶ خانه ریخته شد. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون ۲۰۰ میکرولیتر برومواستیک اسید با غلظت‌های ۰/۲۵، ۰/۵، ۱، ۲، ۴، ۸ و ۱۶ میکرومولار اضافه شد و پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت انکوباسیون ۲۰ میکرولیتر MTT با غلظت ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اضافه شد و به مدت ۲-۳ ساعت در انکوباتور قرار داده شد. بعد از خارج کردن پلیت از انکوباتور زیر میکروسکوپ بلورهای کریستالی را مشاهده شد و در مرحله بعد مایع روی پلیت خالی شد و ۱۰۰ میکرولیتر محلول رقیق DMSO برای حل کردن بلورهای فوماران اضافه شد. به مدت ۱۵ دقیقه درون شیکر قرار داده شد و در نانودراپ جذب در ۵۴۰ خوانده شد. سپس با فرمول زیر درصد کشندگی حساب شد.

$$\text{جذب نمونه} \\ \text{جذب کنترل} \times 100 = (1 -) \text{درصد کشندگی}$$

در نهایت از روی نمودار رسم شده مقدار IC₅₀ نمونه‌ها که بیانگر غلظتی از نمونه است که موجب ۵۰٪ کشندگی سلول‌های سرطانی می‌شود، محاسبه شد (۲۲).

تیمار سلول‌ها با برومو استیک اسید برای استخراج RNA: ابتدا سلول‌ها به تعداد ۵۰×۱۰۰۰۰ توسط لام نئوبار شمارش شد و به هر چاهک پلیت ۳ سی سی از غلظت ۱۰^۴ در هر میلی لیتر کشت داده شد. پس از ۲۴ ساعت از قرار دادن آن در انکوباتور، سلول‌ها با برومو استیک اسید تحت غلظت معادل با IC₅₀ (۲/۵ میکروگرم بر میکرولیتر)، در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تیمار شدند. پس از مدت زمان‌های مذکور سلول‌ها از کف چاهک‌ها طبق دستورالعمل کیت سازنده شرکت Ribospoin (GeneAll, korea) جدا نموده و برای استخراج RNA آماده شد.

استخراج RNA: استخراج RNA از سلول‌های تیمار شده و تیمار نشده توسط کیت RibospinTM طبق دستورالعمل آن انجام گرفت. سپس به منظور اطمینان از استخراج مطلوب RNA کیفیت RNA توسط روش الکتروفورز ژل آگارز مورد بررسی قرار گرفت. غلظت‌های RNAهای استخراج شده توسط دستگاه نانودراپ (Epoch) Biotek اندازه‌گیری شد.

ساخت cDNA: در این مرحله از کیت شرکت Geneall (Hyperscript) و دستورالعمل آن استفاده گردید. یک میکروگرم از RNA حاصل از مرحله قبل را برداشته و به آن یک میکرولیتر از الیگو dT (۱۰۰ pmol) اضافه نموده و حجم نهایی را به وسیله آب تیمار شده با DEPC به ۱۱ میکرولیتر رسانده شد. نگهداری تیوب‌ها برای مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد و سپس بر روی یخ انتقال یافت. در تیوب جداگانه‌ای به ازای هر واکنش ۴ میکرولیتر از بافر آنزیم رونوشت بردار معکوس، ۲ میکرولیتر از dNTPs، ۰/۲۵ میکرولیتر از RNase inhibitor و ۱/۵ میکرولیتر آب تیمار شده با DEPC ریخته شد. از مسترمیکس ۸ میکرولیتر به هر تیوب اضافه شد. در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد برای مدت ۵ دقیقه نگهداری شد. سپس یک میکرولیتر از آنزیم رونوشت بردار معکوس به هر تیوب اضافه شد. سپس در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد برای مدت یک ساعت و سپس در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد برای مدت ۱۰ دقیقه نگهداری می‌شود.

آنالیز آماری: تمامی آنالیزهای MTT در ۷ تکرار انجام شد و با استفاده از نرم افزار Microsoft Excel میانگین ۷ بار تکرار و واریانس آن محاسبه و معادله خط رگرسیون غلظت در برابر درصد کشندگی به دست آمد. برای مطالعه بیان ژن تجزیه و تحلیل اطلاعات با استفاده از شاخص های آمار توصیفی مانند Mean \pm SEM و در سطح آمار استنباطی با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون تعقیبی دانکن برای مقایسه های چندگانه به وسیله نرم افزار SPSS ورژن ۲۱ و ترسیم نمودارها با اکسل انجام شد. سطح معنی داری ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

آغازگرهای مورد استفاده: لیست پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۱ به نمایش گذاشته شده است.

مراحل واکنش Real time PCR: واکنش Real time PCR، در دستگاه ترموسایکلر ABI، محصول کشور آمریکا و با روش $\Delta\Delta$ Ct انجام شد. درون هر تیوب ۱۰ میکرولیتر مسترمیکس (High ROX Real Q Plus 2x mastermix Green، شرکت AMPLIQON)، ۲۰ میکرولیتر حاوی ۳۵ نانوگرم CDNA، یک میکرولیتر حاوی ۱۰ پیکومول از هر پرایمر (پرایمر Forward و پرایمر Reverse) و سپس ۵ میکرولیتر آب مقطر به تیوب اضافه شد.

جدول ۱: لیست پرایمرهای مورد استفاده

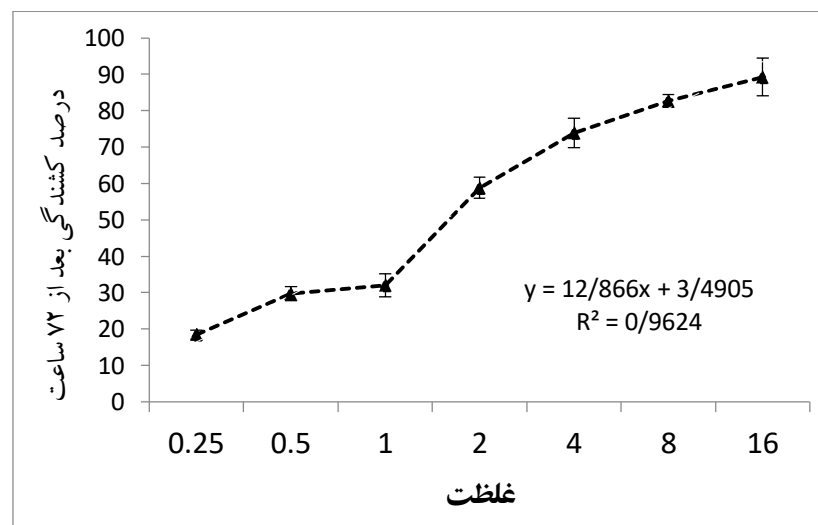
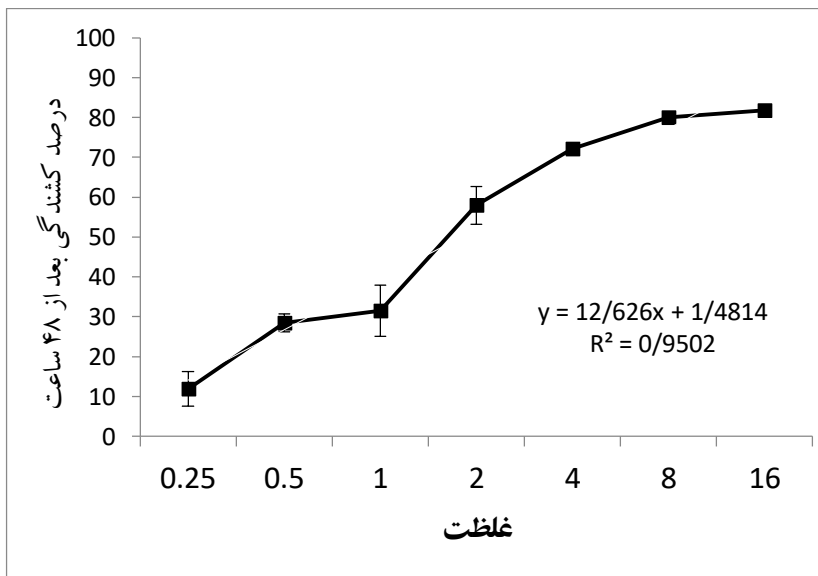
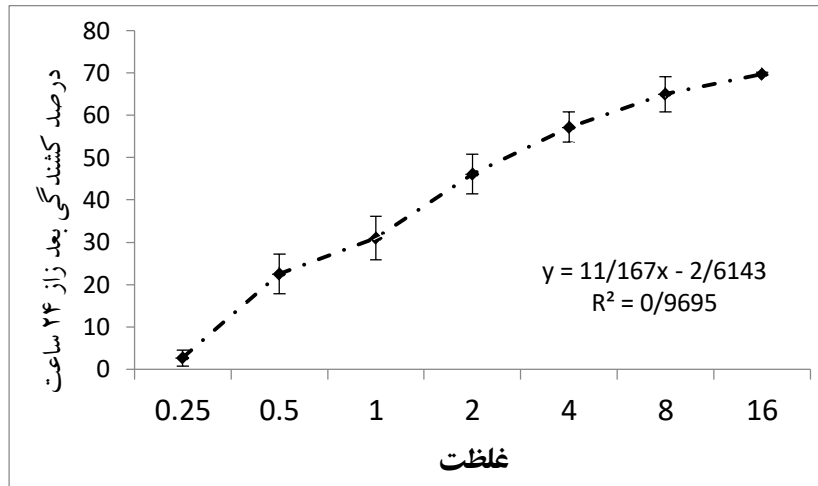
NO.	Name	Sequence	Reference
1	P21-1	CACTCCAAACGCCGGCTGATCTTC	(۲۳)
2	P21-2	TGTAGAGCGGGCCTTTGAGGCCCTC	
3	Caspases3-1	AAGCGAATCAATGGACTCTGG	(۲۴)
4	Caspases3-2	CTGTACCAGACCGAGATGTC	
5	Caspases8-1	CCAGAGACTCCAGGAAAAGAGA	(۲۵)
6	Caspases8-2	GATAGAGCATGACCCTGTAGGC	
7	Bak-1	ATGGTCACCTTACCTCTGCAA	(۲۶)
8	Bak-2	TCATAGCGTTCGGTTGATGTCG	
9	bim-1	GAATCCACTTCGCTCCGCGCAGCCGCCTGGT	(۲۷)
10	bim-2	GGATCCTTGGTCTTTTTTCTTGCGTTTCTC	
11	Bactin1-1	TACCCAGGCATTGCTGACAGG	(۲۸)
12	Bactin1-2	ACTTGCGGTGCACGATGGA	

گروه کنترل و زمان ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت و بین گروه ۲۴ و ۷۲ و بین گروه ۴۸ و ۷۲ ساعت از لحاظ میانگین بیان ژن *Bak* تفاوت معنی دار وجود دارد؛ اما بین زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت تفاوت معنی دار وجود ندارد ($p=0/001$). به عبارت دیگر پس از گذشت ۲۴ ساعت بیان ژن نسبت به کنترل افزایش معنی دار پیدا می کند که این افزایش بعد از ۴۸ ساعت تغییر چندانی ندارد اما بعد از ۷۲ ساعت افزایش بیان بیشتری مشاهده می گردد. نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل بیان ژن *Caspase3* نشان داد که بین گروه کنترل و زمان ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت و بین گروه ۲۴ و ۷۲ و بین گروه ۴۸ و ۷۲ ساعت از لحاظ میانگین بیان ژن *Caspase3* تفاوت معنی دار وجود دارد؛ اما بین زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت تفاوت معنی دار وجود ندارد ($p=0/001$).

یافته ها

سنجش MTT: نمودار ۱ مقایسه اثر زمان بر درصد کشندگی در هر غلظت را نشان می دهد. بر اساس نمودار ۱ بروموآستیک اسید در هر سه زمان، بیشترین میزان کشندگی را در غلظت ۱۶ میکروگرم بر میلی لیتر و کمترین میزان کشندگی در غلظت ۰/۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر داشته است. همچنین بر اساس نمودار IC₅₀ در محدوده غلظت ۲-۳ میکروگرم بر میلی لیتر برای زمان های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ به دست آمد که برای آزمایش های بعدی تیمار سلول با غلظت ۲/۵ میکروگرم بر میلی لیتر برای هر سه زمان استفاده شد.

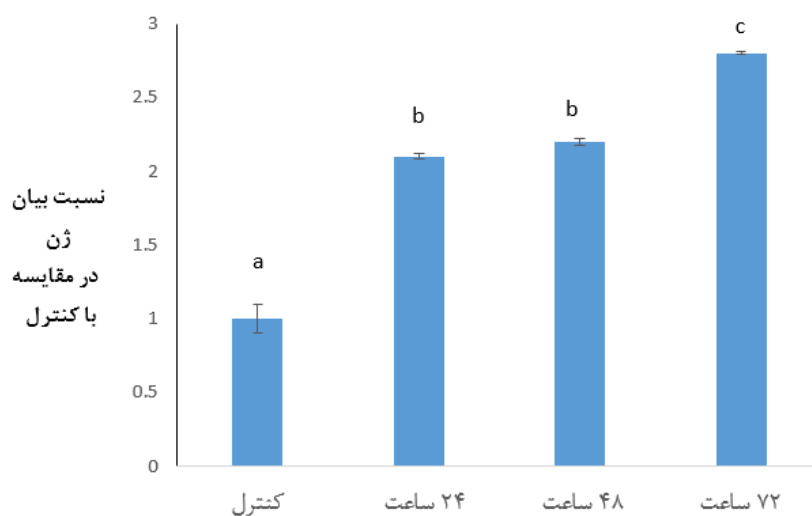
اثر ترکیب بروموآستیک اسید بر بیان ژن *Bak*: نتایج مقایسه های چندگانه با آزمون دانکن نشان داد که بین



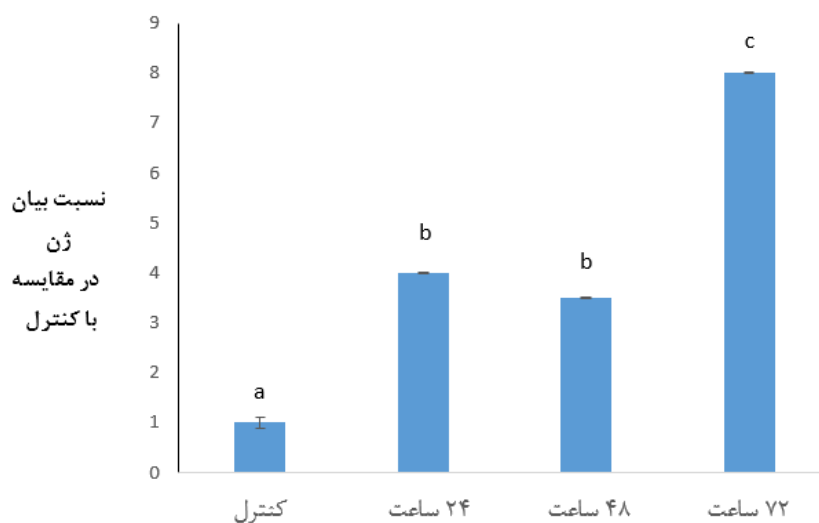
نمودار ۱: روند تغييرات درصد كشدگي با افزايش غلظت بروموآستيك اسيد (بر حسب ميكرومولار) در سه زمان ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت

که بیشترین افزایش میزان بیان در ۷۲ ساعت تیماردهی مشاهده شد که ۸/۲۳۰ برابری را نسبت به گروه شاهد نشان می‌دهد. نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل داده‌ها نشان داد که بیان ژن *Bim* در مدت زمان ۲۴ ساعت تیماردهی به‌طور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل کاهش نشان داد ($p=0/001$). تحت زمان تیماردهی ۴۸ ساعت، تفاوت معناداری بین کاهش میزان بیان این ژن با زمان ۲۴ ساعت را نشان نداد. بیشترین روند کاهشی در بیان این ژن پس از ۷۲ ساعت تیماردهی مشاهده شد.

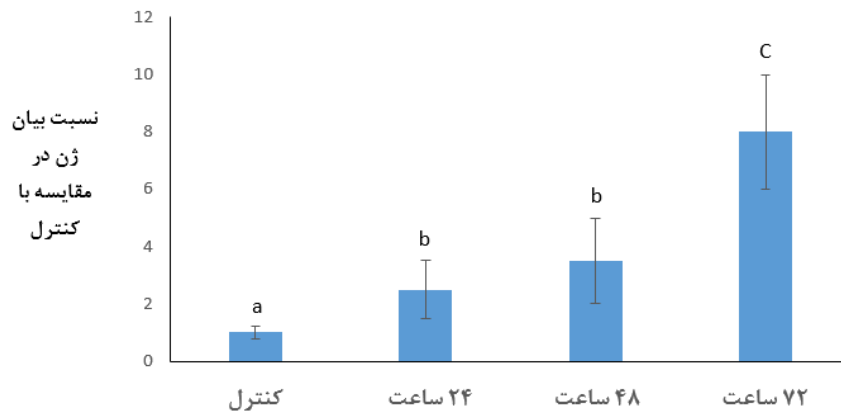
به عبارت دیگر پس از گذشت ۲۴ ساعت بیان ژن نسبت به کنترل افزایش معنی‌دار پیدا می‌کند که این افزایش بعد از ۴۸ ساعت تغییر معنادار نسبت به ۲۴ ساعت ندارد اما بعد از ۷۲ ساعت افزایش بیان بیشتری مشاهده می‌گردد. نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل داده‌ها نشان داد که در غلظت ۲/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر بروموآستیک اسید، میانگین بیان ژن *Caspase8* با گذشت زمان اختلاف معنی‌داری پیدا می‌کند ($p=0/001$). این ژن در زمان ۷۲ ساعت بیشترین افزایش بیان را نشان می‌دهد. به گونه‌ای



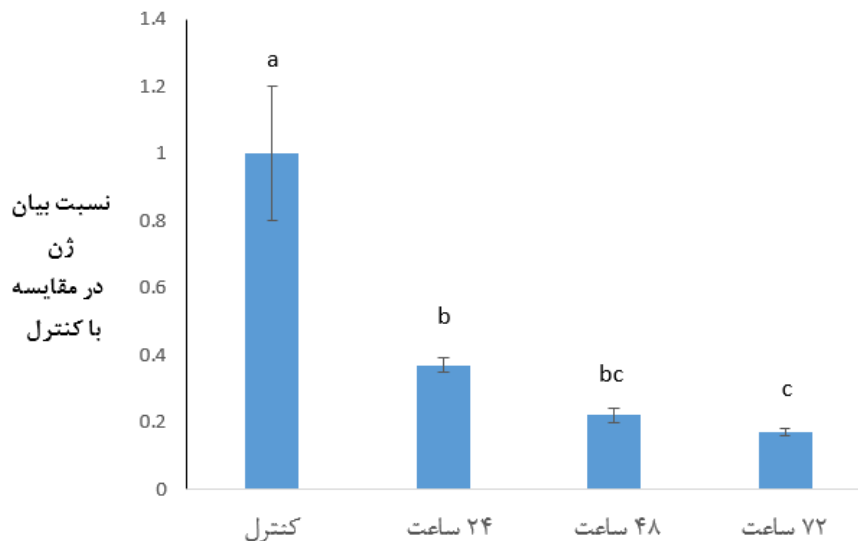
نمودار ۲: آنالیز مقایسه‌ی بیان ژن *Bak* به روش ریل تایم در سلول *MCF7* در غلظت $IC_{50}=2.5\mu M$ بروموآستیک اسید. بیان ژن خانه‌دار *Actin* به عنوان کنترل داخلی در نظر گرفته شد. داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار برای سه تکرار. تحت زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت. حروف متفاوت روی نمودار بیانگر تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۰۱ می‌باشد



نمودار ۳: آنالیز مقایسه‌ی بیان ژن *Caspase3* به روش ریل تایم در سلول *MCF7* در غلظت $IC_{50}=2.5\mu M$ بروموآستیک اسید. بیان ژن خانه‌دار *Actin* به عنوان کنترل داخلی در نظر گرفته شد. داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار برای سه تکرار. تحت زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت. حروف متفاوت روی نمودار بیانگر تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۰۱ می‌باشد.



نمودار ۴: آنالیز مقایسه‌ی بیان ژن *Caspase8* به روش ریل تایم در سلول *MCF7* در غلظت $IC_{50}=2.5\mu M$ برومواستیک اسید. بیان ژن خانه‌دار *Actin* به عنوان کنترل داخلی در نظر گرفته شد. داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار برای سه تکرار. تحت زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت. حروف متفاوت روی نمودار بیانگر تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۰۱ می‌باشد.



نمودار ۵: آنالیز مقایسه‌ی بیان ژن *Bim* به روش ریل تایم در سلول *MCF7* در غلظت $IC_{50}=2.5\mu M$ برومواستیک اسید. بیان ژن خانه‌دار *Actin* به عنوان کنترل داخلی در نظر گرفته شد. داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار برای سه تکرار. تحت زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت. حروف متفاوت روی نمودار بیانگر تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۰۱ می‌باشد و ستون‌هایی که در حداقل یک حرف یکسان هستند تفاوت معنی‌داری ندارند.

که این نتایج با نتایج حاصل از بیان ژن نیز تطبیق خوبی دارد. در تحقیقاتی که توسط سایر پژوهشگران بر روی خواص ضد سرطانی استیک اسید صورت گرفته، کشندگی بسیار خوب این ملکول و تاثیر زمان بر آن، نتایجی مشابه با تحقیق ما را نشان می‌دهد (۲).

همان‌گونه که پیش‌تر نیز ذکر شد محققان نشان داده‌اند که استیک اسید با القای آپتوز منجر به مرگ سلول می‌شود. بنابراین به نظر می‌رسد این ترکیب نیز که شکل نمکی استیک اسید است با مکانیسم مشابهی منجر به

بحث

در این تحقیق، از مقایسه اثر زمان بر درصد کشندگی در هر غلظت را می‌توان نتیجه گرفت هر چه غلظت برومواستیک اسید بیشتر و مدت زمان بیشتر درصد کشندگی بیشتر است و هرچه غلظت برومواستیک اسید کمتر و زمان کمتر درصد زنده ماندن سلولی بیشتر است و زمان و غلظت اثری متقابل با یکدیگر دارند. هم‌چنین در بیشتر غلظت‌ها بین زمان ۲۴ و ۴۸ تفاوت معنی‌داری وجود ندارد اما بین زمان ۲۴ و ۷۲ این تفاوت معنادار است

مرگ سلولی می‌شود. بنابراین در این مطالعه، تلاش شده است تا بررسی بیان ژن‌های موثر در القای آپاپتوز، مکانیسم ضدسرطانی این ملکول مورد بحث و بررسی قرار گیرد.

یک پروتئین کلیدی در آپاپتوز القا شده توسط عوامل مختلف در مسیر داخلی آپاپتوز پروتئین *Bak* می‌باشد. این پروتئین از طریق برهم کنش با پروتئین‌های غشای میتوکندری موجب افزایش نفوذپذیری این غشا و آزاد شدن سیتوکروم C از میتوکندری، فعال شدن کاسپازها و در نهایت آپاپتوز می‌شود. هم‌چنین این پروتئین از خانواده ژن *Bcl-2* است که از طریق رقابت با *Bcl-2* آپاپتوز را افزایش می‌دهد و ژن آن دارای یک قسمت آغازگر برای اتصال با پروتئین سرکوبگر تومور *p53* می‌باشد (۲۹).

در این جا نیز، همان‌گونه که نمودار ۲ نشان می‌دهد تحت تیمار ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت برومواستیک اسید با غلظت ۲/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر افزایش میزان بیان ژن *Bak* نسبت به کنترل مشاهده شد. هر چند بین زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت تفاوت معناداری وجود ندارد اما با افزایش زمان تیماردهی از ۴۸ ساعت به ۷۲ ساعت تغییرات چشمگیری در افزایش میزان بیان این ژن مشاهده شد. به این ترتیب سلول در همان مراحل ابتدایی (۲۴ ساعت تیماردهی) تماس با برومواستیک اسید از طریق فعال نمودن ژن *Bak* که یک ژن پروآپوپتیک است در افزایش جهت مسیر به سمت آپاپتوز نقش مهمی را ایفا می‌کند. با گذشت زمان بیان ژن افزایش می‌یابد. بنابراین می‌توان گفت که بیان این ژن و تاثیر عمل سایتوتوکسیک برومواستیک اسید به صورت *time-dependent* است. نتیجه ای که از سنجش آزمون *MTT* نیز حاصل شد.

با توجه به این نتایج و نتایج بعدی می‌توان به نوع تنظیم بیان این ژن در سلول‌های *MCF7* در تیمار با برومواستیک اسید پی برد. به نظر می‌آید افزایش بیان ژن *Bak* با افزایش زمان تیماردهی مستقیماً بر افزایش فعالیت پایین دست شامل کاسپازها بسیار موثر باشد.

بر اساس یافته‌های علمی، کاسپازها نقش کلیدی در انتقال سیگنال در آپاپتوز دارند. همان‌طور که پیش‌تر نیز اشاره شد کاسپاز ۸ از طریق مسیر گیرنده‌های مرگ سلولی و کاسپاز ۹ از طریق مسیرهای وابسته به میتوکندری فعال می‌شوند. کاسپاز ۸ فعال شده باعث فعال شدن کاسپاز ۳ و در نتیجه القای آپاپتوز می‌شود. آن‌ها از جمله پروتئازهای

صورت آغازگر مانند کاسپاز ۲، ۸، ۹، ۱۰، ۱۱ و ۱۲ و یا به صورت اثرکننده (کاسپاز ۳، ۶ و ۷) در سلول عمل می‌کنند (۳۰-۳۳). در این میان رسپتورهایی وجود دارند که برای تحریک مسیرهای خارجی و درونی آپاپتوز بایستی تعادل بین فاکتورهای پیش آپاپتوز (پروآپاپتوز) *Bid*، *Bax*، *Bak* و *Bad* و اعضای فاکتورهای ضد آپوپتیک (*Bcl-X* و *Bcl2*) ایجاد نمایند. این تعادل بخشی از همودیم‌های پروآپوپتیک برای ایجاد نفوذپذیری بیشتر غشای میتوکندری برای آزاد شدن فعال کننده‌های کاسپاز مانند سیتوکروم C مورد نیاز هستند (۳۴).

در این تحقیق، نمودار ۳ نشان می‌دهد میزان بیان ژن *Caspase3* در سلول‌های تحت تیمار ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت برومواستیک اسید نسبت به کنترل افزایش یافته است. هر چند با افزایش زمان از ۲۴ به ۴۸ افزایش بیان ژن نسبت به کنترل ثابت ماند اما با افزایش زمان تیماردهی از ۲۴ ساعت به ۷۲ ساعت تغییرات چشمگیری در افزایش میزان بیان این ژن مشاهده شد. روند افزایش بیان ژن *Caspase8* نیز با روند افزایشی *Caspase3* کاملاً مشابهت دارد (نمودار ۳ و ۴). نتایج حاصل نشان می‌دهد که با افزایش بیان کاسپازها در حضور برومواستیک اسید احتمال القای آپاپتوز توسط این ترکیب وجود دارد. نتایج حاصل از فلوسایتومتری که در این تحقیق داده‌های آن نشان داده نشده است، این احتمال را تایید می‌کند.

مطالعات گذشته نشان می‌دهد سیگنالینگ آپاپتوز از طریق سه مسیر پیچیده منجر به آپاپتوز می‌شود که شامل مسیر گرفته شده از ۱- *FAC/cytokine*، ۲- گرفته شده از میتوکندری، ۳- گرفته شده از پمپ کلیسیم/ شبکه اندوپلاسمی است. در بیان این سه مسیر مهم مسیر گرفته شده از میتوکندری به نام خانواده *Bcl2* به خوبی مشخصه‌یابی و مطالعه شده است که نقش کلیدی در تنظیم آپاپتوز دارد. وقایع ملکولی که منجر به فعالیت و نهایتاً اجرای برنامه آپاپتوز در سلول می‌شود اساساً با تعادل بین سیگنالینگ پیش-آپوپتوتیک و ضدآپوپتیک کنترل می‌شود. این پروسه معمولاً توسط پروتئین‌های تنظیمی اختصاصی آپاپتوز کنترل می‌شود. اعضای خانواده *Bcl2* به عنوان پروتئین‌های کلیدی درگیر در شکل‌گیری کانال‌های آپوپتیک میتوکندریایی و تنظیم

در این جا نیز، همان‌گونه که نمودار ۲ نشان می‌دهد تحت تیمار ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت برومواستیک اسید با غلظت ۲/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر افزایش میزان بیان ژن *Bak* نسبت به کنترل مشاهده شد. هر چند بین زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت تفاوت معناداری وجود ندارد اما با افزایش زمان تیماردهی از ۴۸ ساعت به ۷۲ ساعت تغییرات چشمگیری در افزایش میزان بیان این ژن مشاهده شد. به این ترتیب سلول در همان مراحل ابتدایی (۲۴ ساعت تیماردهی) تماس با برومواستیک اسید از طریق فعال نمودن ژن *Bak* که یک ژن پروآپوپتیک است در افزایش جهت مسیر به سمت آپاپتوز نقش مهمی را ایفا می‌کند. با گذشت زمان بیان ژن افزایش می‌یابد. بنابراین می‌توان گفت که بیان این ژن و تاثیر عمل سایتوتوکسیک برومواستیک اسید به صورت *time-dependent* است. نتیجه ای که از سنجش آزمون *MTT* نیز حاصل شد.

با توجه به این نتایج و نتایج بعدی می‌توان به نوع تنظیم بیان این ژن در سلول‌های *MCF7* در تیمار با برومواستیک اسید پی برد. به نظر می‌آید افزایش بیان ژن *Bak* با افزایش زمان تیماردهی مستقیماً بر افزایش فعالیت پایین دست شامل کاسپازها بسیار موثر باشد.

بر اساس یافته‌های علمی، کاسپازها نقش کلیدی در انتقال سیگنال در آپاپتوز دارند. همان‌طور که پیش‌تر نیز اشاره شد کاسپاز ۸ از طریق مسیر گیرنده‌های مرگ سلولی و کاسپاز ۹ از طریق مسیرهای وابسته به میتوکندری فعال می‌شوند. کاسپاز ۸ فعال شده باعث فعال شدن کاسپاز ۳ و در نتیجه القای آپاپتوز می‌شود. آن‌ها از جمله پروتئازهای

بر اساس یافته‌های علمی، کاسپازها نقش کلیدی در انتقال سیگنال در آپاپتوز دارند. همان‌طور که پیش‌تر نیز اشاره شد کاسپاز ۸ از طریق مسیر گیرنده‌های مرگ سلولی و کاسپاز ۹ از طریق مسیرهای وابسته به میتوکندری فعال می‌شوند. کاسپاز ۸ فعال شده باعث فعال شدن کاسپاز ۳ و در نتیجه القای آپاپتوز می‌شود. آن‌ها از جمله پروتئازهای

بر اساس یافته‌های علمی، کاسپازها نقش کلیدی در انتقال سیگنال در آپاپتوز دارند. همان‌طور که پیش‌تر نیز اشاره شد کاسپاز ۸ از طریق مسیر گیرنده‌های مرگ سلولی و کاسپاز ۹ از طریق مسیرهای وابسته به میتوکندری فعال می‌شوند. کاسپاز ۸ فعال شده باعث فعال شدن کاسپاز ۳ و در نتیجه القای آپاپتوز می‌شود. آن‌ها از جمله پروتئازهای

بر اساس یافته‌های علمی، کاسپازها نقش کلیدی در انتقال سیگنال در آپاپتوز دارند. همان‌طور که پیش‌تر نیز اشاره شد کاسپاز ۸ از طریق مسیر گیرنده‌های مرگ سلولی و کاسپاز ۹ از طریق مسیرهای وابسته به میتوکندری فعال می‌شوند. کاسپاز ۸ فعال شده باعث فعال شدن کاسپاز ۳ و در نتیجه القای آپاپتوز می‌شود. آن‌ها از جمله پروتئازهای

بیرونی میتوکندری را کاهش داده و منجر به فعال شدن کاسپاز ۳ و آپوپتوز می‌شوند. مسیر بیرونی آپاپتوز نیز با فعال شدن گیرنده‌های مرگ و افزایش بیان کاسپاز ۸ فعال می‌شود. که این وقایع منجر به فعال شدن آبشار کاسپاز و آپوپتوز می‌شود (۳۸، ۳۹) (شکل ۲). بنابراین با توجه به نتایج حاصل می‌توان گفت با توجه به این که در حضور برومواستیک اسید، بیان *Bak* افزایش و بیان *Bim* (ژن‌های مسیر سیگنالینگ داخلی آپاپتوز) کاهش می‌یابد و بیان کاسپاز ۸ (از ژن‌های مسیر سیگنالینگ بیرونی آپاپتوز) و در نهایت کاسپاز ۳ افزایش می‌یابد، این ترکیب اثر سایتوتوکسیک خود را با القای آپاپتوز به سلول تحمیل می‌کند.

نتیجه‌گیری

نتایج مطالعات ما نشان می‌دهد که مولکول برومواستیک اسید یک ترکیب ضدسرطانی قوی با IC_{50} بسیار پایین در مقایسه با داروهای استاندارد است که اثر سیتوتوکسیک خود را با افزایش بیان ژن‌های آپاپتوز به صورت وابسته به زمان *Time-dependent* و از طریق القای دو مسیر سیگنالینگ داخلی و بیرونی آپاپتوز اعمال می‌کند. هر چند از محدودیت‌های این تحقیق، پیشنهاد می‌گردد برای بررسی بیشتر خواص ضدسرطانی برومواستیک این مطالعات بر روی چند رده سلولی دیگر و همچنین روی سیستم زنده نیز انجام شود.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ تعارض منافی در پژوهش حاضر وجود ندارد.

نفوذپذیری میتوکندری و مسیر سیگنالینگ آپوپتیک مبتنی بر میتوکندری بسیار موثر است (۳۵). *Bcl2* یا *Bim* و پروتئین‌هایی که به وسیله آن تولید می‌شوند دارای اثرات ضد آپوپتوزی است و نقش مهمی در حفظ و پایداری غشای خارجی میتوکندری دارند (۳۶). در واقع سیگنال‌های تحریک‌کننده پروسه آپوپتوز حاصل تعادل بین پروتئین‌های آپوپتیک و ضدآپوپتیک است.

در این مطالعه نیز، همان طور که در بخش نتایج ذکر شد بیان ژن *Bim* یا *Bcl2* در سلول‌های تحت تیمار ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت برومواستیک اسید نسبت به کنترل کاهش یافته است. هر چند با افزایش زمان از ۲۴ به ۴۸ این کاهش نسبت به کنترل ثابت ماند. پس از آن با افزایش مدت زمان تیماردهی (۷۲ ساعت) میزان بیان این ژن بیشترین کاهش را نسبت به کنترل نشان می‌دهد. از آنجایی که ژن *Bim* یک تنظیم‌کننده آپوپتوز و یک ملکول ضد آپاپتوز است در رقابت با پیش آپوپتیک *Bak* نمی‌تواند مانع فعالیت آپوپتوز در زمان‌های مختلف شود. مطالعات گذشته بر روی ایندول استیک اسید که مانند برومواستیک اسید مشتقی از استیک اسید است نیز نشان می‌دهد که این ترکیب با افزایش در نسبت *Bak/Bcl2* (یک شاخص مرتبط برای تحریک آپوپتوز)، اثر سیتوتوکسیک خود را اعمال می‌کند که با نتایج مطالعه حاضر مطابقت دارد. همچنین افزایش فعالیت کاسپاز ۳ و ۸ نیز با افزایش مدت زمان تیماردهی مشاهده شده بود (۳۷) که در این مطالعه هم افزایش فعالیت دو آنزیم به عملکرد بهتر پروآپوپتیک‌ها کمک نمود.

به‌طور کلی بر اساس آن چه گفته شد به نظر می‌رسد برومواستیک اسید با افزایش بیان *Bak* پتانسیل غشای

References

1. Terasaki M, Ito H, Kurokawa H, Tamura M, Okabe S, Matsui H, et al. Acetic acid is an oxidative stressor in gastric cancer cells. *Journal of clinical biochemistry and nutrition*. 2018;63(1):36-41.
2. Okabe S, Okamoto T, Zhao CM, Chen D, Matsui H. Acetic acid induces cell death: an in vitro study using normal rat gastric mucosal cell line and rat and human gastric cancer and mesothelioma cell lines. *Journal of gastroenterology and hepatology*. 2014;29 (4):65-9.
3. Bonnet S, Archer SL, Allalunis-Turner J, Haromy A, Beaulieu C, Thompson R, et al. A mitochondria-K⁺ channel axis is suppressed in cancer and its normalization promotes apoptosis and inhibits cancer growth. *Cancer cell*. 2007;11(1):37-51.
4. Kim JS, Cho IA, Kang KR, Lim H, Kim TH, Yu SK, et al. Reversine induces caspase-dependent

- apoptosis of human osteosarcoma cells through extrinsic and intrinsic apoptotic signaling pathways. *Genes & genomics*. 2019;41(6):657-65.
5. Zhang G, Ma F, Li L, Li J, Li P, Zeng S, et al. Palbociclib triggers apoptosis in bladder cancer cells by Cdk2-induced Rad9-mediated reorganization of the Bak.Bcl-xl complex. *Biochemical pharmacology*. 2019;163:133-41.
 6. Kazi A, Sun J, Doi K, Sung SS, Takahashi Y, Yin H, et al. The BH3 alpha-helical mimic BH3-M6 disrupts Bcl-X(L), Bcl-2, and MCL-1 protein-protein interactions with Bax, Bak, Bad, or Bim and induces apoptosis in a Bax- and Bim-dependent manner. *The Journal of biological chemistry*. 2011;286(11):9382-92.
 7. Badr G, Sayed EA, Waly H, Hassan KA, Mahmoud MH, Selamoglu Z. The Therapeutic Mechanisms of Propolis Against CCl4 - Mediated Liver Injury by Mediating Apoptosis of Activated Hepatic Stellate Cells and Improving the Hepatic Architecture through PI3K/AKT/mTOR, TGF-beta/Smad2, Bcl2/BAX/P53 and iNOS Signaling Pathways. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*. 2019;53(2):301-22.
 8. Flentke GR, Baulch JW, Berres ME, Garic A, Smith SM. Alcohol-mediated calcium signals dysregulate pro-survival Snai2/PUMA/Bcl2 networks to promote p53-mediated apoptosis in avian neural crest progenitors. *Birth defects research*. 2019;111(12):686-99.
 9. Liao W, Liu J, Liu B, Huang X, Yin Y, Cai, et al. JIB04 induces cell apoptosis via activation of the p53/Bcl2/caspase pathway in MHCC97H and HepG2 cells. *Oncology reports*. 2018;40(6):3812-20.
 10. Roy S, Sil A, Chakraborty T. Potentiating apoptosis and modulation of p53, Bcl2, and Bax by a novel chrysin ruthenium complex for effective chemotherapeutic efficacy against breast cancer. *Journal of cellular physiology*. 2019;234(4):4888-909.
 11. Tousson E, Rafat BM, Hessien M, El Barbary AA, Sami A. P53 and Bcl2 apoptosis proteins in meso 2,3-dimercaptosuccinic acid treated lead-intoxicated rabbits. *Toxicology and industrial health*. 2011;27(3):271-8.
 12. Song W, Song C, Chen Y, Du M, Hu P, Liu A, et al. Polysaccharide-induced apoptosis in H22 cells through G2/M arrest and BCL2/BAX caspase-activated Fas pathway. *Cellular and molecular biology*. 2015;61(7):88-95.
 13. Li CL, Chang L, Guo L, Zhao D, Liu HB, Wang QS, et al. beta-elemene induces caspase-dependent apoptosis in human glioma cells in vitro through the upregulation of Bax and Fas/ FasL and downregulation of Bcl-2. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*. 2014;15(23):10407-12.
 14. Liang CZ, Zhang JK, Shi Z, Liu B, Shen CQ, Tao HM. Matrine induces caspase-dependent apoptosis in human osteosarcoma cells in vitro and in vivo through the upregulation of Bax and Fas/FasL and downregulation of Bcl-2. *Cancer chemotherapy and pharmacology*. 2012;69(2):317-31.
 15. Mendilcioglu I, Karaveli S, Erdogan G, Simsek M, Taskin O, Ozekinci M. Apoptosis and expression of Bcl-2, Bax, p53, caspase-3, and Fas, Fas ligand in placentas complicated by preeclampsia. *Clinical and experimental obstetrics & gynecology*. 2011;38(1):38-42.
 16. Hikita H, Takehara T, Kodama T, Shimizu S, Shigekawa M, Hosui A, et al. Delayed-onset caspase-dependent massive hepatocyte apoptosis upon Fas activation in Bak/Bax-deficient mice. *Hepatology*. 2011;54(1):240-51.
 17. Gonzaga ACR, Campolina-Silva GH, Werneck-Gomes H, Moura-Cordeiro JD, Santos LC, Mahecha GAB, et al. Profile of cell proliferation and apoptosis activated by the intrinsic and extrinsic pathways in the prostate of aging rats. *The Prostate*. 2017;77(9):937-48.
 18. Toth C, Funke S, Nitsche V, Liverts A, Zlachevska V, Gasis M, et al. The role of apoptosis repressor with a CARD domain (ARC) in the therapeutic resistance of renal cell carcinoma (RCC): the crucial role of ARC in the inhibition of extrinsic and intrinsic apoptotic signalling. *Cell communication and signaling : CCS*. 2017;15(1):16.
 19. Managit C, Sakurai H, Saiki I. Ethanolic extract of *Thevetia peruviana* flowers enhances TNF-alpha and TRAIL-induced apoptosis of human cervical cancer cells via intrinsic and extrinsic pathways. *Oncology letters*. 2017;13(4):2791-8.
 20. Lan T, Zhao H, Xiang B, Wang J, Liu Y. Suture compression induced midpalatal suture chondrocyte apoptosis with increased caspase-3, caspase-9, Bad, Bak, Bax and Bid expression. *Biochemical and biophysical research communications*. 2017;489(2):179-86.
 21. Yang Q, Li S, Fu Z, Lin B, Zhou Z, Wang Z, et al. Shikonin promotes adriamycin-induced apoptosis by upregulating caspase3 and caspase8 in osteosarcoma. *Molecular medicine reports*. 2017;16(2):1347-52.
 22. Medina-Reyes EI, Mancera-Rodriguez MA, Delgado-Buenrostro NL, Moreno-Rodriguez A, Bautista-Martinez JL, Diaz-Velasquez CE, et al. Novel thiosemicarbazones induce high toxicity in estrogen-receptor-positive breast cancer cells (MCF7) and exacerbate cisplatin effectiveness

- in triple-negative breast (MDA-MB231) and lung adenocarcinoma (A549) cells. *Investigational new drugs*. 2020;38(3):558-73
23. Buahorm S, Puthong S, Palaga T, Lirdprapamongkol K, Phuwapraisirisan P, Svasti J, et al. Cardanol isolated from Thai *Apis mellifera* propolis induces cell cycle arrest and apoptosis of BT-474 breast cancer cells via p21 upregulation. *Daru : journal of Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences*. 2015;23 (1):1-11.
 24. Liu C, Zhang RR, Wang YM, Zhang J, Wang Q, Cheng AW, et al. Supercritical CO₂ fluid extraction of croton crassifolius Geisel root: Chemical composition and anti-proliferative, autophagic, apoptosis-inducing, and related molecular effects on A549 tumour cells. *Phytochemistry: international journal of phytotherapy and phytopharmacology*. 2019 Aug;61:152846.
 25. Wang X, Fu Z, Chen Y, Liu L. Fas expression is downregulated in gastric cancer. *Molecular medicine reports*. 2017;15(2):627-34.
 26. Nasim Borhani MM, SorayaSaleh Gargari, Marefat Ghaffari Novin, Ardalan Mansouri, Mir Davood Omrani. Decreased Expression of Proapoptotic Genes Caspase-8- and BCL2-Associated Agonist of Cell Death (BAD) in Ovarian Cancer. *Clinical Ovarian and Other Gynecologic Cancer*. 2014;7(1-2):18-23.
 27. Cheng F, Pan Y, Lu YM, Zhu L, Chen S. RNA-Binding Protein Dnd1 Promotes Breast Cancer Apoptosis by Stabilizing the Bim mRNA in a miR-221 Binding Site. *BioMed research international*. 2017;2017:9596152.
 28. Chen L, Wang L, Yan J, Ma C, Lu J, Chen G, et al. ¹³¹I-labeled monoclonal antibody targeting neuropilin receptor type-2 for tumor SPECT imaging. *International journal of oncology*. 2017;50(2):649-59.
 29. Vartak SV, Iyer D, Santhoshkumar TR, Sharma S, Mishra A, Goldsmith G, et al. Novel BCL2 inhibitor, Disarib induces apoptosis by disruption of BCL2-BAK interaction. *Biochemical pharmacology*. 2017;131:16-28.
 30. Zhu G, Qiu W, Li Y, Zhao C, He F, Zhou M, et al. Sublytic C5b-9 Induces Glomerular Mesangial Cell Apoptosis through the Cascade Pathway of MEKK2-p38 MAPK-IRF- γ -TRADD-Caspase 8 in Rat Thy-1 Nephritis. *Journal of immunology*. 2017;198(3):1104-18.
 31. Peng X, Gan J, Wang Q, Shi Z, Xia X. 3-Monochloro-1,2-propanediol (3-MCPD) induces apoptosis via mitochondrial oxidative phosphorylation system impairment and the caspase cascade pathway. *Toxicology*. 2016;372:1-11.
 32. Deng W, Yang W, Zeng J, Abdalla AE, Xie J. Mycobacterium tuberculosis PPE32 promotes cytokines production and host cell apoptosis through caspase cascade accompanying with enhanced ER stress response. *Oncotarget*. 2016;7(41):67347-59.
 33. Singh R, Banerjee C, Ray A, Rajamani P, Mazumder S. Fluoride-induced headkidney macrophage cell apoptosis involves activation of the CaMKII α -ERK 1/2-caspase-8 axis: the role of superoxide in initiating the apoptotic cascade. *Toxicology research*. 2016;5(5):1477-89.
 34. Frenzel A, Labi V, Chmelewskij W, Ploner C, Geley S, Fiegl H, et al. Suppression of B-cell lymphomagenesis by the BH3-only proteins Bmf and Bad. *Blood*. 2010;115(5):995-1005.
 35. Ghobrial IM, Witzig TE, Adjei AA. Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2005;55(3):178-94.
 36. Shigemi H, Yamauchi T, Tanaka Y, Ueda T. Novel leukemic cell lines resistant to clofarabine by mechanisms of decreased active metabolite and increased antiapoptosis. *Cancer science*. 2013;104(6):732-9.
 37. Yu JS, Lee D, Lee SR, Lee JW, Choi CI, Jang TS, et al. Chemical characterization of cytotoxic indole acetic acid derivative from mulberry fruit (*Morus alba* L.) against human cervical cancer. *Bioorganic chemistry*. 2018;76:28-36.
 38. Wali JA, Masters SL, Thomas HE. Linking metabolic abnormalities to apoptotic pathways in Beta cells in type 2 diabetes. *Cells*. 2013;2 (2):266-83 .
 39. Czabotar PE, Lessene G, Strasser A, Adams JM. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2014;15(1):49-63.