مجله علوم پزشکی مدرس: آسیب‌شناسی زیستی
دوره ۱٤، شماره ۲: از ۳۷-٤۹
تابستان ۱۳۹۰

بررسی تأثیر کورکومین آزاد و دندروزومی بر القای مرگ برنامه‌ریزی شده در سلول‌های بنیادی و سرطانی

نجمه رنجی[۱]، عباس پادگانه[۲]، مجید صادقی‌زاده[۳*]

۱- دانشجوی دکتری تخصصی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت، گیلان، ایران
۲- کارشناس ارشد، گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۳- استاد، گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

دریافت مقاله:۸۹/۱۲/۰۵ پذیرش مقاله: ۹۰/۰۳/۲۳

چکیده

هدف: کورکومین جز فعال گیاه زردچوبه است که با مهار چند مسیر پیام رسانی درون سلولی قادر به القای مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی است. با این حال حلالیت بسیار ضعیف آن در محیط آبی باعث محدودیت استفاده از این ترکیب ارزشمند شده است. در این مطالعه از دندروزوم به‌خاطر حلالیت در آب، داشتن ابعاد نانو و عدم سمیت سلولی برای انتقال کورکومین به سلول استفاده شده است.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش، قابلیت دندروزوم‌ها در رسانش کورکومین به سلول‌های AGS، HT3، 5637، hBMSC و U87 مورد مطالعه قرارگرفت. برای انتخاب بهترین غلظت دارویی و رده سلولی، غلظت‌های مختلف کورکومین در حالت آزاد و قرار گرفته در دندروزوم بر رده‌های سلولی تأثیر داده شد. سپس میزان القای مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی به کمک رنگ پروپیدیوم آیوداید و میزان بیان ژن Bax به روش RT-PCR نیمه کمی بررسی شد.

نتایج: فرمول بندی دندروزومی کورکومین باعث افزایش قابل توجه حلالیت این ماده شدیداً آب‌گریز در سلول‌های AGS شد. به‌طوری که به روش فلوسایتومتری القای مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی بعد از ۱۸ ساعت در سلول‌های تحت تیمار با فرمول بندی دندروزومی کورکومین ٤۸ درصد و با کورکومین آزاد ۲۰ درصد با غلظت بهینهٔ دارو (۲۰میکروگرم در هر میلی‌لیتر) مشاهده شد. همچنین به روش RT-PCR نیمه کمی افزایش سطح بیان ژن القای کننده مرگ برنامه ریزی شده سلول Bax در فرمول بندی دندروزومی نشان داده شد.

نتیجه‌گیری: براساس نتایج، دندروزوم باعث افزایش حلالیت و القای سریع‌تر و بیشتر کورکومین در مقایسه با کورکومین آزاد می‌شود. به‌طوری که افزایش بیان ۵۰ درصدی Bax در سلول‌های تحت تیمار نیز این مسئله را تأیید نمود.

کلیدواژگان: دندروزوم، کورکومین، نانوکورکومین، سلول‌های AGS، مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی

۱- مقدمه

کورکومین (Curcumin) با نام علمی دی فرولوئیل متان (Diferuloylmethane)، پلی فنل زردرنگ و جز فعال اصلی

***نشانی مکاتبه:** تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم زیستی، گروه ژنتیک، کدپستی: ۱٤۱۱۷۱۳۱۱٦
Email: sadeghma@modares.ac.ir

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-10-12]

گیاه همیشه بهار زردچوبه (*Curcuma longa*) است [۱، ۲] که آثار ضد سرطانی آن در سرطان‌هایی از قبیل مثانه، گردن رحم، تخمدان، مغز، پوست و غیره مشاهده شده است. با وجود آن‌که در حلال‌های آلی نظیر دی متیل سولفوکساید (Dimethylsulfoxide: DMSO)، اتانول، و استون حل می‌شود [۳] اما در آب، در شرایط اسیدی انحلال‌ناپذیر و در شرایط خنثی و قلیایی سریعاً تجزیه می‌شود [٤].

امروزه برای افزایش حلالیت این ماده ارزشمند در مایعات بدن و به تبع آن افزایش آثار ضد سرطانی کورکومین، از ناقلین مختلفی برای رسانش دارو استفاده می‌شود. دندروزوم‌ها خانوادهٔ جدیدی از ناقلین هم بَسپار(Copolymer) با ساختار کروی، فرادندانه‌دار و خود متجمع هستند که در تحقیقات گذشتهٔ این گروه برای انتقال ژن به درون سلول‌های یوکاریوتی به‌صورت درون بدنی (In vivo) و آزمایشگاهی (In vitro) مورد استفاده قرار گرفته است [۵، ٦]. در مقایسه با سایر ناقلین دارویی از قبیل لیپوزوم‌ها [۷-۱۱]، نانوذرات [۱۲-۱۵]، فسفولیپیدها و غیره، دندروزوم‌ها از مزایای متعددی از قبیل پایداری، عدم سمّیت و زیست‌تخریب‌پذیری برخوردارند [۵، ٦، ١٦]. در یک بررسی مقایسه‌ای، نشان داده شد که استفاده از دندروزوم‌های حامل ژن وحشی P53، نسبت به ترکیب لیپوفکتامین (Lipofectamine) سبب وقوع مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی (Apoptosis) شدیدتری در رده سلولی اریترولوکمیای انسانی می‌شود [۱۷]. همچنین در بررسی سمّیت، لیپوفکتامین سمّیت بیشتری بر سلول‌های CCRF-CEM (رده سلولی از لوسمی لنفوبلاستیک حاد انسانی) و MOLT-4 (رده سلولی از لوسمی لنفوبلاستیک حاد انسانی) در مقایسه با دندروزوم نشان داد [۱۸]. مطالعه با میکروسکوپ اتمی (Atomic Force Microscopy) نشان می‌دهد، دندروزوم‌ها نانوذراتی با ابعاد ۱۰ تا ۱۰۰ نانومتر هستند و بررسی‌های سمّیت نشان دهندهٔ برتری دندروزوم‌ها نسبت به لیپوفکتامین است. همچنین نشان داده شد که تیمار موش‌ها با دندروزوم‌های حامل ژن HBsAg (Hepatitis B Surface Antigen) منجر به ایمنی‌زایی طولانی مدت‌تری نسبت تیمار سایر ناقلین شد [٦].

با توجه به مزایای ناقلین دندروزومی، در این مطالعه از دندروزوم نسل ۰٤۰۰ [۵، ٦] برای رسانش کورکومین به رده‌های سلولی سرطانی و جنینی استفاده شد. هدف از این مطالعه بررسی حلالیت فرمول بندی دندروزومی کورکومین نسبت به کورکومین آزاد و میزان القای مرگ برنامه‌ریزی شده در سلول‌های تحت تیمار بود. با توجه به حلالیت آبی فرمول بندی دندروزومی کورکومین، در تمامی رده‌های سلولی تحت تیمار با این فرمول‌بندی در مقایسه با کورکومین آزاد القای شدیدتر و سریع‌تر مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی مشاهده شد. همچنین در رده سلولی AGS به دلیل عدم القای مرگ شدید و بقای درصد مناسبی از سلول‌ها، افزایش بیان ژن Bax به روش RT-PCR نیمه کمی تأیید شد.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- کشت سلولی

رده‌های سلولی مورد مطالعه از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران خریداری شد. رده‌های سلولی AGS (رده سلولی آدنوکارسینومای معده)، 5637 (رده سلولی تومور مثانه) و U87 (رده سلولی گلایوما) در محیط کشت کامل RPMI حاوی ۱۰ درصد سرم کشت داده شد. رده سلولی NT2 (رده سلولی کارسینومای جنینی) و HT3 (رده سلولی تومور مثانه) در محیط کشت کامل DMEM با گلوکز زیاد حاوی ۱۰ درصد سرم کشت داده شد و رده سلولی NT2 به‌عنوان کنترل مثبت ژن‌های مربوط استفاده شد. همچنین رده سلولی hBMSC (سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان) در محیط کشت کامل DMEM با گلوکز کم، رشد داده شد.

۲-۲- آماده‌سازی و تهیه فرمول بندی دندروزومی کورکومین

کورکومین استفاده شده در این پژوهش از شرکت Sigma خریداری و فرمول بندی دندروزومی آن مطابق دستور ذکر

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-10-12]

شده در منبع ۵ و ٦ تهیه شد.

۲-۳- افزودن مقادیر مختلف کورکومین دندروزومی و آزاد به سلول‌ها و انتخاب ردهٔ سلولی مناسب

براساس مقالات منتشر شده، برای انتخاب بهترین و مناسب‌ترین غلظت و رده سلولی، غلظت‌های ۲۰، ٤۰ و ۱۰۰ میکروگرم در هر میلی‌لیتر از کورکومین بر رده‌های سلولی AGS، HT3، 5637، hBMSC و U87 تأثیر داده شد. لازم به ذکر است که حساسیت سلول‌ها به غلظت‌های مختلف دارو در امکان بررسی روند تأثیرات تیمار بر چرخه سلولی و بیان ژن‌ها از اهمیت بالایی برخوردار است. برای بررسی تأثیر کورکومین دندروزومی و آزاد بر سلول‌ها تعداد ۲×۱۰^{۵} سلول به هر خانهٔ پلیت ٦ خانه به همراه محیط کشت کامل منتقل شد. پس از رسیدن تراکم سلولی (Confluency) به حدود ۷۰ درصد و تعویض محیط، غلظت‌های مختلف دارو با فواصل زمانی معین به هر خانه اضافه شد. برای تجزیه و تحلیل چرخه سلولی و مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی پس از گذشت ۸ تا ۱۲ ساعت از شروع تیمار دارویی، سلول‌ها با پروپیدیوم آیودایـد (Propidium Iodide) رنگ‌آمیزی و در دستگاه فلوسایتومتر، بررسی شد.

۲-٤- تثبیت سلول‌ها برای عکس‌برداری با میکروسکوپ فلورسنت

پس از انتخاب رده سلولی مناسب (رده سلولی آدنوکارسینومای معده AGS) و غلظت بهینهٔ دارو (۲۰ میکروگرم در هر میلی‌متر)، سلول‌ها با مقادیر مساوی کورکومین آزاد، فرمول بندی دندروزومی کورکومین و دندروزوم خالی به‌مدت ٤ ساعت تیمار شده، سپس محیط کشت محتوی دارو خارج شده و بعد از شستشوی سطح سلول‌ها با PBS (Phosphate Buffered Saline)، سلول‌ها به کمک پارا فرم‌آلدهید ٤ درصد تثبیت و برای عکسبرداری با میکروسکوپ فلورسنت آماده شد.

۲-۵- تجزیه و تحلیل چرخه سلولی با کمک تکنیک فلوسایتومتری

رده سلولی آدنوکارسینومای معده (AGS) همچنین در پلیت‌های ٦ خانه کشت داده شده و پس از رسیدن به تراکم ٦۰-۷۰ درصد، با کورکومین آزاد و فرمول بندی دندروزومی دارو تیمار شد. سپس در بازه‌های زمانی ٤، ٦، ۸، ۱۰، ۱۲ و ۱۸ ساعت پس از تیمار، به کمک پروپیدیوم آیودایـد طبق دستورالعمل شرکت Sigma رنگ‌آمیزی و مورد تجزیه و تحلیل فلوسایتومتری قرار گرفت. دستگاه فلوسیتومتر براساس اندازه نور فلورسانس ساطع شده توسط هر سلول واحد، محتوای DNA آن را تعیین می‌نماید. داده‌های به‌دست آمده از دستگاه فلوسایتومتر به کمک نرم‌افزار FlowMax تفسیر شد. در هیستوگرام‌های به‌دست آمده از دستگاه فلوسایتومتری هنگام تفسیر آن با نرم‌افزار، قلهٔ ابتدایی از سمت چپ به‌طور معمول به‌عنوان نمایندهٔ سلول‌های موجود در مرحله G1 معرفی می‌شود. به‌همین ترتیب قلهٔ دوم نیز به‌عنوان نمایندهٔ سلول‌های موجود در مراحل G2 و M (G2/M) و فاصلهٔ بین دو قله به‌عنوان مرحله S در نظر گرفته می‌شود.

۲-٦- بررسی بیان ژن Bax در رده سلولی AGS با استفاده از روش RT-PCR نیمه کمی

در مطالعهٔ حاضر تفاوت سطح بیان ژن Bax، در دو زمان قبل و پس از تیمار دارویی به کمک روش RT-PCR نیمه کمی و با استفاده از ژن GAPDH (Glyceraldehyde 3- Phosphate dehydrogenase) به‌عنوان کنترل داخلی بررسی شد. برای بررسی بیان ژن Bax ابتدا RNA تام سلولی با استفاده از کیت RNX plus شرکت CinnaGen، قبل و در

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-10-12]

زمان‌های معینی بعد از تیمار دارویی از سلول‌ها استخراج شد. خلوص RNA ی استخراج شده در ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز و با دستگاه NanoDrob مورد بررسی قرار گرفت. سپس واکنش رونویسی معکوس، به کمک آغازگر Oligo-dT و کیت لیوفلیزهٔ سنتز cDNA ی (AccuPower TM RT-PreMix) شرکت Bioneer صورت گرفت. به این منظور آغازگر و RNAی الگو به تیوب‌های لیوفیلیزه سنتز cDNA اضافه و حجم واکنش به میزان مورد نظر رسید. سپس مخلوط واکنش به‌مدت ٦٠ دقیقه در دمای ٤٢ درجه سانتی‌گراد برای انجام واکنش و به‌مدت ١٠ دقیقه در دمای ٧٠ درجه سانتی‌گراد، برای غیرفعال‌سازی آنزیم RT و واسرشت شدن کمپلکس RNA-cDNA در دستگاه ترمال‌سایکلر انکوبه شد. به‌منظور تکثیر قطعهٔ مورد نظر پس از انجام واکنش رونویسی معکوس، واکنش PCR روی محصول RT انجام گرفت. بدین منظور از کیت Titan HotTaq 10X PCR Mix از شرکت BioAtlas استفاده شد. cDNA ی تولید شده به‌عنوان DNA الگو به همراه جفت آغازگر ژن‌های Bax و GAPDH که با نرم‌افزار Gene runner طراحی و توسط شرکت Bioneer سنتز شد، به‌طور جداگانه به مخلوط واکنش طبق دستورالعمل افزوده شد (جدول ١). واکنش PCR طبق برنامه ذیل صورت گرفت: در ابتدا مخلوط واکنش به‌مدت ١٥ دقیقه در دمای ٩٥ درجه سانتی‌گراد گرمادهی شد. سپس در ٣١ چرخه و در هر چرخه به‌ترتیب در دمای ٩٥ درجه سانتی‌گراد ٤٥ ثانیه، در دمای ٦٥ درجه سانتی‌گراد ٤٥ ثانیه و در دمای ٧٢ درجه سانتی‌گراد ٦٠ ثانیه واکنش انجام گرفت. در پایان به‌منظور تکمیل سنتز قطعات نیمه کامل به‌مدت ١٠ دقیقه در دمای ٧٢ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس محصولات PCR روی ژل آگارز ١ درصد تفکیک و با اتیدیوم بروماید (Ethidium Bromide) رنگ‌آمیزی شد. برای کمی کردن داده‌ها (تبدیل باندهای مشاهده شده در ژل آگارز به اعداد قابل اندازه‌گیری) از نرم‌افزار UVtech استفاده شد.

جدول ١ ترادف و سایر مشخصات آغازگرهای به‌کار گرفته شده در واکنش RT-PCR

نام ژن	آغازگر	ترادف	دمای اتصال (Annealing)	طول قطعهٔ به‌دست آمده
Bax	F	TCCACCAAGAAGCTGAGCGAG	٦٤	٢٦٠
	R	CTGATCAGTTCCGGCACCTTG	٦٤	
GAPDH	F	CCCACTCCTCCACCTTTGAC	٥٤	٣٨٠
	R	CATACCAGGAAATGAGCTTGACAA	٥٤	

شکل ١ حلالیت کورکومین درآب؛ تفاوت میزان حلالیت فرمول بندی دندروزومی کورکومین در سمت چپ و کورکومین آزاد در سمت راست در آب نشان داده شده است.

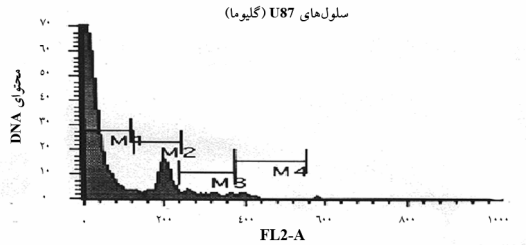
٣- نتایج

٣-١- انتخاب رده سلولی و غلظت مناسب دارو

با توجه به ویژگی‌های ذکر شده در مورد دندروزوم‌ها به‌عنوان ناقلین نانو، انتظار بر این بود که این نانوذرات زیست‌سازگار و شاخه‌دار، از قابلیت مناسبی برای افزایش حلالیت مواد آب‌گریز از قبیل کورکومین برخوردار باشد. بنابراین کمپلکس کورکومین با دندروزوم‌های نسل ٠٤٠٠، حلالیت آن در آب را به شدت افزایش داده و محلولی همگن با قابلیت افزایش زیست‌ماندگاری دارو ایجاد نمود (شکل ١):

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-10-12]

رده‌های سلولی مورد مطالعه با کورکومین در فرمول بندی دندروزومی با غلظت‌های ۲۰، ٤۰ و ۱۰۰ میکروگرم در هر میلی‌لیتر تیمار شده و در بازه‌های زمانی ۸ و ۱۲ ساعت جهت بررسی چرخه سلول و میزان مرگ و بقای سلولی تجزیه و تحلیل فلوسایتومتری شد. در نهایت غلظت ۲۰ میکروگرم در هر میلی‌لیتر و ردهٔ سلولی AGS (با منشا آدنوکارسینومای معده) جهت انجام آزمایش‌های بعدی انتخاب شدند. علت انتخاب این رده سلولی، عدم القای مرگ شدید و بقای درصد مناسبی از سلول‌ها به هدف بررسی بیان ژن بود. در سایر رده‌های سلولی مورد بررسی، غلظت‌های استفاده شده از دارو سبب القای شدید مرگ سلولی شد که خود در بررسی‌های بعدی تأثیر دارو (اندازه‌گیری بیان ژن و ...) عامل محدود کننده بود و امکان بررسی روند تغییرات در اثر تیمار دارو را دشوار می‌ساخت. مطابق (شکل ۲) القای ۸٤ درصدی مرگ در سلول‌های U87 با منشا گلایومای انسانی پس از ۸ ساعت از زمان تیمار با غلظت ۲۰ میکروگرم در هر میلی‌لیتر مشاهده شد. این امر را می‌توان به علت حساسیت مختلف این سلول‌ها به دارو و تأثیر بیش از حد شدید غلظت‌های مورد آزمایش نسبت داد.



شکل ۲ القای مرگ برنامه‌ریزی شده در ردهٔ سلولی U87؛ ۸٤ درصد سلول‌ها پس از ۸ ساعت از زمان تیمار در پیش G1 متوقف شده‌اند.

۳-۲- تیمار رده‌های سلولی با کورکومین آزاد و قرار گرفته در دندروزوم و تجزیه و تحلیل فلوسایتومتری چرخه سلولی

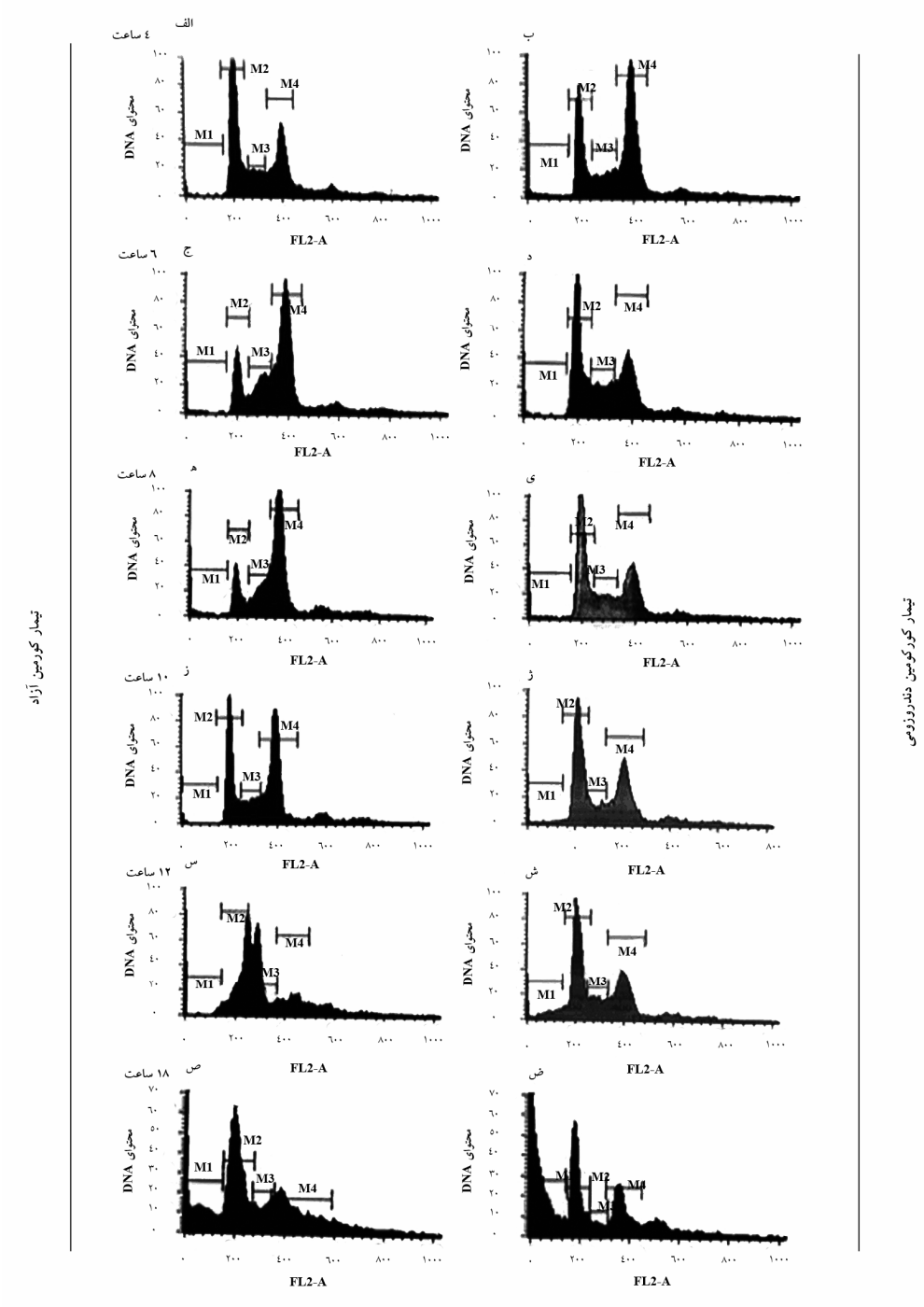
برای بررسی تأثیر کورکومین بر چرخه سلولی، غلظت‌های ۲۰ میکروگرم در هر میلی‌لیتر از کورکومین آزاد به پلیت حاوی سلول اضافه شد و در فواصل زمانی مختلف برای فلوسایتومتری (شکل ۳) و بررسی تأثیر دارو بر مراحل مختلف چرخه سلولی نمونه‌برداری صورت گرفت (شکل ٤). نتایج نشان داد که تیمار سلول‌ها با کورکومین آزاد به‌مدت ٤ ساعت تأثیر قابل توجهی بر چرخه سلولی نداشت (شکل ۳-الف)، در حالی‌که با افزایش زمان به ٦ و ۸ ساعت، توقف چشمگیری در مرحلهٔ G2/M چرخه سلولی در مقایسه با نمونهٔ کنترل (سلول‌های تیمار شده با آب)، مشاهده شد (شکل ۳-ج و ه). با افزایش بیشتر زمان این تیمار به ۱۰ ، ۱۲ و ۱۸ ساعت، به تدریج از سلول‌های تجمع یافته در مرحله G2/M کاسته شده و به سلول‌های مرحله G1 و پیش G1 (Sub-G1) افزوده شد (شکل ۳-ز ،س و ص)؛ در حالی‌که تیمار سلول‌های کشت داده شده با مقادیر مساوی ۲۰ میکروگرم در هر میلی‌لیتر از فرمول بندی دندروزومی، پس از ٤ ساعت از زمان تیمار، منجر به ایجاد توقف چرخه سلولی در مرحلهٔ G2/M شد (شکل۳- ب). همچنین به‌طور مشابهی، با افزایش زمان به ٦، ۸، ۱۰، ۱۲ و ۱۸ ساعت، به تدریج از سلول‌های متوقف شده در این مرحله کاسته شده و به سلول‌های موجود در مرحله G1 و پیش G1 افزوده شد (شکل ۳-ح، ژ، ش و ض).

۳-۳- تأثیر دندروزوم فاقد کورکومین (دندروزوم خالی) بر رده سلولی آدنوکارسینومای معده (AGS)

با توجه به مشاهدات ذکر شده، مشخص شد که در اثر تیمار سلول‌ها با فرمول بندی دندروزومی، توقف در G2/M چرخه سلولی در ساعت ٤ پس از تیمار دارویی القا می‌شود؛ در حالی که این پدیده در مورد کورکومین آزاد، بین ساعات ٦ تا ۸ پس از تیمار مشاهده می‌شود. به‌منظور حصول اطمینان از عدم مشاهده تأثیر فوق به علت حضور ناقل دندروزومی، سلول‌های تیمار شده با مقادیر مساوی دندروزوم خالی در ساعت ٤ برای تجزیه و تحلیل فلوسایتومتری چرخه سلولی بررسی شدند. تیمار سلول‌های AGS با مقادیر مساوی از دندروزوم، ٤ ساعت

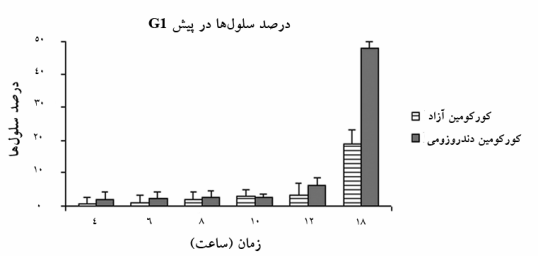
[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-10-12]

پس از شروع تیمار، تأثیر قابل ملاحظه‌ای بر توزیع سلول‌ها در مراحل مختلف چرخه سلولی نداشت. در حالی که شباهت قابل توجهی در توزیع سلولی این گروه با گروه تیمار شده با کورکومین آزاد مشاهده می‌شود (شکل ۵- الف-ت).



شکل ۳ هیستوگرام فلوسایتومتری از تأثیر تیمار سلول‌های AGS (با منشا آدنوکارسینومای معده) بر مراحل مختلف چرخه سلولی در بازه‌های زمانی ٤ (الف-ب)،٦ (ج-د)، ٨ (ه-ی)، ١٠(ز-ژ)، ١٢ (س-ش) و ١٨ (ص-ض) ساعت پس از تیمار با کورکومین آزاد (سمت چپ) و فرمول بندی دندروزومی کورکومین (سمت راست).

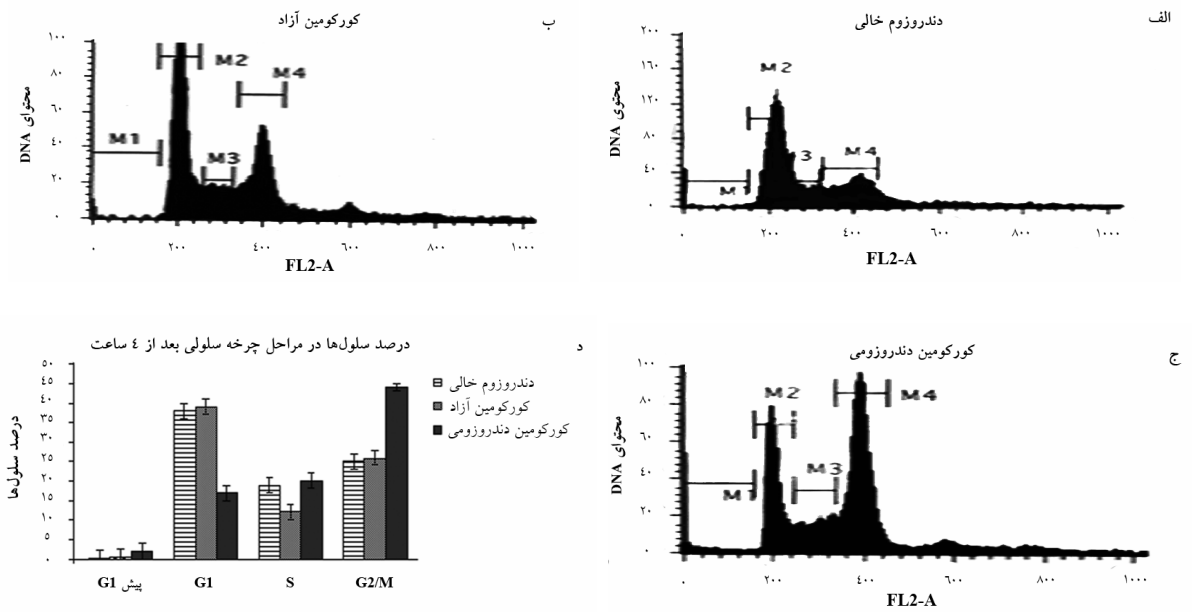
[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-10-12]



شکل ٤ مقایسهٔ درصد سلول‌های وارد شده به مرگ برنامه‌ریزی شده (پیش G1) تحت تیمار با کورکومین. افزایش قابل توجه مرگ سلولی در سلول‌های تیمار شده با فرمول بندی دندرزومی کورکومین در مقایسه با کورکومین آزاد پس از ۱۸ ساعت مشهود است.

۳-٤- مشاهده جذب و ورود کورکومین به سلول‌ها به کمک میکروسکوپ فلوئورسنت

برای مطالعه جذب و ورود دارو به داخل سلول از خصوصیت فلورسنت ذاتی کورکومین استفاده شد. بدین منظور ٤ ساعت پس از شروع تیمار رده سلولی آدنوکارسینومای معده (AGS)، تصویربرداری با میکروسکوپ فلورسنت صورت گرفت که مطابق (شکل ٦) ورود کورکومین دندروزومی به درون سلول‌ها و باقی ماندن کورکومین آزاد در محیط خارج سلولی مشاهده شد.

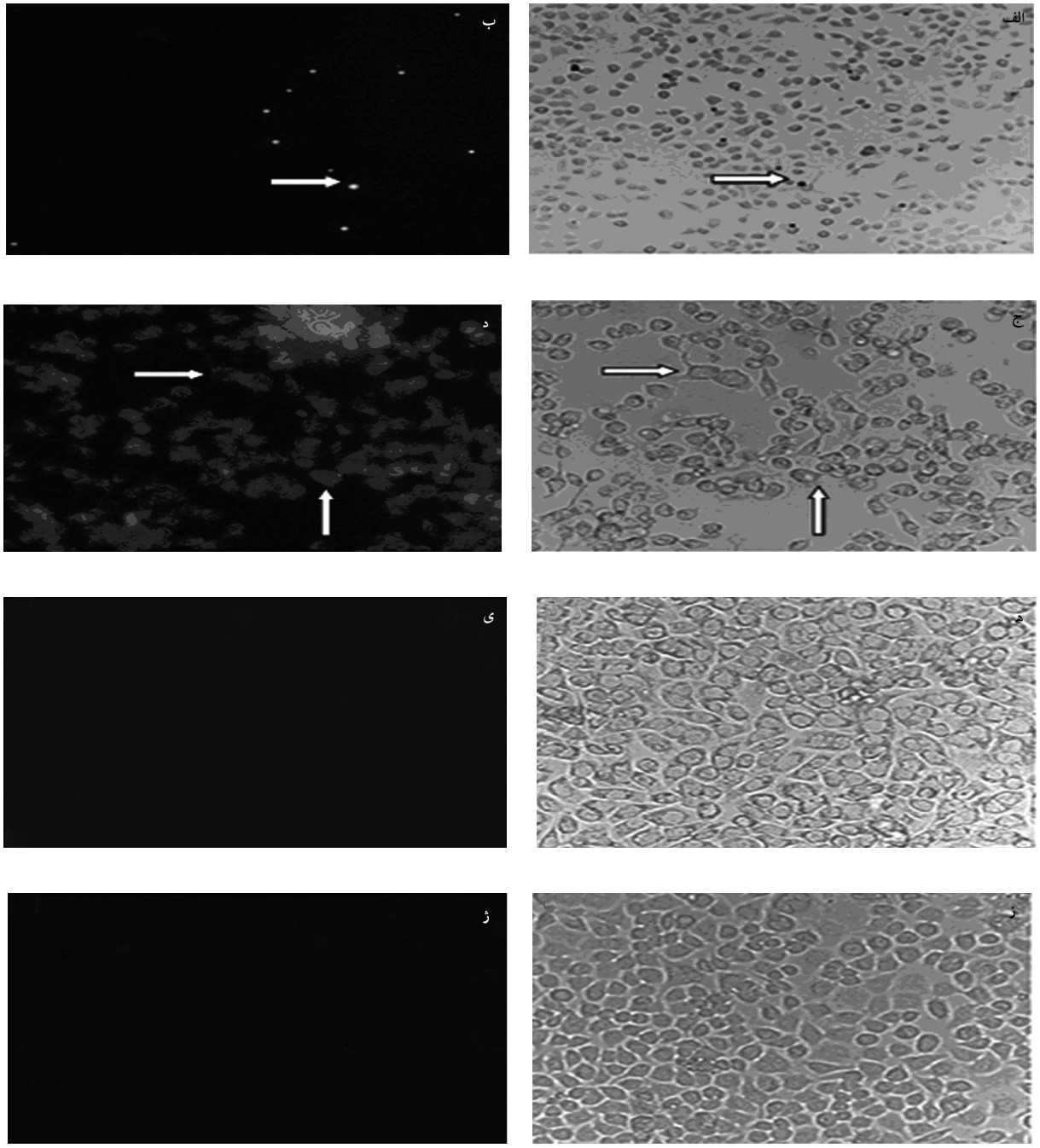


شکل ٥ هیستوگرام فلوسایتومتری (الف-ج) و دیاگرام مقایسه‌ای (د) توزیع سلول‌ها در مراحل مختلف چرخه سلولی؛ ٤ ساعت پس از تیمار سلول‌ها با مقادیر مساوی (۲۰ میکروگرم در هر میلی‌لیتر) از دندروزوم خالی (الف)، کورکومین آزاد (ب) و فرمول بندی دندروزومی کورکومین (ج). به شباهت قابل توجه توزیع سلولی در دو گروه تیمار شده با دندروزوم خالی و کورکومین آزاد در این ساعت توجه نمایید.

۳-٥- بررسی بیان ژن Bax قبل و بعد از تیمار دارویی

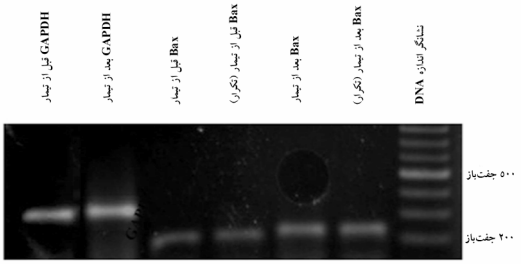
به‌منظور بررسی تأثیر تیمار کورکومین دندروزومی بر میزان بیان ژن Bax، استخراج RNA از سلول‌های تحت تیمار پس از ۸ ساعت صورت گرفت و واکنش رونویسی معکوس و سپس واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای طراحی شده صورت پذیرفت. نتایج براساس شدت باند به‌دست آمده در ژل آگارز (شکل ۷) با نرم‌افزار Uvtech مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. افزایش ٥۰ درصدی در بیان این ژن نشانگر اثر آپوپتوتیک (Apoptotic Effect) فرمول بندی دندروزومی کورکومین است (شکل ۸).

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-10-12]

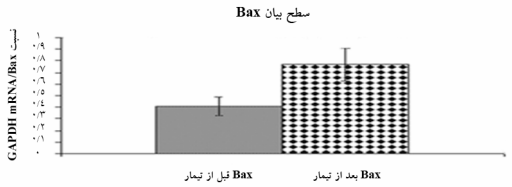


شکل ٦ تصویربرداری با میکروسکوپ فلورسنت و میکروسکوپ نوری؛ تیمار سلول‌های AGS پس از ٤ ساعت با کورکومین آزاد (الف، ب) تجمعات درخشان کورکومین موجود در محیط کشت خارج سلول‌ها و با فرمول بندی دندروزومی کورکومین (بزرگنمایی ×۳/۲) (ج، د)، ورود کورکومین به داخل سلول را (با پیکان) نشان می‌دهد (بزرگنمایی ×۱۰). همچنین مشاهدات نشان داد که سلول‌های تیمار شده با دندروزوم فاقد دارو (هـ ی) (بزرگنمایی× ۲۰)، از لحاظ ریخت‌شناسی، قدرت تکثیر و رشد با سلول‌های تیمار شده با آب [کنترل منفی (ز، ژ)] (بزرگنمایی ×۲۰)، تفاوتی را نشان نمی‌دهند.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-10-12]



شکل ۷ بیان ژن پروآپوپتوتیک Bax در سلول‌های AGS (آدنوکارسینومای معده)؛ بیان ژن Bax بعد از تیمار با کورکومین دندروزومی (۲۰ میکروگرم در هر میلی‌لیتر) افزایش چشمگیری را نسبت به بیان قبل از تیمار نشان می‌دهد.



شکل ۸ دیاگرام مقایسه‌ای بیان ژن Bax قبل و بعد از تیمار سلولی با فرمول بندی دندروزومی کورکومین؛ افزایش ۵۰ درصدی در بیان این ژن نشان دهنده اثر آپوپتوتیک فرمول بندی دندروزومی کورکومین است.

٤- بحث

در عصر اُمیکس (Omics) مشخص شده است که بیشتر بیماری‌ها از جمله سرطان، نتیجه اختلال در عملکرد ۵۰۰ محصول ژنی مختلف است [19] و مهار تنها یک محصول ژنی ممکن است قادر به جلوگیری یا درمان سرطان نباشد [20]. بنابراین روش فعلی در درمان سرطان استفاده از داروهای ترکیبی هوشمند و در مرحله تحقیقات، طراحی و کشف داروهای چند منظوره است [21، 22]. از جمله این داروها می‌توان به کورکومین اشاره نمود که قادر به مهار چندین مسیر پیام رسانی سلولی، جلوگیری از تکثیر سلولی، تهاجم، متاستاز و رگ‌زایی است [20]؛ اما حلالیت بسیار ضعیف آن در آب و جذب کم توسط سلول‌ها، کاربرد این ماده ضد سرطانی مهم را با مشکل مواجه می‌سازد.

بررسی‌هایی که در سه دهه اخیر در زمینه جذب، توزیع، متابولیسم و دفع کورکومین صورت گرفته است، نشان دهنده جذب ضعیف و متابولیسم سریع این ترکیب دارویی است. به‌طوری که والستروم (Wahlstrom) و همکارانش در اولین بررسی خود روی موش‌های صحرایی، جذب بسیار پایین آن توسط دستگاه گوارش را نشان دادند [۲۳]. برای افزایش پایداری و حلالیت کورکومین، لی (Li) و همکارانش پس از بررسی فعالیت ضد توموری کورکومین لیپوزومی روی سلول‌های کارسینومای پانکراس مشخص کردند که کورکومین لیپوزومی مانع از رشد سلول‌های توموری پانکراس می‌شود [۱۷]. از سوی دیگر ناقلینی از جنس کمپلکس‌های میسل و فسفولیپید نیز قادر به افزایش جذب روده‌ای این دارو بوده و در نتیجه مقادیر پلاسمایی دارو را افزایش و سرعت حذف آن را کاهش می‌دهد [۱۲]. علاوه بر این ناقلین، در تحقیقات پیشین این گروه نشان داده شد که دندروزوم‌ها ناقلین کارآیی برای انتقال ژن و ترانسفکشن هستند [۵، ٦]. در این مطالعه نیز از ناقل دندروزومی برای افزایش حلالیت و جذب سلولی کورکومین به دلیل داشتن ویژگی‌هایی از قبیل خنثی بودن از لحاظ بار الکتریکی، ساختار کروی، زیست‌تخریب‌پذیری، عدم سمّیت و ابعاد نانو [۵، ٦، ١٦] استفاده شد. به‌نظر می‌رسد در سلول‌های تیمار شده با کورکومین دندروزومی در مقایسه با سلول‌های تیمار شده با کورکومین آزاد، وقوع زود هنگام توقف در مرز G2/M و جذب سریع‌تر دارو به واسطه افزایش نفوذپذیری غشای سلولی توسط دندروزوم صورت پذیرفت.

از آنجایی که کورکومین، به‌طور انتخابی سبب القای مرگ برنامه‌ریزی شده شدیدتری در سلول‌های پر تقسیم و به شدت تکثیر شونده می‌شود، بنابراین وقوع مرگ برنامه‌ریزی شده در سلول‌های توموری (در مقایسه با سلول‌های طبیعی) بیشتر مشاهده شده است [٢٤]. علت این در تفاوت در تأثیر کورکومین را می‌توان به تغییرات ایجاد شده در غشای سلول‌های توموری و اجزای چرخه سلولی نسبت داد که منجر به تکثیر غیر قابل کنترل و نئوپلاژی (Neoplasia) می‌شود [۲۵]. بخشی از آثار دارویی کورکومین، به مهار تکثیر سلولی و القای مرگ برنامه‌ریزی شده مربوط می‌شود. کورکومین در واقع

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-10-12]

مهار کننده مراحل مختلف در شبکه رونویسی بوده و بدین صورت از تکثیر سلولی جلوگیری می‌نماید. این ترکیب دارویی در بسیاری از رده‌های توموری از قبیل سرطان کولون، سینه، مثانه، مغز، ریه و تخمدان، سبب القای مرگ برنامه‌ریزی شده وابسته به p53 می‌شود. همچنین توقف چرخه سلولی در مرز G2/M چرخه سلولی توسط کورکومین، به‌صورت وابسته به p53 و غیر وابسته به p53 مشاهده شده است [۲۶، ۲۷]. در این تحقیق نیز توقف چرخه سلولی و کاهش رشد که از آثار نوعی کورکومین است، روی سلول‌های آدنوکارسینومای معده مشاهده شد. تیمار رده سلولی فوق با کورکومین دندروزومی، به تدریج منجر به ایجاد تغییراتی در چرخه سلولی از قبیل کاهش رشد سلول‌های تیمار شده و تجمع تدریجی سلول‌ها در نقاط کنترل چرخه سلولی شد. به‌نظر می‌رسد که مهار رشد سلولی توسط فرمول بندی دندروزومی کورکومین ابتدا به شکل سایتواستاتیک بوده و تنها سلول‌ها را در نقاط کنترل چرخه سلولی متوقف می‌نماید، در حالی که با افزایش زمان تیمار، به تدریج سلول‌های متوقف شده در این نقاط وارد مسیر مرگ برنامه‌ریزی شده می‌شوند. با گذشت زمان، سلول‌های متوقف شده می‌بایستی یکی از دو مسیر ذیر را طی نمایند: ۱) در صورت وجود فاکتورهای مناسب برای وقوع مرگ برنامه‌ریزی شده، این سلول‌ها دچار مرگ برنامه‌ریزی شده می‌شوند و در غیر این صورت، با فعالیت سایر مکانیسم‌های عبوری، سلول پس از توقف موقت در این نقطهٔ کنترلی، در نهایت از مرحله G2 خارج شده و تقسیم میتوز صورت می‌گیرد. با تداوم حضور کورکومین در محیط کشت و ورود بیشتر آن به داخل سلول، دومین نقطه کنترلی چرخه سلولی، یعنی نقطه کنترلی G1 فعال شده و مکانیسم‌های مهار کننده عبور سلول از مرحله G1 سبب تجمع تدریجی سلول‌ها در این مرحله و توقف در مرز G1/S می‌شود. در ادامه، افزایش زمان تیمار و تأثیر کورکومین بر مسیرهای آپوپتوتیک [۲۸] و مهار علامت‌های آنتی‌آپوپتوتیک [۲۹]، باعث القای مرگ برنامه‌ریزی شده در سلول‌های متوقف شده در نقاط کنترلی می‌شود.

در مطالعات مختلف مشخص شده که کورکومین قادر به کاهش بیان اعضای آنتی‌آپوپتوتیک خانواده Bcl-2 (B cell lymphoma 2) و افزایش بیان ژن‌های p53، Bax، پروکاسپازهای ۳ (Procaspase 3)، ۸ و ۹، است. پروتئین p53، رونویسی ژن‌های پایین‌دست خود از قبیل $p21^{WAF1}$ و Bax را که القاگر فرایند مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی است، افزایش داده و بدین ترتیب از رشد سلول‌های دچار آسیب DNA و سلول‌های سرطانی جلوگیری به‌عمل می‌آورد [۳۰]. کورکومین نیز قادر به القای بیان ژن p53 در بسیاری از رده‌های توموری گلایوما (Glioma) و سرطان پروستات است [۳۱، ۳۲]. پس از تیمار ردهٔ سلولی AGS، با فرمول بندی دندروزومی کورکومین، سطح بیان پایهٔ ژن Bax، افزایش ۵۰ درصدی را نشان داد که نشانگر فعال شدن تدریجی مسیر میتوکندریایی مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی است. افزایش تدریجی درصد سلول‌های وارد شده به مرحله مرگ برنامه‌ریزی شده از ساعت ۸ به بعد، ادامهٔ این روند احتمالی را پیشنهاد می‌نماید.

۵- تشکر و قدردانی

این مقاله به زنده‌یاد دکتر محمدنبی سربلوکی، استاد گرانقدر مرکز تحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک دانشگاه تهران (Institute of Biochemistry and Biophysics: IBB) تقدیم می‌شود. همچنین از معاونت پژوهشی دانشگاه تربیت مدرس و معاونت پژوهشی و مدیریت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت بابت تأمین امکانات و هزینه‌های این تحقیق کمال تشکر و قدردانی می‌شود.

٦- منابع

[1] Naama JH, Al-Temimi AA, Al-Amiery AAH. Study the anticancer activities of ethanolic Curcumin extract. Afr J Pure Appl Chem 2010; 4(5): 68-73.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-10-12]

[2] Whahlang B, Pawar YB, Bansal AK. Identification of permeability-related hurdles in oral delivery of Curcumin using Coca-2 cell model. Eur J Pharm Biopharm 2011; 77(2): 272-85.

[3] Prasad K, Mantha SV, Kalra J, Lee P. Prevention of Hypercholesterolemic Athero-sclerosis by Garlic, an Antixoidant. J Cardiovasc Pharmacol Ther 1997; 2(4): 309-20.

[4] Wang YJ, Pan MH, Cheng AL, Lin LI, Ho YS, Hsieh CY, Lin JK. Stability of curcumin in buffer solutions and characterization of its degradation products. J Pharm Biomed Anal 1997; 15(12): 1867-76.

[5] Sarbolouki MN, Sadeghizadeh M, Yaghoobi MM, Karami A, Lohrasbi T. Dendrosomes: a novel family of vehicles for transfection and therapy. J Chem Technol Biotechnol 2000; 75(10): 919-22.

[6] Sadeghizadeh M, Ranjbar B, Damaghi M, Khaki L, Sarbolouki MN, Najafi F, Parsaee S, Ziaee AA, Massumi M, Lubitz W, Kudela P, Paukner S, Karami A. Dendrosomes as novel gene porters-III. J Chem Technol Biotechnol 2008; 83: 912-20.

[7] Li L, Ahmed B, Mehta K, Kurzrock R. Liposomal curcumin with and without oxaliplatin: effects on cell growth, apoptosis, and angiogenesis in colorectal cancer. Mol Cancer Ther 2007; 6(4): 1276-82.

[8] Narayanan NK, Nargi D, Randolph C, Narayanan BA. Liposome encapsulation of curcumin and resveratrol in combination reduces prostate cancer incidence in PTEN knockout mice. Int J Cancer 2009; 125(1): 1-8.

[9] Chen C, Johnston TD, Jeon H, Gedaly R, McHugh PP, Burke TG, Ranjan D. An in vitro study of liposomal curcumin: stability, toxicity and biological activity in human lymphocytes and Epstein-Barr virus-transformed human B-cells. Int J Pharm 2009; 366(1-2): 133-9.

[10] Shankeshi J, Aukunuru J. Preparation. Characterization and evaluation of antidiabetic activity of a liposomal formulation encapsulating curcumin, an ayurvedic natural product. Pharmacist 2008; 3(2): 1-5.

[11] Marczylo TH, Verschoyle RD, Cooke DN, Morazzoni P, Steward WP, Gescher AJ. Comparison of systemic availability of curcumin with that of curcumin formulated with phosphatidylcholine. Cancer Chemother Pharmacol 2007; 60(2): 171-7.

[12] Bisht S, Feldmann G, Soni S, Ravi R, Karikar C, Maitra A, Maitra A. Polymeric nanoparticle-encapsulated curcumin ("nanocurcumin"): a novel strategy for human cancer therapy. J Nanobiotechnology 2007; 5: 3.

[13] Das RK, Kasoju N, Bora U. Encapsulation of curcumin in alginate-chitosan-pluronic composite nanoparticles for delivery to cancer cells. Nanomedicine 2010; 6(1): 153-60.

[14] Cartiera MS, Ferreira EC, Caputo C, Egan ME, Caplan MJ, Saltzman WM. Partial correction of cystic fibrosis defects with PLGA nanoparticles encapsulating curcumin. Mol Pharm 2010; 7(1): 86-93.

[15] Anand P, Nair HB, Sung B, Kunnumakkara AB, Yadav VR, Tekmal RR, Aggarwal BB. Design of curcumin-loaded PLGA nanoparticles formulation with enhanced

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-10-12]

cellular uptake, and increased bioactivity in vitro and superior bioavailability in vivo. Biochem Pharmacol 2010; 79(3): 330-8.

[16] Balenga NA, Zahedifard F, Weiss R, Sarbolouki MN, Thalhamer J, Rafati S. Protective efficiency of dendrosomes as novel nano-sized adjuvants for DNA vaccination against birch pollen allergy. J Biotechnol 2006; 124(3): 602-614.

[17] Li L, Braiteh FS, Kurzrock R. Liposome-encapsulated curcumin: in vitro and in vivo effects on proliferation, apoptosis, signaling, and angiogenesis. Cancer 2005; 104(6): 1322-31.

[18] Massumi M, Ziaee AA, Sarbolouki MN. Apoptosis induction in human lymphoma and leukemia cell lines by transfection via dendrosomes carrying wild-type p53 cDNA. Biotechnol Lett 2005; 28(1): 61-6.

[19] Anand P, Sundaram C, Jhurani S, Kunnumakkara AB, Aggarwal BB. Curcumin and cancer: an "old-age" disease with an "age-old" solution. Cancer Lett 2008; 267(1): 133-64.

[20] Kunnumakkara AB, Anand P, Aggarwal BB. Curcumin inhibits proliferation, invasion, angiogenesis and metastasis of different cancers through interaction with multiple cell signaling proteins.Cancer Lett 2008; 269: 199-225.

[21] Jimeno A, Hidalgo M. Multitargeted therapy: can promiscuity be praised in an era of political correctness? Crit Rev Oncol Hematol 2006; 59(2): 150-8.

[22] Sams-Dodd F. Target-based drug discovery: is something wrong? Drug Discov Today 2005; 10(2): 139-47.

[23] Wahlström B, Blennow G. A study on the fate of curcumin in the rat. Acta Pharmacol Toxicol (Copenh) 1978; 43(2): 86-92.

[24] Choudhuri T, Pal S, Agwarwal ML, Das T, Sa G. Curcumin induces apoptosis in human breast cancer cells through p53-dependent Bax induction. FEBS Lett 2002; 512(1-3): 334-40.

[25] Sa G, Das T. Anti cancer effects of curcumin: cycle of life and death. Cell Div 2008; 3: 14.

[26] Choudhuri T, Pal S, Das T, Sa G. Curcumin selectively induces apoptosis in deregulated cyclin D1-expressed cells at G2 phase of cell cycle in a p53-dependent manner. J Biol Chem 2005; 280(20): 20059-68.

[27] Moos PJ, Edes K, Mullally JE, Fitzpatrick FA. Curcumin impairs tumor suppressor p53 function in colon cancer cells. Carcinogenesis 2004; 25(9): 1611-7.

[28] Chaudhary LR, Hruska KA. Inhibition of cell survival signal protein kinase B/Akt by curcumin in human prostate cancer cells. J Cell Biochem 2003; 89(1): 1-5.

[29] Bush JA, Cheung KJ Jr, Li G. Curcumin induces apoptosis in human melanoma cells through a Fas receptor/caspase-8 pathway independent of p53. Exp Cell Res 2001; 271(2): 305-14.

[30] el-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, Lin D, Mercer WE, Kinzler KW, Vogelstein B. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. Cell 1993; 75(4): 817-25.

[31] Liu E, Wu J, Cao W, Zhang J, Liu W, Jiang X, Zhang X. Curcumin induces G2/M cell cycle arrest in a p53-dependent manner and upregulates ING4 expression in human glioma.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-10-12]

J Neurooncol 2007; 85(3): 263-70.

[32] Aggarwal BB, Shishodia S, Takada Y, Banerjee S, Newman RA, Bueso-Ramos CE, Price JE. Curcumin suppresses the paclitaxel-induced nuclear factor-kappaB pathway in breast cancer cells and inhibits lung metastasis of human breast cancer in nude mice. Clin Cancer Res 2005; 11(20): 7490-8.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-10-12]