

Dendrosomal Curcumin Upregulates Expression of the Long Non-coding RNA gene *MEG3* in U87MG Glioblastoma Cells

Mina Zamani¹, Majid Sadeghizadeh^{2*}, Mehrdad Behmanesh³

1- M.Sc. Student, Department of Genetics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

2- Professor, Department of Genetics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

3- Associated Professor, Department of Genetics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

*Corresponding Address: P.O.Code: 1411713116, Department of Genetics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
Email: sadeghma@modares.ac.ir

Received: 13/May/2014, Accepted: 14/Jul/2014

Abstract

Objective: Glioblastoma is an invasive tumor of the central nervous system. Epigenetic therapy of cancer is potentially very useful in reversing some of cancer defects due to reversibility of epigenetic alterations. *MEG3* is a tumor suppressor long non-coding RNA (lncRNA) that expresses in the majority of normal tissues. Methylation of the *MEG3* promoter region elicits a decrease in its expression in glioblastoma cells. Bioactive nutrients including curcumin offer great potential in altering DNA methylation status. Herein, we aim to investigate the epigenetic-based role of dendrosomal-curcumin (DNC) in upregulation of *MEG3* expression in glioblastoma cells.

Methods: We evaluated DNC entrance to U87MG cells with the use of the fluorescent characteristics of curcumin. Next we performed the MTT assay to evaluate DNC and dendrosome effects on cell viability. The ability of DNC to boost expression of *MEG3* in DNA methylation regulation was accomplished by a study of the relative expressions of *MEG3* and DNA methylation regulator enzymes, DNA methyltransferases (*DNMT1*, *DNMT3A* and *3B*) using semi-quantitative and quantitative PCR.

Results: We observed the entrance of DNC into U87MG cells. DNC significantly caused U87MG cell death in a time and dose-dependent manner. However dendrosome did not show any toxic effect on this cell line. Data acquired from gene expression assays determined that DNC upregulated *MEG3* expression ($P<0.05$) and downregulated *DNMT3B* expression ($P<0.05$). There was no significant effect on *DNMT1*, *3A* expression in U87MG cells.

Conclusion: The data showed that DNC could awaken epigenetically silenced tumor suppressor genes through an ambiguous route in glioblastoma cells. Notwithstanding, DNA hypomethylation has occurred by downregulation of DNMTs, inactive DNA demethylation and or active DNA demethylation, subsequently tumor suppressor genes such as *MEG3* a cell growth regulator overexpressed. We concluded that DNC has useful characteristics in epigenetic therapy of glioblastoma.

Keywords: Glioblastoma, DNC, Epigenetic, *MEG3*, *DNMT*

Modares Journal of Medical Sciences: *Pathobiology*, Vol 17, No 3, Autumn 2014, Pages: 41-56

نانوکورکومین دندروزومی بیان ژن MEG3 را در رده سلولی گلیوبلاستوما U87MG افزایش می‌دهد

مینا زمانی^۱، مجید صادقی‌زاده^{۲*}، مهرداد بهمنش^۳

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۲- استاد، گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۳- دانشیار، گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

*آدرس نویسنده مسئول: ایران، تهران، کدپستی: ۱۴۱۷۱۳۱۱۶، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم زیستی، گروه ژنتیک

Email: Sadeghma@modares.ac.ir

پذیرش مقاله: ۹۳/۰۴/۲۳

دریافت مقاله: ۹۳/۰۲/۲۳

چکیده

هدف: گلیوبلاستوما یک تومور تهاجمی از سیستم عصبی مرکزی است. درمان اپیژنتیکی سرطان برای برگرداندن برخی از نواقص سرطان به دلیل قابلیت برگشت پذیری تغییرات اپیژنتیک، بالقوه مفید است. MEG3 یک lncRNA است که در بسیاری از بافت‌های طبیعی بیان می‌شود. متیلاسیون ناحیه پرموتری آن منجر به کاهش بیان این ژن در گلیوبلاستوما می‌شود. ترکیبات غذایی زیست فعال شامل کورکومین توانایی بالایی در تغییر متیلاسیون DNA دارد. در این مطالعه نقش اپیژنتیکی کورکومین دندروزومی یا نانوکورکومین در افزایش بیان MEG3 بررسی شد.

مواد و روش‌ها: در بررسی حاضر ورود نانوکورکومین به سلول‌های U87MG با استفاده از خاصیت ذاتی فلورسانس کورکومین بررسی شد. سپس آزمون MTT به منظور ارزیابی اثر دندروزوم و نانوکورکومین روی زیست‌مانایی سلول انجام شد. توانایی نانوکورکومین برای تقویت بیان MEG3 با اثر روی تنظیم متیلاسیون DNA، با مطالعه بیان نسبی MEG3 و DNA متیل ترانسفرازها شامل DNA متیل ترانسفراز ۱، ۳A و ۳B توسط PCR کمی و نیمه کمی ارزیابی شد.

نتایج: ورود نانوکورکومین به سلول‌های U87MG نشان داده شد. نانوکورکومین به‌طور معنی‌داری در حالت وابسته به غلظت و زمان مسبب مرگ سلول‌های U87MG شد، هرچند دندروزوم اثر سمی معنی‌داری روی سلول‌ها در طیف غلظت آزمایش شده نشان نداد. داده‌های حاصل از سنجش نسبی بیان ژن‌ها نشان دهنده افزایش بیان ژن MEG3 و کاهش بیان DNA متیل ترانسفراز ۳B ($P < 0/05$) و عدم تغییر بیان معنی‌دار DNA متیل ترانسفراز ۱، ۳A در U87MG بود.

نتیجه‌گیری: اطلاعات حاصل از مطالعه نشان می‌دهد نانوکورکومین ژن‌های مهارگر تومور که به‌طور اپیژنتیکی خفته‌است را از طریق مبهم بیدار می‌کند. به هر حال رخداد هیپومتیلاسیون به دنبال کاهش بیان DNA متیل ترانسفراز یا فعال‌سازی دمتیلاسیون DNA در این سلول‌ها رخ می‌دهد و پس از آن ژن‌های مهارگر توموری چون MEG3 یک تنظیم کننده رشد سلولی افزایش بیان می‌یابد؛ بنابراین نانوکورکومین ویژگی‌های مفیدی در درمان اپیژنتیکی گلیوبلاستوما دارد.

کلیدواژگان: گلیوبلاستوما، نانوکورکومین دندروزومی، اپیژنتیک، MEG3، DNA متیل ترانسفراز

مجله علوم پزشکی مدرس: آسیب شناسی زیستی، دوره ۱۷، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۳، صفحات: ۴۱-۵۶

مقدمه

سرطان یکی از مهم‌ترین عوامل مرگ و میر در جهان است؛ بنابراین توجه به پیش‌گیری و درمان آن از اهمیت زیادی

برخوردار است [۱]. برخی از انواع سرطان از جمله گلیوبلاستوما با داشتن پتانسیل بالا برای رشد، تهاجم و مقاومت در برابر درمان‌های عمومی مانند شیمی درمانی و رادیودرمانی دارای توانایی عود مجدد بالایی است [۲، ۳]. تغییرات اپی ژنتیک، از وقایع ابتدایی بالقوه در ایجاد سرطان، به عنوان اهداف جدید راه کارهای جلوگیری از سرطان مطرح است. یکی از تغییرات اپی ژنتیک، متیلاسیون DNA است که فرآیندی بیوشیمیایی است و توسط DNMT (DNA Methyltransferase) کاتالیز می‌شود. در اغلب سرطان‌ها DNMT‌ها افزایش بیان می‌یابد و الگوی متیلاسیون DNA ناهنجار در آن‌ها مشاهده می‌شود [۴]. تجزیه و تحلیل ترانسکریپتوم (Transcriptome) نشان دهنده این است که حدود ۹۰ درصد ژنوم یوکاریوتی رونویسی می‌شود و تنها ۱-۲ درصد این رونوشت‌ها پروتئین کد می‌کنند. نقش عملکردی اغلب این رونوشت‌های غیر کد کننده و ارتباط آن‌ها با فیزیولوژی و بیماری انسان معین نشده است [۵، ۶]. بلوغ پیشرونده و انعطاف‌پذیری سیستم عصبی مرکزی در وقایع متعدد تحت کنترل مغز از جمله وجود حافظه و تغییر مستمر آن در بخشی از سلول‌های مغزی، نشان دهنده میان‌کنش فعال محیط و ترانسکریپتوم این سیستم در قالب شبکه‌های پیچیده RNA‌های غیر کد کننده است. به نظر می‌رسد مکانیسم‌های اپی ژنتیکی بر پایه RNA‌های غیر کد کننده برای هدایت این پدیده طبیعی ضروری باشد و این پیچیدگی دلیل طیف وسیع بیماری‌های عصبی است [۷]. بخشی از RNA‌های غیر کد کننده lncRNA (Long non-coding RNA)‌ها هستند که شواهد موجود گواه شباهت تنظیمی آن‌ها با ژن‌های کد کننده پروتئین است و این شباهت در مکانیسم‌هایی که بیان RNA‌های غیر کد کننده را در سرطان تغییر می‌دهد- از جمله مکانیسم‌های اپی ژنتیک- هم می‌تواند صادق باشد [۸، ۹]. جذابیت برآمده طی سال‌های اخیر در اپی ژنتیک سرطان ناشی از این حقیقت است که این عامل مهم در سرطان‌زایی، قابل وراثت و برگشت‌پذیر است و بدون تغییر توالی DNA بیان ژن را تحت تأثیر قرار می‌دهد [۴، ۱۰، ۱۱]. ژن MEG3

(Maternally Expressed Gene 3) ژن حک‌گذاری شده (Imprinted) با بیان مادری در انسان است که در موقعیت 14q32.2 (MEG3/DLK1) قرار دارد. این جایگاه حاوی ژن‌های حک‌گذاری شده پدری یا مادری متعدد، miRNA‌ها و snRNA‌هاست، جایگاهی که در بسیاری از سرطان‌ها دچار ناهنجاری می‌شود و نشان دهنده حضور بالقوه ژن مهار کننده تومور در این مکان است [۱۲، ۱۳]. با توجه به این‌که ژن‌های بیان شونده مادری رشد جفت و تهاجم تروفوبلاست (Trophoblast) را محدود می‌کند، می‌توان به نقش بالقوه مهار کنندگی آن‌ها در تومورزایی پی برد [۱۴]. MEG3 یک ژن LncRNA است که در اکثر بافت‌های طبیعی با بیشترین میزان در مغز و غده هیپوفیز بیان می‌شود. بیان این ژن با متیلاسیون ناحیه پروموتوری در بسیاری از بدخیمی‌ها و در رده‌های سلولی سرطانی مثانه، شش، کولون، مغز و پستان کاهش می‌یابد [۱۲، ۱۵]. افزایش بیان آن در سلول‌های سرطانی منجر به مهار رشد سلولی، القای بیان و فعال‌سازی p53 و راه‌اندازی مرگ سلولی برنامه ریزی شده (Apoptosis) می‌شود [۱۲، ۱۵، ۱۶]. MEG3 به دلیل توانایی کنترل مسیرهای وابسته به p53، همچنین مسیرهای سیگنالی Wnt، Notch، MAPK و Mitogen-activated protein kinase (به عنوان یک LncRNA سطح بالا (Top level) که رشد سلولی را تحت کنترل دارد، مطرح است [۱۵، ۱۷، ۱۸]. برای درمان بیماری چندعاملی مانند سرطان باید روی ترکیبات درمانی با چند هدف تأکید داشت که یکی از این ترکیبات درمانی جالب توجه برای پیشگیری و درمان سرطان کورکومین (Curcumin) است. کورکومین پلی فنل آب‌گریز استخراج شده از چاشنی طلایی زردچوبه (*Curcuma longa*) است که طی مطالعات فراوان خواص ضد سرطانی، ضد التهابی، ضد اکسیدانی و ضد توکسیکی (Antitoxicity) آن به اثبات رسیده است. بررسی‌های انجام شده نشان می‌دهد که کورکومین مولکولی پلی‌تروپیک (Polytropic) است؛ بدین معنی که قادر است اهداف مختلفی در سلول را شناسایی کند. این ترکیب عوامل

برخوردار است [۱]. برخی از انواع سرطان از جمله گلیوبلاستوما با داشتن پتانسیل بالا برای رشد، تهاجم و مقاومت در برابر درمان‌های عمومی مانند شیمی درمانی و رادیودرمانی دارای توانایی عود مجدد بالایی است [۲، ۳]. تغییرات اپی ژنتیک، از وقایع ابتدایی بالقوه در ایجاد سرطان، به عنوان اهداف جدید راه کارهای جلوگیری از سرطان مطرح است. یکی از تغییرات اپی ژنتیک، متیلاسیون DNA است که فرآیندی بیوشیمیایی است و توسط DNMT (DNA Methyltransferase) کاتالیز می‌شود. در اغلب سرطان‌ها DNMT‌ها افزایش بیان می‌یابد و الگوی متیلاسیون DNA ناهنجار در آن‌ها مشاهده می‌شود [۴]. تجزیه و تحلیل ترانسکریپتوم (Transcriptome) نشان دهنده این است که حدود ۹۰ درصد ژنوم یوکاریوتی رونویسی می‌شود و تنها ۱-۲ درصد این رونوشت‌ها پروتئین کد می‌کنند. نقش عملکردی اغلب این رونوشت‌های غیر کد کننده و ارتباط آن‌ها با فیزیولوژی و بیماری انسان معین نشده است [۵، ۶]. بلوغ پیشرونده و انعطاف‌پذیری سیستم عصبی مرکزی در وقایع متعدد تحت کنترل مغز از جمله وجود حافظه و تغییر مستمر آن در بخشی از سلول‌های مغزی، نشان دهنده میان‌کنش فعال محیط و ترانسکریپتوم این سیستم در قالب شبکه‌های پیچیده RNA‌های غیر کد کننده است. به نظر می‌رسد مکانیسم‌های اپی ژنتیکی بر پایه RNA‌های غیر کد کننده برای هدایت این پدیده طبیعی ضروری باشد و این پیچیدگی دلیل طیف وسیع بیماری‌های عصبی است [۷]. بخشی از RNA‌های غیر کد کننده lncRNA (Long non-coding RNA)‌ها هستند که شواهد موجود گواه شباهت تنظیمی آن‌ها با ژن‌های کد کننده پروتئین است و این شباهت در مکانیسم‌هایی که بیان RNA‌های غیر کد کننده را در سرطان تغییر می‌دهد- از جمله مکانیسم‌های اپی ژنتیک- هم می‌تواند صادق باشد [۸، ۹]. جذابیت برآمده طی سال‌های اخیر در اپی ژنتیک سرطان ناشی از این حقیقت است که این عامل مهم در سرطان‌زایی، قابل وراثت و برگشت‌پذیر است و بدون تغییر توالی DNA بیان ژن را تحت تأثیر قرار می‌دهد [۴، ۱۰، ۱۱]. ژن MEG3

داشت [۲۵-۲۸]. نانوحامل دندروزومی حاوی کورکومین یا نانوکورکومین تولید شده توسط محققین حاضر امکان به کارگیری مفیدتر این ترکیب در تحقیقات و درمان را میسر می سازد [۲۲، ۲۳، ۲۹-۳۱].

مواد و روش ها

سنتز حامل دندروزومی

دندروزوم ها (میسلهای پگیله شده مشتق از واحدهای اسید چرب اولئیک اسید هستند)، دندروزوم مورد استفاده در این تحقیق برای اولین بار در ایران و در گروه تحقیقاتی حاضر طراحی و ساخته شده است. نحوه آماده سازی نانوکورکومین در مطالعه های قبلی گروه حاضر بیان شده است [۲۲، ۲۳]. به طور خلاصه اولئیل کلرید (Sigma Aldrich، آمریکا)، کلو فرم (Merck، آلمان) و تری اتیل آمین (Merck، آلمان) خریداری شد. حامل های دندروزومی OA400 طی واکنش استریفیکاسیون (Esterification) اولئیل کلرید (۰/۳ گرم) و پلی اتیلن گلیکول ۴۰۰ (۴ گرم) و در حضور تری اتیل آمین (۱/۲ گرم) و کلو فرم به عنوان حلال ساخته شد. در نهایت حامل های دندروزومی OA400 بعد از جداسازی نمک تری اتیل آمین هیدروکلرید از فاز آلی و تبخیر کلو فرم در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد و در شرایط خلأ به مدت ۴ ساعت به دست آمد.

آماده سازی کورکومین دندروزومی

کورکومین به صورت تجاری از شرکت Merck (آلمان) خریداری شد. دندروزوم های OA400 به عنوان نانوحامل برای افزایش حلالیت کورکومین در تحقیق حاضر استفاده شد. آماده سازی نانوکورکومین دندروزومی طبق دستور تهیه بهینه شده آن در آزمایشگاه انجام شد. به طور مختصر طیف غلظتی از دندروزوم و کورکومین (نسبت ۱:۵۰ تا ۱:۱۰) به منظور انتخاب نسبت مناسب از دندروزوم و کورکومین توسط اسپکتروفتومتری بررسی شد و در نهایت نسبت وزنی ۱:۲۵ به عنوان نسبت بهینه

مشترک زیادی در سرطان ها را مورد هدف قرار می دهد و خواص ضد سرطانی خود را در بسیاری از سرطان ها به اثبات رسانده است [۱۹، ۲۰]، این نکته الزام انجام تحقیقات تکمیلی در روشن سازی بخش های تاریک باقی مانده در روند به کارگیری کورکومین علیه سرطان را نشان می دهد. ترکیبات غذایی زیست فعال (Bioactive) پتانسیل خوبی در تغییر متیلاسیون DNA با تغییر سطح بیان و عملکرد DNMT ها در راستای پیشگیری و درمان سرطان دارد [۲۱]، کورکومین می تواند یکی از این ترکیبات باشد که طبق تحقیقات *In vitro* (در شرایط آزمایشگاهی) و *In vivo* (در بدن موجود زنده) در آزمایشگاه محققان حاضر [۲۲، ۲۳] به صورت یک ترکیب قدرتمند در مهار رشد توموری و القای مرگ سلولی برنامه ریزی شده (Apoptosis) عمل می کند و با توجه به مطالعات فارماکوکینتیک (Pharmacokinetics)، غلظت پلاسمایی خیلی کمی در انسان نسبت به حالت *In vitro* دارد؛ بنابراین می توان در نظر گرفت فعالیت های زیستی مؤثر آن در انسان حتی در غلظت های کم که طبق مطالعات پیش درمناگاهی به اثبات رسیده است، ناشی از تنظیمات اپی ژنتیکی این ترکیب است. برخلاف تغییرات ژنتیک تغییرات اپی ژنتیک می تواند تحت تأثیر محیط، مواد غذایی و مداخله فارماکولوژیک (Pharmacologic) روی دهد که این نکته علاقه به توسعه راه کارهای درمانی با پلی فنول های غذایی مثل کورکومین را افزایش می دهد [۲۴]. باید در نظر داشت که کاربرد درمانی این داروی مؤثر در درمان سرطان به علت حلالیت کم، متابولیسم سریع و متعاقباً زیست مانایی (Bioavailability) ضعیف آن محدود است. امروزه کاربرد نانوذرات (Nanoparticles) در زمینه سانس داروهای مختلف به سبب افزایش زیست مانایی دارو و هدفمند نمودن آن، مورد توجه محققین قرار گرفته است. این ذرات می تواند انحلال آبی داروهای با خاصیت آب گریزی نظیر کورکومین را افزایش دهد؛ بنابراین انتقال دارویی بر پایه نانوذرات، ارایه بهتر مواد با خاصیت آب گریزی مانند کورکومین و رفع مشکل حلالیت کم آن را در پی خواهد

نانوکورکومین و درمان اپیژنتیکی گلیوبلاستوما

ماده دیگر روی سلول از آزمون MTT استفاده می‌شود. معرف MTT (۳-۴ و ۵-۵ دی متیل تترازولیل - ۲-۲ و ۵-۵ دی فنیل تترازولیوم بروماید) که یک نمک تترازولیوم زرد رنگ است جذب میتوکندری سلول‌های با متابولیک فعال شده و در اثر فعالیت آنزیم‌های دهیدروژناز، تولید بلور فورمازون با رنگ بنفش می‌کند که در حلال مناسب حل می‌شود و میزان رنگ تولید شده با اسپکتروفتومتری اندازه‌گیری می‌شود. برای هر نوع سلولی باید با رسم منحنی، رابطه متناسبی از تعداد سلول و رنگ تولید شده را به دست آورد. به طور مختصر حدود ۵۰۰۰ سلول در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه کشت و ۲۴ ساعت بعد با غلظت‌های معینی از نانوکورکومین و نانوحامل تیمار داده شدند. بعد از زمان مورد نظر برای تیمار، محیط هر چاهک با ۲۰۰ میکرولیتر محلول شامل ۲۰ میکرولیتر MTT (Sigma Aldrich، آمریکا) با غلظت ۵ میلی‌گرم در هر میلی‌لیتر بافر نمکی فسفات و ۱۸۰ میکرولیتر محیط کشت تازه تعویض شد. سپس پلیت‌ها در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد و CO₂ ۵ درصد به مدت ۴ ساعت انکوبه شد. در نهایت ۲۰۰ میکرولیتر DMSO (Di-Methyl Sulfoxide) افزوده شد و زیست‌مانایی نسبی سلول در طول موج ۵۴۰ نانومتر توسط دستگاه الایزا (ELISA Plate Reader) (TECAN، سوئیس) تعیین شد. نسبت جذب در سلول‌های گروه تیمار به گروه کنترل (غلظت صفر) میزان بقای سلول‌ها در هر غلظت را نشان خواهد داد. غلظتی که در آن ۵۰ درصد از سلول‌ها توسط دارو کشته شدند تحت عنوان غلظت کشنده در نظر گرفته شد. داده‌های حاصل از ۳ آزمایش مجزا به صورت میانگین $\pm$ انحراف استاندارد ارائه شد.

استخراج RNA تام سلولی

لیز سلول‌ها با واکشنر (Invitrogene، آمریکا) صورت گرفت. مراحل استخراج RNA طبق روش کار شرکت سازنده انجام شد.

انتخاب شد. نانوکورکومین دندروزومی با غلظت ۲۷۰۰ میکرومولار تهیه و در شرایط دور از نور و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. رقیق‌سازی نانوکورکومین دندروزومی پیش از استفاده برای غلظت مورد نظر تیمار سلول‌ها با استفاده از محیط کشت کامل صورت گرفت.

کشت سلول

در تحقیق حاضر از رده سلولی گلیوبلاستوما U87MG (خریداری شده از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران) استفاده شد. سلول‌ها در محیط کشت RPMI1640 حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی و ۱ درصد آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین-استرپتومایسین (Penicillin-Streptomycin) در شرایط انکوباسیون ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد رشد داده شدند. سلول‌ها پس از گذشت ۳ روز با استفاده از تریپسین (Trypsin) ۰/۲۵ درصد و ۰/۰۲ درصد EDTA (-Ethylenediamine tetraacetic Acid) پاساژ داده شدند. تمامی مواد کشت سلول از شرکت Gibco آمریکا خریداری شد.

مشاهده کورکومین در داخل سلول‌ها با میکروسکوپ

فلورسنت

برای تأیید جذب کورکومین در داخل سلول می‌توان از خاصیت فلورسانسی ذاتی مولکول کورکومین به عنوان شناسه استفاده کرد. بدین منظور سلول‌ها در پلیت کشت و سپس به مدت ۴ ساعت با غلظت ۱۵ میکرومولار کورکومین دندروزومی تیمار شدند. پس از آن محیط کشت حاوی نانوکورکومین خارج شد و بعد از شست شوی سلول‌ها با بافر نمکی فسفات (Phosphate Buffered Saline: PBS)، عکس‌برداری با میکروسکوپ فلورسنت از سلول‌ها انجام گرفت.

آزمون MTT

به منظور سنجش میزان سمیت یک ترکیب شیمیایی یا هر

بررسی کمی و کیفی RNA استخراج شده

پس از استخراج RNA کمیت و کیفیت آن با روش‌های UV اسپکتروفتومتری و الکتروفورز ژل آگارز بررسی شد. بررسی غلظت RNA با روش اسپکتروفتومتری یک روش کمی بود و می‌توان غلظت و خلوص نمونه RNA و آلودگی آن با پروتئین و ترکیبات فنولی را با استفاده از جذب نوری در طول موج‌های ۲۶۰ (برای جذب اسیدنوکلئیک)، ۲۸۰ (برای جذب پروتئین) و ۲۳۰ (برای جذب فنول) نانومتر بررسی کرد. نمونه RNAیی که از نظر شیمیایی دست نخورده باشد و از نظر زیستی کیفیت استاندارد داشته باشد، الگوی باند ویژه‌ای روی ژل آگارز نشان می‌دهد. حضور باندهای RNA ریبوزومی ۱۸S و ۲۸S نشان دهنده سالم و دست نخورده بودن RNA است. نمونه‌هایی با کیفیت عالی، حداقل اسمیر را در بالا، بین و پایین باندهای مذکور نشان می‌دهد و شدت باند ۲۸S تقریباً دو برابر باند ۱۸S است. فقدان باندهای واضح RNA ریبوزومی ۱۸S و ۲۸S نشان دهنده تجزیه نمونه RNA توسط آنزیم RNase است؛ به‌ویژه اگر حالت اسمیر محدود به بخش تحتانی ژل باشد.

واکنش رونویسی معکوس (Reverse Transcription)

برای تبدیل RNA به cDNA (Complementary DNA) نیاز به آغازگر (Primer) برای جفت شدن با RNA است و توسط آنزیم DNA پلیمراز وابسته به RNA کپی cDNA

ایجاد می‌شود. آغازگری که برای سنتز اولین رشته cDNA استفاده می‌شود می‌تواند به‌طور اختصاصی به RNA مورد هدف یا عمومی باشد و به همه RNAها متصل شود. در این تحقیق آغازگرهای عمومی استفاده شد. به دلیل احتمال آلودگی RNA استخراج شده به DNA، نمونه‌های RNA با DNaseI (Thermo Fisher Scientific، آمریکا) تیمار شدند. سپس برای سنتز cDNA در این تحقیق از کیت PrimeScript™ RT reagent (Takara Bio Inc، ژاپن) استفاده شد. باید توجه داشت که کلیه مراحل با وسایل و محلول‌های عاری از RNase انجام شود.

واکنش RT-PCR (Reverse Transcription PCR)

پس از واکنش رونویسی معکوس، ابتدا واکنش PCR معمولی یا نیمه کمی برای اطمینان از درستی و اختصاصی بودن آغازگرها روی محصول RT یا cDNA انجام گرفت. سپس از واکنش Real time RT-PCR و سیستم Eva green (ROX) (Ampliqon، دانمارک) برای سنجش کمی بیان ژن‌ها استفاده شد.

طراحی آغازگر

برای طراحی آغازگر از نرم‌افزارهای (Primer Biosoft International، کانادا) AlleleID 6.00، PerlPrimer v1.1.16، و Oligo 7 و IDT (Oligo analyser) استفاده شد (جدول ۱).

جدول ۱ آغازگرهای مورد استفاده در RT-PCR

ژن	آغازگر	موقعیت کروموزومی	ترادف	طول قطعه (جفت باز)
DNMT1	جلویی برگشتی	19p13.2	5'-GAAGGAGCCCGTGGATG-3' 5'-GTTGATGTCTGCGTGGTAG-3'	۲۳۳
DNMT3A	جلویی برگشتی	2p23	5'-TACGCACCACCTCCAC-3' 5'-AGATGTCCTCAATGTTCC-3'	۱۱۰
DNMT3B	جلویی برگشتی	20q11.2	5'-CGACCTCACAGACGACAC-3' 5'-TTCCAAACTCCTTCCCATCC-3'	۱۷۰
MEG3	جلویی برگشتی	14q32	5'-ATCATCCGTCCACCTCCTTGCTTTC-3' 5'-GTATGAGCATAGCAAAGGTCAGGC-3'	۲۸۴
HOTAIR	جلویی برگشتی	12q13.13	5'-CCAAACAGAGTCCGTTTCAGTG-3' 5'-TACACAAGTAGCAGGGAAAGG-3'	۱۱۰
GAPDH	جلویی برگشتی	12p13	5'-GTGAACCATGAGAAGTATGACAAC-3' 5'-CATGAGTCCTTCCACGATACC-3'	۱۲۳

نمودار رسم شده، چرخه آستانه (C_T : Threshold cycle) تعیین شد. در ادامه پس از محاسبه تفاضل میانگین C_T ژن مرجع از میانگین C_T ژن مورد نظر برای هر دو نمونه کنترل و تیمار، شاخص ΔC_T در دو نمونه کنترل (رابطه ۱) و تیمار (رابطه ۲) به دست آمد. همچنین از تفاضل دو ΔC_T ، شاخصی تحت عنوان $\Delta\Delta C_T$ (رابطه ۳) محاسبه شد [۳۲]:

$$\begin{aligned} \text{رابطه ۱: } \Delta C_T &= [mC_T (\text{کنترل}) - mC_T (\text{ژن مورد نظر})] \\ \text{رابطه ۲: } \Delta C_T &= [mC_T (\text{تیمار}) - mC_T (\text{ژن مورد نظر})] \\ \text{رابطه ۳: } \Delta\Delta C_T &= \Delta C_T (\text{کنترل}) - \Delta C_T (\text{تیمار}) \end{aligned}$$

نتایج

مشاهده کورکومین داخل سلول با میکروسکوپ فلورسنت

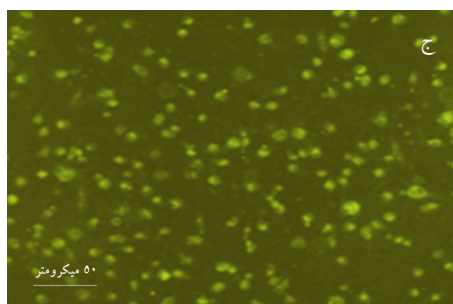
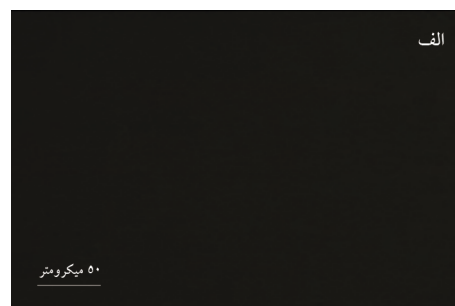
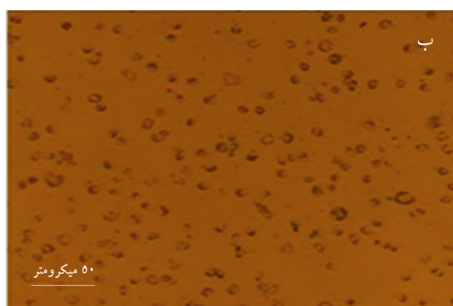
در مطالعات قبلی گروه حاضر مقایسه بین ورود نانوکورکومین و کورکومین به تنهایی به رده‌های مختلف سلولی و از جمله آن‌ها U87MG صورت گرفته است [۲۲، ۲۳]، در این مطالعه هدف بررسی ورود نانوکورکومین به سلول و تأثیر آن روی بیان ژن‌های مورد نظر است.

پس از محاسبه کارایی تکثیر آغازگرها با نرم‌افزار PCR Linreg (Heart Failure Research Center، هلند) که به منظور استفاده از روش $2^{-\Delta\Delta C_T}$ انجام شد و نشان دهنده کارایی بالای ۹۰ درصد برای همه آغازگرها بود، سنجش Real-time PCR برای ژن‌های هدف و مرجع در مورد نمونه‌های مورد نظر با استفاده از این روش صورت گرفت. با اتمام تکثیر و بر اساس

در ادامه نسبت تغییرات بیانی بین دو نمونه تیمار و کنترل با استفاده از رابطه ۴ تعیین شد [۳۲].

$$\text{رابطه ۴: } \text{Ratio}^{-\Delta\Delta C_T} = (\text{نسبت بیانی})$$

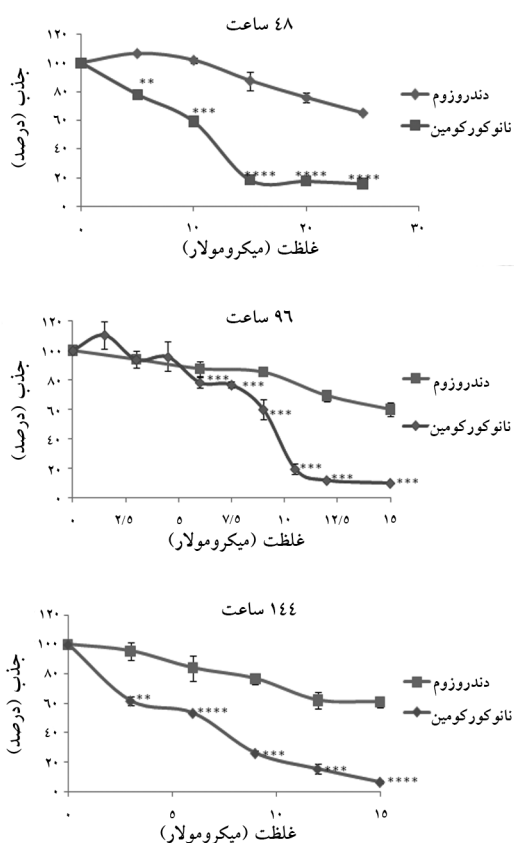
تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار GraphPad Prism5 و تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از روش T-test Unpaired بین نمونه کنترل و تیمار انجام شد. نرمال‌سازی (Normalization) تغییرات سطوح بیانی mRNA ها و lncRNA ها در مقایسه با سطوح بیانی ژن GAPDH انجام شد.



شکل ۱ مشاهده جذب سلولی کورکومین با میکروسکوپ، تصاویر از رده سلولی U87 MG؛ (الف) تصویر کنترلی در حالت خاموشی UV، (ب) تصویر میکروسکوپ نوری، (ج) تصویر میکروسکوپ UV، (عکس‌ها با بزرگنمایی $\times 100$)

بررسی زیست‌مانایی سلول‌های U87MG تحت تیمار با نانوکورکومین با استفاده از آزمون MTT

بررسی حساسیت سلول‌های توموری U87MG به واسطه تیمار این سلول‌ها با نانوکورکومین دندروزومی در غلظت‌های مختلف و بازه‌های زمانی ۴۸، ۹۶ و ۱۴۴ ساعت انجام شد.

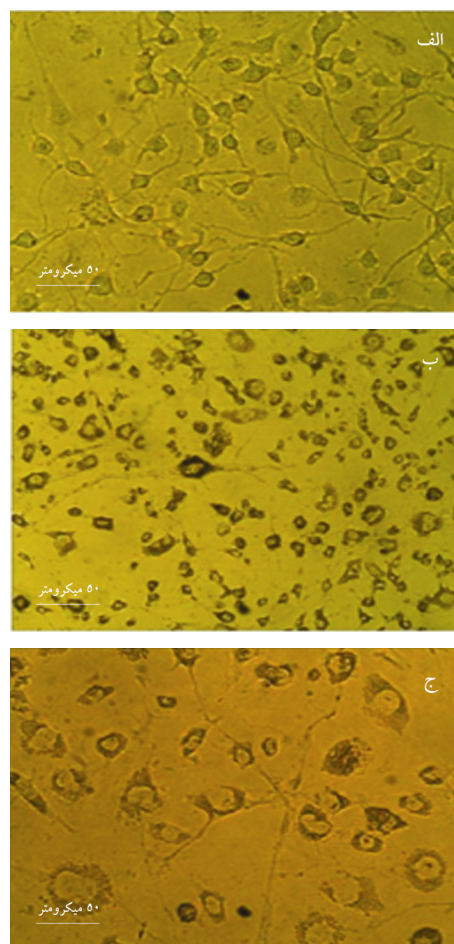


شکل ۳: بررسی تأثیر نانوکورکومین دندروزومی و دندروزوم تنها بر بقای رده سلولی U87MG؛ سلول‌ها به مدت ۴۸، ۹۶ و ۱۴۴ ساعت با غلظت‌های مختلف از دندروزوم و نانوکورکومین تیمار شدند. نتایج به صورت میانگین $\pm$ انحراف استاندارد بیان شده است. (*: $P < 0/05$, **: $P < 0/01$, ***: $P < 0/001$, ****: $P < 0/0001$)

نتایج به دست آمده (شکل ۳) با روش MTT نشان داد نانوکورکومین در یک روش وابسته به زمان و غلظت، تکثیر سلول‌های سرطانی رده سلولی مورد آزمایش را به طور معنی داری مهار می‌کند ($P < 0/05$)، در حالی که در همان غلظت‌ها نانوحامل

در شکل ۱ تصاویر بیانگر ورود نانوکورکومین به سلول‌هاست و فلورسنت کورکومین در تصویر میکروسکوپ فلورسنت مشاهده می‌شود.

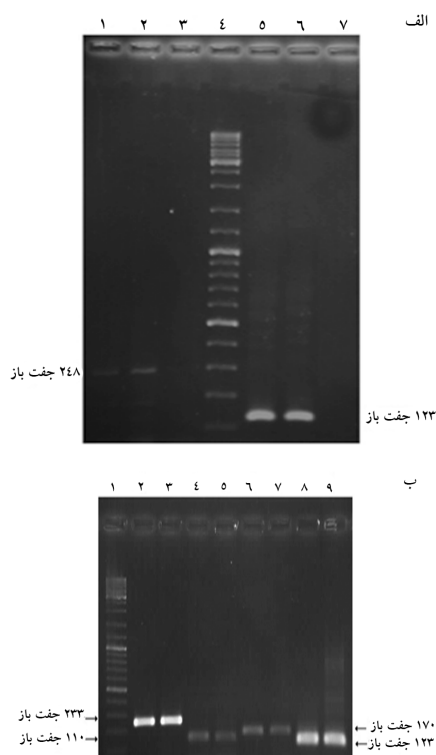
همان‌طور که در تصاویر شکل ۲ مشاهده می‌کنید رشد سلول‌ها در نمونه تیمار نسبت به نمونه کنترل کاهش نشان می‌دهد، همچنین در نمونه تیمار سلول‌ها به حالت وزیکوله - یکی از نشانه‌های ظاهری سلول در حالت آپوپتوز (Apoptosis) یا مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده - هستند.



شکل ۲: اثر سمیت سلولی نانوکورکومین روی سلول‌های سرطانی U87MG؛ (الف) سلول‌ها بدون تیمار ($\times 200$)، (ب) سلول‌ها به مدت ۴۸ ساعت با ۱۲ میکرومولار نانوکورکومین تیمار شدند ($\times 200$). (ج) تصویر سلول‌های تیمار شده با بزرگنمایی بیشتر ($\times 400$). همان‌طور که در عکس‌ها مشخص است نانوکورکومین به طور معنی داری رشد سلول‌ها را مهار کرده و تغییرات پارزی به صورت اشکال وزیکولی در شکل و ظاهر سلول‌ها قابل مشاهده است.

نانوکورکومین و درمان اپیژنتیکی گلیوبلاستوما

تحلیل آماری انجام شد. همان‌طور که در قسمت ب از شکل ۵ مشاهده می‌شود، نتیجه نشان دهنده افزایش بیان معنی‌دار HOTAIR و MEG3 ($P < 0.05$) و عدم تغییر بیان معنی‌دار ژن HOTAIR بود. بیان این ژن‌ها در نمونه‌های تیمار با نانوکورکومین نسبت به بیان آن‌ها در نمونه‌های کنترل-نرمال‌سازی شده نسبت به ژن کنترل درون‌زاد GAPDH- در جدول ۲ قابل مشاهده است.



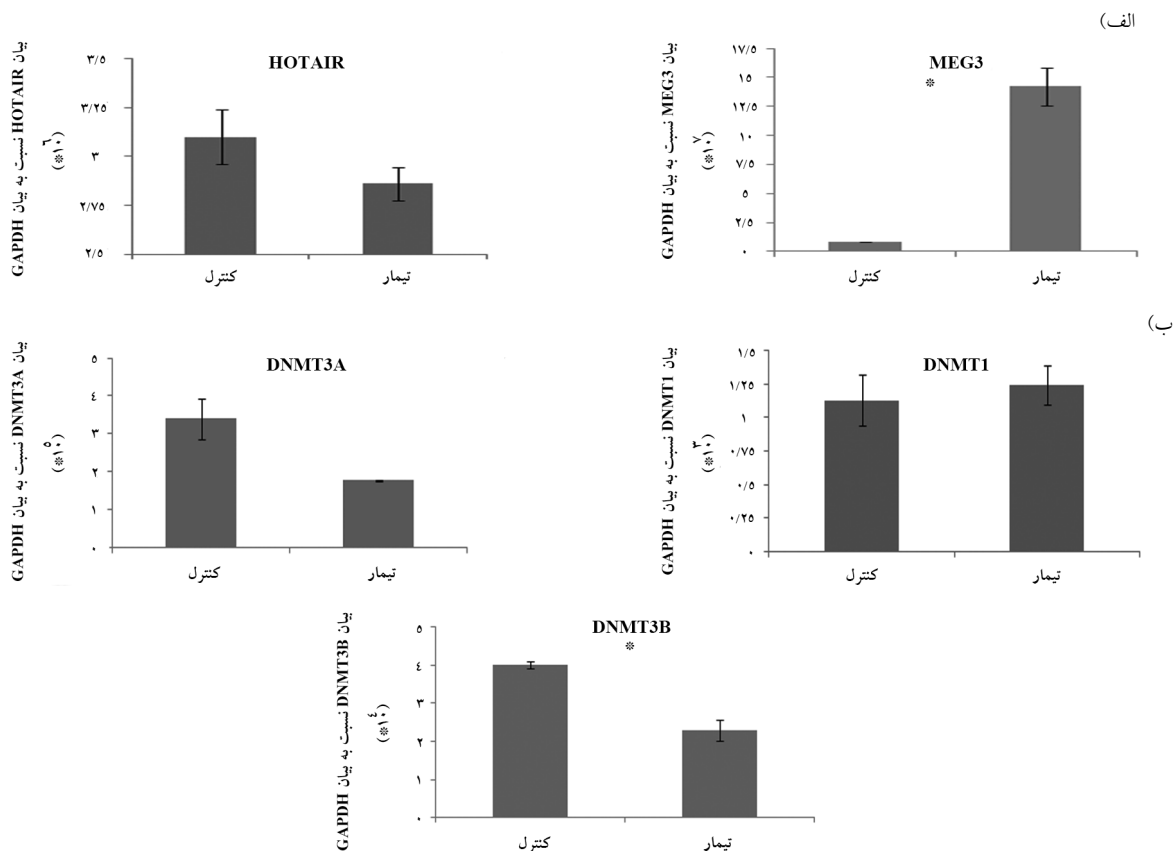
شکل ۴: تغییرات بیان ژن‌های MEG3 و DNMT ها در اثر تیمار با نانوکورکومین در بازه زمانی ۴۸ ساعت در رده سلولی U87MG به صورت نیمه کمی؛ (الف) تغییرات بیان MEG3 در اثر تیمار با نانوکورکومین در رده سلولی U87MG روی ژل آگارز ۱/۵ درصد، چاهک‌ها به ترتیب: (۱) بیان MEG3 در نمونه کنترل (بدون تیمار)، (۲) بیان MEG3 نمونه تیمار شده با نانوکورکومین، (۳) نمونه کنترل منفی، (۴) نشانگر (Marker)، (۵) بیان GAPDH در نمونه کنترل (بدون تیمار)، (۶) بیان GAPDH نمونه تیمار شده با نانوکورکومین، (۷) نمونه کنترل منفی (ب) بررسی نیمه کمی بیان ژن‌های DNMT ها؛ نتایج RT-PCR نیمه کمی ژن‌های DNMT1، DNMT3A، DNMT3B به همراه کنترل داخلی GAPDH در نمونه‌های کنترل و تیمار ۴۸ ساعت رده‌های سلولی U87MG روی ژل آگارز ۱/۵ درصد، چاهک‌ها به ترتیب: (۱) نشانگر، (۲) بیان DNMT1 در نمونه کنترل (بدون تیمار)، (۳) بیان DNMT1 نمونه تیمار شده با نانوکورکومین، (۴) بیان DNMT3A در نمونه کنترل (بدون تیمار)، (۵) بیان DNMT3A در نمونه تیمار شده با نانوکورکومین، (۶) بیان DNMT3B در نمونه کنترل (بدون تیمار)، (۷) بیان DNMT3B در نمونه تیمار شده با نانوکورکومین، (۸) بیان GAPDH در نمونه کنترل (بدون تیمار)، (۹) بیان GAPDH در نمونه تیمار شده با نانوکورکومین، (نشانگر: Fermentas، GeneRuler DNA ladder mix، آمریکا)

یا دندروزوم اثر سمیتی نشان نمی‌دهد ولی در غلظت‌های بالاتر برای رده سلولی مورد آزمایش سمیت نشان داد و این داده نشان می‌دهد که مرگ مشاهده شده در سلول‌های گلیوما به واسطه کورکومین انجام گرفته است و دندروزوم با افزایش حلالیت کورکومین این رسانش را به سلول‌های سرطانی تسهیل کرده است. عدم داشتن تأثیر سمی نانوحامل روی این رده سلولی و رده‌های سلولی دیگر در مطالعات قبلی عنوان شده نشان می‌دهد که این استفاده از نانوحامل برای ورود کورکومین به این سلول‌ها ایمن است. مقدار دوز مؤثر کشنده یا IC_{50} (Inhibitory Concentration) یا LD_{50} (Lethal Dose) که معادل غلظتی است که در آن نیمی از سلول‌ها دچار مرگ شده‌اند و از تقسیم بازایستاده‌اند، برای نانوکورکومین در سلول‌های U87 MG ۱۲/۵ میکرومولار در زمان ۴۸ ساعت بود. همچنین مقدار LD_{50} یا IC_{50} برای نانوکورکومین برای سلول‌های U87 MG ۹/۵ میکرومولار در زمان ۹۶ ساعت و ۵/۵ میکرومولار در زمان ۱۴۴ ساعت بود.

بررسی بیان ژن‌های DNMT ها و ژن‌های lncRNA MEG3 و HOTAIR در رده سلولی U87MG تحت تیمار با نانوکورکومین

بیان MEG3 (شکل ۴ الف) و بیان DNMT های از نو (de novo) شامل DNMT3A و DNMT3B (DNA متیل ترانسفرازهایی که اغلب مسئول ایجاد متیلاسیون در جایگاه‌های CpG که متیل نیست) و نگهدارنده DNMT1 (DNA متیل ترانسفرازهایی که طی همانندسازی، الگوهای متیلاسیونی را که از قبل موجود است روی رشته جدید کپی می‌کند)، (شکل ۴ ب) در رده سلولی U87MG تحت اثر تیمار با نانوکورکومین در بازه زمانی ۴۸ ساعت با روش RT-PCR نیمه کمی بررسی شد.

بیان دو ژن MEG3 و lncRNA HOTAIR توسط RT-PCR کمی یا Real time PCR بین نمونه‌های کنترل و تیمار با نانوکورکومین در بازه زمانی ۴۸ ساعت نسبت به بیان ژن GAPDH بررسی شد و با روش Unpaired t-test تجزیه و



شکل ۵ بررسی تغییرات بیان دو ژن lncRNA و سه ژن DNMT در نمونه کنترل و تیمار با نانوکوکومین در بازه زمانی ۴۸ ساعت به صورت کمی؛ (الف) بررسی بیان HOTAIR و MEG3 با استفاده از تجزیه و تحلیل داده‌های Real-time PCR، (ب) کمی‌سازی بیان DNMT3B، DNMT3A، DNMT1 در نمونه‌های کنترل و تیمار ۴۸ ساعت با نانوکوکومین توسط نرم‌افزار ImageJ 1.45s. نتایج به صورت میانگین $\pm$ انحراف استاندارد بیان شده است. (*): $P < 0.05$

سرطانی U87MG نشان دهنده کاهش بیان DNMT3B و عدم تغییر بیان معنی‌دار ژن‌های DNMT3A و DNMT1 بود. بیان این ژن‌ها در نمونه‌های تیمار با نانوکوکومین نسبت به بیان آن‌ها در نمونه‌های کنترل-نرمال‌سازی شده نسبت به ژن کنترل درون‌زاد GAPDH- در جدول ۲ قابل مشاهده است.

تصاویر باند مربوط به هر ژن DNMT (شکل ۴ الف) نسبت به کنترل داخلی GAPDH با استفاده از نرم‌افزار ImageJ 1.45s (National Institute of Health، آمریکا) کمی‌سازی شد و با روش Unpaired t-test تجزیه و تحلیل آماری انجام شد (شکل ۵ الف). نتایج بررسی بیان ژن‌های DNMT در رده سلولی

جدول ۲ سطوح نسبی رونوشت ژن‌ها (mRNA و lncRNA) در نمونه‌های تیمار شده با نانوکوکومین نسبت به نمونه‌های کنترل

ژن	تغییر بیانی هر ژن نسبت به کنترل داخلی GAPDH ($2^{-\Delta\Delta CT}$)	ارزش P	افزایش یا کاهش بیان
DNMT1	۱/۱۰۱۷	۰/۵۳۴۳	(تغییر بیان با $P > 0.05$ معنی‌دار نیست)
DNMT3A	۰/۶۳	۰/۰۹۳۹	(تغییر بیان با $P > 0.05$ معنی‌دار نیست)
DNMT3B	۰/۶۰۷	۰/۰۲۷۵	(کاهش)
MEG3	۷/۸۳۲۹۸۶۸۱۸	۰/۰۲۶۴	(افزایش)
HOTAIR	۰/۹۸۷۱۹۸	۰/۱۷۵۸	(تغییر بیان با $P > 0.05$ معنی‌دار نیست)

بحث

ترکیبات غذایی طبیعی منبع بسیار مناسبی برای درمان سرطان، مهم‌ترین عامل مرگ قرن، است. با وجود تحقیقات فراوان در زمینه پیشگیری، تشخیص و درمان سرطان، هنوز سرطان یکی از بزرگ‌ترین چالش‌های سلامت بشر است. به هرحال نیاز مبرمی به داروهای ضد سرطان، ترکیبات دارویی جدید و راه‌کارهای شیمی درمانی با اکتشافات علمی و شناسایی گنجینه عظیم ترکیبات طبیعی، زیستی و مصنوعی است [۳۳]. به‌خوبی نشان داده شده است که یک سلول نه تنها براساس ژنوم (جهش در ژن‌های کلیدی) بلکه بر اساس اپی ژنوم (بیان نامناسب ژن‌های کلیدی) خود نیز سرطانی می‌شود. فعالیت اپی ژنتیکی نادرست نقش مهمی در ایجاد سرطان دارد، برخلاف جهش‌های DNA - تغییرات دایمی - تغییرات اپی ژنتیکی قابلیت برگشت‌پذیری دارد. این بدین معنی است که می‌توان راهی برای تنظیم فعالیت نادرست اپی ژنتیکی برای کسب دوباره بیان مناسب ژن و غلبه بر سرطان‌های مقاوم به شیمی درمانی پیدا کرد. طی سال‌های اخیر، شواهد نشان دهنده این بوده است که محصولات طبیعی و ترکیبات غذایی، بالقوه توانایی اثر روی متیلاسیون DNA و احیای بیان ژن‌های مهارگر تومور خاموش شده با متیلاسیون پروموتور را دارد [۳۴]. اخیراً گروه Esteller تنظیم وابسته به متیلاسیون را برای lncRNA هایی که بدون داشتن جهش در سرطان دچار اختلال بیان می‌شود، مطرح کرده است [۳۵]. بیان MEG3 در بسیاری از سرطان‌ها با هیپرمتیلاسیون پروموتور، کاهش می‌یابد. این ژن در تکوین مغز و سیستم عصبی مرکزی نقش به‌سزایی دارد و فقدان بیان آن منجر به افزایش بیان عوامل رگ‌زایی در مغز می‌شود، همچنین در بیماری‌های تخریب‌گر عصبی مانند هانتینگتون (Huntington) بیان آن کاهش می‌یابد که این اطلاعات گواه عملکرد اختصاصی این lncRNA در سلول‌های مغزی است [۳۶-۳۸]. کورکومین یک پلی فنول ضد سرطان است و آثار ضد التهابی و ضد اکسیداتیو آن به‌خوبی به اثبات رسیده است [۱۹]؛ در ارتباط با تأثیر آن در مکانیسم مولکولی

تنظیم اپی ژنتیک، گرچه در تعدادی از گزارش‌ها دارا بودن پتانسیل مهار ساختاری DNMT1 برای کورکومین ذکر شده است ولی به‌طور مستقیم تأثیر اپی ژنتیکی کورکومین در مورد سرطان گلیوما مطالعه نشده است. لیو (Liu) و همکارانش نشان دادند کورکومین و یکی از مشتقات آن تتراهیدروکورکومین می‌تواند DNMT1 را از طریق مهار کردن گروه تیول کاتالازیک C1226، مهار کند [۳۹]. با وجود این‌که اثر مهار ساختاری کورکومین روی DNMT1 گزارش شد اما در مورد اثر کورکومین روی بیان DNMT ها گزارش‌های ضد و نقیضی شامل عدم کاهش بیان DNMT1، DNMT3A و 3B در سرطان پروستات و کاهش بیان آن‌ها در سطح RNA و پروتئین در لوکمی (Leukemia) موجود است [۴۰، ۴۱]. در مطالعه حاضر فرض بر این اساس بود که نانوکورکومین توانایی کاهش بیان DNMT ها و در نهایت احیای بیان ژن‌های مهارگر تومور از جمله MEG3 را خواهد داشت؛ در این راستا نتایج نشان داد که در رده سلولی U87MG تنها کاهش بیان کمی در مورد DNMT3B تحت تیمار با نانوکورکومین رخ می‌دهد و این تیمار تأثیر معنی‌داری روی بیان DNMT1، 3A در سطح RNA ندارد. نتایج متفاوت U87MG نسبت به رده سلولی لوکمی و هپاتوما (Hepatoma) (تحقیق مرتبط انجام شده در گروه) که کاهش بیان هر سه نوع DNMT در اثر تیمار با کورکومین را نشان می‌دهد، احتمال دارد نشانگر بخش دیگری از تفاوت‌های بین اپی ژنوم سلول‌های مغز و سایر سلول‌های بدن باشد، زیرا در سلول‌های مغزی متیلاسیون DNA تحت تأثیر فعالیت مغز، قابلیت شکل‌پذیری بیشتری دارد و به‌نظر می‌رسد دمتیلاسیون فعال در مغز برخلاف سایر بافت‌های بدن رخ دهد. ۵- هیدروکسی متیل سیتوزین به جای متیل سیتوزین در سلول‌های بالغ مغزی مشاهده می‌شود؛ پیوند هیدروکسی متیل با کربن ۵ سیتوزین به اندازه پیوند متیل با سیتوزین قوی نیست و قابلیت جداسازی آن وجود دارد و دمتیلاسیون در اثر فعالیت عصبی در مغز رخ می‌دهد [۴۲، ۴۳] که این خصوصیت تا به حال تنها در سلول‌های مغزی گزارش شده است. به هر

حال افزایش بیان ژن‌های مهار کنندهٔ تومور از جمله MEG3 می‌تواند پیشبردی برای درمان سرطان‌های مقاوم به درمان‌های معمول مورد استفاده، از جمله گلیوما باشد و نگاهی به درمان با اساس سنتی راهی برای غلبه بر چنین سرطان‌هایی باز کند. از طرفی HOTAIR یک lncRNA با توانایی تنظیم ساختار کروماتین و پیشبرد متاستاز در سرطان است که به‌عنوان یک میانجی بین DNA و کمپلکس‌های تنظیم کنندهٔ ساختار کروماتین، هیستون متیل ترانسفراز PRC2 عمل می‌کند. بیان این lncRNA در سرطان سینه و همچنین کبد افزایش می‌یابد [۴۴، ۴۵]، در مطالعهٔ حاضر تأثیر نانوکورکومین روی بیان HOTAIR بررسی شد و نتیجه نشان دهندهٔ عدم تغییر بیان آن در اثر تیمار با نانوکورکومین بود [۴۶]. این ارزیابی نشانگر توانایی عملکرد اختصاصی نانوکورکومین در مهار متاستاز از طریق هدف‌گیری مولکول‌های خاص و مهم درگیر در سلول‌های سرطانی است. بر اساس مطالعات گذشته مربوط به این RNA غیر کد کننده، با وجود نقش انکوژنی آن در سرطان‌های مختلف از جمله سرطان‌های کبد و سینه، نقش انکوژنی HOTAIR در ردهٔ سلولی U87MG گزارش نشده است و احتمال دارد نقش قابل توجهی در سرطان‌زایی گلیوما نداشته باشد ولی با در نظر گرفتن نقش مؤثر RNA غیر کد کننده MEG3 در تکوین سلول‌های مغزی و روند تومورزایی سلول‌های مغزی می‌توان به هدف‌گیری اثربخش کورکومین توجه داشت و تلاش برای کاربرد درمانگاهی آن در بهبود روندهای درمانی سرطان‌های مرتبط با سلول‌های مغزی را در پیش گرفت. باید توجه داشت نتایج فوق نیاز به پژوهش‌های بیشتر و استفاده از روش‌های دقیق‌تر در این زمینه دارد. در شیمی درمانی از مواد شیمیایی مانند نوکلئوتیدهای تغییر یافته از جمله ۵-آزاسیتیدین استفاده می‌شود که در هیپومتیلایسیون DNA مؤثر است، محققان حاضر پیشنهاد می‌کنند نانوکورکومین با چنین موادی در تیمارهای یکسان مورد مقایسه قرار گیرد زیرا نانوکورکومین با دارا بودن عوارض جانبی کمتر و اختصاصیت درمانی بیشتر نسبت به مواد شیمیایی که برای

سلول‌های طبیعی آسیب‌رسان بوده است و اختصاصیت درمانی پایینی دارد، برتری دارد و می‌تواند جایگزین بهتری برای درمان اپی‌ژنتیکی باشد. برای ژن‌های کد کننده پروتئین، تجزیه و تحلیل بیان تنها در سطح RNA کافی نیست و بهتر است در سطح پروتئین نیز بیان آن‌ها بررسی شود، همچنین در صورت وجود فعالیت آنزیمی، می‌توان فعالیت آنزیمی آن‌ها را نیز مورد مطالعه قرار داد. تأثیر نانوکورکومین روی بیان پروتئین DNMT‌ها از طریق وسترن بلات و استفاده از آنتی‌بادی‌های اختصاصی، همچنین بررسی فعالیت آن‌ها با استفاده از کیت‌های تجاری موجود پیشنهاد می‌شود. بررسی بیان چندین ژن هدف پایین دست MEG3 و عملکردهای سلولی آن تحت تیمار با نانوکورکومین می‌تواند در نتیجه‌گیری دقیق‌تر مرتبط با این مطالعه یاری‌رسان باشد. سلول‌های سرطانی خودبازتجدیدپذیر (Self-renewal) یا سلول‌های بنیادی سرطان اغلب به درمان‌های موجود مقاوم است و دانشمندان معتقدند، درمان‌های جدید برای نتایج دراز مدت درمان سرطان مورد نیاز است. برگشت خاموشی ژن‌ها با استفاده از درمان اپی‌ژنتیکی می‌تواند راهبردی جدید برای حل این مسئله باشد. به‌طور کل می‌توان نتیجه گرفت با استفاده از ویژگی رخداد دمتیلایسیون فعال در سلول‌های مغزی و هدایت آن در مسیر مهار رشد سلول‌های سرطانی شدهٔ آن‌ها، با کمک نیروی پیشبرنده ترکیبات شیمیایی از جمله کورکومین، بالقوه راهی مفید برای حذف سلول‌های سرطانی مغزی یا بهبود وضعیت آن‌هاست.

تشکر و قدردانی

تحقیق حاضر بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد دانشجویی مصوب گروه ژنتیک دانشکده علوم زیستی دانشگاه تربیت مدرس است که با حمایت مالی و امکانات آن دانشگاه انجام شده است. با یاد دکتر محمدنبی سربلوکی، استاد مرکز تحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک دانشگاه تهران و به امید پیشرفت محققین در مسیر درمان سرطان به کلیهٔ تلاش‌گران در این راه تقدیم می‌شود.

- [1] Cao Y, DePinho RA, Ernst M, Vousden K. Cancer research: past, present and future. *Nat Rev Cancer* 2011; 11(10): 749-54.
- [2] Holland EC. Glioblastoma multiforme: the terminator. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97(12): 6242-4.
- [3] Dell'Albani P. Stem cell markers in gliomas. *Neurochem Res* 2008; 33: 2407-15.
- [4] Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet* 2002; 3(6): 415-28.
- [5] ENCODE Project Consortium. The ENCODE (ENCyclopedia Of DNA Elements) Project. *Science* 2004; 306(5696): 636-40.
- [6] Amaral PP, Mattick JS. Noncoding RNA in development. *Mamm Genome* 2008; 19(7-8): 454-92.
- [7] Mehler MF, Mattick JS. Noncoding RNAs and RNA editing in brain development, functional diversification, and neurological disease. *Physiol Rev* 2007; 87(3): 799-823.
- [8] Gibb EA, Vucic EA, Enfield KS, Stewart GL, Lonergan KM, Kennett JY, Becker-Santos DD, MacAulay CE, Lam S, Brown CJ, Lam WL. Human cancer long non-coding RNA transcriptomes. *PLoS One* 2011; 6(10): e25915.
- [9] Louro R, Smirnova AS, Verjovski-Almeida S. Long intronic noncoding RNA transcription: expression noise or expression choice?. *Genomics* 2009; 93(4): 291-8.
- [10] Bender CM, Zingg JM, Jones PA. DNA methylation as a target for drug design. *Pharm Res* 1998; 15(2): 175-87.
- [11] Santini V, Kantarjian HM, Issa JP. Changes in DNA methylation in neoplasia: pathophysiology and therapeutic implications. *Ann Intern Med* 2001; 134(7): 573-86.
- [12] Zhang X, Zhou Y, Mehta KR, Danila DC, Scolavino S, Johnson SR, Klibanski A. A pituitary-derived MEG3 isoform functions as a growth suppressor in tumor cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88(11): 5119-26.
- [13] Zhang X, Rice K, Wang Y, Chen W, Zhong Y, Nakayama Y, Zhou Y, Klibanski A. Maternally expressed gene 3 (MEG3) noncoding ribonucleic acid: isoform structure, expression, and functions. *Endocrinology* 2010; 151(3): 939-47.
- [14] Ribarska T, Ingenwerth M, Goering W, Engers R, Schulz WA. Epigenetic inactivation of the placentally imprinted tumor suppressor gene TFPI2 in prostate carcinoma. *Cancer Genomics Proteomics* 2010; 7(2): 51-60.
- [15] Zhou Y, Zhong Y, Wang Y, Zhang X, Batista DL, Gejman R, Ansell PJ, Zhao J, Weng C, Klibanski A. Activation of p53 by MEG3 non-coding RNA. *J Biol Chem* 2007; 282(34): 24731-42.
- [16] Lim JH, Park JW, Min DS, Chang JS, Lee YH, Park YB, Choi KS, Kwon TK. NAG-1 up-regulation mediated by EGR-1 and p53 is critical for quercetin-induced apoptosis in HCT116 colon carcinoma cells. *Apoptosis* 2007; 12(2): 411-21.
- [17] Benetatos L, Dasoula A, Hatzimichael E, Georgiou I, Syrrou M, Bourantas KL. Promoter hypermethylation of the MEG3 (DLK1/MEG3)

- imprinted gene in multiple myeloma. *Clin Lymphoma Myeloma* 2008; 8(3): 171-5.
- [18] Benetatos L, Vartholomatos G, Hatzimichael E. MEG3 imprinted gene contribution in tumorigenesis. *Int J Cancer* 2011; 129(4): 773-9.
- [19] Aggarwal BB, Harikumar KB. Potential therapeutic effects of curcumin, the anti-inflammatory agent, against neurodegenerative, cardiovascular, pulmonary, metabolic, autoimmune and neoplastic diseases. *Int J Biochem Cell Biol* 2009; 41(1): 40-59.
- [20] Goel A, Kunnumakkara AB, Aggarwal BB. Curcumin as "Curecumin": from kitchen to clinic. *Biochem Pharmacol* 2008; 75(4): 787-809.
- [21] Meeran SM, Ahmed A, Tollefsbol TO. Epigenetic targets of bioactive dietary components for cancer prevention and therapy. *Clin Epigenetics* 2010; 1(3-4): 101-116.
- [22] Babaei E, Sadeghizadeh M, Hassan ZM, Feizi MA, Najafi F, Hashemi SM. Dendrosomal curcumin significantly suppresses cancer cell proliferation in vitro and in vivo. *Int Immunopharmacol* 2012; 12(1): 226-34.
- [23] Tahmasebi Mirgani M, Isacchi B, Sadeghizadeh M, Marra F, Bilia AR, Mowla SJ, Najafi F, Babaei E. Dendrosomal curcumin nanoformulation downregulates pluripotency genes via miR-145 activation in U87MG glioblastoma cells. *Int J Nanomedicine* 2014; 9: 403-17.
- [24] Teiten MH, Eifes S, Dicato M, Diederich M. Curcumin-the paradigm of a multi-target natural compound with applications in cancer prevention and treatment. *Toxins (Basel)* 2010; 2(1): 128-62.
- [25] 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.
- [26] Sarbolouki MN, Parsaee S, Kosary P. Mixed micelle proliposomes for preparation of liposomes containing amphotericin B, in-vitro and ex-vivo studies. *PDA J Pharm Sci Technol* 2000; 54(3): 240-6.
- [27] 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(6): 912-20.
- [28] 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.
- [29] Alizadeh AM, Khaniki M, Azizian S, Mohaghheghi MA, Sadeghizadeh M, Najafi F. Chemoprevention of azoxymethane-initiated colon cancer in rat by using a novel polymeric nanocarrier--curcumin. *Eur J Pharmacol* 2012; 689(1-3): 226-32.
- [30] Tahmasebi Mirgani M, Sadeghizadeh M, Najafi F, Mowla SJ. Dendrosomal curcumin Induced apoptosis by suppression of pluripotency genes in 5637 bladder cancer cells. *Modares Journal of Medical Sciences: Pathobiology* 2013; 16(1): 23-39. (Persian)
- [31] Panahi A, Nakhaisistani R, Sadeghizadeh M. Evaluation of apoptosis induction on gastric cancer AGS cells made by polymer nano

- curcumin. Police Teb J 2012; 1(3): 200-7. (Persian)
- [32] Livak KJ¹, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001; 25(4): 402-8.
- [33] Mukherjee AK, Basu S, Sarkar N, Ghosh AC. Advances in cancer therapy with plant based natural products. *Curr Med Chem* 2001; 8(12): 1467-86.
- [34] Voderholzer U, Cuntz U, Schlegl S. Eating disorders: state of the art research and future challenges. *Nervenarzt* 2012; 83(11): 1458-67.
- [35] Lujambio A, Portela A, Liz J, Melo SA, Rossi S, Spizzo R, Croce CM, Calin GA, Esteller M. CpG island hypermethylation-associated silencing of non-coding RNAs transcribed from ultraconserved regions in human cancer. *Oncogene* 2010; 29(48): 6390-401.
- [36] McLaughlin D, Vidaki M, Renieri E, Karagogeos D. Expression pattern of the maternally imprinted gene Gtl2 in the forebrain during embryonic development and adulthood. *Gene Expr Patterns* 2006; 6(4): 394-9.
- [37] Johnson R. Long non-coding RNAs in Huntington's disease neurodegeneration. *Neurobiol Dis* 2012; 46(2): 245-54.
- [38] Blackshaw S, Harpavat S, Trimarchi J, Cai L, Huang H, Kuo WP, Weber G, Lee K, Fraioli RE, Cho SH, Yung R, Asch E, Ohno-Machado L, Wong WH, Cepko CL. Genomic analysis of mouse retinal development. *PLoS Biol* 2004; 2(9): E247.
- [39] Liu Z, Xie Z, Jones W, Pavlovicz RE, Liu S, Yu J, Li PK, Lin J, Fuchs JR, Marcucci G, Li C, Chan KK. Curcumin is a potent DNA hypomethylation agent. *Bioorg Med Chem Lett* 2009; 19(3): 706-9.
- [40] Khor TO, Huang Y, Wu TY, Shu L, Lee J, Kong AN. Pharmacodynamics of curcumin as DNA hypomethylation agent in restoring the expression of Nrf2 via promoter CpGs demethylation. *Biochem Pharmacol* 2011; 82(9): 1073-8.
- [41] Ma L, Zhou Z, Wang H, Zhou H, Zhang D, Li H, Qi A, Yang R. Increased expressions of DNA methyltransferases contribute to CD70 promoter hypomethylation and over expression of CD70 in ITP. *Mol Immunol* 2011; 48(12-13): 1525-31.
- [42] Dulac C. Brain function and chromatin plasticity. *Nature* 2010; 465(7299): 728-35.
- [43] Guo JU, Ma DK, Mo H, Ball MP, Jang MH, Bonaguidi MA, Balazer JA, Eaves HL, Xie B, Ford E, Zhang K, Ming GL, Gao Y, Song H. Neuronal activity modifies the DNA methylation landscape in the adult brain. *Nat Neurosci* 2011; 14(10): 1345-51.
- [44] Gupta RA, Shah N, Wang KC, Kim J, Horlings HM, Wong DJ, Tsai MC, Hung T, Argani P, Rinn JL, Wang Y, Brzoska P, Kong B, Li R, West RB, van de Vijver MJ, Sukumar S, Chang HY. Long non-coding RNA HOTAIR reprograms chromatin state to promote cancer metastasis. *Nature* 2010; 464(7291): 1071-6.
- [45] Geng YJ, Xie SL, Li Q, Ma J, Wang GY. Large intervening non-coding RNA HOTAIR is associated with hepatocellular carcinoma progression. *J Int Med Res* 2011; 39(6): 2119-28.
- [46] Cheng AS, Lau SS, Chen Y, Kondo Y, Li MS, Feng H, Ching AK, Cheung KF, Wong HK,

Tong JH, Jin H, Choy KW, Yu J, To KF, Wong N, Huang TH, Sung JJ. EZH2-mediated concordant repression of Wnt antagonists

promotes β -catenin-dependent hepato-carcinogenesis. *Cancer Res* 2011; 71(11): 4028-39.