Original Article

Dendrosomal curcumin Induced Apoptosis by Suppression of Pluripotency Genes in 5637 Bladder Cancer Cells

Maryam Tahmasebi Mirgani[1], Majid Sadeghizadeh[2*], Farhood Najafi[3], Seyed Javad Mowla[4]

1- Ph.D. Candidate, 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- Assistant Professor, Department of Resin and Additives, Institute for Color Science and Technology, Tehran, Iran
4- 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: 30/Jan/2013, Accepted: 19/May/2013

Abstract

Objective: The anti-cancer properties of curcumin, a poliphenol extract from the rhizome of curry, has been confirmed by many investigators. However, low levels of uptake, tissue distribution and rapid metabolism has limited its application as an anti-cancer drug. This study is aimed at increasing curcumin's water solubility due to a biodegradable, neutral and non-toxic micellar nano-carrier called dendrosome. This study intends to evaluate the role of dendrosomal-curcumin (DNC) in bladder cancer cell growth.

Methods: We performed the MTT assay, flow cytometry and Annexin V-FLUOS (as an apoptosis detection kit) to evaluate cell death. The genetic mechanism of DNC-induced apoptosis was accomplished by a study of the relative expressions of *OCT4A*, *OCT4B1*, *SOX-2* and *Nanog* using real-time PCR.

Results: DNC-induced cell death complied with a time and dose-dependent paradigm in the 5637 cell line. Cell cycle analysis revealed that the number of cells increased in pre-G1 and gradually decreased in G1 and S phases. This showed the inhibitory property of dendrosomal-curcumin on DNA synthesis. Data from real-time PCR determined that expressions of *OCT4A, OCT4B1, SOX-2* and *Nanog* could be related to 5637 cancer cell growth. Dendrosomal-curcumin significantly suppressed mRNA expression of the above mentioned genes ($p<0.01$).

Conclusion: The data showed that DNC induced apoptosis by suppression of pluripotency genes in 5637 bladder cancer cells, which confirmed the useful characteristic of nano-drug in bladder cancer therapy.

Keywords: Curcumin, Dendrosome, Cell-programmed death, Bladder cancer, Pluripotency genes

Modares Journal of Medical Sciences: *Pathobiology*, Vol 16, No 1, Spring 2013, Pages: 23-39

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-01-31]

مقاله اصیل

القای مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی در رده سلولی توموری ۵۶۳۷ مثانه توسط نانوکورکومین دندروزومی با مهار ژن‌های دخیل در پرتوانی

مریم طهماسبی میرگانی[۱]، مجید صادقی‌زاده[۲*]، فرهود نجفی[۳]، سیدجواد مولی[٤]

۱- دانشجوی دکتری تخصصی، گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۲- استاد، گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۳- استادیار، گروه پژوهشی رزین و افزودنی‌ها، مؤسسه پژوهشی علوم و فناوری رنگ و پوشش، تهران، ایران
۴- دانشیار، گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

*آدرس نویسنده مسئول: ایران تهران، کدپستی ۱۴۱۱۷۱۳۱۱۶، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم زیستی، گروه ژنتیک
Email: sadeghma@modares.ac.ir

دریافت مقاله: ۹۱/۱۱/۱۰ پذیرش مقاله: ۹۲/۰۲/۲۹

چکیده

هدف: اگرچه خواص ضد سرطانی کورکومین، پلی فنل به دست آمده از ریشه گیاه زرد چوبه، مورد تأیید بسیاری از محققان است، با این حال جذب و توزیع بافتی پایین در بدن، فعالیت کم و متابولیسم سریع از جمله معایبی است که استفاده از کورکومین را به عنوان یک داروی ضد سرطان تا به امروز با محدودیت رو به رو کرده است. در این مطالعه حلالیت کورکومین به واسطه نانوحامل‌های میسلی تخریب‌پذیر، خنثی و غیر سمی تحت عنوان دندروزوم افزایش و نقش مهاری آن بر رشد سلول‌های توموری مثانه بررسی شد.

مواد و روش‌ها: روش‌های MTT، فلوسیتومتری و Annexin V-FLUOS (کیت اختصاصی تشخیص مرگ سلولی) برای بررسی مرگ سلولی و مکانیسم ژنتیکی مرگ القاء شده توسط نانوکورکومین دندروزومی به واسطه مطالعه ژن‌های دخیل در پرتوانی سلول شامل *OCT4A*، *OCT4B1*، *SOX-2* و *Nanog* با استفاده از روش Real-Time PCR انجام گرفت.

نتایج: یافته‌ها بیانگر القای مرگ سلولی به واسط نانوکورکومین دندروزومی به صورت وابسته به غلظت و زمان در رده سلولی توموری ٥٦٣٧ مثانه بود. بررسی چرخه سلولی بیانگر افزایش جمعیت سلولی در Pre-G1 و کاهش سلول‌ها در فاز G1 و S بود که نشان دهنده نقش مهاری کورکومین بر همانندسازی سلول‌های رده توموری ٥٦٣٦٧ مثانه است. همچنین مشاهده بیان *OCT4A*، *OCT4B1*، *SOX-2* و *Nanog* در تجزیه و تحلیل Real-Time بیانگر نقش تومورزایی این ژن‌ها در رشد تومورهای مثانه است. تیمار با نانوکورکومین دندروزومی به طور معنی‌داری بیان mRNA این ژن‌ها را کاهش داد ($P<۰/۰۱$).

نتیجه‌گیری: به طور کلی یافته‌های مذکور نشان می‌دهد که نانوکورکومین دندروزومی با تغییر بیان ژن‌های دخیل در تکثیر، سلول‌های توموری را به سمت مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی هدایت می‌کند که بیانگر نقش کاربردی نانودارو در درمان سرطان مثانه است.

کلیدواژگان: کورکومین، دندروزوم، مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی، سرطان مثانه، ژن‌های پرتوانی

مجله علوم پزشکی مدرس: آسیب شناسی زیستی، دوره ۱۶، شماره ۱، بهار ۱۳۹۲، صفحات: ۲۳-۳۹

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-01-31]

مقدمه

افزایش رو به رشد نرخ سرطان‌ها در سال‌های اخیر توجه بسیاری از محققین را به یافتن راه‌کارهایی در راستای تولید داروهای ضد سرطان معطوف کرده است و در این میان ترکیباتی با منشأ گیاهی به علت داشتن آثار جانبی کمتر از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است [۱]. کورکومین (Curcumin) پلی فنلی آب گریز مستخرج از گیاه زردچوبه است. تاریخچه درمانی این گیاه در طب سنتی طیف وسیعی از خواص دارویی را برای کورکومین پیشنهاد می‌کند. نقش آنتی اکسیدانی، ضد التهاب و ضد سرطانی کورکومین طی سال‌های اخیر به اثبات رسیده است [۲]. نا محلول بودن، جذب و توزیع بافتی پایین، فعالیت کم، متابولیسم سریع و غیر فعال بودن محصولات حاصل در بدن، استفاده از کورکومین را به عنوان یک دارو با محدودیت رو به رو کرده است [۳]. طراحی آنالوگ‌های ساختاری، مهار کننده‌های متابولیسمی و ناقل‌های فسفولیپیدی از جمله راه‌کارهای پیشنهادی در راستای مرتفع کردن مشکلات کورکومین است [٤]. دندروزم‌ها (Dendrosomes) نانوناقل‌های پلیمری منشعب مشتق از اولئیک اسید است و برای اولین بار توسط دکتر سربلوکی و همکاران در ایران سنتز شد. پایداری، عدم سمیت، خنثی بودن بار الکتریکی، زیست تخریب‌پذیری (Biodegradability)، تهیه آسان و هزینه اندک تولید از مزایای این نانوذرات در مقایسه با ناقلین فسفولیپیدی است [۵، ٦]. توانایی بالای دندروزوم‌ها در انتقال ژن به سلول‌ها منجر به پیدایش این فرضیه که دندروزوم‌ها به عنوان حاملی برای انتقال کورکومین به سلول‌های سرطانی در نظر گرفته شوند، شد. کارایی داروی نانوکورکومین دندروزمی برای اولین بار در مدل‌های موشی مبتلا به فیبروسارکوما (Fibrosarcoma) تأیید شد. همچنین نشان داده شد که دندروزم‌ها به تنهایی فاقد سمیت است [۷]. طی مطالعه‌ای دیگر، نقش ضد سرطانی نانوکورکومین دندروزمی در مدل‌های موشی مبتلا به سرطان کولون موفقیت‌آمیز گزارش شد [۸]. خاصیت تکثیر و پرتوانی از ویژگی‌های مشترک سلول‌های سرطانی و بنیادی است بنابراین امروزه دانشمندان بر این باورند که سرطان می‌تواند یک بیماری برخواسته از سلول‌های بنیادی باشد [۹]. افزایش بیان بسیاری از ژن‌های اختصاصی سلول‌های بنیادی در طیف وسیعی از سرطان‌ها گزارش شده است و به نظر می‌رسد که رابطه مستقیمی بین افزایش بیان این ژن‌ها و رشد، پیشرفت (Progression) و تهاجم (Invasion) سلول‌های سرطانی وجود دارد. افزایش بیان و نقش تومورزای (Oncogene) ژن‌های *OCT-4*، *SOX-2* و *Nanog* که زیر واحدهای کلیدی در برقراری چرخه تکثیر و پرتوانی سلول‌های بنیادی هستند، در طیف وسیعی از سرطان‌ها نظیر مثانه، ریه، کولون، سینه گزارش شده است [۱۰-۱۳]. بنابراین طراحی داروهایی با پتانسیل هدف قرار دادن چنین ژن‌های درگیر در مسیرهای تکثیر، روشی مطلوب در راستای درمان سرطان‌ها خواهد بود. سرطان مثانه به عنوان یکی از تومورهای مقاوم به روش‌های رایج درمان سرطان شناخته شده است. جراحی ناحیه توموری روش مرسوم در درمان سرطان مثانه است که در ۳۰-۸۵ درصد موارد با بازگشت مجدد تومور در فرد بیمار همراه است [١٤]. نقش ژنتیک و وراثت در بروز تومورهای مثانه ثابت شده است و اختلال در عملکرد طیف وسیعی از ژن‌ها به عنوان عوامل مستعد کننده برای این بیماری گزارش شده است [۱۵]. گزارش‌هایی مبنی بر نقش ژن‌های *OCT-4*، *SOX-2* و Nanog در رشد و تکثیر تومورهای مثانه ارایه شده است [١٦-۱۹]. بر پایه این یافته‌ها و در ادامه تحقیقات نانوکورکومین دندروزمی، مطالعه حاضر بر بیان ژن‌های *OCT-4*، *SOX-2* و Nanog در رده سلولی ٥٦٣٧ مثانه پس از تیمار سلول‌ها با نانوکورکومین دندروزومی استوار شد.

مواد و روش‌ها

سنتز حامل‌های پلیمری OA400

دندروزوم‌ها میسل‌های پگیله شده (Polyethylenglycol: PEG) مشتق از واحدهای اسید چرب اولئیک اسید است و برای اولین بار در ایران و در گروه تحقیقاتی دکتر مجید

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-01-31]

صادقی‌زاده در دانشگاه تربیت مدرس طراحی و سنتز شده‌است. اولئیل کلرید (Sigma Aldrich، آمریکا)، پلی اتیلن گلیگول (Sigma Aldrich، آمریکا)، کلروفرم (Merck، آلمان)و تری اتیل آمین (Merck، آلمان) به صورت تجاری خریداری و بدون خالص‌سازی بیشتر پس از تهیه، استفاده شد. حامل‌های دندروزومی OA400 طی واکنش استریفیکاسیون (Esterification) اولئیل کلرید (۰/۳ گرم) و پلی اتیلن گلیکول ٤۰۰ (٤ گرم) در حضور تری اتیل آمین (۱/۲ گرم) و کلروفرم به عنوان حلال سنتز شد. در نهایت حاملین دندروزومی OA400 پس از جداسازی نمک تری اتیل آمین هیدروکلرید از فاز آلی و تبخیر کلروفرم در دمای ٤۰ درجه سانتی‌گراد و در شرایط خلأ به مدت ٤ ساعت، به دست آمد.

آماده‌سازی کورکومین در فرمول دندروزومی

کورکومین مورد استفاده در این تحقیق با خلوص ۹۵ درصد از شرکت Merck (آلمان) خریداری شد. دندروزم‌های O-400 به عنوان نانوحامل‌هایی پلیمری برای افزایش حلالیت کورکومین در این تحقیق استفاده شد. آماده‌سازی نانوکورکومین دندروزومی مطابق دستورالعمل بهینه شده در آزمایشگاه صورت گرفت. به طور خلاصه طیف غلظتی از کورکومین و دندروزوم (نسبت ۱:۵۰ تا نسبت ۱:۱۰) به منظور انتخاب نسبت مناسب از کورکومین و دندروزوم توسط اسپکتروفتومتری بررسی و در نهایت نسبت وزنی ۱:۲۵ به عنوان نسبت بهینه انتخاب شد. نانوکورکومین دندروزومی با غلظت ۲۷۰۰ میکرومولار تهیه و در شرایط دور از نور و ٤ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد [۷]. رقیق‌سازی دارو پیش از استفاده در هر روش با استفاده از محیط کشت کامل انجام گرفت.

کشت سلولی

رده سلولی ٥٦۳۷ سرطان مثانه از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران خریداری شد. سلول‌ها در محیط کشت RPMI1640 حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی و یک درصد آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین- استرپتومایسین (Penicillin-Streptomycin) و در شرایط انکوباسیون ۳۷ درجه سانتی‌گراد و CO_2 ۵ درصد رشد داده شدند. سلول‌ها پس از گذشت ۳ روز با استفاده از تریپسین (Trypsin) ۰/۲۵ درصد- EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid) ۰/۰۲ درصد پاساژ داده شدند. تمامی مواد کشت سلول از شرکت Gibco آمریکا خریداری شد.

بررسی بقای سلولی پس از تیمار با کورکومین دندروزومی با استفاده از روش MTT

میزان حساسیت سلول‌های مثانه به داروی نانوکورکومین دندروزومی با استفاده از روش MTT [3-(4,5-dimethythiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] بررسی شد. اساس این روش بر پایه احیای سوبسترای زرد رنگ MTT به ترکیب بنفش رنگ فورمازان (Formazan) به واسطه آنزیم‌های میتوکندریایی دهیدروژناز در سلول‌های زنده است. شدت رنگ تولید شده پس از حل نمودن رسوب فورمازان در حلال‌های آلی نظیر دی متیل سولفوکسید (Dimethyl Sulfoxide: DMSO) با استفاده از روش اسپکتروفوتومتری قابل اندازه‌گیری است و رابطه مستقیمی با تعداد سلول‌های زنده دارد. به طور خلاصه بیست هزار سلول سرطانی در هر چاهک از پلیت‌های ۹٦ خانه رشد داده شدند و پس از گذشت ۲٤ ساعت برای رشد و اتصال در پلیت، تحت تیمار با غلظت‌های مختلف نانوکورکومین دندروزومی در سه بازه زمانی ۲٤، ٤۸ و ۷۲ ساعت قرار گرفتند. تیمار با دندروزوم تنها برای بررسی سمیت این حامل بر رده سلولی مورد مطالعه نیز مد نظر قرار گرفت. پس از طی زمان مورد نظر، محیط کشت حاوی دارو حذف و سلول‌ها با بافر نمکی فسفات (Phosphate Buffered Saline: PBS) شستشو داده شدند و سوبسترای MTT با غلظت ۵ میلی‌گرم در هر میلی‌لیتر درPBS تهیه و در حجم ۲۰ میکرولیتر به هر چاهک اضافه شد و پلیت مربوط به مدت ٤ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. ۲۰۰ میکرولیتر

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-01-31]

DMSO برای حل کردن رسوب فورمازان اضافه شد و شدت رنگ با استفاده از دستگاه الایزا (ELISA plate reader) در طول موج ۵۷۰ نانومتر برآورد شد. نسبت جذب در سلول‌های گروه تیمار به گروه کنترل (غلظت صفر از دارو) 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 (LD_{50}: Lethal Dosage) در نظر گرفته شد. داده‌های حاصل از ۳ آزمایش مجزا به صورت میانگین ± انحراف استاندارد (Mean ± SD) ارایه شد.

بررسی ورود نانوکورکومین دندروزومی به سلول‌های سرطانی با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت

خاصیت فلورسنت ذاتی مولکول کورکومین این امکان را فراهم می‌کند که ورود این مولکول به سلول‌ها قابل ردیابی باشد [۲۰]. بدین منظور سلول‌ها به مدت ٤ ساعت با غلظت ۲۰ میکرومول نانوکورکومین دندروزومی تیمار شده، سپس محیط کشت حاوی دارو خارج و بعد از شستشوی سلول‌ها با PBS، عکس‌برداری با میکروسکوپ فلورسنت انجام گرفت. به منظور بررسی کارایی عملکرد حامل‌های دندروزومی در راستای افزایش حلالیت و دسترسی زیستی کورکومین، یک گروه کنترل از سلول‌ها که با غلظت مساوی از کورکومین تیمار شده بودند، نیز عکس‌برداری شدند.

مطالعه چرخه سلولی با استفاده از روش فلوسیتومتری

تأثیر نانوکورکومین دندروزومی بر توزیع سلول‌ها در چرخه سلولی به واسطه تجزیه و تحلیل فلوسیتومتری (flow Cytometry) و رنگ‌آمیزی پروپیدیومیدید (Propidium Iodide: PI) بررسی شد. طبق دستورالعمل، سلول‌ها به تعداد ^{5} ۱۰×۳ در پلیت‌های ٦ خانه کشت و با غلظت‌های مد نظر از نانوکورکومین در سه بازه زمانی ۱۲، ٢٤ و ٣٦ ساعت تیمار شدند. پس از طی زمان مورد نظر، سلول‌ها جمع‌آوری و با PBS شستشو و در اتانل ۷۰ درصد تثبیت شدند. سلول‌های تثبیت شده به مدت یک شبانه روز در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. سلول‌ها مجدداً با PBS شستشو و ٤۰۰ میکرولیتر محلول PI شامل ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر PI، سدیم سیترات ۰/۱ درصد و تریتون X۱۰۰ ۰/۱ درصد در بافر PBS تهیه و برای رنگ‌آمیزی DNA سلولی به هر نمونه اضافه شد. نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شدند. سپس سلول‌ها برای تجزیه و تحلیل وارد تیوب‌های مخصوص شده و داخل دستگاه فلوسیتومتر قرار گرفتند. در دستگاه فلوسیتومتر همه سلول‌ها رنگ شده (سلول‌های مرده) و رنگ نشده (زنده) طیفی از فلورسنس را ساطع می‌کنند و جاذب دستگاه این تشعشات را در طول موج‌های مختلف جذب می‌کند. دستگاه را براساس سلول‌های بدون رنگ کالیبره کرده و نمونه‌های مختلف که رنگ به آن‌ها اضافه می‌شود، خوانده می‌شود. بدین ترتیب درصد سلول‌های رنگ شده که نماینده سلول‌های مرده درون نمونه هستند تعیین می‌شود. داده‌های خام به دست آمده از دستگاه فلوسیتومتر برای بازیابی اطلاعات با نرم‌افزار WinMDI که قادر به تفسیر این داده‌ها است، خوانده شد. در هیستوگرام‌های به‌دست آمده از نرم‌افزار WinMDI، قله (Peak) اولیه بیانگر جمعیت سلولی موجود در فاز G1 است. جمعیت سلولی قبل از این قله، سلول‌های وارد شده به فاز مرگ (Sub-G1) را نشان می‌دهد. قله دوم بیانگر جمعیت سلولی موجود در فاز G2/M و فاصله بین دو قله سلول‌های قرار گرفته در فاز S را نشان می‌دهد. داده‌های حاصل از ۳ آزمایش مجزا به صورت میانگین ± انحراف استاندارد ارایه شد.

بررسی مرگ سلولی پس از تیمار با کورکومین دندروزومی

به طور کلی آپوپتوز (Apoptosis) یا مرگ برنامه‌ریزی شده سلول (Cell Programmed Death) با ایجاد تغییراتی در غشای سلول همراه است. انتقال فسفولیپید فسفاتیدیل سرین از سطح سیتوپلاسمی غشاء به سطح خارج سلولی آن به عنوان شاخص شروع برنامه‌ریزی شده سلول در نظر گرفته می‌شود.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-01-31]

برای تشخیص مرگ برنامه‌ریزی شده سلول القاء شده به واسطه تیمار با نانوکورکومین دندروزومی، کیت رنگ‌آمیزی Annexin-V-FLOUS و PI از شرکت Roche آلمان خریداری شد. عدم تقارن ایجاد شده در سطح غشاء به واسطه انتقال فسفولیپید فسفاتیدیل سرین از سطح سیتوپلاسمی به سطح خارج سلولی غشاء اساس عملکرد این روش را تشکیل می‌دهد. در این روش رنگ‌آمیزی دوگانه سلول‌ها با استفاده از AnnexinV و PI امکان جداسازی سلول‌های سالم از انواع سلول‌های دچار مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده (Apoptotic Cells) و نکروزی (Necrotic cells) را امکان‌پذیر می‌نماید.Annexin-V یک پروتئین متصل شونده به فسفولیپیدهاست که تمایل بالایی برای اتصال به فسفاتیدیل سرین دارد. این اتصال در حضور یون کلسیم کاتالیز می‌شود. PI نیز ترکیبی با پتانسیل قرارگیری در بین بازهای DNA است (Intercalating Agent). از AnnexinV-FLUOS به عنوان یک پروب (Probe) فلورسنت برای شناسایی فسفاتیدیل سرین در نیمه خارجی غشای سلول‌های دچار مرگ برنامه‌ریزی شده و از PI برای شناسایی DNA در سلول‌های نکروزی که یکپارچگی و تمامیت (Integrity) غشایی خود را از دست داده‌اند، استفاده می‌شود که در نهایت موجب جداسازی سلول‌های دچار مرگ برنامه‌ریزی شده و نکروزی از یکدیگر می‌شود. بر طبق دستورالعمل Roche، سلول‌ها در پلیت‌های ٦ خانه کشت و در بازه‌های زمانی ١٢، ٢٤ و ٣٦ ساعت با نانوکورکومین دندروزومی تیمار شدند. پس از طی زمان مدنظر، سلول‌ها جمع‌آوری شدند و ١٠٠ میکرولیتر از محلول نشانگر حاوی Annexin-V- PI به هر نمونه سلولی اضافه و به مدت ٢٠ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شدند. سپس تجزیه و تحلیل با استفاده از دستگاه فلوسیتومتر انجام شد. دستگاه فلوسیتومتر براساس شدت نور ساطع شده توسط هر سلول، میزان تشعشع نور فلورسنت از رنگ‌های AnnexinV-FLUOS و PI را با استفاده از فیلترهای مختلف از هم جدا می‌سازد. داده‌های خام به دست آمده از دستگاه توسط نرم‌افزار WinMDI به شکل دات بلات (Dot Blot) بازیابی شد. در نمودار چهارگانه دات بلات، سلول‌هایی با رنگ‌آمیزی ($AnnexinV^-/PI^-$)، ($AnnexinV^+/PI^-$)، ($AnnexinV^+/PI^+$) و ($AnnexinV^-/PI^+$) به ترتیب به عنوان سلول‌های سالم، سلول‌های قرار گرفته در فاز اولیه مرگ سلولی، سلول‌های قرار گرفته در فاز تأخیری مرگ سلولی و سلول‌های نکروزی شناسایی شدند.

استخراج RNA

RNA سلولی با استفاده از واکنش‌گر تریزول (Invitrogene، آمریکا) از سلول‌ها استخراج شد. غلظت و خلوص نمونه RNA با روش‌های UV اسپکتروفتومتری و استفاده از دستگاه Nanodrop با محاسبه جذب نوری نمونه‌ها در طول موج‌های ٢٦٠ و ٢٨٠ نانومتر به طور کمی بررسی شد. همچنین به منظور بررسی کیفی RNA، مقدار ١ میکروگرم از نمونه توسط الکتروفورز افقی روی ژل آگارز ١ درصد بررسی شد. در ادامه برای حذف DNA احتمالی موجود در RNA استخراج شده و به منظور ممانعت از تکثیر احتمالی قطعات از روی DNA در واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمراز، نمونه‌های RNA استخراج شده تحت تیمار آنزیم DNaseI (Fermentas، آمریکا) قرار گرفت. بدین منظور مخلوط واکنشی شامل نمونه RNA (٢٠-٥٠ میکروگرم)، بافر DNaseI ١٠x (٥ میکرولیتر)، آنزیم DNaseI (١٠ واحد) و مهار کننده ریبونوکلئازی (٢٠ واحد) تهیه و با آب DEPC به حجم نهایی ٥٠ میکرولیتر رسانده شد. مخلوط واکنشی به مدت ٢٠-٣٠ دقیقه در دمای ٣٧ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. برای غیر فعال‌سازی DNaseI، ٢/٥ میکرولیتر EDTA ٠/٥ مولار به هر نمونه اضافه و نمونه‌ها به مدت ٢ دقیقه در ٨٠ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد و در نهایت حجم نهایی محلول با استفاده از آب DEPC (Diethylpyrocarbonate) به ١٠٠ میکرولیتر رسانده شد.

واکنش نسخه‌برداری معکوس (cDNA Synthesis)

سنتز cDNA بر طبق دستورالعمل PrimScriptTM RT

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-01-31]

reagent kit (TAKARA، ژاپن) انجام گرفت. مخلوط واکنشی مطابق دستورالعمل کیت و در حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر آماده و سنتز cDNA با استفاده از آغازگرهای الیگو dT و راندوم هگزامر (Random Hexamer) صورت گرفت. واکنش نسخه‌برداری معکوس در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه انجام گرفت. در پایان آنزیم نسخه‌بردار معکوس در شرایط دمایی ۸۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ ثانیه غیر فعال شد.

بررسی بیان ژن‌های *OCT-4*، *SOX-2* و *Nanog* با استفاده از روش Real-Time PCR

واکنش پلیمراز زنجیره‌ای کمی با استفاده از SYBR Premix Ex Taq ^{TM} II (TAKARA، ژاپن) و آغازگرهای اختصاصی ژن‌های *OCT4* (A,B,B1)، *SOX-2*، *Nanog* و GAPDH (ژن مرجع) انجام گرفت. نام و توالی آغازگرهای مورد استفاده در جدول ۱ خلاصه شده است. بدین منظور، توالی رونوشت ژن‌های مورد نظر از پایگاه اینترنتی www.ncbi.nlm.nih.gov دریافت و آغازگرهای الیگونوکلئوتیدی مستقیم (Forward Primer) و معکوس (Reverse Primer) توسط نرم‌افزار Primer Express 3، طراحی شد. لازم به ذکر است که طراحی آغازگرهای اختصاصی واریانت‌های ژن *OCT4* شامل *OCT4A*، *OCT4B* و *OCT4B1* با توجه به نوآرایی اگزونی حاصل از پردازش ژن *Oct4* انجام شد. مخلوط واکنشی Real-Time PCR مطابق دستورالعمل کیت مذکور تهیه شد. واکنش Real-Time PCR در ٤٠ چرخه اجرا و مراحل دمایی و زمانی برای واسرشتگی اولیه، واسرشتگی و اتصال و گسترش به ترتیب ۹۵ درجه سانتی‌گراد- ۱۰ ثانیه، ۹۵ درجه سانتی‌گراد- ۵ ثانیه و ٦٠ درجه سانتی‌گراد- ٣٤ ثانیه بهینه شد. به منظور تجزیه و تحلیل منحنی ذوب، هر مرحله تکثیری کامل توسط یک مرحله تفکیک که شامل ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه، ٦٠ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و ۹۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه بود ادامه یافت. کارایی تکثیر ژن‌های هدف و مرجع پس از انجام هر واکنش Real-Time PCR با استفاده از نرم‌افزار LinregPCR تعیین و تخمین تغییر بیان ژن‌ها با استفاده از تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از Real-Time PCR براساس چرخه آستانه به دست آمده برای ژن‌های هدف و مرجع و محاسبه $2^{-\Delta\Delta Ct}$. انجام گرفت. میانگین کارایی عملکرد آغازگرها برای *Oct4A*، *OCT4B*، *OCT4B1*، *SOX-2*، *Nanog* و GAPDH به ترتیب برابر ۷۸، ۸۸، ۸۷، ۷۹، ۸۷ و ۸۰ درصد به دست آمد.

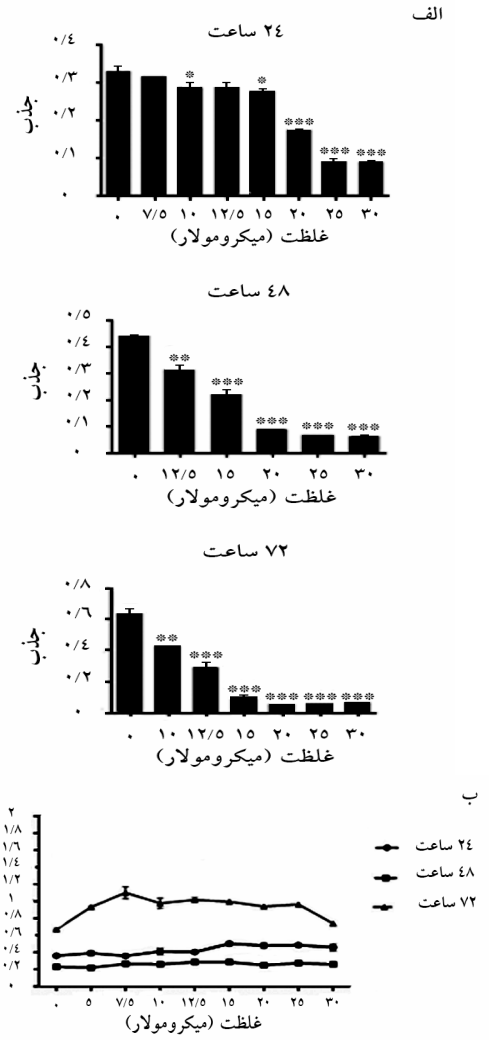
جدول ۱ نام و توالی آغازگرهای مورد استفاده در Real-Time PCR

ژن	آغازگر	توالی	طول قطعه تکثیری
OCT4A	جلویی	TCGCAAGCCCTCATTTC	۱۳۱
	برگشتی	CCATCACCTCCACCACCT	
OCT4B	جلویی	AGATTGATAACTGGTGTGTTTATGTTC	۱۹۱
	برگشتی	GCTGAATACCTTCCCAAATAGAAC	
OCT4B1	جلویی	GGTTCTATTTGGTGGGTTCC	۱۳۰
	برگشتی	TTCTCCCTCTCCCTACTCCTC	
SOX-2	جلویی	AAGACTAGGACTGAGAGAAAGAAGAG	۱۷۱
	برگشتی	AAGAGAGAGGCAAACTGGAATC	
Nanog	جلویی	AATACCTCAGCCTCCAGCAGATG	۱٤۹
	برگشتی	TGCGTCACACCATTGCTATTCTTC	
GAPDH	جلویی	GTGAACCATGAGAAGTATGACAAC	۱۲۳
	برگشتی	CATGAGTCCTTCCACGATACC	

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-01-31]

تجزیه و تحلیل آماری

نتایج حاصل با استفاده از تجزیه و تحلیل آماری آزمون آنالیز واریانس یک طرفه (One- way Analysis of Variance: ANOVA) و آزمون T (Student t-Test) با استفاده از نرم‌افزار Graphpad prisms و به صورت میانگین ± انحراف استاندارد گزارش شد.



شکل ۱ بررسی تأثیر نانوکورکومین دندروزومی و دندروزوم تنها بر بقای رده سلولی ٥٦۳۷ مثانه؛ (الف) سلول‌های توموری به مدت ۲٤، ٤۸ و ۷۲ ساعت با غلظت‌های مختلف نانودارو تیمار شدند (ب) سلول‌های توموری به مدت ۲٤، ٤۸ و ۷۲ ساعت با غلظت‌های مختلف دندروزوم تنها تیمار شدند. نتایج به صورت میانگین ± انحراف استاندارد بیان شده است. *** بیانگر معنی‌داری نتایج با ارزش آماری <۰/۰۰۱ در مقایسه با گروه کنترل است.

نتایج

مهار تکثیر سلول‌های سرطانی مثانه توسط نانوکورکومین دندروزومی

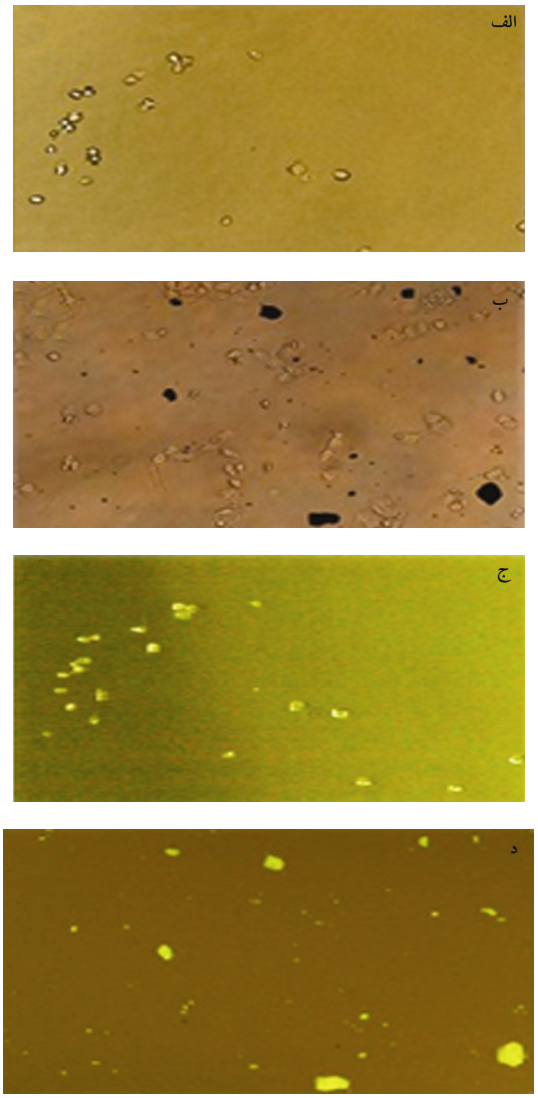
بررسی حساسیت سلول‌های توموری ٥٦۳۷ مثانه به واسطه تیمار این سلول‌ها با نانوکورکومین دندروزومی در غلظت‌های مختلف این دارو و سه بازه زمانی ۲٤، ٤۸ و ۷۲ ساعت و با استفاده از روش MTT انجام گرفت. نتایج به دست آمده نشان داد که نانوکورکومین دندروزومی به شکل وابسته به غلظت و زمان موجب مهار رشد سلول‌های سرطانی مثانه می‌شود (شکل ۱ الف) و این در حالی است که دندروزم به تنهایی فاقد سمیت بر این رده سلولی است (شکل ۱ ب) و این داده نشان می‌دهد که مرگ مشاهده شده در سلول‌های مثانه به واسطه کورکومین انجام گرفته است و دندروزوم با افزایش حلالیت کورکومین این رسانش را به سلول‌های سرطانی تسهیل کرده است (شکل ۱ ج). دوز مؤثر کشنده (LD_{50}) که معادل غلظتی است که در آن نیمی از سلول‌ها دچار مرگ شده‌اند در سه بازه زمانی ۲٤، ٤۸ و ۷۲ به ترتیب ۲۰، ۱۵ و ۱۲/۵ میکرومولار به دست آمد (ارزش معنی‌داری آماری در هر سه بازه زمانی<۰/۰۰۰۱ محاسبه شد.).

افزایش حلالیت و دسترسی زیستی کورکومین به سلول‌های سرطانی توسط حامل‌های دندروزومی

عکس‌برداری فلورسنت برای بررسی ورود کورکومین به سلول‌های سرطانی و بر پایهٔ فلورسنت ذاتی این مولکول انجام گرفت. همان طور که در شکل ۲ نشان داده شده است، سلول‌های تیمار شده با نانوکورکومین دندروزومی به واسطه ورود کورکومین در نتیجه افزایش حلالیت کورکومین، در عکس‌برداری با میکروسکوپ فلورسنت به رنگ سبز دیده می‌شوند و این درحالی است که در سلول‌های تیمار شده با کورکومین آزاد و به دلیل نامحلول بودن این مولکول در

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-01-31]

محیط‌های آبی، کورکومین به شکل ذرات نامحلول و سبز در فضای بین سلولی قابل مشاهده است.



شکل ۲ مطالعه ورود نانوکورکومین دندروزومی در رده سلولی ۵۶۳۷ مثانه با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت و بر پایه خاصیت فلورسنت ذاتی کورکومین و پس از ٤ ساعت تیمار با غلظت ۱۷/۵ میکرومولار نانوکورکومین دندروزومی و کورکومین آزاد، بزرگنمایی: ۱۰۰x. (الف) تصویر میکروسکوپ نوری سلول‌های تیمار شده با نانوکورکومین دندروزومی (ب) تصویر میکروسکوپ نوری سلول‌های تیمار شده با کورکومین (ج) تصویر میکروسکوپ نورفلورسنت سلول‌های تیمار شده با نانوکورکومین دندروزومی: سلول‌ها به دلیل ورود کورکومین به آن‌ها به رنگ سبز دیده می‌شود. (د) تصویر میکروسکوپ نورفلورسنت سلول‌های تیمار شده با کورکومین آزاد: به علت عدم حلالیت کورکومین، این ترکیب در فضای بین سلولی باقی و به رنگ سبز دیده می‌شود.

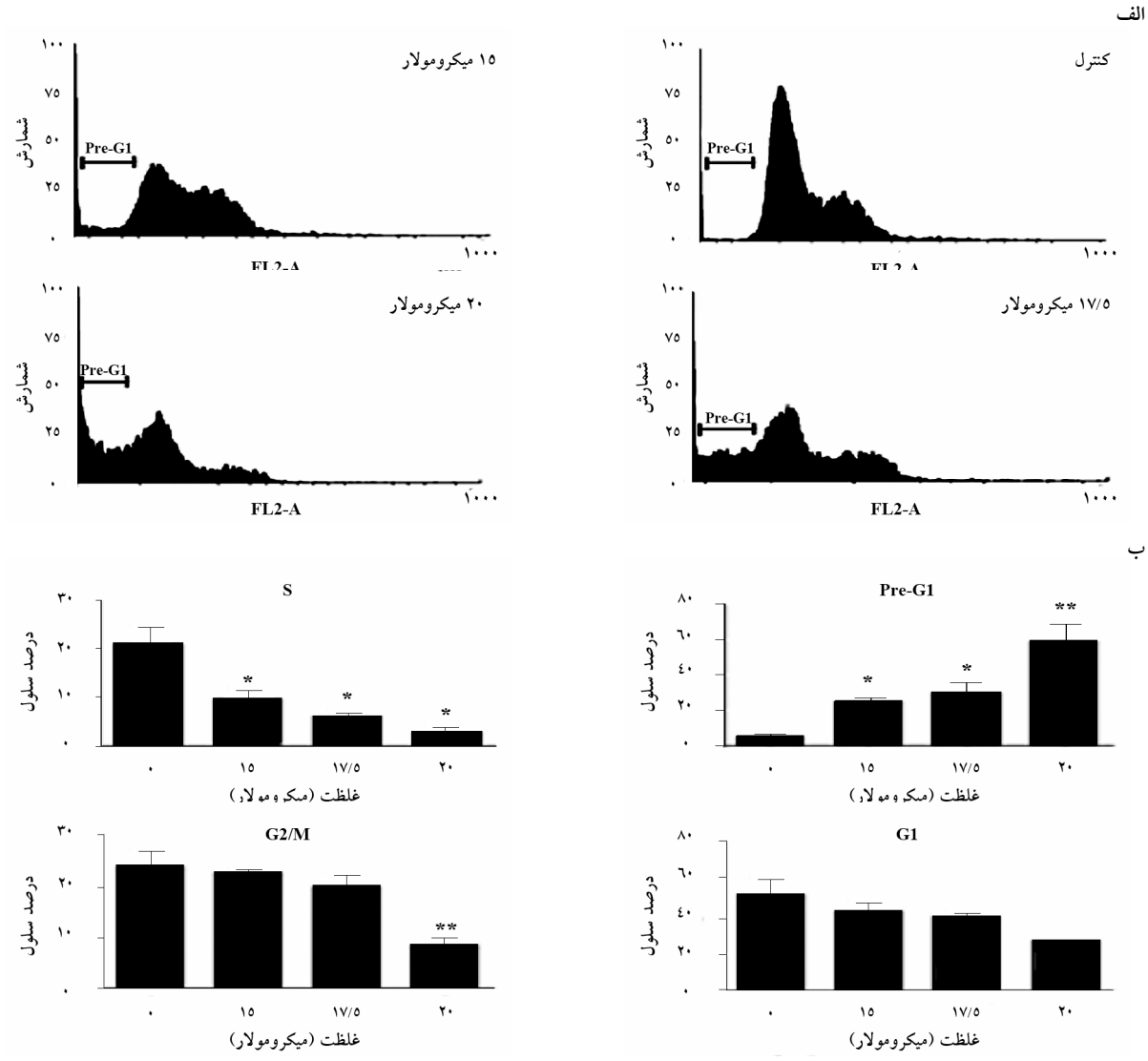
القای افزایش جمعیت سلول‌ها در فاز Pre-G1 چرخه سلولی توسط نانوکورکومین دندروزومی

تأثیر نانوکورکومین دندروزومی بر توزیع سلول‌ها در چرخه تکثیر با استفاده از روش فلوسیتومتری بررسی شد. بدین منظور سلول‌ها در سه بازه زمانی ۱۲، ٢٤ و ٣٦ ساعت و با غلظت‌های ۱۵، ۱۷/۵ و ۲۰ میکرومولار تحت تیمار دارویی قرار گرفتند. داده‌های حاصل از تجزیه و تحلیل فلوسیتومتری در جدول ۲ نشان داده شده است. به نظر می‌رسد نانوکورکومین دندروزومی به شکل وابسته به غلظت (شکل ۳) و زمان (شکل ٤)، مرگ را در سلول‌های توموری مثانه ایجاد کرده است؛ بدین معنی که با افزایش غلظت در هر سه بازه زمانی ۱۲، ٢٤ و ٣٦ ساعت، میزان مرگ القا شده در سلول به میزان معنی‌داری افزایش می‌یابد [ارزش معنی‌داری آماری (P-value) ۱۲ ساعت برابر ۰/۰۱، ارزش معنی‌داری آماری ٢٤ ساعت برابر ۰/۰۰٦ و ارزش معنی‌داری آماری ٣٦ ساعت برابر ۰/۰۲]. همچنین نشان داده شد که در غلظت ثابت ۱۷/۵ میکرومولار دارو با افزایش زمان، ازدیاد جمعیت سلولی در فاز Pre-G1 مشاهده خواهد شد (ارزش معنی‌داری آماری برابر ۰/۰٤٦۲). اگرچه روند کاهشی در جمعیت سلولی فاز G1 در بازه زمانی ۱۲ و ٢٤ ساعت پس از تیمار با غلظت‌های متفاوت از نانوکورکومین دندرروزومی معنی‌دار نبود اما کاهش معنی‌دار جمعیت سلولی در فاز S و G2/M مشاهده شد (ارزش آماری ۱۲ ساعت<۰/۰۵) که بیانگر تأثیر دارو در فاز همانندسازی و تقسیم سلولی است. در بازه زمانی ٣٦ ساعت پس از تیمار دارویی نیز افزایش معنی‌دار سلول‌ها در فاز Pre-G1 (ارزش معنی‌داری آماری برابر ۰/۰۰۲) با کاهش تدریجی سلول‌ها در فاز G1 (ارزش معنی‌داری آماری برابر ۰/۰۱٤۳) و G2/M (ارزش معنی‌داری آماری برابر ۰/۰۰٦) همزمان بود. براساس داده‌های به دست آمده، غلظت ۱۷/۵ میکرومولار با مطلوب‌ترین درصد القای مرگ در هر سه بازه زمانی و تأثیر معنی‌دار خود در هر سه فاز چرخه سلولی به عنوان غلظت انتخابی برای ادامه مطالعات مد نظر قرار گرفت.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-01-31]

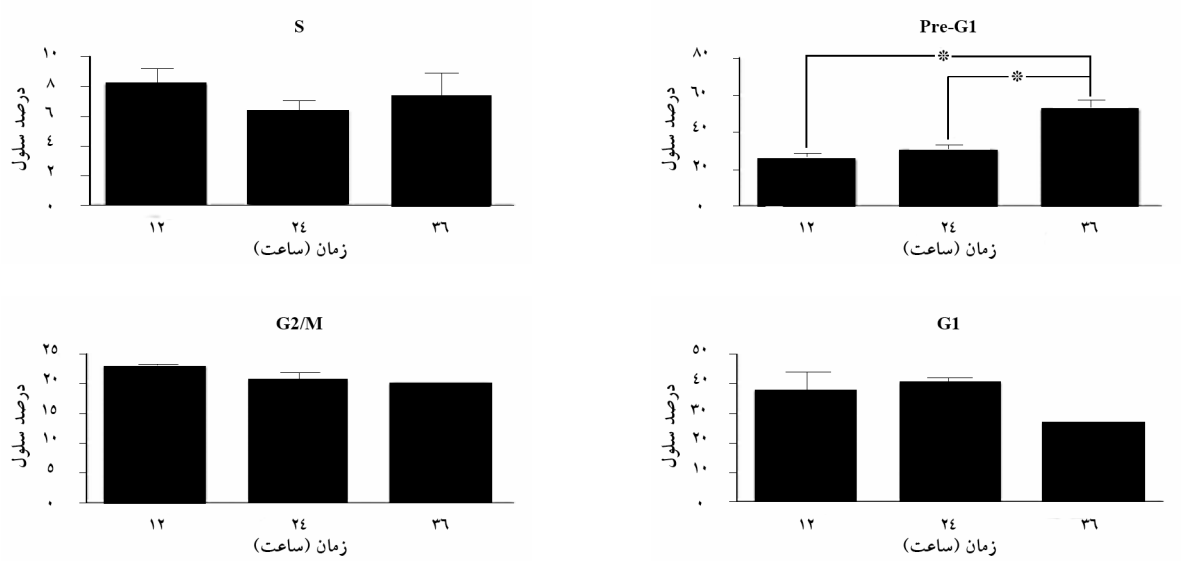
جدول ۲ نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل فلوسیتومتری در رده سلولی توموری ۵۶۳۷ مثانه پس از ۱۲، ۲۴ و ۳۶ ساعت تیمار با غلظت‌های صفر (کنترل)، ۱۵، ۱۷/۵ و ۲۰ از نانوکورکومین دندروزومی؛ داده‌ها بر پایهٔ درصد میانگین مرگ القا شده (مرگ برنامه‌ریزی شده سلول تأخیری) در این سلول‌ها گزارش شده است.

غلظت (میکرومولار)	۱۲ ساعت	۲۴ ساعت	۳۶ ساعت
صفر	۷/۱۶±۰/۰۰۹	۵/۱۸±۰/۰۱	۳±۰/۰۰۴
۱۵ میکرومولار	۱۶/۵۵±۰/۰۴	۲۴/۸۶±۰/۰۲	۳۴/۷۶±۰/۰۶
۱۷/۵ میکرومولار	۲۵±۰/۰۵	۳۰±۰/۰۴	۵۲±۰/۰۸
۲۰ میکرومولار	۳۳/۲۴±۰/۰۳	۵۹±۰/۱	۸۱/۲۸±۰/۰۱



شکل ۳ تأثیر وابسته به غلظت نانوکورکومین دندروزومی بر چرخه سلولی رده سلولی توموری ۵۶۳۷ مثانه؛ (الف) درصد سلولی پس از ۲۴ ساعت تیمار با غلظت‌های ۱۵، ۱۷/۵ و ۲۰ میکرومولار نانوکورکومین دندروزومی منجر به افزایش جمعیت سلولی Pre-G1 در مقایسه با گروه کنترل شد. (ب) تأثیر نانوکورکومین دندروزومی بر فازهای مختلف چرخه سلولی پس از ۲۴ ساعت تیمار با غلظت‌های ۱۵، ۱۷/۵ و ۲۰ میکرومولار نانوکورکومین دندروزومی. نتایج به صورت میانگین ± انحراف استاندارد بیان شده است. * بیانگر معنی‌داری نتایج با ارزش آماری $<0/05$ در مقایسه با گروه کنترل است.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-01-31]



شکل ٤ تأثیر وابسته به زمان نانوکورکومین دندروزومی بر رده سلولی توموری مثانه پس از۱۲، ۲٤ و ۳٦ ساعت تیمار دارویی با غلظت ۱۷/۵ میکرومولار از نانوکورکومین دندروزومی؛ نتایج به صورت میانگین ± انحراف استاندارد بیان شده است. * بیانگر معنی‌داری نتایج با ارزش آماری <۰/۰۵ در مقایسه با گروه کنترل است.

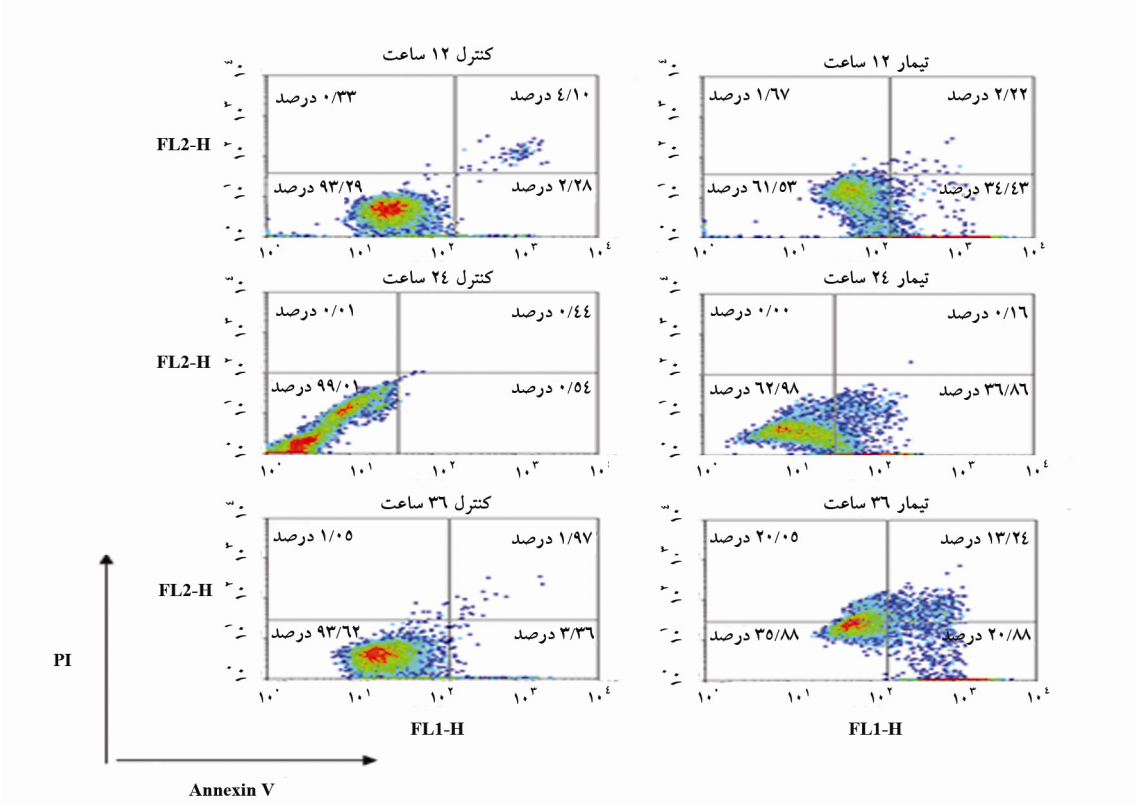
مهار رشد سلول‌های توموری مثانه توسط نانوکورکومین دندروزومی با القای مرگ برنامه‌ریزی شده مرگ سلولی

به منظور بررسی نوع مرگ القا شده در سلول‌های توموری مثانه (مرگ سلولی یا نکروز)، آزمون Annexin-V- PI و تیمار با نانوکورکومین دندروزومی به شکل وابسته به غلظت (۱۵، ۱۷/۵ و ۲۰ میکرومولار) و زمان (۱۲، ۲٤ و ۳٦ ساعت) انجام گرفت. در این آزمایش قرارگیری سلول‌ها به سمت راست نمودار بیانگر مرگ سلولی است. همان‌طور که در شکل ۵ نشان داده شده است، میزان مرگ برنامه‌ریزی شده القا شده در سلول‌ها پس از ۱۲، ۲٤ و ۳٦ ساعت تیمار با نانوکورکومین دندروزومی با غلظت ۱۷/۵ میکرومولار به ترتیب ۳٤/۱۷، ۳۵/۲۲ و ٤۹/۱٦ درصد به دست آمد که نسبت به سلول‌های تیمار نشده (کنترل) معنی‌دار به دست آمد. به طور کلی نتایج حاصل نشان داد که نانوکورکومین دندروزومی به صورت وابسته به غلظت و زمان مرگ سلولی را در رده سلولی ٥٦۳۷ مثانه القاء می‌کند (P<۰/۰۵).

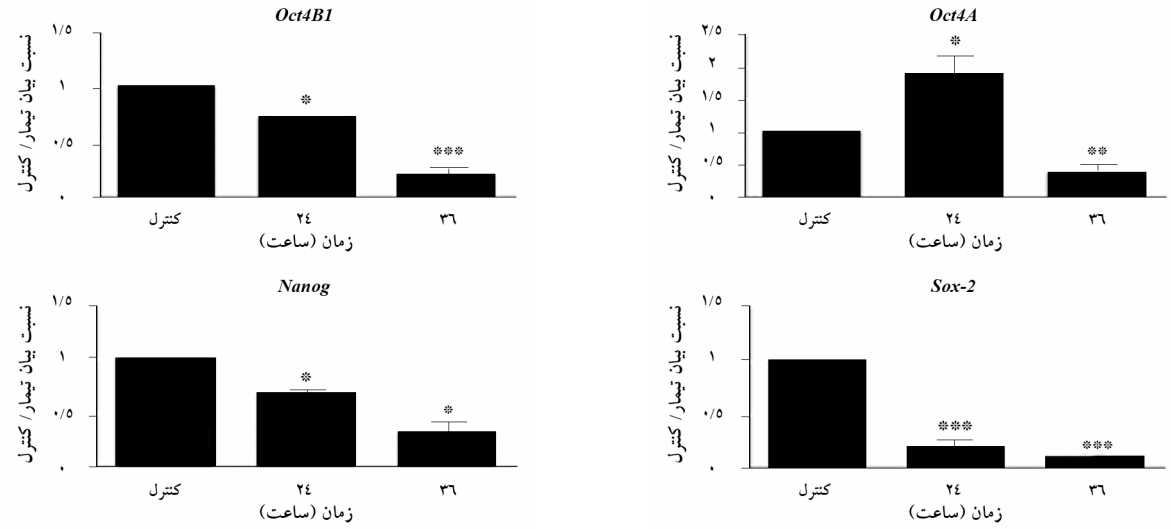
کاهش بیان ژن‌های *OCT4A*، *OCT4B1*، *SOX-2* و *Nanog* توسط نانوکورکومین دندروزومی

داده‌های حاصل از Real-Time نشان داد که *OCT4A* بیان ضعیف و *OCTB* فاقد بیان در رده سلولی ٥٦۳۷ مثانه است و این در حالی است که ژن‌های *OCT4B1*، *SOX-2* و *Nanog* بیان نسبتاً بالایی دارند که می‌تواند بیانگر دخالت این ژن‌ها در رشد و تکثیر تومورهای مثانه باشد. تیمار با نانوکورکومین دندروزومی در دو بازه زمانی ۲٤ و ۳٦ ساعت با غلظت ۱۷/۵ میکرومولار دارو با مهار معنی‌دار بیان این ژن‌ها همراه بود که به صورت وابسته به زمان مشاهده شد (شکل ٦). (ارزش معنی‌داری آماری به ترتیب برای *OCT4B1*، *SOX-2* و *Nanog* برابر ۰/۰۰٦، ۰/۰۰۲، ۰/۰۰۸ و ۰/۰۱ محاسبه شد).

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-01-31]



شکل ۵ مطالعه القای مرگ سلولی در رده سلولی توموری ۵٦۳۷ مثانه با استفاده از رنگ‌آمیزی AnnexinV-FLOUS/PI و پس از تیمار با ۱۷/۵ میکرومولار نانوکورکومین دندروزومی در سه بازه زمانی ۱۲، ۲٤ و ۳٦ ساعت؛ سلول‌های با رنگ‌آمیزی ($AnnexinV^-/PI^-$)، ($AnnexinV^+/PI^-$)، ($AnnexinV^+/PI^+$) و ($AnnexinV^-/PI^+$) به ترتیب به عنوان سلول‌های سالم، سلول‌های قرار گرفته در فاز اولیه مرگ برنامه‌ریزی شده سلول، سلول‌های قرار گرفته در فاز تأخیری مرگ برنامه‌ریزی شده سلول و سلول‌های نکروزی شناسایی می‌شوند.



شکل ٦ کاهش بیان در سطح mRNA در ژن‌های درگیر در مسیرهای تکثیر و پرتوانی پس از تیمار وابسته به زمان رده سلولی توموری مثانه با غلظت ۱۷/۵ میکرومولار از نانوکورکومین دندروزومی؛ نتایج به صورت میانگین ± انحراف استاندارد بیان شده است. * و *** به‌ترتیب بیانگر معنی‌داری نتایج با ارزش آماری کمتر از ۰/۰۰۱ و ۰/۰۵ در مقایسه با گروه کنترل است.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-01-31]

بحث

مطالعه پایه وراثتی سرطان‌ها یکی از موضوعات اصلی تحقیقات پزشکی امروز است. به نظر می‌رسد که اختلال در بیان ژن‌ها می‌تواند عامل بروز فنوتیپ سرطان‌ها باشد. بررسی‌های اخیر نشان می‌دهد در سرطان‌ها بیان بیش از ۳۰۰ ژن دچار تغییر شده است و این در حالی است که اکثر روش‌های درمانی تنها یک هدف را در سلول درگیر می‌کند که در کنار بازدهی کم، عوارض جانبی و هزینه بالا، سبب تلاش محققان برای یافتن روش‌های نوین با پتانسیل تحت اثر قرار دادن چندین هدف درون سلولی در درمان سرطان شده است [۲۱]. کورکومین مولکولی پلیوتروپیک (Pleiotropic Molecule) است بدین معنی که قادر است اهداف مختلفی را در سلول شامل عوامل رونویسی، گیرنده‌ها، آنزیم‌ها و عوامل رشد شناسایی کند و پتانسیل بالایی در درمان سرطان‌ها داشته باشد [۲۲]. تمایل کورکوومین به سلول‌های سرطانی نسبت به انواع طبیعی، نقش این مولکول را در تحقیقات سرطان برجسته‌تر کرده است [۲۳]؛ هرچند عدم حلالیت، جذب ضعیف و متابولیسم سریع، استفاده از این ترکیب دارویی را تا به امروز با محدودیت روبه رو کرده است. طراحی آنالوگ‌های ساختاری کورکومین و توسعه حامل‌های رسانش فسفولیپیدی نظیر لیپوزوم و میسل‌ها از جمله راه‌کارهای مورد مطالعه در راستای افزایش زیست‌ماندگاری این مولکول بوده است [۳]. داروی نانوکورکومین دندروزومی مورد استفاده در این تحقیق بر پایهٔ حامل‌هایی با ساختار میسلی تحت عنوان دندروزوم طراحی شد. نقش این حامل در راستای افزایش حلالیت کورکومین به واسطه مقایسه نقش ضد سرطانی نانوکورکومین دندروزومی و کورکومین آزاد بر مدل سرطانی فیبروسارکوما در سطح کشت سلول و مدل‌های موشی تأیید شد [۷]. نتایج حاصل از MTT تأثیر نانوکورکومین دندروزومی بر رده سلولی توموری ۵۶۳۷ مثانه روندی وابسته به غلظت و زمان را نشان می‌دهد؛ بدین معنی که با افزایش این دو متغیر، افزایش مرگ سلولی رده سلولی توموری ۵۶۳۷ مثانه مشاهده می‌شود. دوز مؤثر کشنده (LD_{50}) در سه بازه زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ به ترتیب ۲۰، ۱۵ و ۱۲/۵ میکرومولار به دست آمد. همچنین نشان داده شد که دندروزوم به تنهایی فاقد تأثیر کشنده بر رده سلولی توموری ۵۶۳۷ مثانه است که نشان می‌دهد مرگ مشاهده شده در سلول‌های مثانه به واسطه کورکومین انجام گرفته است و دندروزوم با افزایش حلالیت کورکومین این رسانش را به سلول‌های سرطانی تسهیل کرده است. افزایش غلظت نانوکورکومین دندروزومی با کاهش تدریجی جمعیت سلولی در فاز G1 و S و G2/M و ورود سلول‌ها به فاز مرگ یا Pre-G1 همراه است. افزایش زمان تیمار سلول‌ها نیز با افزایش میزان مرگ القا شده در فاز Pre-G1 و کاهش معنی‌دار جمعیت سلولی در فاز G1 همرا بود. این یافته‌ها نشان می‌دهد که نانوکورکومین دندروزومی قادر به مهار رشد، تکثیر و تقسیم رده سلولی توموری ۵۶۳۷ مثانه است. بررسی نوع مرگ القا شده توسط نانوکورکومین دندروزومی نشان داد که این ترکیب سلول‌ها را به سمت مرگ برنامه‌ریزی شده هدایت می‌کند که این ویژگی در کنار تمایل کورکومین به سلول‌های سرطانی نسبت به انواع طبیعی، پتانسیل نانوکورکومین دندروزومی را به عنوان دارویی با آثار جانبی کمتر افزایش می‌دهد. پیش‌تر نیز تأثیرات مهاری وابسته به غلظت و زمان کورکومین بر رشد و تکثیر طیفی از رده‌های سلولی توموری مثانه همانند رده‌های سلولی EJ و T24 نشان داده شده است و به نظر می‌رسد که کورکومین تأثیر مهاری خود را به واسطه افزایش بیان ژن‌های دخیل در مرگ برنامه‌ریزی شده سلول نظیر C-myc، P53 و کاسپازها یا کاهش بیان ژن‌هایی نظیر Bcl2 و سوروایوین (Survivin) القا می‌کند. فعال‌سازی مسیرهای انتقال پیام PI3K/AKT نیز پس از تیمار با کورکومین گزارش شده است [۲۴-۲۶]. مطالعه ژنتیکی مکانیسم عملکرد کورکومین در القای مرگ سلولی در رده سلولی توموری ۵۶۳۷ مثانه با انتخاب ژن‌های *OCT4*، *SOX-2* و *Nanog*- ژن‌های شاخص در حفظ حالت پرتوانی سلول‌های بنیادی- صورت پذیرفت. انتخاب این ژن‌ها از دو جنبه اهمیت دارد؛ اول آن‌که امروزه جداسازی جمعیت‌های

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-01-31]

سلولی با خصوصیات مشابه با سلول‌های بنیادی از بسیاری از توده‌های توموری این ایده که سرطان بیماری‌ای برخواسته از سلول‌های بنیادی باشد را ترویج کرده است [۲۷]. بیان این نشانگرهای سلول‌های بنیادی در طیف وسیعی از سرطان‌ها نیزگزارش شده است، بنابراین به نظر می‌رسد که این ژن‌ها از عوامل دخیل در رشد سلول‌های سرطانی، مقاومت به درمان یا عود مجدد تومورها باشد، پس می‌تواند هدف مناسبی برای مهار سرطان‌ها در نظر گرفته شود [۲۸]، از طرفی؛ مطالعات نشان می‌دهد که پروتئین‌های کد شونده توسط این ژن‌ها از جمله فاکتورهای ضروری در تنظیم فعالیت کروماتین، همانندسازی، رونویسی، پردازش و ترمیم سلول است که در کنار نقش مهاری بر فرآیند مرگ سلولی در تکثیر و حفظ حالت پرتوانی سلول‌ها دخالت دارد [۲۹]. بنابراین با توجه به این مشاهده که کورکومین تأثیر مهاری خود را در رده سلولی توموری ۵۶۳۷ مثانه به واسطه مهار تکثیر DNA انجام می‌دهد، می‌تواند هدف مناسبی برای کورکومین در نظر گرفته شود. نتایج حاصل از این تحقیق در رده سلولی توموری ۵۶۳۷ مثانه نشان داد که *OCT4B1*، *SOX-2* و *Nanog* دارای بیان نسبتاً بالایی در این رده سلولی توموری است که می‌توان این شدت بیان را به اهمیت این ژن‌ها در رشد و تکثیر تومورهای مثانه نسبت داد. نقش تومورزای *OCT4*، *SOX-2* و *Nanog* در تومورهای مثانه و دخالت آن در روند تمایز و متاستاز (Metastase) تومورهای مثانه، قبلاً نیز گزارش شده است [۳۰، ۳۱]. داده‌های حاصل از تأثیر نانوکورکومین دندروزومی بر بیان این ژن‌ها نشان داد که این فورمولاسیون به شیوه مؤثری ژن‌های مذکور را هدف قرار می‌دهد و از این میان دو ژن *OCT4A* و *SOX-2* تأثیرپذیری بیشتری نشان داد که می‌تواند بیانگر نقش کلیدی این دو عامل در رشد و توسعه سلول‌های سرطانی مثانه باشد. بنابراین به نظر می‌رسد که کورکومین می‌تواند به عنوان تنظیم کننده منفی ژن‌های پرتوانی عمل کند و با مهار بیان این ژن‌ها، سلول سرطانی را به سمت مسیرهای مرگ هدایت کند. نقش مهاری کورکومین بر مهار تکثیر سلول‌های بنیادی سرطانی در طیف وسیعی از سرطان‌ها نظیر مری، گلی بلاستوما (Glioblastoma) و کولون به اثبات رسیده و نشان داده شده است که بیان شاخص‌های سلول‌های بنیادی نظیر ALDH1A1 و CD44 پس از تیمار با کورکومین به طور معنی‌داری کاهش می‌یابد. کاهش فعالیت مسیر انتقال پیام wnt/β-catenin، STAT3 و Notch از مسیرهای درگیر در پرتوانی سلول‌های بنیادی، پس از تیمار با کورکومین یا آنالوگ‌های ساختاری آن گزارش شده است. همچنین نشان داده شده است که کورکومین قادر به مهار رشد سرطان‌ها به واسطه القای تمایز در سلول‌های سرطانی بنیادی است [۳۲-۳۴]. با این حال تا به امروز گزارشی مبنی بر هدف قرار گرفتن عوامل پرتوانی *OCT4*، *SOX-2* و *Nanog* در دست نیست و این مطالعه برای اولین بار نقش مهاری کورکومین بر رده سلولی توموری مثانه را به واسطه کاهش بیان ژن‌های درگیر در پرتوانی سلول بنیادی ارایه داده است.

تشکر و قدردانی

کلیه امکانات و حمایت‌های مالی این پروژه توسط معاونت محترم پژوهشی دانشگاه تربیت مدرس تأمین شده است و به زنده یاد دکتر محمدنبی سربلوکی، استاد گرانقدر مرکز تحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک دانشگاه تهران تقدیم می‌شود.

منابع

[1] Shi M, Cai Q, Yao L, Mao Y, Ming Y, Ouyang G. Antiproliferation and apoptosis induced by curcumin in human ovarian cancer cells. Cell Biol Int 2006; 30(3): 221-6.

[2] Salvioli S, Sikora E, Cooper EL, Franceschi C. Curcumin in cell death processes: a challenge

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-01-31]

for CAM of age-related pathologies. Evid Based Complement Alternat Med 2007; 4(2): 181-90.

[3] Anand P, Kunnumakkara AB, Newman RA, Aggarwal BB. Bioavailability of curcumin: problems and promises. Mol Pharm 2007; 4(6): 807-18.

[4] Ohori H, Yamakoshi H, Tomizawa M, Shibuya M, Kakudo Y, Takahashi A, Takahashi S, Kato S, Suzuki T, Ishioka C, Iwabuchi Y, Shibata H. Synthesis and biological analysis of new curcumin analogues bearing an enhanced potential for the medicinal treatment of cancer. Mol Cancer Ther 2006; 5(10): 2563-71.

[5] 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 Biot 2008; 83(6): 912-20.

[6] Sarbolouki MN, Sadeghizadeah 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.

[7] 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.

[8] Alizadeh AM, Khaniki M, Azizian S, Mohaghgheghi 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.

[9] Jordan CT, Guzman ML, Noble M. Cancer stem cells. N Engl J Med 2006; 355(12): 1253-61.

[10] He W, Li K, Wang F, Qin YR, Fan QX. Expression of OCT4 in human esophageal squamous cell carcinoma is significantly associated with poorer prognosis. World J Gastroenterol 2012; 18(7): 712-9.

[11] Karoubi G, Gugger M, Schmid R, Dutly A. OCT4 expression in human non-small cell lung cancer: implications for therapeutic intervention. Interact Cardiovasc Thorac Surg 2009; 8(4): 393-7.

[12] Gazouli M, Roubelakis MG, Theodoropoulos GE, Papailiou J, Vaiopoulou A, Pappa KI, Nikiteas N, Anagnou NP. OCT4 spliced variant OCT4B1 is expressed in human colorectal cancer. Mol Carcinog 2012; 51(2): 165-73.

[13] Leis O, Eguiara A, Lopez-Arribillaga E, Alberdi MJ, Hernandez-Garcia S, Elorriaga K, Pandiella A, Rezola R, Martin AG. Sox2 expression in breast tumours and activation in breast cancer stem cells. Oncogene 2012; 31(11): 1354-65.

[14] Jung I, Messing E. Molecular mechanisms and pathways in bladder cancer development and progression. Cancer Control 2000; 7(4): 325-34.

[15] Gu J, Wu X. Genetic susceptibility to bladder cancer risk and outcome. Per Med 2011; 8(3): 365-374.

[16] Zhu Z, Wen J, Zheng X, Wang D, Wang Q, Fan C. Expression of transcription factor Oct4 in bladder cancer cell line T24 and its effects on the biological characteristics of the cells. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci 2009; 29(1): 73-6.

[17] Xu K, Zhu Z, Zeng F. Expression and significance of Oct4 in bladder cancer. J

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-01-31]

cancer Cells via Modulating C-Myc and PI3K/Akt Signaling Pathway. World J Onol 2011; 2(3): 113-22.

[26] Tian B, Wang Z, Zhao Y, Wang D, Li Y, Ma L, Li X, Li J, Xiao N, Tian J, Rodriguez R. Effects of curcumin on bladder cancer cells and development of urothelial tumors in a rat bladder carcinogenesis model. Cancer Lett 2008; 264(2): 299-308.

[27] Jordan CT. Cancer stem cell biology: from leukemia to solid tumors. Curr Opin Cell Biol 2004; 16(6): 708-12.

[28] Ling GQ, Chen DB, Wang BQ, Zhang LS. Expression of the pluripotency markers Oct3/4, Nanog and Sox2 in human breast cancer cell lines. Oncol Lett 2012; 4(6): 1264-8.

[29] Campbell PA, Perez-Iratxeta C, Andrade-Navarro MA, Rudnicki MA. Oct4 targets regulatory nodes to modulate stem cell function. PLoS One 2007; 2(6): e553.

[30] Ruan J, Wei B, Xu Z, Yang S, Zhou Y, Yu M, Liang J, Jin K, Huang X, Lu P, Cheng H. Predictive value of Sox2 expression in transurethral resection specimens in patients with T1 bladder cancer. Med Oncol 2013; 30(1): 445.

[31] Zhao P, Liu C, Xu K, Zheng S, Li H, Xu Y, Xu A, Li B, Huang P. [Expression of OCT4 protein in bladder cancer and its clinicopathological implications]. Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao 2012; 32(5): 643-6.

[32] Almanaa TN, Geusz ME, Jamasbi RJ. Effects of curcumin on stem-like cells in human esophageal squamous carcinoma cell lines. BMC Complement Altern Med 2012; 12: 195.

Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci 2007; 27(6): 675-7.

[18] Schoenhals M, Kassambara A, De Vos J, Hose D, Moreaux J, Klein B. Embryonic stem cell markers expression in cancers. Biochem Biophys Res Commun 2009; 383(2): 157-62.

[19] Chan KS, Espinosa I, Chao M, Wong D, Ailles L, Diehn M, Gill H, Presti J Jr, Chang HY, van de Rijn M, Shortliffe L, Weissman IL. Identification, molecular characterization, clinical prognosis, and therapeutic targeting of human bladder tumor-initiating cells. Proc Natl Acad Sci U S A 2009; 106(33): 14016-21.

[20] 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.

[21] 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.

[22] Goel A, Kunnumakkara AB, Aggarwal BB. Curcumin as "Curecumin": from kitchen to clinic. Biochem Pharmacol 2008; 75(4): 787-809.

[23] Ravindran J, Prasad S, Aggarwal BB. Curcumin and cancer cells: how many ways can curry kill tumor cells selectively? AAPS J 2009; 11(3): 495-510.

[24] Tong QS, Zheng LD, Lu P, Jiang FC, Chen FM, Zeng FQ, Wang L, Dong JH. Apoptosis-inducing effects of curcumin derivatives in human bladder cancer cells. Anticancer Drugs 2006; 17(3): 279-87.

[25] Wang J, Wang Z, Wang H, Zhao J, Zhang Z. Curcumin Induces apoptosis in EJ bladder

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-01-31]

[33] Zhang XZ, Li XJ, Zhang HY. Curcumin's potential to modulate stem cell fate. Trends Pharmacol Sci 2009; 30(7): 331-2.

[34] Zhuang W, Long L, Zheng B, Ji W, Yang N, Zhang Q, Liang Z. Curcumin promotes differentiation of glioma-initiating cells by inducing autophagy. Cancer Sci 2012; 103(4): 684-90.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-01-31]