

Evaluation of Apoptosis Induction on Gastric Cancer AGS Cells Made by Polymer Nano Curcumin

Received: 8 December 2012

Revised: 15 December 2012

Accepted: 25 December 2012

ABSTRACT

Alireza Panahi¹
Ruhollah Nakhaei Sistani²
Majid Sadeghizadeh*¹

¹Department of Genetics,
Faculty of Biologic Sciences,
Tarbiat Modares University,
Tehran

²Department of Cellular
Biotechnology,
Faculty of Chemistry,
Kashan University,
Kashan-Iran

***Corresponding Author:**

Professor of Genetics,
Email: sadeghma@modares.ac.ir

Background: Gastric cancer is known as the 4th cause of malignancy and mortality in the world. Several risk factors have been defined for this malignancy as diet and environmental factors. Curcumin is a herbal derivate which has obvious effects on suppression of malignancies via inhibition of apoptosis, cell proliferation, invasion and angiogenesis. It has also been shown that Curcumin has no adverse effect on body normal cells. The most important limitation factor in its clinical use is being water insoluble, low absorption rate and bio-instability. The aim of this study was to use Dendrosomes as carriers of Curcumin and to study the induction of apoptosis on AGS cells.

Materials and Methods: In this study, AGS cells have been exposed to different concentrations of Polymer Nano Curcumin (5 to 20 micromole). Metabolic activity of these cells has been evaluated by using MTT test. Also apoptosis has been studied using Annexin test.

Results: This study showed that Nano Curcumin concentration of 13 micromole is able to suppress metabolic activity of 50% of cellules and also to suppress apoptosis in 26% of them in compare with control group.

Conclusion: The concentration of encapsulated agent that may lead to inhibition of metabolic activity and apoptosis is too low. As Dendrosomes have been shown to be non-toxic on body cells and also– the amount of free Curcumin which is needed to have effects like this study is too high, it looks that 13 micromole concentration of Nano Curcumin polymer has significant better effect on clinical targets in compare with free form.

Keywords: Polymer Nano Curcumin, Apoptosis, Gastric cancer, Drug concentration

بررسی القای آپوتوز ناشی از نانوکورکومین پلیمری در رده سلولی سرطان معده (AGS)

تاریخ پذیرش: ۵ دی ۱۳۹۱

تاریخ اصلاح: ۲۵ آذر ۱۳۹۱

تاریخ دریافت: ۱۸ آذر ۱۳۹۱

چکیده

علیرضا پناهی^۱روح الله نخعی سیستانی^۲مجید صادقی زاده^{۱*}^۱دانشگاه تربیت مدرس،

دانشکده علوم زیستی، گروه ژنتیک،

تهران

^۲دانشگاه کاشان، دانشکده شیمی،

گروه بیوتکنولوژی سلولی،

کاشان - ایران

مقدمه: سرطان معده بعنوان چهارمین سرطان بدخیم و عامل مرگ و میر در سطح دنیا شناخته شده است. عوامل مختلفی بعنوان عامل خطر این بیماری معرفی شده اند که از آن جمله می توان به رژیم غذایی و محیط اشاده نمود. کورکومین یک ترکیب گیاهی است که تاثیرات آن در مهار جنبه های مختلف سرطان از جمله آپوتوز، مهار تکثیر سلولی، تهاجم و رگزایی به اثبات رسیده است و نشان داده شده است که بر سلولهای سالم فرد تاثیر سوئی نمی گذارد. اما مهمترین عامل محدود کننده در کاربرد بالینی این دارو نامحلول بودن آن در آب، جذب پایین و ناپایداری زیستی آن می باشد. لذا در این مطالعه سعی شده است تا جهت رفع این مشکلات از دندروزوم به عنوان ناقل استفاده شود و القاء آپوتوز بر سلولهای AGS بررسی گردد.

مواد و روش ها: در این تحقیق سلول های AGS در معرض غلظت های مختلف نانوکورکومین پلیمری (۵ تا ۲۰ میکرومولار) قرار گرفتند و مهار فعالیت متابولیکی آنها توسط آزمون MTT سنجیده شد و در ادامه ایجاد آپوتوز نیز توسط آزمون انکسین تعیین گردید.

یافته ها: در این آزمایش نشان داده شد که غلظت ۱۳ میکرومولار نانوکورکومین می تواند به مهار متابولیکی ۵۰ درصدی سلولها و نیز آپوتوز ۲۶ درصدی آنها در مقایسه با گروه کنترل بیانجامد. **نتیجه گیری:** در این مطالعه مشخص گردید، غلظتی از داروی انکپسوله که می تواند منجر به مهار فعالیت متابولیکی و آپوتوزی گردد بسیار پایین است. از آنجا که مطالعات بر روی دندروزوم حاکی از عدم سمیت دندروزوم بر روی سلول ها است، و از طرفی مقدار کورکومین فاقد حامل مورد نیاز جهت اعمال تاثیر مشابه آنچه که در این آزمایش بدست آمد بسیار بیشتر است، به نظر میرسد که فرمولاسیون نانوکورکومین پلی مری (DNC) با غلظت ۱۳ میکرومولار جهت اهداف بالینی نسبت به شکل فاقد حامل دارو برتری قابل ملاحظه ای دارد.

کلید واژه ها: نانوکورکومین پلیمری، آپوتوز، سرطان معده، غلظت دارو

*نویسنده مسئول:

استاد دانشگاه تربیت مدرس

پست الکترونیک: sadeghma@modares.ac.ir

مقدمه

راهکارهای مختلفی برای درمان آن در نظر گرفته می شود برای مثال جراحی، رادیودرمانی، شیمی درمانی، ژن درمانی، ایمنی درمانی، [۲، ۳] و نیز استفاده از فناوری نانو و غیره میباشد. کورکومین ترکیب پلی فنلی است [۴] که در گیاه زردچوبه وجود دارد [۵]. کورکومین با نام علمی Diferuloylmethane و فرمول شیمیایی $C_{21}H_{20}O_6$ می باشد که خاصیت ضدسرطانی، ضد تکثیر سلولی، ضد التهاب، ضد جهش زا، ضد رگزایی و آنتی اکسیدانی دارد [۱۲-۶]. کورکومین می تواند در سرطان هایی نظیر کولون [۱۳]، سینه، کبد [۱۴] و لوکمی [۱۵] و ... آپوتوز را القا کند. القاء آپوتوز بواسطه ی کورکومین هم از طریق مسیر وابسته به گیرنده و هم مسیر میتوکندریایی است که در رده های سلولی مختلف می تواند متفاوت باشد [۱۶]. کورکومین در حال حاضر در

سرطان یک بیماری مزمن و ناهمگون ژنتیکی می باشد که پس از بیماری های قلبی و عروقی، دومین علت شایع مرگ و میر در جهان به شمار می رود. این ضایعه کشنده، در اثر بروز تدریجی چندین جهش در ژن های کنترل کننده مسیر های حیاتی سلول از جمله رشد و نمو و آپوتوز به وجود آمده و باعث تولید توده های سلولی توموری می شود که از قوانین تکاملی حاکم بر ماهیت پرسولوی یک موجود زنده پیروی نکرده و با به دست آوردن ویژگی هائی از جمله عدم توجه به فاکتورهای رشد داخلی و خارجی، توانائی تکثیر خود به خودی، فرار از آپوتوز و متاستاز بیماری سرطان را ایجاد می کنند [۱، ۲]. با توجه به طبیعت پیچیده بیماری سرطان

در مرزها خدمت می نمایند بیشتر در معرض ابتلا به این سرطان قرار گیرند لذا بررسی راه های پیشگیری و درمان این بیماری بسیار حایز اهمیت است. به همین دلیل این مطالعه بر روی سلول های AGS که مدل مطالعه سرطان معده است انجام گرفته است تا توانایی داروی نانوکورکومین پلیمری را در القاء آپوپتوز بررسی گردد. در این بررسی نشان داده شد که نانوکورکومین پلیمری با غلظت $13 \mu M$ توانایی القاء آپوپتوز را در سلول های AGS دارد و لذا دارای این توانایی بالقوه است که به عنوان دارو جهت درمان سرطان معده و نیز پیش گیری از آن مورد استفاده قرار گیرد.

مواد و روش ها

کشت سلول: رده ی سلولی سرطان معده (AGS) از مؤسسه ی پاستور (ایران، تهران) خریداری شد. در فلاسک کشت با نسبت ۱:۱ از محیط کشت RPMI و HamsF12 (Gibco, Germany) به همراه ۱۰٪ سرم جنین گاو (FBS)(Gibco, Germany) و 100 U/ml از پنی سیلین G و 100 mg/ml استرپتومایسین (Gipco, Germany) رشد داده شدند. سلول ها در معرض ۵٪ دی اکسید کربن و ۹۵٪ هوای مرطوب و در دمای $37^\circ C$ در فلاسک های ۲۵ میلی لیتری یا پلیت های ۹۶ چاهکی کشت داده شدند.

بررسی قابلیت بقاء و رشد سلولی: ابتدا جهت تعیین تعداد سلول مناسب منحنی استاندارد ترسیم شد، بدین طریق که در چاهکهای مختلف تعداد متفاوتی سلول با حد فاصل های یکسان اضافه شد و پس از رسیدن به شکل طبیعی و هم زمان شدن (از طریق کشت در محیط کشت حاوی ۴٪ سرم) با گذشت زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت به هر چاهک $20 \mu l$ از محلول ۰/۵٪ (۴) - ۳ (۵ و ۷) - دی متیل تیازول-۲-ئیل (۵ و ۲) دی فنیل تترازولیوم بروماید (MTT) در PBS اضافه شد اضافه شد. رنگ نامحلول در آب فرمازان توسط DMSO (چاهک/ $200 \mu l$) حل شد و سپس شدت رنگ ایجاد شده توسط دستگاه الیزاریدر (BioTek) (ELISA reader) (U.S.A) سنجیده شد.

در مرحله بعد تعداد مشخص شده از سلول ها مطابق مرحله قبل در هر چاهک کشت شدند اما این بار به هر چاهک مقادیر مشخصی از نانوکورکومین پلی مری نیز اضافه گردید و به همان روش محلول MTT اضافه شد و نتیجه توسط دستگاه الیزاریدر تعیین گردید.

تهیه ی محلول نانوکورکومین پلیمری: محلول غلیظ (استوک) به غلظت ۲۷۰۰ میکرومولار کورکومین محلول در دندروزم طبق روش بابایی وهمکاران [۲۵] تهیه شد. سپس توسط PBS به غلظت ۲۰۰ میکرومولار رسانده شد و در ادامه این محلول به عنوان محلول کاری مورد استفاده قرار گرفت.

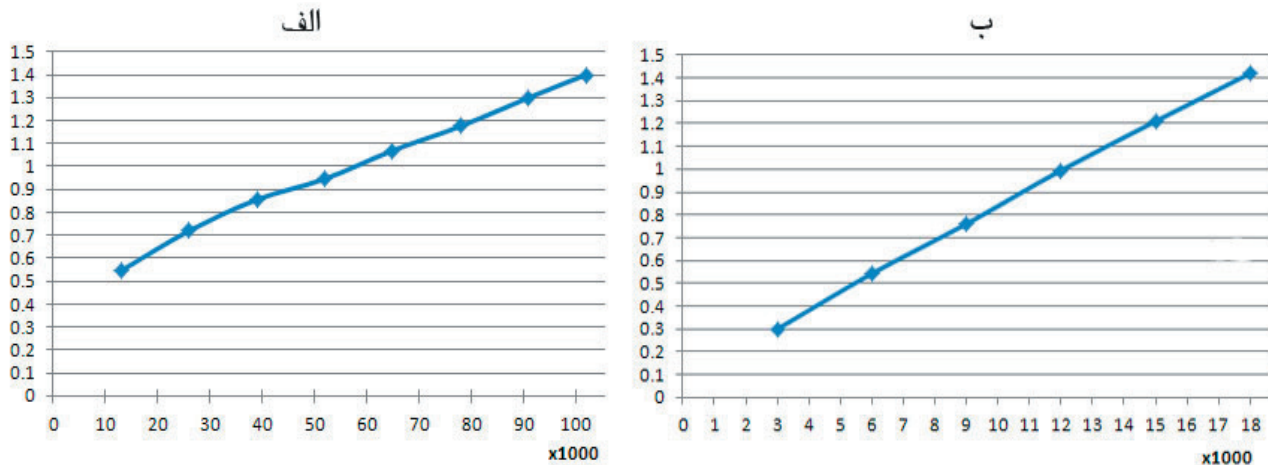
تیمار با نانوکورکومین پلیمری: سلول ها در فلاسک ۲۵ میلی لیتری مطابق شرایط طبیعی رشد داده شدند و پس از رسیدن سلول ها به شکل طبیعی به هر فلاسک کشت مقدار مشخص

فاز II تحقیقات بالینی برای درمان انواع مختلفی از سرطان ها است [۱۷، ۱۸].

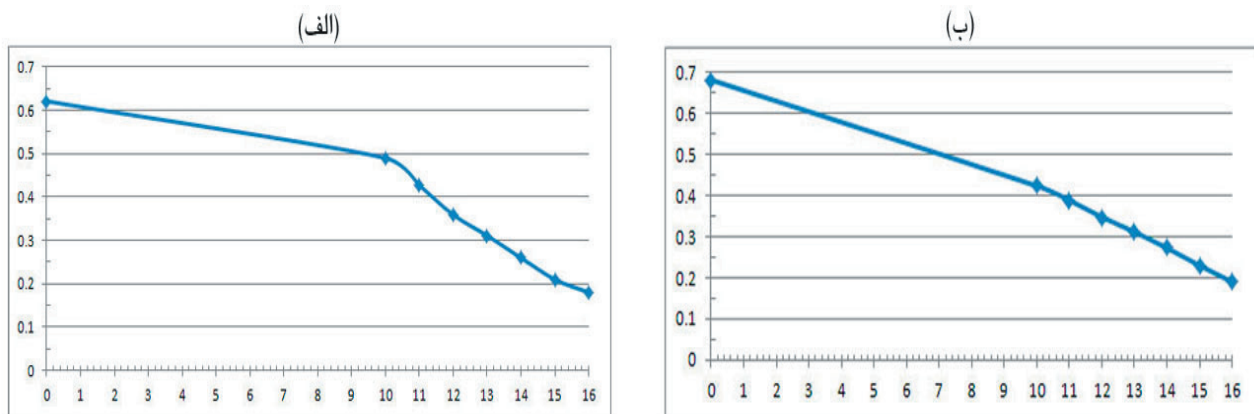
بررسی هایی که در سه دهه اخیر در زمینه قدرت جذب، توزیع، متابولیسم و دفع کورکومین صورت گرفته است، حاکی از جذب ضعیف و متابولیسم سریع این ترکیب دارویی و در نتیجه محدودیت استفاده از آن به دلیل زیست ماندگاری ضعیف کورکومین می باشد. مطالعات مختلف *in vivo* نشان داده اند که پس از استعمال خوراکی و یا تزریق درون صفاقی کورکومین مقادیر بسیار کمی از آن در دسترس بافت ها قرار می گیرد و بقیه از بدن موجود زنده دفع می گردد [۱۹، ۲۰]. به منظور رفع مشکل فوق تاکنون راهکارهای مختلفی از جمله استفاده از ادجوانت ها، میسل ها، لیپوزوم ها و همچنین به کارگیری ذرات نانو، اندیشیده شده است [۲۱]. کاربرد نانو ذرات در زمینه رسانش داروهای مختلف، به سبب افزایش زیست ماندگاری دارو و امکان هدفمند نمودن آن، اخیراً توجه محققان را بخود جلب نموده است. در مورد ترکیبات به شدت هیدروفوب، مانند کورکومین، کاربرد نانوذرات، به جهت افزایش انحلال آبی دارو از اهمیت ویژه ای برخوردار می باشد [۲۲].

سرطان معده یکی از شایعترین سرطانهای انسانی و دومین سرطان کشنده در جهان می باشد. براساس آخرین گزارشهای سازمان بهداشت جهانی (WHO) سرطان معده چهارمین سرطان بدخیم در جهان محسوب می شود البته شیوع این سرطان در نواحی مختلف جهان یکسان نیست [۱۷]. هر ساله حدود ۵۰۰۰۰ نفر جان خود را بر اثر سرطان معده از دست می دهند [۱۸]. سرطان معده در مردان نسبت به زنان شایعتر می باشد و معمولاً در سن ۴۵ تا ۷۰ سالگی اتفاق می افتد. در کشور ما ایران نیز شیوع سرطان معده بالا است [۲۳]. معده در معرض عوامل سرطانزایی متعددی قرار دارد که هم از طریق موادی که بلعیده می شوند و هم باکتریهای موجود در معده اثر می کنند و خطر ابتلا به سرطان معده را افزایش می دهند که این عوامل عبارتند از: ۱- رژیم غذایی: مصرف غذاهای سوخته و سرخ کردنی و چای داغ، نمک، غذاهای دارای مواد نگهدارنده، و کاهش مصرف ویتامینهای A و C خطر ابتلا به سرطان معده را افزایش می دهند. ۲- مصرف الکل و دخانیات، احتمال خطر را ۳ تا ۵ برابر افزایش می دهند. ۳- افرادی که از خویشاوندان درجه اول مبتلایان به سرطان معده هستند ۲ تا ۳ برابر احتمال خطر در آنها افزایش می یابد. ۴- افرادی که به ویروس EBV و باکتری هلیکوباکتریپیلوری آلوده هستند احتمال ابتلا به سرطان در آنها افزایش می یابد. از مهمترین فاکتورهای خطر برای سرطان معده در ایران عفونت هلیکوباکتریپیلوری و زخم معده می باشد [۲۳، ۲۴].

با توجه به نقش رژیم غذایی و کمبود برخی ویتامین ها در سرطان معده می توان انتظار داشت که افرادی که به دلایل شغلی در نقاط دور افتاده زندگی می کنند و به مواد غذایی مناسب و میوه جات کافی دسترسی ندارند، از جمله برخی از پرسنل نیروی انتظامی که



شکل ۱: نمودار منحنی استاندارد. الف ۲۴ ساعت و ب ۴۸ ساعت، محور عمودی جذب نوری و محور افقی تعداد سلول را نشان می دهد. تعداد سلول بهینه به منظور انجام آزمون MTT در هر زمان در بین جذب نوری ۰/۵ تا ۰/۷ انتخاب گردید. بر این اساس برای زمان ۲۴ ساعت ۲۰۰۰۰ و ۴۸ ساعت ۷۰۰۰ سلول انتخاب شد.



شکل ۲: نمودار MTT غلظت نانوکورکومین پلیمری. نمودارهای الف و ب مربوط به زمان های ۲۴ و ۴۸ ساعت می باشد. در هر مورد سلول ها در چاهک های مختلف در معرض غلظت های ۵ تا ۲۰ میکرومولار از DNC قرار گرفتند و پس از گذشت زمان مورد نظر بقاء آنها توسط محلول MTT سنجیده شد. محور عمودی مربوط به جذب نوری و محور افقی غلظت دارو بر حسب میکرومولار می باشد.

سلول به ازای هر چاهک در نتایج آزمون MTT، ابتدا منحنی استاندارد ترسیم شد تا تعدادی از سلولها انتخاب شوند که در زمان آزمون، OD بین ۰/۵ تا ۰/۷ داشته باشد شکل (۱). بدین طریق تعداد سلولها برای زمان ۲۴ ساعت ۲۰۰۰۰ سلول و برای ۴۸ ساعت ۷۰۰۰ سلول تعیین شد.

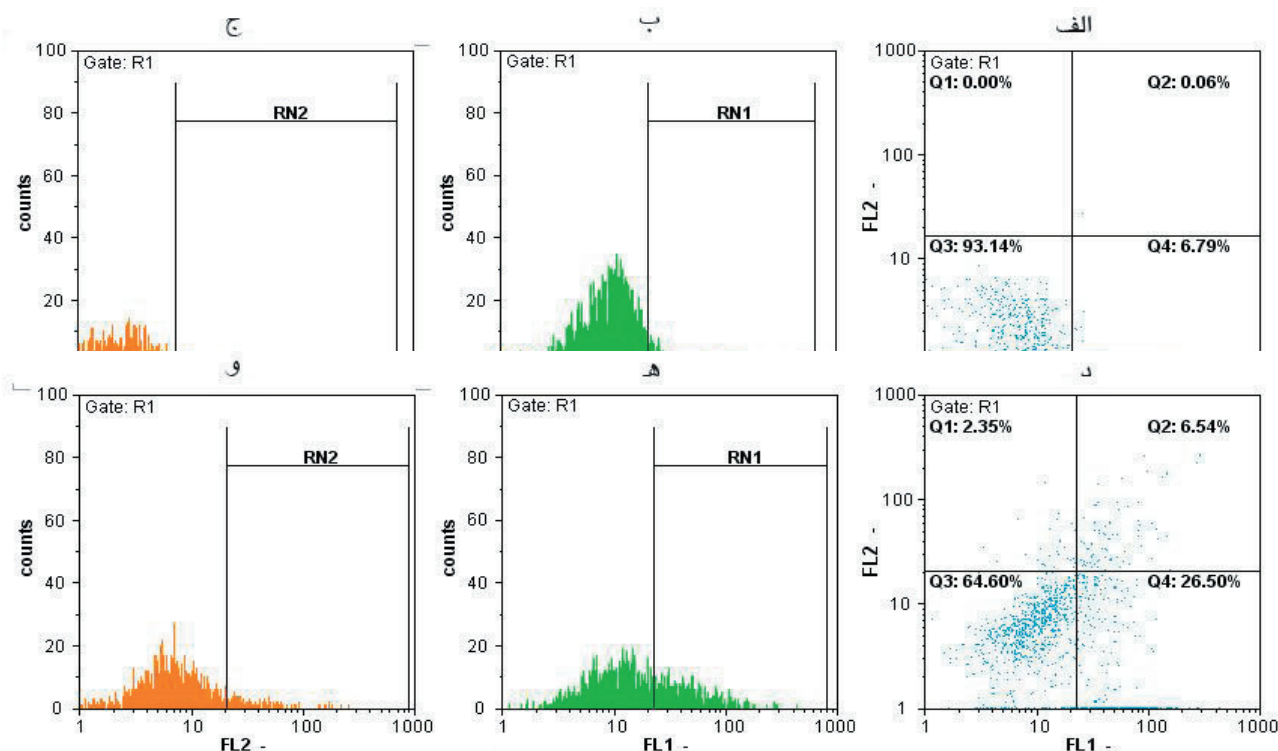
غلظت کشندگی نانوکورکومین پلیمری: برای تعیین مقداری از دارو که می تواند رده ی سلولی سرطان معده را به سمت آپوپتوز ببرد از آزمون MTT استفاده شد. به همین منظور رده ی سلولی AGS در معرض غلظت های متفاوت نانوکورکومین پلیمری قرار گرفت و سپس میزان بقاء آنها توسط نمک MTT تعیین گردید. نمودارهای ارائه شده توسط شکل (۲) میزان بقاء سلولی (سلول های به لحاظ متابولیکی فعال) را برای زمان های ۲۴، ۴۸ ساعت

از محلول نانوکورکومین اضافه شد. به طور موازی سلول های کنترل با شرایط یکسان با گروه تیمار کشت داده شدند و به جای نانوکورکومین پلیمری همان مقدار از محلول PBS اضافه گردید.

بررسی آپوپتوز با استفاده از آزمون Annexin V/FITC: سنجش آپوپتوز با استفاده از کیت Annexin-V-Fluos (Roche, Germany) مطابق دستور العمل کیت انجام گرفت. داده ها با استفاده از نرم افزار FlowMax بررسی شد.

نتایج

تعیین تعداد سلول جهت آزمون MTT: با توجه به اهمیت تعداد



شکل ۳: تاثیر آپوپتوزی نانوکورکومین پلیمری بر سلول های AGS. جهت آزمون انکسین سلولها در معرض غلظت IC₅₀ از DNC قرار گرفتند و میزان و نوع مرگ سلولی القا شده توسط سنجیده شد. نمودارهای الف، ب و ج سلول کنترل و د، ه و و سلول تیمار. الف و د توزیع سلولها را در منطقه آپوپتوزی اولیه (Q₄) و ثانویه (Q₂)، نکروزی (Q₁) و سالم (Q₃) را نشان می دهد. نمودار ب و ه پیک مربوط به رنگ انکسین (نشانگر آپوپتوز) و ج و و پیک مربوط به PI (نشانگر نکروز) را نشان می دهد.

... جهت انتقال مؤثرتر آن استفاده شده است [۲۹-۳۱]. در این مطالعه دندروزوم که یک ترکیب کروی فرادندانه دار است و همچنین پایداری بالایی داشته، عدم سمیت و زیست تخریب پذیر میباشد [۳۲-۳۴]. بعنوان ناقل انتقال کورکومین استفاده گردید. در این مطالعه مشخص شد که غلظت ۱۳ میکرومولار کورکومین دندروزومی میتواند در زمان ۲۴ ساعت به توقف ۵۰ درصدی متابولیسم سلولها بیانجامد. این در حالی است در مطالعات قبلی نشان داده شده بود که خود کورکومین آزاد به تنهایی در غلظت هایی بسیار بالاتر می تواند نتایج مشابهی را ایجاد نماید [۳۵]. این مطالعه نشان داد که این تأثیر کورکومین وابسته به غلظت و زمان است و لذا هرچه غلظت نانوکورکومین پلیمری افزایش یابد یا زمان در معرض قرارگیری بیشتر باشد میزان توقف فعالیت متابولیک نیز بیشتر می شود. بعلاوه آزمون انکسین نیز نشان داد که نوع مرگ ایجاد شده از نوع آپوپتوز است. لذا نشان می دهد که مرگ ایجاد شده بگونه ای است که به بافت های سالم در بدن آسیب نمی رساند.

نتیجه گیری

با توجه به اینکه سرطان معده در بدن از آسیب های پیش سرطانی

و بر حسب میزان جذب نور نشان می دهند. غلظت IC₅₀ برای زمان های ۲۴ و ۴۸ ساعت به ترتیب ۱۳ و ۱۲ میکرومولار تعیین شد.

بررسی Annexin V/FITC: بررسی آزمون انکسین نشان داد که اولاً نوع مرگی که نانوکورکومین پلیمری القا می نماید از نوع آپوپتوز است و ثانياً این غلظت دارو میتواند باعث القاء ۲۰ درصد آپوپتوز بیشتر نسبت به فلاسک کنترل گردد شکل (۳).

بحث

در سال های اخیر مطالعات گسترده ای بر روی تأثیرات درمانی کورکومین به خصوص در زمینه ی انواع سرطان ها انجام گرفته است و نشان داده شده است که این ترکیب می تواند در انواع مختلف سلول های سرطانی آپوپتوز را القا نماید و از سوی دیگر بر روی سلول های نرمال تأثیر سوئی نمی گذارد [۲۷-۲۸]. اگرچه کورکومین در عمل می تواند بعنوان یک داروی هوشمند رفتار کرده بسیاری از مسیرهای ایجاد سرطان را تعدیل نماید اما کاربرد بالینی آن بواسطه ی نامحلول بودن و جذب بافتی کم محدود شده است. از همین رو مطالعات مختلفی در جهت محلول نمودن آن صورت گرفته است و از انواع ناقلین نظیر میسل ها، لیپوزوم ها و

منابع

1. Kitano H. Cancer as a robust system: implications for anticancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2004; 4: 227-237.
2. McCormick F. Cancer Gene Therapy: Fringe or cutting edge? *Nat Rev Cancer* 2001; 41-2:13.
3. Cassileth BR. Complementary and Alternative Therapies for Cancer. *The oncologist* 2004; 9: 80-89.
4. Standby G, Fuller B, Jeremy J, Cheetham K, Rolles K. Endothelin release-a facet of reperfusion injury in clinical liver transplantation? *Transplantation* 1993; 56: 239-240.
5. Gao X, Kuo J, Jiang H, Deeb D, Liu. Y Divine. G, Chapman R.A, Dulchavsky SA, Gautam SC. Immunomodulatory activity of curcumin: suppression of lymphocyte proliferation, development of cell-mediated cytotoxicity, and cytokine production in vitro. *Biochem Pharmacol* 2004; 68: 51-61.
6. Araujo CC, and Leon LL. Biological activities of curcuma longa L. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2001; 96: 723-728.
7. Aggarwal BB, Kumar A, Bharti AC. Anticancer potential of curcumin: preclinical and clinical studies. *Anticancer Res* 2003; 23: 363-398.
8. Campbell FC, Collett GP. Chemopreventive properties of curcumin, *Fut Oncol*. 2005; 1: 405-414.
9. Skommer J, Wlodkowic Pelkonen D J. Cellular foundation of curcumin-induced apoptosis in follicular lymphoma cell lines, exp. *Hematol* 2006; 34: 463-474.
10. Lin JK, Pan MH, and Lin-Shiau SY. Recent studies on the biofunctions and biotransformation of curcumin. *Biofactors* 2000; 13: 153-158.
11. Miller JSM, Angeles FM, Reuter BK, Bobrowski P, Sandoval M. Dietary antioxidants protect gut epithelial cells from oxidant-induced apoptosis. *BMC Complement Altern Med* 2001; 1- 11.
12. Surh YJ, Chun KS, Cha HH, Han SS, Keum YS, Park KK, and Lee SS. Molecular Mechanisms underlying chemo preventive activities of anti-inflammatory phytochemicals: down-regulation of cox-2

التهابی بوجود می آید و از آنجا که کورکومین یک ترکیب ضد التهاب نیز میباشد می توان چنین انتظار داشت که مصرف نانوکورکومین می تواند در پیش گیری از وقوع سرطان نقش داشته باشد. بعلاوه زردچوبه از مدتها به عنوان یک ادویه در مواد غذایی استفاده می شد و نشان داده اند که مصرف مقادیر بالای آن نیز در فرد مسمومیت ایجاد نمی نماید. بررسی دندروزوم به تنهایی نیز به عدم سمیت سلولی آن دلالت دارد [۲۵]. بنابراین می توان انتظار داشت که محلول دندروزوم-کورکومین نیز این پتانسیل را دارد که به عنوان یک دارو با حداقل اثرات جانبی جهت درمان سرطان معده به کار رود.

and inos through suppression of nf-kappa b activation. *Mutat Res* 2001; 480-481: 243-268.

13. Chen H, Zhang S, Zhang YL, and Zhou DY. Curcumin inhibits cell croliferation by interfering with the cell cycle and inducing apoptosis in colon carcinoma cells. *Anticancer Res* 1999; 19: 3675-3680.

14. Jiang MC, Yang-Yen HF, Yen JJ and Lin JK. Curcumin induces apoptosis in immortalized NIH 3T3 and malignant cancer cell lines. *Nutr Cancer* 1996; 26: 111-120.

15. Kuo ML, Huang TS and Lin JK. Curcumin, an antioxidant and anti-tumor promoter, induces apoptosis in human leukemia cells. *Acta Biochim Biophys* 1996; 1317: 95-100.

16. Anto RJ, Mukhopadhyay A, Denning K and Aggarwal BB. Curcumin (diferuloylmethane) induces apoptosis through activation of caspase-8, BID cleavage and cytochrome c release: its suppression by ectopic expression of Bcl-2 and Bcl-xl. *Carcinogenesis* 2002; 23: 143-150.

17. Nishino Y, Tsuji IM, Wakai K, Tanaka K, Tsugane S. Tobacco smoking and gastric cancer risk. *J Clin Oncol* 2006; 36(12): 800-807.

18. Tetzalf ED, Cheng JD, and Ajani JA. Review of docetaxel in the treatment of gastric cancer. *Ther clin Risk Manag* 2008; 4(5): 999-1007.

19. Banerjee A, Kunwar A, Mishra B, and Priyadarshini K I. Concentration dependent antioxidant/prooxidant activity of curcumin studies from AAPH induced hemolysis of RBCs. *Chem Biol Interact* 2008; 174: 134-139.

20. Pan MH, Huang TM, and Lin J K. Biotransformation of curcumin through reduction and glucuronidation in mice. *Drug Metab Dispos* 1999; 27: 486-494.

21. Epstein J, Sanderson IR, and Macdonald TT, Curcumin as a therapeutic agent: the evidence from in vitro, animal and human studies. *Brit J Nutr* 2006; 103: 1545-1557.

22. Phan TT, See P, Lee ST, and Chan SY. Protective effects of curcumin against oxidative damage on skin cells in vitro: its implication for wound

healing. *J Trauma* 2001; 51: 927-931.

23. Malekzadeh R, Derakhshani M H, and Malekzadeh Z. Gastric cancer in Iran: epidemiology and risk factors. *Arch Iran Med* 2009; 12(6): 576-580.

24. Babaei M, Pourfarzib F, Yazdanbod A, et al. Gastric cancer in Ardabil, Iran- a Review and update cancer registry data. *Asian Pac J Cancer Prev* 2010; 11: 1-5.

25. Babaei E, Sadeghizadeh M, Mohammad Hassan Z. Dendrosomal curcumin significantly suppresses cancer cell proliferation in vitro and in vivo. *INT J Immunopharmac* 2012; 12: 226-234.

26. Chen H, Zhang ZS, Zhang YL and Zhou DY. Curcumin inhibits cell proliferation by interfering with the cell cycle and inducing apoptosis in colon carcinoma cells. *Anticancer Res* 1999; 19: 3675-3680.

27. Jiang MC, Yang-Yen HF, Yen JJ and Lin JK. Curcumin induces apoptosis in immortalized NIH 3T3 and malignant cancer cell lines. *Nutr Cancer* 1996; 26: 111-120.

28. Kuo ML, Huang TS and Lin JK Curcumin, an antioxidant and anti-tumor promoter, induces apoptosis in human leukemia cells. *Acta Biochim Biophys* 1996; 1317: 95-100.

29. Li L, Braiteh FS, Kurzrock R. Liposomeencapsulatedcurcumin: in vitro and in vivo effects on proliferation, apoptosis, signaling, andangiogenesis. *Cancer* 2005; 104(6): 1322-31.

30. Bisht S, Feldmann G, Soni S, Ravi R, Karikar C, Maitra A, Maitra A. Polymeric nanoparticleencapsulated curcumin ("nanocurcumin"): a novel strategy for human cancer therapy. *J Nanobiotechnology* 2007; 5: 3.

31. Wahlström B, Blennow G. A study on the fate of curcumin in the rat. *Acta Pharmacol Tox* 1978; 43(2): 86-92.

32. 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.

33. Sadeghizadeh M, Ranjbar B, Damaghi M, Khaki L, Sarbolouki MN, Najafi F, et al. Dendrosomes

as novel gene porters-III. J Chem Technol Bi 2008; 83: 912-20.

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

35. Ranji N, Padeganeh A, Sadeghizadeh M. Analysis of the effects of free and dendrosomal curcumin on apoptosis induction in stem cells and cancerous cells. Modares J Med Sci Pathol 1390; 14(2): 37-49. (Persian)