Journal of Police Medicine

Winter 2014; Vol. 2, No. 4: 263-272

Original Article

Research of Nanocurcumin Effect on Progression and Adhesion to Extracellular Matrix Rate in SW480 Cancer Cells

Received: 1 June 2013 **Revised:** 19 September 2013 **Accepted:** 24 September 2013

ABSTRACT

Back ground: Adhesion to extracellular matrix is a main necessity for invasion and malignancy in cancer cells. As a result, current treatment for patients with malignant tumors is inhibition of tumor cell movement and invasion. Among the herbal medicine, curcumin has long been considered by researchers. However, the lack of solubility of this compound in aqueous environments, has reduced its bioavailability. numerous carriers were suggested so far, however, any perfect formulation has not yet been found. In this study we used this medication mounted on a new and native carrier of nano particle to investigate its effects on the adhesion to the extracellular matrix and progression ability of SW480 cells.

Materials and Methods: In present study, in order to produce nanocurcumin, net curcumin and native nanoparticle of O-400 generation were used for the production of nanocurcumin, for getting cellular viability and IC50 rate, was used MTT assay and for evaluating cellular adhesion measure was used adhesion assay.

Results: The results showed that nanocurcumin exerted an inhibitory effect with the little dosages (0-15 μM) on the cellular viability and adhesion rate of SW480 cells and the IC50 concentration was obtained in the range of about 15.86, 11.57 and 7.64 μM at 24, 48 and 72 h post-treatment of nanocurcumin.

Conclusions: As a result, the nanocurcumin combinational medicine that has been approved in previous studies and showed high efficacy to inhibit the growth of cancerous tumors, can be known as an acceptable treatment option and we can hope its cancer preventive agent in future.

Keywords: colon cancer, nanocurcumin, cellular progression, adhesion to extracellular matrix

Mohammad Javad Dehghan Esmatabadi[1]
Baharak Farhangi[2]
Hadi Shirzad[3]
Majid Sadeghizadeh[4*]

[1]Ph.D Student, Department of Genetics, School of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

[2]Ms.c Student, Department of Genetics, School of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

[3]Assistant Professor, Technology Management Department, Police Sciences and Social Studies Institute, Tehran, Iran.

[4]Professor, Department of Genetics, School of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

[*]**Corresponding Author:**
Majid Sadeghizadeh
Tel : (+98)2182884484

Email: sadeghma@modares.ac.ir

زمستان۱۳۹۲- دوره ۲- شماره ۴- صفحات ۲۶۳-۲۷۲

مجله طب انتظامی

مقاله تحقیقی

بررسی اثر نانوکورکومین در مهار نرخ رشد و چسبندگی به ماتریکس خارج سلولی در سلول سرطانی رده SW480

تاریخ دریافت: ۱۰ تیر ۱۳۹۲ **تاریخ اصلاح:** ۲۸ شهریور ۱۳۹۲ **تاریخ پذیرش:** ۲ مهر ۱۳۹۲

چکیده

مقدمه: چسبندگی به بافت هدف تهاجم، از ضروریات اصلی فرایند تهاجم و بدخیم شدن توده سرطانی می‌باشد. امروزه توانایی ممانعت کردن از تهاجم سلول‌های توموری یک راه درمان بیماران سرطانی بدخیم است؛ از میان داروهای مختلف گیاهی، کورکومین به عنوان یک داروی ضد سرطانی، سال‌هاست مورد توجه محققان می‌باشد؛ با این حال عدم حلالیت این ترکیب باعث کاهش دسترسی زیستی این ماده شده است؛ اگرچه تا کنون حامل‌های مختلف برای حمل کورکومین ارائه شده است ولی گزارشات اندکی در مورد کارایی بالای آن‌ها در حل این مشکل ارائه شده است. در این مطالعه از کورکومین سوار شده بر حاملی از نانوپارتیکل با فرمولاسیون جدید و بومی، برای بررسی اثرات آن بر میزان رشد و چسبندگی سلولی رده سلول SW480 سرطان کولون استفاده شد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه جهت تولید نانوکورکومین از کورکومین خالص به همراه نانو ذره نسل O-400، ساخته شده با دانش بومی، جهت بررسی اثرات این داروی ترکیبی روی میزان رشد و بقای سلولی و به‌دست آوردن میزان غلظت حد واسط دارویی، از آزمون MTT و جهت بررسی اثرات آن روی میزان چسبندگی سلولی از آزمون استاندارد Adhesion Assay استفاده شد.

یافته‌ها: در طی این تحقیق، در تیمار سلول‌های SW480 با غلظت‌های (۱۵-۰) میکرومولار از نانوکورکومین، به طور معناداری میزان رشد و بقا سلولی و چسبندگی سلولی کاهش یافت. و میزان IC50 یا میزان غلظت حد واسط دارویی در تیمار نانوکورکومین در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به ترتیب ۱۵/۸۶، ۱۱/۵۷ و ۷/۶۴ میکرومولار حاصل شد.

نتیجه‌گیری: در نتیجه داروی ترکیبی نانوکورکومین، که در آزمایشات پیشین، کارایی بسیار زیادی در مهار رشد توده‌های سرطانی از خود نشان داده است، گزینه بسیار مناسبی برای ادامه تحقیقات می‌باشد و بنابراین می‌توان امیدوار بود که پس از مطالعات بیشتر، به عنوان یک عامل پیشگیری کننده‌ی سرطان در آینده به‌کار رود.

کلید واژه‌ها: سرطان کولون، نانوکورکومین، میزان رشد سلولی، اتصال به ماتریکس خارج سلولی

محمد جواد دهقان عصمت آبادی[۱]
بهارک فرهنگی[۲]
هادی شیرزاد[۳]
مجید صادقی زاده[۴*]

[۱]دانشجوی دکتری، گروه ژنتیک، دانشکده علوم پایه، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.
[۲]دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه ژنتیک، دانشکده علوم پایه، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.
[۳]استادیار، گروه مدیریت فن‌آوری، پژوهشگاه علوم انتظامی و مطالعات اجتماعی، تهران، ایران.
[۴]استاد، گروه ژنتیک، دانشکده علوم پایه، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.

[*]نویسنده مسئول:
مجید صادقی زاده
تلفن: ۲۱۸۲۸۸۴۴۸۴(۹۸+)
پست الکترونیک:
sadeghma@modares.ac.ir

مقدمه

سالانه ۵۰۰۰ مورد جدید سرطان در ایران تشخیص داده می‌شود که سرطان‌های گوارشی تعداد قابل توجهی از این آمار را تشکیل می‌دهند. سرطان روده بزرگ پس از سرطان معده و مری، سومین سرطان شایع گوارشی در ایران می‌باشد. این نوع بدخیمی سومین و چهارمین سرطان شایع، به ترتیب در مردان و زنان ایرانی می‌باشد و

Journal of Police Medicine
Winter 2014; Vol. 2, No. 4: 263-272

در کشورهای غربی، دومین علت مرگ و میر ناشی از سرطان را تشکیل می‌دهد. علل و عوامل مختلفی می‌تواند به عنوان عامل سرطان‌های مختلف هم چون کولون در نظر گرفته شود از جمله عوامل ژنتیکی، محیطی و رژیم غذایی. در ایجاد یک توده سرطانی در بافت نرمال از بافت طبیعی اپی تلیال روده، حداقل باید ۸ جهش ایجاد شود تا توده سرطانی تشکیل گردد با ایجاد این جهش‌ها در بافت روده، مسیرهای پیام رسانی سرطان زا در یاخته‌ها فعال می‌شوند که برخی از آن‌ها نقش مهم تری در ایجاد سرطان دارند در همین راستا می‌توان به دو مسیر اصلی پیام رسانی درگیر در سرطان کولون اشاره کرد: مسیرهای WNT و K-RAS [۷-۱]. این تغییرات منجر به تغییرات در سطوح بیانی ژن‌ها و رشد تومور و بدخیمی می‌شود [۸]. یکی از مهمترین این تغییرات در مقایسه با سلول‌های نرمال، این است که سلول‌های سرطانی در میزان دریافت پیام‌های رشد، خودکفا می‌شوند، سلول‌ها به پیام‌های ممانعت کننده یا مرگ برنامه ریزی شده پاسخ نمی‌دهند، رگ زایی[1] را تقویت کرده و توانایی تهاجم و متاستاز می‌یابند [۹]. تقریباً ۲۰ ٪ بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال (کولون)، هنگام مراجعه به پزشک، دچار متاستاز دوردست می‌باشند. شایع ترین محل‌ها برای متاستاز به ترتیب عبارتند از: عقده‌های لنفاوی منطقه‌ای، کبد، ریه‌ها، مغز و استخوان. تقریباً در نیمی از بیماران، متاستاز در کبد اتفاق می‌افتد و به همین دلیل نسبت متاستاز در محل‌های دیگر کمیاب‌تر می‌شود [۱۳-۱۰] متاستاز اصلی ترین عامل برای مدیریت سرطان است زیرا، اکثریت مرگ ناشی از سرطان، بدلیل پخش شدن سلول‌های سرطانی در بدن است تا ایجاد تومورهای اولیه؛ در بیشتر مواقع بیماران سرطانی با تومورهای موضعی شانس بهبود بیشتری نسبت به افراد با تومورهای پخش شده در بدن دارند. اخیراً شواهد نشان داده‌اند که مراحل اولیه متاستاز یکی از حوادث اولیه ایجاد سرطان است و اینکه ۶۰ تا ۷۰ ٪ بیماران در هنگام تشخیص سرطان، مراحل اولیه متاستاز را شروع کرده‌اند. متاستاز یک فرایند چند مرحله‌ای است؛ متاستاز زمانی است که یک تومور سرطانی، گسترش یافته و سایر قسمت‌های بدن را مورد حمله قرار می‌دهد و با تغییراتی که در سطح بیان ژن‌های مختلف در آن رخ می‌دهد تمایلش به چسبندگی به ماتریکس خارج سلولی بافت هدف تهاجم، به شدت افزایش می‌یابد، در نتیجه قدرت لانه گزینی و استقرار در این بافت را پیدا می‌کند. بر همین اساس افزایش قدرت چسبندگی به ماتریکس خارج سلولی، از اولین وقایع شروع فرایند متاستاز می‌باشد [۱۴]. بنابراین بررسی هر چه بیشتر عوامل دارویی که از طرفی بتوانند جلوی رشد توده سرطانی و از طرف دیگر، جلوی اتصال آن به ماتریکس خارج سلولی بافت هدف را بگیرد، نقش بسیار مهمی در درمان بیماری مهلک سرطان دارد [۱۶, ۱۵]. مسیر WNT یکی از مسیرهای پیام رسانی از مجموعه مکانیسم‌های پیام رسانی داخل سلولی می‌باشد که عملکرد تغییر یافته اجزای استاندارد آن همراه با سرطان است، زیرا، ژن‌های هدف این مسیر، تنظیم کننده‌های تکثیر سلولی، متاستاز و قدرت چسبندگی به ماتریکس خارج سلولی هستند [۱۸, ۱۷]. اما فعالیت غیر نرمال مسیر پیام رسانی WNT (مسیر استاندارد)، اساساً از طریق جهش‌هایی در پروتئین APC و در بعضی موارد در پروتئین CTNNB1 یا AXIN، در بسیاری از سرطان‌های کولون دیده شده است. فعالیت بیش از حد این مسیر در رده‌های سلولی مختلف سرطان کولون، مانند SW480 دیده شده است، از سوی دیگر عملکرد پیام رسانی اساسی مسیر WNT ممکن است برای کامل سازی تاثیر دیگر واسطه‌های عامل رشد بیشتر و چسبندگی سلولی، در جهت پیشرفت و گسترش سرطان نیاز باشد [۱۹]. کورکومین جزء ساختاری اصلی پودر زرد چوبه است که از ساقه‌ی زیر زمینی گیاه Curcuma longa استخراج می‌شود و نقش مهمی را در سرکوب و تأخیر سرطان‌زایی ایفا می‌کند. این ماده در آب نامحلول و در حلال‌های آلی مثل اتانول، متانول و ... محلول است. از نظر عملکرد، اهداف مولکولی متنوعی را دارا می‌باشد که از جمله‌ی آن‌ها می‌توان به فاکتورهای رونویسی، فاکتورهای رشد و گیرنده‌های آن‌ها، سیتوکین‌ها، آنزیم‌ها و ژن‌های دخیل در تنظیم تکثیر سلولی و آپوپتوز اشاره کرد. از طرفی کورکومین باعث مهار بقا و تکثیر سلولی اکثر سلول‌های توموری می‌شود و مهم ترین عملکردش نقش انتخابی آن در مرگ سلول‌های سرطانی نسبت به سلول‌های نرمال می‌باشد [۲۱, ۲۰]. با این حال عدم حلالیت این ترکیب در محیط‌های آبی باعث کاهش دسترسی زیستی این ماده در محیط in vivo و in vitro شده است و بنابراین به عنوان یک فاکتور محدود کننده برای استفاده از این ترکیب به شکل یک عامل درمانی مطرح می‌شود. از این رو امروزه برای غلبه بر این مشکل و افزایش حلالیت کورکومین از ترکیبات مختلف از جمله ادجوانت‌ها ، لیپوزوم‌ها و اخیراً نانو پارتیکل‌ها استفاده می‌شود که در این میان به کارگیری نانو پارتیکل‌های دندروزومی می‌تواند باعث افزایش حلالیت کورکومین و در نتیجه افزایش خصوصیت ضد سرطانی آن در محیط in vivo و in vitro بشود [۲۲]. با توجه به اهمیت کورکومین در درمان بیماری‌های مختلف از جمله سرطان، در این مطالعه به منظور افزایش دسترس‌پذیری زیستی آن، از حاملی از جنس نانوپارتیکل‌های دندروزومی نسل ۴۵۰ ساخته شده با دانش بومی برای حمل کورکومین استفاده گردید؛ بر همین اساس در ادامه این متن، داروی ترکیبی کورکومین و حامل دندروزومی با عنوان

[1]: Angiogenesis

مجله طب انتظامی
زمستان ۱۳۹۲ - دوره۲ - شماره ۴- صفحات ۲۶۳-۲۷۲

نانوکورکومین ذکر خواهد شد [۲۳]. اخیراً مطالعات زیادی نشان داده‌اند که کورکومین فعالیت ۲ گانه مسیر (WNT در سطح تنظیم رونویسی و در سطح اتصالات سلول به سلول) مهار می‌کند [۲۵, ۲۴]. از این رو، این احتمال وجود دارد که این دارو بتواند با مهار این مسیر، جلوی قدرت رشد، چسبندگی به ماتریکس و بدخیم شدن سلول‌های سرطانی رده SW480 بگیرد؛ تاکنون آزمایشات اندکی به بررسی اثر داروی کورکومین روی میزان تمایل سلول‌های سرطانی در چسبندگی به ماتریکس خارج سلولی بافت هدف در رده‌های مختلف سلول‌های سرطانی پرداخته اند (تاکنون مطالعه‌ای در این زمینه روی رده سلولی SW480 صورت نگرفته است). در نتیجه، این مطالعه با استفاده از داروی ترکیبی کورکومین و حامل دندروزوم O-400 بومی می‌تواند نمای آشکاری از نقش داروی ترکیبی نانوکورکومین را در کاهش میزان رشد و چسبندگی سلولی در رده سلولی سرطانی SW480 نشان بدهد.

مواد و روش‌ها

کشت سلول

سلولی که در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفت رده‌ی سلولی SW480 بود که از انیستیتو پاستور ایران خریداری شد. سلول‌ها در محیط کشت RPMI1640 حاوی ۱ درصد سرم جنین گاوی و یک درصد آنتی بیوتیک پنی سیلین- استرپتومایسین و در شرایط انکوباسیون ۳۷ درجه سانتی گراد و CO_2 ۵ درصد رشد داده شدند. سلول‌ها پس از گذشت ۳ روز با استفاده از تریپسین ۰/۲۵ درصد- EDTA ۰/۰۲ درصد پاساژ داده شدند تمامی مواد کشت سلول از شرکت Gibson آمریکا خریداری شد.

آماده سازی نانوکورکومین

کورکومین مورد استفاده در این تحقیق با خلوص ۹۵ درصد از شرکت Merck (آلمان) خریداری شد. در این مطالعه از دندروزم‌های O-400 به عنوان نانو حامل‌هایی پلیمری که در آزمایشات پیشین کارایی بسیار بالایی در افزایش دسترس پذیری زیستی را نشان داده بودند، جهت افزایش حلالیت کورکومین استفاده شد [۲۶, ۲۲]. آماده سازی نانوکورکومین مطابق دستورالعمل بهینه شده‌ای که پیش از این شرح داده شده است، صورت گرفت [۲۲]. به طور خلاصه طیف غلظتی از نانوکورکومین (نسبت ۱:۵۰ تا ۱:۱۰) به منظور انتخاب نسبت مناسب از نانوکورکومین توسط اسپکتروفتومتری بررسی و در نهایت نسبت وزنی ۱:۲۵ به عنوان نسبت بهینه انتخاب شد . نانوکورکومین با غلظت ۲۷۰۰ میکرومولار تهیه و در شرایط دور از نور و ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شد. رقیق سازی دارو پیش از استفاده در هر روش با استفاده از محیط کشت کامل انجام گرفت.

آزمون سنجش MTT

برای بررسی قدرت زیستی سلول‌ها از آزمون MTT استفاده شد؛ اساس این آزمون بر احیای نمک زرد رنگ دی متیل تیازول دی فنیل تترازولیوم برماید به بلورهای نامحلول و ارغوانی رنگ فورمازون می‌باشد که توسط آنزیم‌های دهیدروژناز میتوکندریایی سلول‌های زنده صورت می‌گیرد و شدت رنگ ارغوانی تولید شده با میزان سلول‌هایی که از نظر متابولیکی فعال هستند نسبت مستقیم دارد. بر همین اساس، ابتدا رسوب سلول‌ها از فلاسک متلاقی سلول تریپسینه شده، جدا گردید و مقدار مناسب از محلول محیط کشت به آن اضافه گردید. تعداد سلول در هر میلی لیتر محیط کشت توسط لام نئوبار محاسبه گردید. سپس به چاهک‌های قاب ۹۶ خانه تعداد سلول یکسان برای هر زمان انکوباسیون مشخص اضافه شد (پیش از این مرحله مقدار محلول محیط کشت لازم به هر چاهک اضافه شده بود و همچنین تعداد سلول‌های مورد نظر برای زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بوسیله منحنی استاندارد به ترتیب ۳۵۰۰، ۶۰۰۰ و ۸۵۰۰ سلول محاسبه و به‌دست آورده شد). این عمل در سه قاب و برای زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت انجام گرفت. به هر تعداد سلول نیز سه چاهک از هر قاب اختصاص داده شد. به هر چاهک غلظت مشخصی از دارو اضافه گردید. طیف گسترده ای از غلظت‌های داروی نانوکورکومین در نظر گرفته شد: از ۰ تا ۱۵ میکرومولار، هر آزمون نیز ۳ بار تکرار گردید. قاب‌های حاوی سلول و مقدار مناسب از محیط کشت (حجم سلول + محلول محیط کشت = ۲۰۰ میکرولیتر) به انکوباتور منتقل شد. پس از گذشت زمان مورد نظر به هر چاهک ۲۰ میکرولیتر از محلول MTT اضافه گردید. پس از گذشت ۴ ساعت محیط روی سلول‌ها با دقت خالی شد و به هر چاهک ۲۰۰ میکرولیتر از DMSO[1] اضافه گردید تا رسوب نمک نامحلول فورمازان کاملاً حل شود. سپس نتایج توسط دستگاه ELISA reader به‌دست آمد. مقداری از سلول برای هر زمان انتخاب گردید که چگالی اپتیکی بین ۰/۴ تا ۰/۶ داشته باشد.

به‌دست آوردن میزان غلظت کشنده موثر حد واسط (IC50)

غلظت کشنده موثر حد واسط یا IC50 با محاسبه میزان نرخ بقای سلولی در بازه‌های غلظتی مختلف (۰ تا ۳۰ میکرومولار) و با استفاده از نرم افزار GraphPad Prism، ۵ محاسبه شد.

بررسی میزان چسبندگی سلول‌ها به ماتریکس با استفاده از آزمون Adhesion to matrix انجام شد.

[1]: Dimethyl sulfoxid

Journal of Police Medicine
Winter 2014; Vol. 2, No. 4: 263-272

برای محاسبه میزان تغییر چسبندگی نسبی سلول‌های SW480 به ماتریکس خارج سلولی، پس از رقیق نمودن فیبرونکتین و ژلاتین (۲/۵ میلی گرم بر میلی لیتر)، ۵۰ µl به هر چاهک پلیت ۹۶ خانه اضافه و یک شب در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگه داری شدند. سپس محلول رویی هر چاهک خالی و به آرامی چند بار با بافرPBS استریل شستشو داده شد تا بلورهای اضافی تشکیل شده، برداشته شود. سپس تعداد ۱۰۰۰۰ سلول اضافه شد (برای هر رقتی ۳ حفره) البته ابتدا سلول‌ها با غلظت‌های مختلف نانوکورکومین از غلظت ۰ تا ۱۵ با بازه ۳ میکرومولار در زمان ۴۸ ساعت از پیش انکوبه شده بودند و سپس تریپسینه و به چاهک‌ها اضافه شدند. قبل از افزودن سلول‌ها به حفرات پلیت، پلیت با محلول ۲٪ BSA یا آلبومین سرم گاوی به مدت ۲ ساعت انکوبه شدند تا مانع از اتصال غیر اختصاصی سلول‌ها به مکان‌های احتمالی پوشیده نشده با کلاژن شود. سلول‌ها به مدت ۶۰ دقیقه در انکوباتور انکوبه و سپس محیط رویی تخلیه و همان مراحل رنگ آمیزی که در مورد تست خراش صورت گرفت، اینجا نیز انجام شد با این تفاوت که در اینجا از رنگ کریستال ویوله به دلیل داشتن پیک جذبی در ۵۵۰ نانومتر استفاده شد. در نهایت جذب هر چاهک توسط دستگاه الایزا ریدر در طول موج ۵۵۰ نانومتر خوانده شد، این میزان جذب سلولی به عنوان شاخصی از میزان چسبندگی سلولی ارزیابی می‌شود (درصد چسبندگی به ماتریکس در تیمار فاقد نانوکورکومین یا کنترل ۱۰۰ در نطر گرفته شد) [۲۷].

آنالیز آماری داده‌ها

نتایج به‌دست آمده در این مطالعه براساس حداقل سه بار تکرار استوار است که با گرفتن میانگین و محاسبه انحراف معیار، میزان تغییرات محاسبه شد. برای آزمون مقایسه‌ای بین میانگین گروه‌ها روش ناپارامتریک wilcoxon مورد استفاده قرار گرفت.

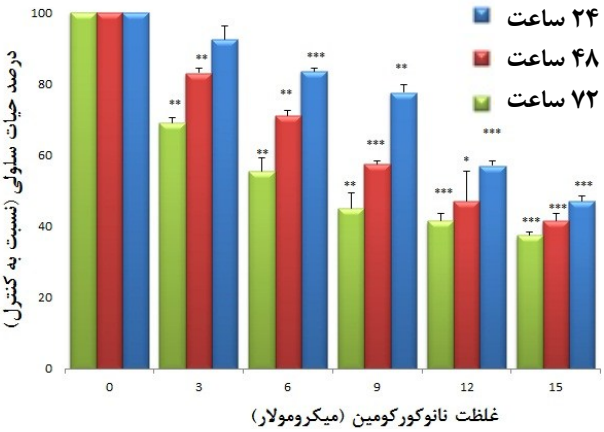
یافته‌ها

بررسی اثر نانوکورکومین بر بقای رده سلولی SW480

به منظور بررسی میزان بقای رده سلولی SW480 تحت اثر نانوکورکومین، آزمون MTT انجام گرفت. از این رو سلول‌های SW480 به تعداد مناسب (به ترتیب ۱۳۰۰۰، ۸۰۰۰ و ۳۵۰۰ سلول) برای انجام این تست در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت کشت داده شدند. سپس سلول‌ها به صورت تکرارهای سه‌گانه تحت تیمار با طیفی از غلظت‌های نانوکورکومین از ۱۵-۰ میکرومولار قرار گرفتند. پس از خواندن جذب نهایی توسط دستگاه الایزا ریدر، جذب نمونه کنترل منفی (فاقد تیمار دارویی یا غلظت ۰ نانوکورکومین) طبق فرمول ارائه شده در قسمت مواد و روش‌ها، ۱۰۰٪ در نظر گرفته شده و سایر نمونه‌ها نسبت به آن سنجیده شدند. همانطور که در شکل ۱ نشان داده شد تیمار سلول‌های SW480 با غلظت‌های ۳، ۶، ۹، ۱۲ و ۱۵ میکرومولار از نانوکورکومین به ترتیب باعث کاهش بقای سلولی به میزان ۷/۵، ۱۶/۵، ۲۷/۵، ۴۳ و ۵۳ درصد نسبت به کنترل شد؛ میزان بقای سلولی در غلظت‌های ۳، ۶ و ۹ میکرومولار تغییر آن چنان معناداری نسبت به کنترل نداشتند در حالی که در غلظت‌های ۱۲ و ۱۵ میکرومولار تغییر میزان بقای سلولی کاملا مشهود بود. لذا این نتیجه حاصل شد که غلظت‌های ۰ تا ۹ میکرومولار از نانوکورکومین سمیت زیادی روی سلول‌ها ندارند.

بررسی اثر نانوکورکومین بر میزان غلظت حدواسط کشنده (IC50) رده سلولی SW480

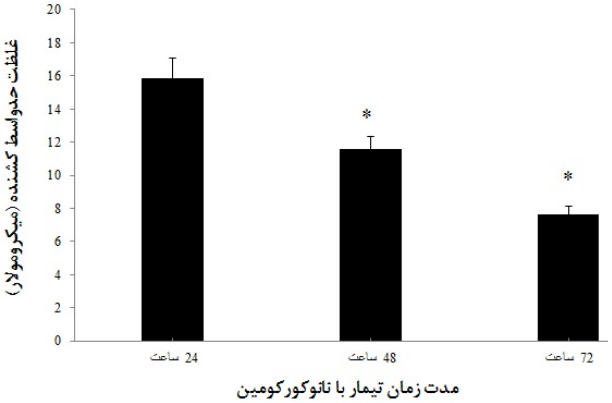
برای محاسبه غلظت موثر ۵۰ درصد یا حد واسط، از غلظت‌های بالاتر نانوکورکومین استفاده شد (۰-۳۰ میکرومولار)، پس از گذشت زمان‌های مورد نظر ، همانطور که در شکل ۲ می‌بینید غلظتی از نانوکورکومین که تنها ۵۰ ٪ سلول‌ها در مجاورت آن قابلیت زیستن و بقا داشتند (IC50)، در زمان‌های ۲۴ ، ۴۸ و ۷۲ ساعت به ترتیب ۱۵/۸۶، ۱۱/۵۷ و ۷/۶۴ میکرومولار به‌دست آورده شد. نتایج به‌دست آمده از این آزمایش نشان داد که نانوکورکومین به شیوه‌ای وابسته به زمان و غلظت به صورت معناداری بر سلول‌های SW480 تأثیر



شکل ۱: تاثیر نانوکورکومین بر بقای سلول‌های SW480 در زمان‌های ۲۴ ، ۴۸ و ۷۲ ساعت

منحنی حاصل نشان دهنده اثر بازدارندگی نانوکورکومین بر حیات سلول‌ها به صورت تابعی از غلظت و زمان می‌باشد. داده‌های حاصل از این آزمون نشان داد که نانوکورکومین به شیوه‌ای وابسته به زمان و غلظت به صورت معناداری بر سلول‌های SW480 تأثیر می‌گذارد، بطوری که با افزایش مدت زمان تیمار با نانوکورکومین و نیز بالا رفتن غلظت مورد استفاده از این ترکیب، میزان رشد و بقای سلول‌های SW480 بطور چشم‌گیری کاهش می‌یابد. هر یک از نقاط، میانگین نتایج حاصل از ۳ آزمون مستقل می‌باشد. * نشان دهنده معنادار بودن در سطح معناداری (P<۰/۰۵)، ** (P<۰/۰۵) و *** (P<۰/۰۰۱) می‌باشد.

مجله طب انتظامی
زمستان ۱۳۹۲ – دوره۲ – شماره ۴- صفحات ۲۶۳-۲۷۲



شکل ۲: نمودار مقادیر غلظت حدواسط کشنده یا IC50 در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت

منحنی حاصل نشان دهنده اثر بازدارندگی و کاهشی نانوکورکومین بر میزان غلظت حد واسط کشنده سلول‌ها به صورت تابعی از زمان می‌باشد. غلظتی از نانوکورکومین که تنها ۵۰ ٪ سلول‌ها در مجاورت آن قابلیت زیستن و بقا داشتند (IC50)، در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به ترتیب ۱۵/۸۶، ۱۱/۵۷ و ۷/۶۴ میکرومولار به‌دست آورده شد. نتایج به‌دست آمده از این آزمایش نشان داد که نانوکورکومین به شیوه‌ای وابسته به زمان به صورت معناداری بر سلول‌های SW480 تأثیر می‌گذارد، بطوری که با افزایش مدت زمان تیمار با نانوکورکومین غلظت حد واسط کشنده مورد استفاده از این ترکیب بطور چشم‌گیری کاهش می‌یابد. هر یک از نقاط، میانگین نتایج حاصل از ۳ آزمون مستقل می باشد. * نشان دهنده معنادار بودن در سطح معناداری (P<۰/۰۵)، ** (P<۰/۰۵) و *** (P<۰/۰۰۱) می‌باشد.

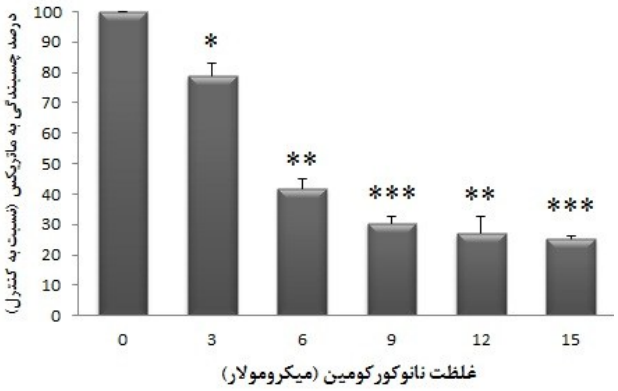
می‌گذارد، به طوری که با افزایش مدت زمان تیمار با نانوکورکومین و نیز بالا رفتن غلظت مورد استفاده از این ترکیب، میزان رشد و بقای سلول‌های SW480 به طور چشم‌گیری کاهش می‌یابد.

اثر مهاری نانوکورکومین بر چسبندگی به ماتریکس خارج سلولی سلول‌های SW480

سلول‌های رده SW480 دارای قدرت تهاجمی بالایی در جهت هجوم به بافت‌های مختلف می‌باشند در نتیجه در این آزمون، جهت فراهم سازی حداقل‌های لازم برای شبیه سازی تهاجم سلولی، از فیبرونکتین به عنوان یکی از اصلی ترین اعضای ماتریکس خارج سلولی بافت‌ها، به همراه ژلاتین (مخلوطی از دیگر کربوهیدرات‌ها و پروتئین‌های غشا) استفاده شد. نتایج به‌دست آمده از این آزمون اثر مهاری نانوکورکومین بر قابلیت چسبندگی سلول‌های SW480 به فیبرونکتین و ژلاتین را به صورت وابسته به غلظت تأیید کرد. همانطور که در شکل ۳ و ۴ مشاهده می‌کنید بعد از تیمار سلول‌ها با غلظت‌های مختلف نانوکورکومین از غلظت‌های بالای حد واسط تا زیر حد واسط برای ارزیابی کامل اثرات داروی نانوکورکومین روی چسبندگی سلولی (۰ تا ۱۵ میکرومولار) به مدت ۴۸ ساعت، و زمان انکوباسیون ۱ ساعت، نانوکورکومین میزان چسبندگی سلول‌های تیمار شده را نسبت به سلول‌های تیمار نشده (کنترل منفی) به صورت معناداری کاهش داد. اعداد ارائه شده از درصد جذب نوری سلول‌ها در طول موج ۵۵۰ نانومتر در نمونه‌های آزمون به میزان جذب سلول‌ها در نمونه کنترل منفی به‌دست آمده است به صورتی که درصد چسبندگی نمونه کنترل منفی ۱۰۰ در نظر گرفته شده است.

بحث و نتیجه‌گیری

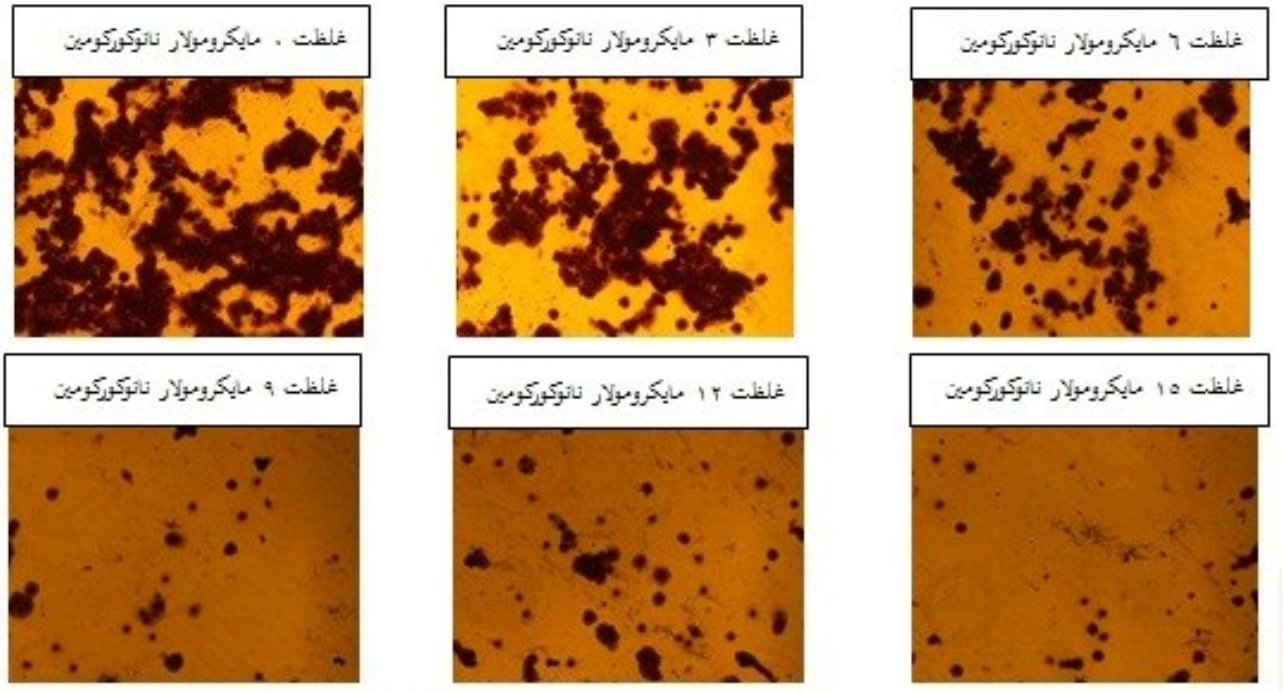
با توجه به شیوع بسیار بالای سرطان و مرگ ناشی از این بیماری، اهمیت پرداختن به پژوهش‌های مرتبط با داروها از جمله ترکیبات موثر در پیشگیری، درمان و جلوگیری از عود و بازگشت سرطان کاملا واضح و آشکار می‌باشد. سالانه ۵۰۰۰ مورد جدید سرطان در ایران تشخیص داده می شود که سرطان‌های گوارشی تعداد قابل توجهی از این آمار را تشکیل می دهند. سرطان روده بزرگ، پس از سرطان معده و مری، سومین سرطان شایع گوارشی در ایران می‌باشد. همچنین تقریباً ۲۰٪ بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال (کولون)، هنگام مراجعه دچار متاستاز دوردست می‌باشند. شایع ترین محل‌ها برای متاستاز به ترتیب عبارت از عقده‌های لنفاوی منطقه‌ای، کبد، ریه‌ها، مغز و استخوان می باشند [۱۰-۱۳]. متاستاز زمانی است که یک تومور سرطانی، گسترش یافته و سایر قسمت‌های بدن را مورد حمله قرار می‌دهد و با تغییراتی که در سطح بیان ژن‌های



شکل۳: نمودار نتایج آزمون چسبندگی سلولی برای بررسی میزان چسبندگی به سطح سلول‌ها در رده سلولی SW480 در حالت تیمار با نانوکورکومین و بدون نانوکورکومین

با تیمار نانوکورکومین در غلظت‌های ۳، ۶، ۹، ۱۲ و ۱۵ میکرومولار میزان چسبندگی سلول‌های تحت تیمار، نسبت به کنترل به ترتیب ۳۰، ۵۹، ۶۹، ۷۱ و ۷۳ درصد کاهش پیدا کردند. هر یک از نقاط، میانگین نتایج حاصل از ۳ آزمون مستقل می باشد. * نشان دهنده معنادار بودن در سطح معناداری (P<۰/۰۵)، ** (P<۰/۰۵) و *** (P<۰/۰۰۱) می‌باشد.

Journal of Police Medicine
Winter 2014; Vol. 2, No. 4: 263-272



شکل۴: تصویر شماتیک نتایج آزمون چسبندگی سلولی برای بررسی میزان چسبندگی سلول‌ها به ماتریکس خارج سلولی در رده سلولی SW480 در حالت تیمار با نانوکورکومین و بدون نانوکورکومین

این تصویر نمایی از سلول‌های چسبیده درون یک چاهک پلیت ۶ چاهکه را بعد از ۴۸ ساعت پیش تیمار با نانوکورکومین در غلظت‌های مختلف (۰ تا ۱۵ مایکرومولار) و ا ساعت انکوباسیون درون چاهک‌های پوشیده شده از فیبرونکتین و ژلاتین را نشان می‌دهد؛ بدلیل اینکه هر چه تعداد سلول‌های همچنان چسبیده بیشتر باشد میزان چسبندگی به سطح نیز بیشتر است در تصویر به وضوح کاهش میزان چسبندگی به سطح با تیمار نانوکورکومین مشهود است. (در تصویر از رنگ آمیزی کریستال ویوله برای رنگ آمیزی سلول‌ها استفاده شده است)

مختلف در آن رخ می‌دهد تمایلش به چسبندگی به ماتریکس خارج سلولی بافت هدف تهاجم، به شدت افزایش می‌یابد در نتیجه قدرت لانه گزینی و استقرار در این بافت را پیدا می‌کند و این در حالی است که افزایش قدرت چسبندگی به ماتریکس خارج سلولی از اولین وقایع شروع فرایند متاستاز، می‌باشد [۱۴]. علی‌رغم پیشرفت شگرف دانش بشری در زمینه بیولوژی سرطان، در میزان شیوع و مرگ ناشی از آن که اغلب ناشی از تشخیص دیر هنگام و بدخیم شدن توده سرطانی است تغییر چندانی حاصل نشده است. اکثر داروهای در دسترس جهت درمان سرطان، به علت تک هدفه بودن این داروها، سمیت زیاد، هزینه بسیار بالا، عدم اطمینان از عود دوباره توده سرطانی و عدم مهار رشد و چسبندگی سلولی، کارایی چندانی ندارند. با توجه به مطالب ذکر شده به نظر می‌رسد برای درمان کاراتر بیماران مبتلا به سرطان‌های بدخیم که اکثریت مبتلایان به سرطان را تشکیل می‌دهند توجه ویژه به داروهای مهار کننده فرایند رشد، پیشرفت و چسبندگی سلولی، امری غیر قابل چشم پوشی باشد. از طرفی کشفیات جدید به این نتیجه رسیده‌اند که به احتمال فراوان زیر مجموعه‌ای خاص از سلول‌ها در داخل توده توموری قابلیت رشد، زنده ماندن، چسندگی سلولی و تهاجم به دوردست را دارا می‌باشند؛ نکته جالب توجه این است که به نظر می‌رسد این زیرمجموعه خاص همان سلول‌های بنیادین سرطانی باشند که قبلا تصور بر این بود که فقط در شروع و عود و بازگشت دوباره سرطان دخیل هستند [۲۹, ۲۸]؛ کشف این حقیقت که اغلب سلول‌های مسئول فرایند رشد، چسبندگی به ماتریکس خارج سلولی و عود سرطان یکسان هستند و به تبع آن مکانیسم عملکردی آن‌ها در این ۲ فرایند نیز مشابهت زیادی دارد (از جمله فعال شدن فرایند انتقال از اپی تلیال به مزانشیمال و بیش فعال شدن مسیر پیام رسانی WNT) این فرضیه را تداعی می‌کند که، رشد بیش از حد و تمایل بالای اتصالی به ماتریکس خارج سلولی سلول‌های سرطانی یکی از اولین مراحل برای شروع خطر بازگشت و عود سرطان است و از طرفی هر عامل دارویی که می‌تواند مسیر پیام رسانی WNT که عامل اصلی این فرایند است را مهار کند (مثل کورکومین) به صورت خودکار علاوه بر مهار چسبندگی به ماتریکس خارج سلولی، جلوی بازگشت و عود سرطان را نیز می‌گیرد [۲۹, ۲۸]. و از سوی دیگر یکی از دلایل اصلی عدم کارایی اکثر داروها، راهکارهای درمانی تک

مجله طب انتظامی
زمستان ۱۳۹۲ - دوره۲ - شماره ۴- صفحات ۲۶۳-۲۷۲

هدفه آن‌ها (مثل فعال کردن فرایند آپوپتوز) در هدف گیری مرگ سلولی است به عنوان نمونه، ثابت شده است راه‌های مرگ سلولی مثل آپوپتوز، خود می‌تواند به عنوان شروعی دوباره برای بازگشت، عود سرطان و چسبنده تر شدن سلول‌های سرطانی مجاور سلول‌های آپوپتوتیک محسوب شود (فرایند Phoenix Rising)؛ در این فرایند با تیمار دارویی، فرایند آپوپتوز، القا شده و موجب فعال شدن کاسپاز ۳ در سلول‌های آپوپتوتیک می‌شود و بوسیله آنزیم عمل کاسپاز ۳، پروستاگلاندین E2 فعال شده و با ترشح به محیط پیرامون، باعث بیش فعال شدن مسیر پیام رسانی WNT و به تبع آن بیان بیش از حد ژن‌های هدف این مسیر می‌شود که نتیجه آن رشد و تکثیر و چسبنده تر شدن دوباره توده سلولی سرطانی تحت تیمار با داروهای فعال کننده آپوپتوز در توده‌های سرطانی می‌باشد [۳۰]، در نتیجه به نظر می‌رسد، داروهایی تک هدفه که برای مهار سرطان به کار می‌روند و اغلب مکانیسم ضد سرطانی خود را با فعال کردن مسیر آپوپتوز در سلول‌ها موجب می‌شوند؛ بدلیل افزایش خطر تهاجمی و چسبنده تر کردن سلول‌ها و احتمال عود سرطان (که به نظر می‌رسد هر دو نتیجه، ناشی از فعال کردن بیش از حد مسیر WNT می‌باشد) کارایی چندانی نداشته باشند و از طرفی هر عامل دارویی که می‌تواند مسیر پیام رسانی WNT که یکی از عوامل اصلی چسبندگی به ماتریکس خارج سلولی و رشد سلولی است را، مهار کند (مثل کورکومین) می‌تواند اثر افزایش تکثیر و چسبندگی سلولی ناشی از آپوپتوز را با مهار این مسیر خنثی کند [۲۸, ۲۵, ۲۴]. معایب اکثر داروهای موجود، باعث شده است که محققین جهت درمان موثر سرطان به داروها و ترکیبات چند هدفه- ای توجه نمایند که اثرات جانبی حداقلی داشته باشند. کشف این موضوع که نانوکورکومین مسیر پیام رسانی WNT را مسدود میکند این فرضیه را مطرح نموده که این دارو احتمالاً قابلیت جلوگیری از چسبندگی سلولی و جلوگیری از عمل پروستاگلاندین E2 را از طریق این مسیر دارد. از این رو ضرورت بررسی بیشتر اثرات جلوگیری کننده از رشد و چسبندگی سلولی این داروی گیاهی بیش از بیش احساس می‌شود؛ بنابراین در این مطالعه، با بررسی و اثبات اثرات مهاری نانوکورکومین بر میزان رشد و چسبندگی سلولی رده سلولی سرطانی SW480، کارایی این داروی گیاهی چند هدفه بر مهار رشد، تهاجمی شدن و بازگشت سرطان بیشتر از گذشته آشکار شد.

در طی این تحقیق ثابت شد که داروی گیاهی چند هدفه سوار شده بر حاملی از نانو پارتیکل از جنس دندروزوم O-400 ساخته شده با دانش بومی، قابلیت مهار رشد، چسبندگی به ماتریکس خارج سلولی، تهاجم و عود سلول‌های سرطانی را دارا می‌باشد بنابراین می‌توان امیدوار بود که این نانوکورکومین بومی (که در آزمایشات پیشین کارایی بسیار بالایی در افزایش زیست دسترس پذیری کورکومین از خود نشان داده است) به عنوان یک عامل درمانی موثر و همچنین یک عامل پیشگیری کننده‌ی سرطان در آینده به‌کار رود.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از همکاری موثر رئیس محترم بهداری کل ناجا جناب آقای دکتر علی مجیدی و رئیس محترم مرکز تحقیقات کاربردی بهداری کل ناجا سرکار خانم ساره صمدی و همکارانشان بابت تمامی تلاش‌ها و کمک‌هایشان در حین انجام این پروژه، کمال تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

1. Kolligs F, Bommer G, Göke B. Wnt/beta-catenin/tcf signaling: a critical pathway in gastrointestinal tumorigenesis. Digestion 2002; 66:131-44.
2. Giovannucci E. body weight, and colorectal cancer: a summary of the epidemiologic evidence. J Womens Health (Larchmt) 2003; 12:173-82.
3. Mohamed O, Dufort D, Clarke H. Expression and Estradiol Regulation of Wnt Genes in the Mouse Blastocyst Identify a Candidate Pathway for Embryo-Maternal Signaling at Implantation. Biol Reprod 2004; 71:417-24.
4. Sadjadi A, Nouraie M, Mohagheghi M, Mousavi-Jarrahi A, Malekezadeh R, Parkin D. Cancer occurrence in Iran in 2002, an international perspective. Asian Pac J Cancer Prev 2005; 6:359-63.
5. Sodeifi N, Sotoudeh M, Shafieyan S. Immunohistochemical and Tissue Array Study for Comparison of the Expression of Tumor Suppressor Genes and with Intercellular Adhesive Molecules in Colorectal Adenocarcinoma and Nontumoral Colon. Yakhteh 2006; 8:178-83.
6. Yi H, Nakamura R, Mohamed O, Dufort D, Hackam A. Characterization of Wnt signaling during photoreceptor degeneration. Invest Ophthalmol Vis Sci 2007; 48:5733-41.
7. Alberts B, Johnson A. Molecular biology of the cell. 5th edition. New York. Garland Science 2008.
8. Baselga J, Norton L. Focus on breast cancer. Cancer Cell 2002; 1:319-22.
9. Fehm T, Müller V, Alix-Panabières C, Pantel K. Micrometastatic spread in breast cancer: detection, molecular characterization and clinical relevance. Breast Cancer Res 2008; 10 Suppl 1:S1.
10. Kanthan R, Loewy J, Kanthan S. Skeletal metastases in colorectal carcinomas: a Saskatchewan profile. Dis Colon Rectum 1999; 42: 1592-97.
11. Sheen A, Drake D, Langton S, Sherlock D. Unusual bony colorectal metastases in post-

Journal of Police Medicine

Winter 2014; Vol. 2, No. 4: 263-272

hepatometastasectomy patients. Hepatobiliary Pancreat Surg 2002; 9: 379-82.

12.Sundermeyer M, Meropol N, Rogatko A, Wang H, Cohen S. Changing patterns of bone and brain metastases in patients with colorectal cancer. Clin Colorectal Cancer 2005; 5: 108-13.

13.Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Thun M. Cancer statistics. CA Cancer J Clin 2007; 57: 43-66.

14.Morgan-Parkes J. Metastases: mechanisms, pathways, and cascades. American Journal of Roentgenology 1995; 164: 1075-82.

15.Liotta L, Stetler-Stevenson W. Principles of Molecular Cell Biology of Cancer. Cancer Metastasis 1993; 4.

16.Al-Mehdi A, Tozawa K, Fisher A, Shientag L, Lee A, Muschel R. Intravascular origin of metastasis from the proliferation of endothelium-attached tumor cells: a new model for metastasis. Nat Med 2000; 6: 100-102

17.Clevers H. Wnt/β-catenin signaling in development and disease. Cell 2006; 127: 469-80.

18.Waltzer L, Bienz M. Drosophila CBP represses the transcription factor TCF to antagonize Wingless signalling. Nature 1998; 395: 521-25.

19.Zhou A, Diao L, Xu H, Xiao Z, Li J, Zhou H, Qu L. beta-Catenin/LEF1 transactivates the microRNA-371-373 cluster that modulates the Wnt/beta-catenin -signaling pathway. Oncogene 2012; 31: 2968-78.

20.Das T, Sa G, Saha B, Das K. Multifocal signal modulation therapy of cancer: ancient weapon, modern targets. Mol Cell Biochem 2010; 336: 85-95.

21.Ravindran J, Prasad S, Aggarwal B. Curcumin and Cancer Cells: How Many Ways Can Curry Kill Tumor Cells Selectively? American Association of Pharmaceutical Scientists 2009; 11: 495-510.

22.Babaei E, Sadeghizadeh M, Hassan ZM, Feizi MAH, Najafi F, Hashemi SM. Dendrosomal curcumin significantly suppresses cancer cell proliferation in vitro and in vivo. International Immunopharmacology 2012; 12: 226-34

23.Paleos C. Formation of artificial multicompartment vesosome and dendrosome as prospected drug and gene delivery carriers. J Control Release 2013; 170: 141-52.

24.Jaiswal A, Marlow B, Gupta N, Narayan S. β-catenin-mediated transactivation and cell–cell adhesion pathways are important in curcumin (diferuylmethane)-induced growth arrest and apoptosis in colon cancer cells. Oncogene 2002; 21: 8414-27.

25.Park C, Hahm E, Park S, Kim H, Yang C. The inhibitory mechanism of curcumin and its derivative against b-catenin/Tcf signaling. FEBS letters 2005; 579: 2965–71.

26.Mirgani MT, 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. International journal of nanomedicine 2014; 9:403-17.

27.Ohashi Ya, Tsuchiya Ya, Koizumi Ka, Sakurai Ha, Saiki I. Prevention of Intrahepatic Metastasis by Curcumin in an Orthotopic Implantation Model. oncology 2003; 6: 250-58

28.Brabletz T, Jung A, Spaderna S, Hlubek F, Kirchner T. Opinion: migrating cancer stem cells—an integrated concept of malignant tumour progression. Nat Rev Cancer 2005; 5:744–49.

29.Hong Y, Jichao Q, Dean GT. Cancer Stem Cells: Potential Mediators of Therapeutic Resistance and Novel Targets of Anti-cancer Treatments. Pharmaceutical Perspectives of Cancer Therapeutics 2009.

30.Qian H, Fang L, Xinjian L. Caspase 3-mediated stimulation of tumor cell repopulation during cancer radiotherapy. Nat Med 2012; 17:860–66.

مجله طب انتظامی
زمستان ۱۳۹۲ - دوره۲ - شماره ۴- صفحات ۲۶۳-۲۷۲