Journal of Police Medicine
Winter 2013; Vol. 1, No. 3: 200-207
Original Article

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 Panahi[1]
Ruhollah Nakhaei Sistani[2]
Majid Sadeghizadeh[*1]

[1]*Department of Genetics, Faculty of Biologic Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran*
[2]*Department 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

مجله طب انتظامی
زمستان ۱۳۹۱ – شماره ۱ – مسلسل ۳– صفحات ۲۰۰-۲۰۷
مقاله تحقیقی

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

تاریخ دریافت: ۱۸ آذر ۱۳۹۱ **تاریخ اصلاح:** ۲۵ آذر ۱۳۹۱ **تاریخ پذیرش:** ۵ دی ۱۳۹۱

چکیده

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 آپوپتوز، 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 آپوپتوز 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 آپوپتوز 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 آپوپتوز 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 آپوپتوزی گردد بسیار پایین است. از آنجا که مطالعات برروی 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 واژه‌ها: نانوکورکومین پلیمری، آپوپتوز، سرطان معده، غلظت دارو

علیرضا پناهی[۱]
روح الله نخعی سیستانی[۲]
مجید صادقی زاده[۱*]

[۱]دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم زیستی، گروه ژنتیک، تهران
[۲]دانشگاه کاشان، دانشکده شیمی، گروه بیوتکنولوژی سلولی، کاشان – ایران

[*]نویسنده مسئول:
استاد دانشگاه تربیت مدرس
پست الکترونیک: sadeghma@modares.ac.ir

مقدمه

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 آپوپتوز به وجود آمده و باعث تولید توده های سلولی توموری می شود که از قوانین تکاملی حاکم بر ماهیت پرسلولی 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 آپوپتوز و متاستاز بیماری سرطان را ایجاد می کنند [۱ ،۲]. با توجه به طبیعت پیچیده بیماری سرطان راهکارهای مختلفی برای درمان آن در نظر گرفته می شود برای مثال جراحی، رادیودرمانی، شیمی درمانی،ژن درمانی، ایمنی درمانی، [۲, ۳] ونیز استفاده از فناوری نانو و غیره میباشد.

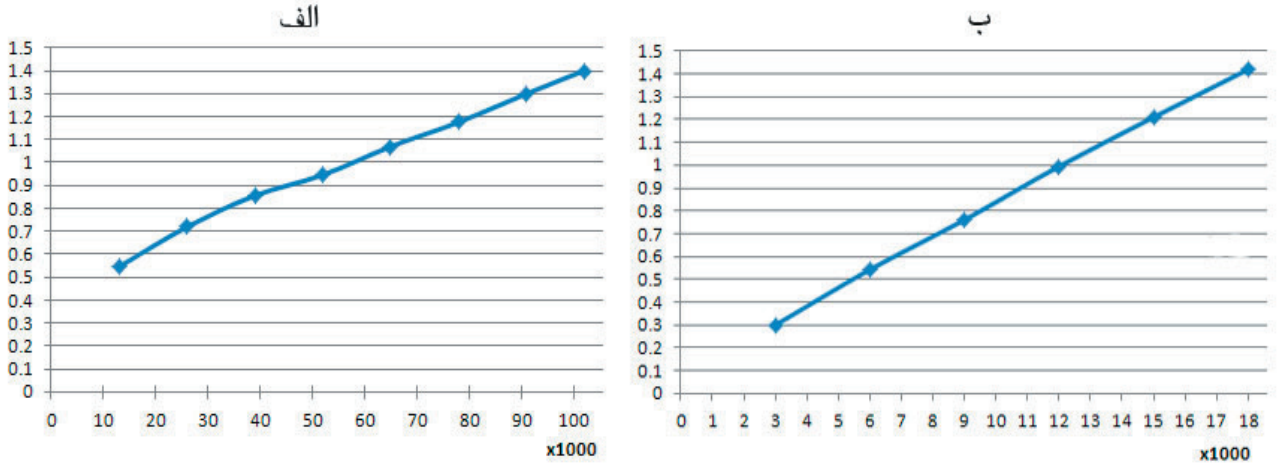
کورکومین ترکیب پلی فنلی است [۴] که در گیاه زردچوبه وجود دارد [۵]. کورکومین با نام علمی Diferuloylmethane و فرمول شیمیایی $C_{21}H_{20}O_6$ می باشد که خاصیت ضدسرطانی، ضد تکثیر سلولی، ضد التهاب، ضد جهش زایی، ضد رگزایی و آنتی اکسیدانی دارد [۱۲–۶]. کورکومین می تواند در سرطان هایی نظیر کولون [۱۳]، سینه، کبد [۱۴] و لوکمی [۱۵] و ... آپوپتوز را القا کند. القا آپوپتوز 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

Journal of Police Medicine
Winter 2013; Vol. 1, No. 3: 200-207

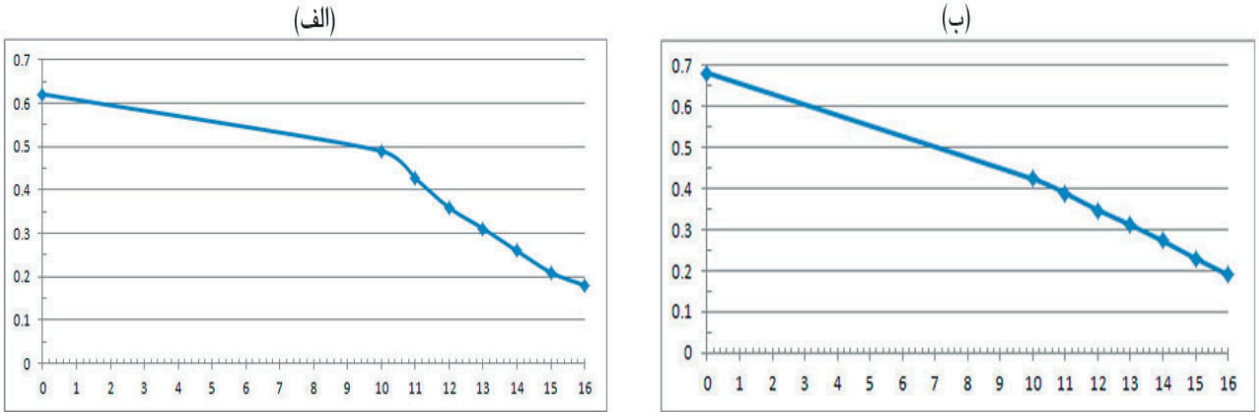
فاز II تحقیقات بالینی برای درمان انواع مختلفی از سرطان ها است [۱۷, ۱۸].
بررسی هایی که در سه دهه اخیر در زمینه قدرت جذب، توزیع، متابولیسم و دفع کورکومین صورت گرفته است، حاکی از جذب ضعیف و متابولیسم سریع این ترکیب دارویی و در نتیجه محدودیت استفاده از آن به دلیل زیست ماندگاری ضعیف کورکومین می باشد. مطالعات 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، اخیرا 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 انسا نی 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]. هرساله حدود ۵۰۰۰۰ نفر جان خود را بر اثر سرطان معده از دست می هند[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 هلیکوباکترپیلوری آلوده هستند احتمال ابتلا به سرطان در آنها افزایش می یابد. از مهمترین فاکتورهای خطر برای سرطان معده در ایران عفونت هلیکوباکترپیلوری 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 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 ۱۳μM 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 RPMIو HamsF۱۲ (Gibco, Germany) به همراه ٪۱۰ سرم جنین گاو (FBS)(Gibco,Germany) و ۱۰۰U/ml از پنی سیلین G و ۱۰mg/ml استرپتومایسین (Gipco, Germany) رشد داده شدند. سلول ها در معرض ٪۵ دی اکسید کربن و ٪۹۵ هوای مرطوب و در دمای ۳۷C° در فلاسک های۲۵میلی لیتری یا پلیت های ۹۶ چاهکی کشت داده شدند.
بررسی قابلیت بقاء و رشد سلولی: ابتدا جهت تعین 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 ۲۰μl از محلول ٪۰/۵ (۴) -۳ (۳-(۴,۵-دی متیل تیازول-۲-ئیل) ۲و۵ دی فنیل تترازولیوم بروماید(MTT) در PBS اضافه شد. رنگ نامحلول در آب فرمازان توسط DMSO (چاهک/۲۰۰μl) حل شد و سپس شدت رنگ ایجاد شده توسط دستگاه الایزاریدر (ELISA reader(BioTek, 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 الایزاریدر 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



شکل ۱: نمودار منحنی استاندارد. الف ۲۴ ساعت و ب ۴۸ ساعت، محور عمودی جذب نوری و محورافقی 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 ۲۴و 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.

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.

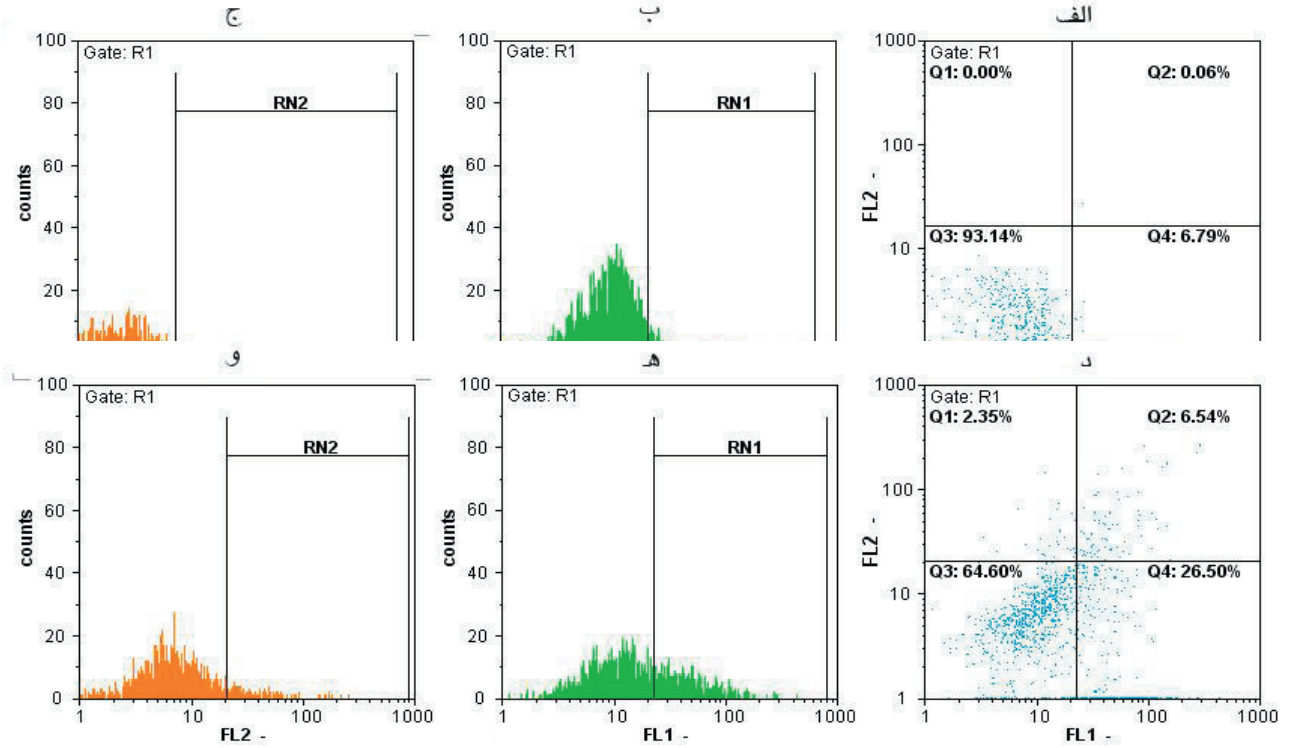
بررسی آپوپتوز با استفاده از آزمون Annexin V/FITC: سنجش آپوپتوز با استفاده از کیت Annexin-V-Fluos Staining (Roche, Germany) مطابق دستور العمل کیت انجام گرفت. داده ها با استفاده از نرم افزار FlowMax بررسی شد.

نتایج

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

Journal of Police Medicine
Winter 2013; Vol. 1, No. 3: 200-207



شکل ۳: تاثیر آپوپتوزی نانوکورکومین پلیمری بر سلول های AGS. جهت آزمون انکسین سلولها در معرض غلظت IC۵۰ 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 (Q۴) و ثانویه (Q۲)، نکروزی (Q۱) و سالم (Q۳) 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.

و بر حسب میزان جذب نور نشان می دهند. غلظت IC۵۰ برای زمان های ۲۴ و ۴۸ ساعت به ترتیب ۱۳و ۱۲ میکرومولار تعیین شد.

بررسی Annexin V/FITC : بررسی آزمون انکسین نشان داد که اولا نوع مرگی که نانوکورکومین پلیمری القا می نماید از نوع آپوپتوز است و ثانیا این غلظت دارو میتواند باعث القاء ۲۰درصد 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 [۲۸-۲۷]. 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 ... جهت انتقال مؤثرتر آن استفاده شده است [۳۱-۲۹].

در این مطالعه دندروزوم که یک ترکیب کروی فرادندانه دار است و همچنین پایداری بالایی داشته ، عدم سمیت و زیست تخریب پذیر میباشد [۳۴-۳۲]. 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

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.

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

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 Priyadarsini 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 Immunopharmaco 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)