مقایسه تأثیرات کورکومین و نانوکورکومین بر بیان ژن فاکتور رشد اندوتلیال عروق (*VEGF-A*) در رده سلولی هلا

رضوانه واحدیان صادقی[۱]، مسعود پارسانیا[۲*]، مجید صادقی زاده[۳]، ستاره حقیقت[٤]، سیده سحر مرتضوی فارسانی[٥]

۱- دانشجوی دکترای تخصصی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم و فناوری های نوین، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲- دانشیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده پزشکی، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

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

٤- دانشیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم و فناوری های نوین، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۵- دکترای ژنتیک مولکولی، گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

*** تهران، کدپستی ۱۹۳٦۸۹۳۸۱۳**

mparsania@iautmu.ac.ir

دریافت: ۱٤۰۰/۰۸/٤ پذیرش: ۱٤۰۰/۰۹/۰۷

چکیده

سرطان دهانه رحم، چهارمین سرطان شایع در بین زنان است. در سال‌های گذشته توجه به محصولات طبیعی مانند کورکومین با پتانسیل ضدسرطانی به‌عنوان مکمل درمانی افزایش پیدا کرده است. با این حال به دلیل حلالیت ضعیف، استفاده بالینی از این ترکیب‌ها محدود است. در این راستا، در پژوهش حاضر با هدف بهبود پارامترهای بالینی، آثار نانوکورکومین در ممانعت از فعالیت آنژیوژنز سرطان دهانه رحم بررسی و با کورکومین آزاد مقایسه شد.

مواد و روش‌ها: روش MTT برای ارزیابی تکثیر رده سلولی هلا، با کورکومین آزاد و نانوکورکومین در دوزها و فاصله‌های زمانی مختلف استفاده شد. میزان آپوپتوز نیز به‌وسیله فلوسیتومتری ارزیابی شد. سپس، بیان ژن فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (*VEGF-A*) در سلول‌های هلا به‌وسیله Real-Time PCR و وسترن بلات اندازه‌گیری شدند.

یافته‌ها: با توجه به IC50 در مدت ٤۸ ساعت در رده سلولی هلا که برای نانوکورکومین و کورکومین آزاد ۱۵μM/ml و ۵۰μM/ml بود، ترکیب نانوکورکومین اثرکشندگی بیشتری نشان داد. بیان ژن فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (p <0.0001) و میزان پروتئین(p <0.01) به‌دنبال تیمار با نانو کورکومین به‌طور بسیار چشمگیری کمتر از کورکومین آزاد بود.

نتیجه: نانوحامل باعث افزایش حلالیت و تأثیر بیشتر مهار تکثیر سلول‌های سرطانی دهانه رحم هلا شده و در ممانعت از فعالیت آنژیوژنز در غلظت یکسان، سه‌برابر مؤثرتر از کورکومین بود. بنابراین، نانوکورکومین می‌تواند گزینه خوبی برای مکمل دارویی در کنار درمان‌های رایج سرطان دهانه رحم باشد.

کلیدواژگان سرطان دهانه رحم، نانوکورکومین، سلول هلا، فاکتور رشد اندوتلیال عروقی.

۱- مقدمه

سرطان دهانه رحم[1]، چهارمین نوع شایع سرطان زنان در سراسر جهان است و به‌ویژه در کشورهای در حال توسعه که غربال‌گری زنان از نظر بالینی به اندازه کافی انجام نمی‌شود، از اهمیت زیادی برخوردار است [۱]. انواع ویروس سرطان‌زا پاپیلوما انسانی[2] (HPV) مانند HPV16 و HPV18 سلول‌های اپیتلیال را هدف قرار می‌دهند و تقریباً مسئول همه موارد سرطان دهانه رحم هستند. البته عوامل دیگر از جمله ژنتیک و عوامل محیطی نیز نقش بسیار مهمی در ایجاد و پیشرفت سرطان دهانه رحم دارند [۲].

همان‌طور که در بسیاری از منابع گزارش شده است مراحل رشد، تهاجم و متاستاز در بسیاری از سرطان‌ها به روند رگ‌زایی[3] بستگی دارد و توده‌های تومور به تشکیل عروق جدید نیاز دارند. درنتیجه رگ‌زایی سلول‌های سرطانی در دریافت پیام‌های رشد خودکفا می‌شوند و همچنین به پیام‌های مهاری یا مرگ برنامه‌ریزی[4] شده پاسخ نمی‌دهند. در این بین، رگ‌زایی تقویت‌شده و سلول‌ها توانایی حمله و متاستاز را نیز به‌دست می‌آورند. سازوکارهای مولکولی مؤثر در فرایندهای رگ‌زایی تومور هنوز به‌خوبی شناخته نشده است، اما به نظر می‌رسد که تغییرات در تعادل بین محرک‌های رگ‌زایی و عوامل ضد رگ‌زایی با گذشت زمان منجر به تغییر در این فرایند در تومور می‌شود. تاکنون چندین فاکتور تحریک‌کننده و مهارکننده رگ‌زایی شناسایی و تعیین توالی شده است [۳؛ ٤]. بررسی‌ها نشان داده است که بیان ژن فاکتور رشد اندوتلیال عروقی[5] *VEGF-A* با افزایش تراکم رگ‌های کوچک[6] (MVD) و پیشرفت تومورهای جامد، از جمله سرطان دهانه رحم همراه است [۵؛ ٦]. علاوه بر این، شواهد نشان می‌دهد که آنکوپروتئین‌های HPV با افزایش بیان *VEGF-A* در دهانه رحم باعث ایجاد رگ زایی و درنتیجه تومورزایی می‌شوند [۷؛ ۸]. پروتئین کدشونده به‌وسیله ژن *VEGF-A*، یک گلیکوپروتئین دایمر است و به‌عنوان یک عامل اصلی رشد عروقی در نظر گرفته می‌شود. این پروتئین در بزرگسالان در زمان ترمیم زخم ضروری است و در بروز بیماری‌های رگ‌های خونی مانند درگیری کلیوی در بیماران دیابتی[7]، تخریب ماکولای وابسته به سن[8] و نیز رگ‌زایی تومور نقش دارند.

کورکومین[9] (CUR) یک ترکیب پلی‌فنول طبیعی است که از ریزوم گیاه دارویی *Curcuma longa Linn* مشتق شده است. این ترکیب به دلیل اثربخشی در برابر التهاب، بیماری‌های تنفسی و سایر اختلال‌ها، در طب سنتی هند بسیار استفاده شده است [۹؛ ۱۰]. خواص ضدالتهابی و ضدسرطانی کورکومین به‌طور گسترده در زمینه درمان سرطان مطالعه شده و آثار پیشگیری‌کننده و درمانی را در آزمایش‌های بالینی وابسته به دوز نشان داده است [۱۱؛ ۱۲]. اثر کورکومین در برابر رگ‌زایی در درجه اول در تومورها، هم در شرایط آزمایشگاهی[10] و هم در داخل بدن[11] نشان داده شده است. مشخص شده است که

1 Cervical cancer
2 Human papilloma virus
3 Angiogenesis
4 Apoptosis
5 Vascular endothelial growth factor
6 Micro vessel density
7. Diabetic retinopathy
8. Age-related macular degeneration
9. Curcumin
10. *In vitro*
11. *In vivo*

کورکومین می‌تواند *VEGF* را در الگوهای آزمایشگاهی سرکوب کند [۱۳]. با این حال، ماندگاری کم، انحلال‌پذیری کم، فارماکوکینتیک ضعیف، جذب ضعیف و دفع سریع کورکومین را نمی‌توان نادیده گرفت [۱٤-۱٦]. فناوری نانو، یک روش مؤثر برای رساندن دارو به تومورهای سرطانی فراهم کرده است [۱۷]. بررسی‌ها نشان داده است که حامل‌های میسل و کمپلکس‌های فسفولیپید قادر به افزایش جذب روده‌ای این دارو هستند. درنتیجه باعث افزایش سطح پلاسمای دارو می‌شوند و میزان حذف آن را کاهش می‌دهند [۱۸].

هدف از انجام این مطالعه، ارزیابی اثر ضد سرطانی نانوکورکومین بر تکثیر سلول‌های سرطانی دهانه رحم در پاسخ به تغییرات ژن مربوط به فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (*VEGF-A*) است. در این مطالعه، از حامل‌های OA400برای ارزیابی توانایی نانوحامل‌ها در افزایش حلالیت در آب و فراهمی زیستی کورکومین استفاده شد. هدف از این مطالعه پیاده‌سازی این فرمولاسیون نانوکورکومین برای دستیابی به آثار ضد سرطانی مؤثرتر بر سرطان دهانه رحم بود.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱ آماده‌سازی نانوکورکومین

روش تهیه نانوکورکومین در مطالعه‌های قبلی بیان شده است [۱۹؛۲۰]. به‌طور خلاصه، نانوحامل OA400 زمان واکنش استریفیکاسیون[1] بین اولئیل کلراید[2] (خریداری‌شده از شرکت سیگما آلدریچ[3]) و پلی‌اتیلن گلیکول ٤٠٠[4] (شرکت مرک[5]) و همراه با تری‌اتیل آمین[6] (شرکت مرک) و کلروفرم[7] (شرکت مرک) به‌عنوان حلال در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد ساخته شد. به‌منظور تهیه نانوکورکومین، غلظت‌های مناسب کورکومین (خریداری‌شده از شرکت سیگما آلدریچ) و نانوحامل (1:25 w/w) با یکدیگر مخلوط شدند.

۲-۲ کشت سلول

رده سلول‌های سرطانی دهانه رحم انسان (سل لاین هلا)[8] و سلول‌های طبیعی فیبروبلاست[9] از انستیتو پاستور ایران خریداری شد. محیط رشد DMEM شامل ۱۰ درصد (v:v)سرم گاوی جنین[10] (FBS) و ۱ درصد (v: v) پنی‌سیلین[11] و استرپتومایسین[12] (خریداری‌شده از شرکت گیبکو بیوکولت[13]، پایسلی[14]، اسکاتلند[15]،یوکی[16]) برای کشت سلول‌های هلا و فیبروبلاست استفاده شد. شرایط انکوباسیون شامل ۵ درصد CO2 و دمای ۳۷ درجه سانتیگراد بود. تعداد و میزان زنده ماندن سلول‌ها به‌ترتیب توسط هموسیتومتر[17] و رنگ آمیزی تریپان بلو[18] مشخص شد. این سلول‌ها از راه trypsin/EDTA (خریداری‌شده از شرکت بیوسرا[19]،فرنس[20]) پاساژ داده شدند.

۲-۳ آزمون MTT

آثار نانوکورکومین، کورکومین و OA400 در زنده‌ماندن سلول‌های فیبروبلاست و هلا از راه روش MTT[21]سنجش شد.به طور خلاصه، نخست سلول‌ها با استفاده از تریپان بلو رنگ‌آمیزی‌شده و تعداد آنها به‌وسیله هموسیتومتر اندازه‌گیری شد. تقریباً 10^4 سلول در هر چاه

1 Esterification
2 Oleoyl chloride
3SigmaAldrich
4 Polyethylene glycol 400
5 Merck
6 Triethylamine
7 Chloroform

8 HeLa cell line
9 Fibroblast
10 Fetal bovine serum
11 Penicillin
12 Streptomycin
13 GibcoBioCult
14 Paisley
15 Scotland
16 UK
17. Hemocytometer
18 Trypan blue
19 Biosera
20 Franc
21 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide

از پلیت ۹٦ چاهک کشت داده شد. پس از انکوباسیون به مدت ۲٤ ساعت، تک‌لایه‌های سلولی تشکیل شد. سپس با نانوکورکومین (μM ۱۰ تا μM ٤۰)، کورکومین (μM ۱۰ تا μM ۷۰) و OA400 (μM ۱۰ تا μM ۱٦۰) به مدت ٤۸ ساعت تیمار انجام شد. با توجه به اینکه سلول‌های سرطانی در مقایسه با سلول‌های طبیعی نسبت به کورکومین حساسیت بیشتری دارند [۱۷]، سلول‌های فیبروبلاست با غلظت‌های 10 μM تا 160 μM از این ترکیب تحت درمان قرار گرفتند. بعد از مدت ٤۸ ساعت برای تیمار، محیط هر چاهک با محلول حاوی MTT با غلظت $0/5\ mg\ ml^{-1}$ (خریداری‌شده از شرکت سیگما آلدریچ) جایگزین شد و به مدت ٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد در CO2 با غلظت ۵ درصد انکوبه شد. فرمازان با استفاده از ۲۰۰ میکرولیتر DMSO[1] (خریداری‌شده از شرکت سیگما آلدریچ) حل شد و چگالی نوری[2] (OD) نمون ها در ٥٤۰ نانومتر به‌وسیله پلیت ریدر (بیوتک[3]) اندازه‌گیری شد. درصد بقای سلول با نسبت جذب سلول‌های تیمارشده به سلول‌های کنترل به دست آمد. غلظتی که در آن ۵۰ درصد از سلول‌ها از بین رفت، به‌عنوان غلظت بازدارنده[4] (IC50) در نظر گرفته شد.

۲-٤ آنالیز مرگ برنامه‌ریزی‌شده و نکروز سلولی از راه فلوسیتومتری

در روش آپوپتوز، سلول‌های هلا و فیبروبلاست با توجه به مقدار IC50 با کورکومین (۵۰μM) و نانوکورکومین (۱۵μM) به مدت ٤۸ ساعت تحت تیمار قرار گرفتند. براساس دستور کارخانه سازنده (ترموفیشر[5]، ایبیوساینس[6])، سلول‌ها با کیت تشخیص آپوپتوز با انکسین آغشته شدند. سطح مرگ برنامه‌ریزی‌شده و نکروز سلول‌ها از راه فلوسیتومتری (فکس کالیبر[7]) تشخیص داده شد. اطلاعات پس از آن به‌وسیله نرم‌افزار (تری استار نسخه ۱۰[8]) بررسی شدند.

۲-۵ استخراج RNA، سنتز cDNA و RT-PCR

RNA کل از سلول‌های هلا و فیبروبلاست تحت تیمار و تیمارنشده با کورکومین و نانوکورکومین، با استفاده از معرف TRIzol (Cat.no: 15596-026) اینویتروژن[9]) استخراج شد. مراحل استخراج براساس شیوه‌نامه‌های کیت فاورژن بیوتک[10] انجام شد. بررسی اسپکتروفتومتری UV نشان داد که RNAهای استخراج‌شده واجد شرایط بودند. RNA با استفاده از کیت سنتز cDNA (شرکت فاورژن بیوتک) و با توجه به دستورکار آن، رونویسی معکوس شد. برای اطمینان از آلودگی‌نداشتن RNA به DNA، تیمار به‌وسیله آنزیم DNaseIانجام شد. اندازه‌گیری کمی بیان ژن *VEGF-A* براساس روش کمی مقایسه‌ای، به‌وسیله RT-PCR در سیستم تشخیص توالی یک مرحله ABI[11] انجام شد. در این روش، SYBR® Premix Ex Taq™ II) ; Cat.RR82LR ژاپن ، تاکارای[12]) با توجه به دستورکار آن استفاده و از ژن *GAPDH* به‌عنوان یک کنترل داخلی استفاده شد. توالی‌های آغازگرهای ژن هدف که (غلظت آن‌ها در واکنش ppm ۱۰ بود) در جدول ۱ نشان داده شده است. برای محاسبه بیان نسبی ژن‌ها از روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ استفاده شد. تفسیر نتایج با استفاده از نرم‌افزار گرف پد پریزم[13](نسخه ۷) انجام شد.

1 Dimethyl sulfoxide
2 Optical density
3 BioTek
4. Half-maximal inhibitory concentration
5 Thermo Fisher
6 Ebioscience
7 FACS Calibur
8 version10, Treestar
9 Invitrogen
10 Favorgen Biotech
11 Applied Bio- systems, CA, USA
12 TAKARA, Japan
13 GraphPad Prism

جدول ۱ توالی پرایمرهای استفاده‌شده در فرایند **Real time PCR**

Gene	Forward primer	Reverse primer
VEGFA	5′-TGAGGAGTCCAACATCACCATG-3′	5′- CAAGGCCCACAGGGATTTT-3′
GAPDH	5′- CCGAGCCACATCGCACAG-3′	5′-GGCAACAATATCCACTTTACCAG-3′

۲-٦ آنالیز وسترن بلات

سطح پروتئین *GAPDH* و *VEGF-A* در سلول‌های هلا تیمارشده با کورکومین، نانوکورکومین و گروه کنترل بعد از ٤٨ ساعت از طریق وسترن بلات تعیین شد. به‌منظور استخراج پروتئین، سلول‌ها در بافر RIPA (Cat No: 9803، سل سیگنالینگ تکنولوژی[1]) لیز شدند. این بافر حاوی Tris-HCl با غلظت ۲۰ میلی‌مولار و pH 7.5، NaCl با غلظت ۱۵۰ میلی‌مولار، EGTA با غلظت ۱ میلی‌مولار، NP-40 یک درصد و سدیم دئوکسی کولات یک درصد است. مقدار پروتئین استخراج‌شده به‌وسیله رنگ‌آمیزی بردفورد[2] و فلوسیتومتری تعیین شد. مقدار مساوی از نمونه‌های پروتئین (٤٠ میکروگرم) به مدت ٥ دقیقه در دمای ۹۰ درجه سانتیگراد قرار گرفته و به SDS-PAGE و سپس به غشای فیلتر PVDF[3] منتقل شد. غشاهای مسدودشده به‌وسیله BSA[4] با توجه به شیوه ساخت، با آنتی‌بادی اولیه ویژه برای پروتئین‌های *GAPDH* و *VEGF-A* (آنتی‌بادی‌های منوکلونال موش، تهیه‌شده از مؤسسه رویان ایران) در دمای ٤ درجه سانتیگراد انکوبه شدند. آنتی‌بادی ثانویه کونژوگه پراکسیداز (آنتی‌بادی ثانویه HRP Rabbit Anti-Mouse (IgG) خریداری‌شده از شرکت ابکم[5]) برای اتصال به آنتی‌بادی‌های اصلی با غلظت ۱: ۱۰۰۰ (نسبت حجم محلول به حلال) براساس دستور کار آن استفاده شد. باندهای پروتئینی با روش شیمی لومینسانس[6] (ECL) (شرکت بیومدیکال[7]) شناسایی شدند. کنترل داخلی این آزمایش پروتئین *GAPDH* بود. این پروتئین به‌وسیله آنتی‌بادی اولیه *GAPDH* موش (۱: ۱۰۰۰، خریداری‌شده از شرکت ابکم) و آنتی‌بادی ثانویه کونژوگه HRC ضد موشی (۱: ۱۰۰۰، خریدرای‌شده از شرکت سانتاکروز[8]) شناسایی شد. نتایج وسترن بلات از راه نرم‌افزار ایمیج جی[9] (SCR_003070) بررسی شدند و آنالیز نتایج به‌وسیله گرف پد پریزم (نسخه ۷) انجام شد.

۳- تجزیه و تحلیل آماری

از آزمون t -test برای بررسی میزان اختلاف بین دو گروه استفاده شد. تجزیه‌وتحلیل آماری به‌وسیله نرم‌افزار گرف پد پریزم (نسخه ۷) انجام شد. سطح معناداری آزمون نیز با مقادیر $P\text{-value} < 0.05$ مشخص شد.

٤- نتایج

٤-۱ اثر کورکومین و نانوکورکومین بر زنده‌ماندن سلول‌های هلا و فیبروبلاست

زنده‌ماندن سلول‌های هلا و فیبروبلاست تحت تیمار با نانوکورکومین، کورکومین خالص و نانوحامل در غلظت‌های مختلف با استفاده از روش MTT به مدت ٤٨ ساعت ارزیابی شد. نتایج MTT حاصل از تیمارهای نانوکورکومین، کورکومین و نانوحامل با غلظت‌های مختلف در بقای رده سلولی هلا نشان داد که درصد سلول‌های زنده به‌طور چشمگیری بعد از ٤٨ ساعت تغییر کرده است. مقدار IC50 نانوکورکومین برای رده سلولی هلا در ٤٨ ساعت حدود ۱۵ μM بود. این اثر مهاری رشد

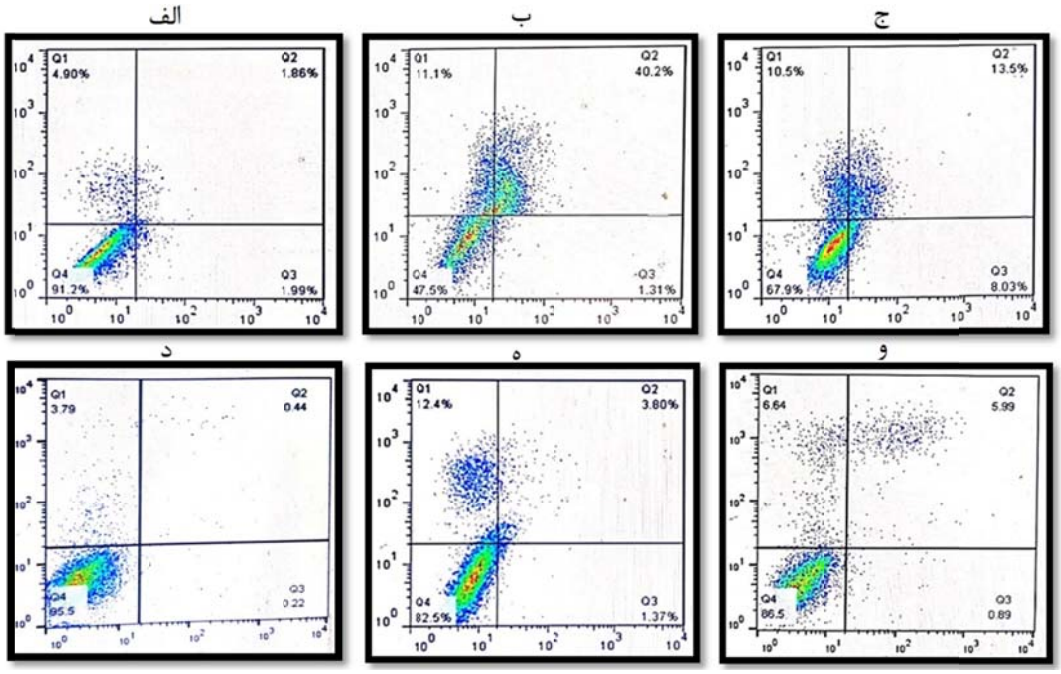
1 Cell Signaling Technology
2 Bradford
3 Polyvinylidene fluoride
4 Bovine serum albumin
5Abcam
6 Chemiluminescence
7 Biomedical
8 Santa Cruz
9 Image j

نانوکورکومین بسیار بیشتر از کورکومین است. مقدار IC50برای سلول‌های هلا تحت درمان با کورکومین به مدت ٤٨ ساعت به حدود ٥٠ µM بود. همچنین نتایج این آنالیز نشان داد که نانوحامل OA400 هیچ اثر مهاری بر رشد سلول هلا نداشت. در این آزمایش، سلول‌ها با نانوحامل تا غلظت ١٦٠ µM تحت تیمار قرار گرفتند، اما در هیچ‌یک از غلظت‌ها بقای سلول به ٥٠ درصد نرسید. نانوکورکومین در غلظت‌های بسیار بالا (١٦٠µM) زنده‌ماندن سلول‌های فیبروبلاست را تقریباً تا ٥٠ درصد کاهش داد. کورکومین و نانوحامل نتوانستند قابلیت زنده‌ماندن سلول‌ها را به‌طور معناداری حتی در غلظت‌های بالاتر از ١٠٠ µM کاهش دهند.

٤-٢ اثر کورکومین و نانوکورکومین در القای مرگ برنامه‌ریزی‌شده در سلول‌های سرطانی هلا

رنگ‌آمیزی انکسین- پروپیدیوم یدید[1] و فلوسیتومتری برای ارزیابی اثر نانوکورکومین و کورکومین بر مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلول‌های هلا و فیبروبلاست انجام شد. نتایج فلوسیتومتری نشان داد ٤١,٥١ درصد سلول‌های هلا که به‌وسیله ١٥µM نانوکورکومین تحت تیمار قرار گرفتند، علایم مرگ برنامه‌ریزی‌شده را نشان دادند. کورکومین آزاد با غلظت بالاتر (٥٠µM) توانست باعث بروز مرگ برنامه‌ریزی‌شده در٢١,٥٣ درصد از سلول‌های هلا شود. بنابراین، نانوکورکومین بسیار مؤثرتر از کورکومین عمل کرد. آزمون مرگ برنامه‌ریزی‌شده برای سلول‌های فیبروبلاست نشان داد که نانوکورکومین (١٥µM) و کورکومین (٥٠µM) تأثیر مهمی بر مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلولی این سلول‌های طبیعی نداشتند (شکل ١).

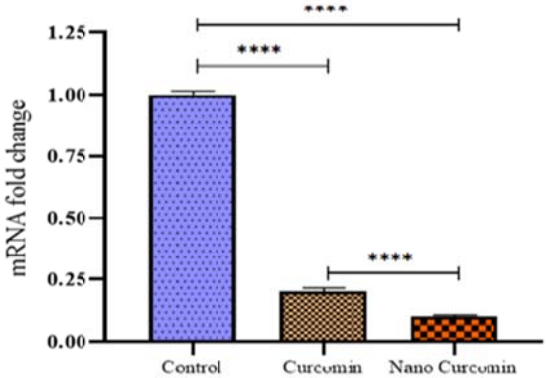
1 Annexin V-PI



شکل ۱ نتایج فلوسیتومتری به‌دست‌آمده از آزمون انکسین برای ارزیابی آپوپتوز سلولی: نتایج فلوسیتومتری برای الف- نمونه کنترل سلول هلا، ب- غلظت ۱۵ μM نانوکورکومین در سلول‌های هلا، ج- غلظت ۵۰ μM کورکومین در سلول‌های هلا، د- نمونه کنترل سلول‌های فیبروبلاست، ه- غلظت ۱۵ μM نانوکورکومین در سلول‌های فیبروبلاست، و) غلظت 50μm کورکومین در سلول‌های فیبروبلاست

٤-۳ اثر تنظیم نانوکورکومین بر بیان mRNA ی *VEGF-A*

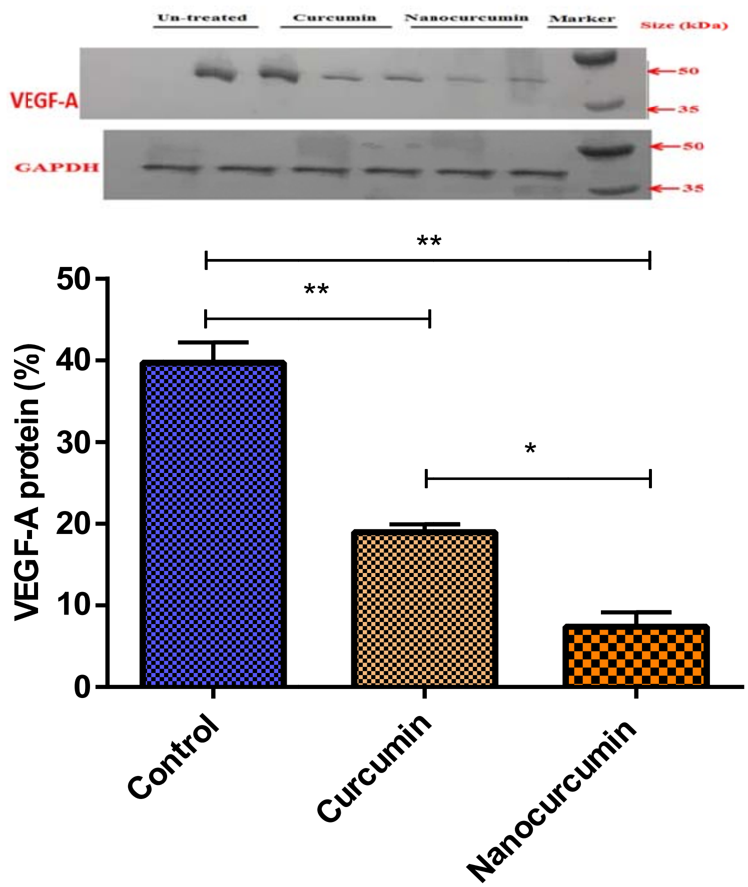
بیان ژن *VEGF-A* در سلول‌های هلا اندازه‌گیری شد. براساس نتایج، در سلول‌های هلا، بیان ژن *VEGF-A* پس از ٤٨ ساعت درمان با کورکومین و نانوکورکومین کاهش پیدا کرد ($p<0.0001$****) (شکل ۲). تغییر بیان این ژن در شرایط تیمار با نانوکورکومین بیشتر بود. این یافته‌ها اثر تنظیم مثبت نانوکورکومین نسبت به مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلول‌های سرطانی را نشان می‌دهد. بنابراین، نانوکورکومین سلول‌های فیبروبلاست طبیعی را به فرایند مرگ برنامه‌ریزی شده نمی‌رساند. این نتیجه با یافته‌های MTTو آزمایش‌های مرگ برنامه‌ریزی‌شده سازگار است.



شکل ۲ بیان ژن *VEGF-A* پس از ٤٨ ساعت درمان با کورکومین و نانوکورکومین در سلول‌های سرطانی هلا. با توجه به نمودار، بیان این ژن پس از ٤٨ ساعت درمان با نانوکورکومین بیشتر از کورکومین کاهش پیدا کرد ($p < 0.0001$).

٤-٤ اثر کورکومین و نانوکورکومین بر میزان پـروتئین *VEGF-A*

بیان پروتئین *VEGF-A* از روش وسترن بلات بررسی شد. نتایج نشـان داد کـه سـطح پـروتئین*VEGF-A* پـس از ٤٨ ســاعت در ســلول‌هــای ســرطانی تحــت درمــان بــا نانوکورکومین بیشتر ازکورکومین کاهش پیدا کرد(p=0.01 * و p=0.004-0.08**) (شکل ۳). همچنین باندهای مربـوط به پـروتئین *GAPDH* تفـاوت معنـاداری نداشـت. نتـایج وسترن بلات، یافته‌های روش RT-PCR را تأیید کرد.



شکل۳ نتایج وسترن بلات برای پروتئین *VEGF-A* در سلول‌های هلا تحت درمان با نانوکورکومین و کورکومین: درمان با نانوکورکومین توانست بیان پروتئین *VEGF-A* را بیش از کورکومین کاهش دهد. داده‌ها به‌وسیله نرم‌افزار ایمیج جی کمی شد و میزان تغییرات پروتئین نیز تعیین شد (*p =0.01 ،** p =0.004-0.008).

۵- بحث

سرطان دهانه رحم، یـک سـرطان شـایع در زنـان اسـت. بسیاری از انواع عفونت ویـروس HPV مانـند HPV16 و HPV18تقریباً در همه موارد، در ابتلا به بیمـاری سـرطان دهانه رحم نقش دارند. با توجه به شـیوع بـالای سـرطان دهانه رحم و نیز مقاومـت دارویـی و سـمیت سیسـتمیک بـرای شـیمی‌درمـانی و پرتودرمـانی معمـولی، شناسـایی ترکیب‌های طبیعـی ضدسـرطان ایمـن، مـؤثر و شـیمیایی پیشگیرانه ضروری است [۲۱]. در این مطالعه، آثار تنظـیم مثبـت داروی نـانوکورکومین بـر بیـان ژن*VEGF-A* در

سلول‌های هلا (سرطان دهانه رحم) انسان تعیین شد. نتایج حاصل از این بررسی نشان داد که نانوکورکومین می‌تواند باعث افزایش مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلولی و کاهش دوام سلول‌های هلا شود.

یافته‌های این مطالعه مبنی بر تأثیر کورکومین و نانوکورکومین بر افزایش مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلولی و کاهش بیان ژن محرک رگ‌زایی هم‌راستا با یافته‌های گذشته و تأییدکننده اثر مثبت این ترکیب به‌عنوان مکمل دارویی در درمان سلول‌های سرطانی است، به‌طوری‌که در مطالعه‌های قبل نشان داده شده است، کورکومین می‌تواند با مهار *VEGF* و *VEGFR2* و نیز با کاهش فاکتور پروانژیوژنز *VEGF* باعث مهار رگ‌زایی شود [۲۲؛ ۲۳]. بنابراین، انتظار می‌رود همان‌طور که پژوهش‌های گذشته نشان داده‌اند، آنالوگ‌های کورکومین EF31 و UBS109 باعث کاهش *VEGF* در سرطان لوزالمعده شده‌اند، ترکیب‌های حاوی کورکومین شامل لیپوزوم‌های کورکومین و نانوذرات کورکومین نیز با مهار *VEGF* ، اثر ضد رگ‌زایی و ضد توموری را نشان دهند [۲٤؛ ۲۵]. مطالعه‌های قبلی، نانوکورکومین شامل کورکومین و نانوحامل OA400 را تولید کرده و خواص ضدسرطانی آن را در سرطان‌های مختلف بررسی کرده است [۲٦–۲۸]. به نظر می‌رسد این نانوذره (که در مطالعه حاضر نیز استفاده شده است) محدودیت‌های کورکومین را برطرف کرده باشد و جذب سریع‌تر آن نیز احتمالاً به دلیل افزایش نفوذپذیری غشای سلول به‌وسیله این نانوحامل باشد [۱۹؛ ۲۹].

در این مطالعه، آثار کورکومین و نانوکورکومین بر زنده‌ماندن و مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلول‌های هلا نشان داد که نانوکورکومین بسیار مؤثرتر از کورکومین است. این یافته در مطالعه‌های قبلی برای سایر سلول‌های سرطانی نیز به اثبات رسیده است [۲۰] و ممکن است به این دلیل باشد که نانوکورکومین از نظر سلولی، قابلیت زیست‌پذیری بیشتری از کورکومین دارد. از طرف دیگر، تأثیرنداشتن نانوکورکومین بر سلول‌های فیبروبلاست‌ها تأییدکننده اثر غیرسمی این نانوحامل و ایمنی‌بودن آن باشد (شکل ۱). همچنین این یافته تأیید می‌کند که مرگ برنامه‌ریزی‌شده به‌واسطه اثر کورکومین و نه نانوحامل اتفاق افتاده است.

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که روند مرگ برنامه‌ریزی‌شده در سلول‌های سرطانی هلا (که به‌واسطه نانوکورکومین القا شد) وابسته به دوز بود. هم‌راستا با این نتیجه، توانایی نانوکورکومین دیگری برای القا آپوپتوز سلول‌های سرطانی و تمایزنیافته از نظر زمان و وابسته به دوز تشخیص داده شد [۳۰].

همچنین این مطالعه نشان داد که نانوکورکومین تأثیر بسیار چشمگیری روی سلول‌های طبیعی فیبروبلاست نداشته است. زنده‌ماندن تقریباً ۵۰ درصد از سلول فیبروبلاست در غلظت‌های بسیار بالا (۱٦۰µM) که درحقیقت غلظت عملکردی نیستند، تأیید می‌کند که نانوکورکومین در غلظت موردمطالعه برای سلول‌های طبیعی بی‌خطر است. هم‌راستا با این یافته، مطالعه‌های گذشته نیز نشان داده‌اند که کاهش گلوتاتیون داخل سلول در سلول‌های سرطانی به‌وسیله بوتیونین سولفوکسامین[1] باعث افزایش سطح گونه‌های فعال اکسیژن[2] (ROS) می‌شود و این سلول‌ها را نسبت به کورکومین حساس‌تر می‌کند [۳۱].

در مطالعه حاضر نانوکورکومین با غلظت کمتر (15 µM) عملکردی بود. پژوهشگران در مطالعه دیگری نشان دادند که کورکومین در غلظت‌های بالاتر از ٤۰ میکرومولار باعث مرگ برنامه‌ریزی‌شده در سلول‌های سرطانی هلا می‌شود [۳۲]. یافته‌های ما تأیید می‌کند که نانوکورکومین به‌طور مؤثرتری کار می‌کند و جذب سلولی بیشتری نسبت به کورکومین دارد. بنابراین این ساختار نانوکورکومین پتانسیل بسیار چشمگیری برای استفاده

1. Butyonin sulfoximine
2. Reactive oxygen species

به‌عنوان داروی مکمل جهت درمان دهانه رحم دارد. بهبود عملکرد ضدتکثیری کورکومین (که در مطالعه‌های مختلف درباره سلول‌های مختلف سرطانی گزارش شده است) می‌تواند با استفاده از نانوحامل رخ دهد [۳۳].

٦- منابع

[۱] Zur Hausen, H., *Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application.* Nature reviews cancer, 2002. **2**(5): p. 342-350.

[۲] Bosch, F.X., et al., *The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer.* Journal of clinical pathology, 2002. **55**(4): p. 244-265.

[۳] Creuzet, S., et al., *Negative effect of Hox gene expression on the development of the neural crest-derived facial skeleton.* 2002.

[٤] Mackenzie, F. and C. Ruhrberg, *Diverse roles for VEGF-A in the nervous system.* Development, 2012. **139**(8): p. 1371-1380.

[٥] Guidi, A.J., et al., *Vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) expression and angiogenesis in cervical neoplasia.* JNCI: Journal of the National Cancer Institute, 1995. **87**(16): p. 1237-1245.

[٦] Lee, I.-J., et al., *Prognostic value of vascular endothelial growth factor in Stage IB carcinoma of the uterine cervix.* International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics, 2002. **54**(3): p. 768-779.

[۷] Toussaint-Smith, E., D.B. Donner, and A. Roman, *Expression of human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins in primary foreskin keratinocytes is sufficient to alter the expression of angiogenic factors.* Oncogene, 2004. **23**(17): p. 2988-2995.

[۸] Chen, W., et al., *Human papillomavirus causes an angiogenic switch in keratinocytes which is sufficient to alter endothelial cell behavior.* Virology, 2007. **367**(1): p. 168-174.

[۹] Rahman, I., S.K. Biswas, and P.A. Kirkham, *Regulation of inflammation and redox signaling by dietary polyphenols.* Biochemical pharmacology, 2006. **72**(11): p. 1439-1452.

[۱۰] Tirkey, N., et al., *Curcumin, a diferuloylmethane, attenuates cyclosporine-induced renal dysfunction and oxidative stress in rat kidneys.* BMC pharmacology, 2005. **5**(1): p. 1-10.

[۱۱] Deeb, D., et al., *Chemosensitization of hormone-refractory prostate cancer cells by curcumin to TRAIL-induced apoptosis.* Journal of experimental therapeutics & oncology, 2005. **5**(2.(

[۱۲] Tønnesen, H.H. and J. Karlsen, *Studies on curcumin and curcuminoids.* Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung, 1985. **180**(5): p. 402-404.

[۱۳] Wang, T.-y. and J.-x. Chen, *Effects of curcumin on vessel formation insight into the pro- and antiangiogenesis of curcumin.* Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2019. **2019**.

[۱٤] Anand, P., et al., *Bioavailability of curcumin: problems and promises.* Molecular pharmaceutics, 2007. **4**(6): p. 807-818.

[۱٥] Shehzad, A., F. Wahid, and Y.S. Lee, *Curcumin in cancer chemoprevention: molecular targets, pharmacokinetics, bioavailability, and clinical trials.* Archiv der Pharmazie, 2010. **343**(9): p. 489-499.

[۱٦] Shehzad, A., et al., *Curcumin therapeutic promises and bioavailability in colorectal cancer.* Drugs of today, 2010. **46**(7): p. 523.

[۱۷] Shaikh, J., et al., *Nanoparticle encapsulation improves oral bioavailability of curcumin by at least 9-fold when compared to curcumin administered with piperine as absorption*

Molecular cancer therapeutics, 2007. **6**(4): p. 1276-1282.

[۲٦] Alizadeh, A.M., et al., *Chemoprevention of azoxymethane-initiated colon cancer in rat by using a novel polymeric nanocarrier–curcumin.* European journal of pharmacology, 2012. **689**(1-3 :(p. 226-232.

[۲۷] Montazeri, M., et al., *Dendrosomal curcumin nanoformulation modulate apoptosis-related genes and protein expression in hepatocarcinoma cell lines.* International journal of pharmaceutics, 2016. **509**(1-2): p. 244-254.

[۲۸] Babaei, E., et al ,*Dendrosomal curcumin significantly suppresses cancer cell proliferation in vitro and in vivo.* International immunopharmacology, 2012. **12**(1): p. 226-234.

[۲۹] Sadeghzadeh, H., et al., *The effects of nanoencapsulated curcumin-Fe3O4 on proliferation and hTERT gene expression in lung cancer cells.* Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents), 2017. **17**(10): p. 1363-1373.

[۳۰] Zaman, M.S., et al., *Curcumin nanoformulation for cervical cancer treatment.* Scientific reports, 2016. **6**(1): p. 1-14.

[۳۱] Syng-Ai, C., A.L. Kumari, and A. Khar, *Effect of curcumin on normal and tumor cells: role of glutathione and bcl-2.* Molecular cancer therapeutics, 2004. **3**(9): p. 1101-1108.

[۳۲] Flowers, L.C., et al., *Curcumin suppresses growth of cervical cancer cells*. 2005, AACR.

[۳۳] Ravindran, J., S. Prasad, and B.B. Aggarwal, *Curcumin and cancer cells: how many ways can curry kill tumor cells selectively?* The AAPS journal, 2009. **11**(3): p. 495-510.

enhancer. European journal of pharmaceutical sciences, 2009. **37**(3-4): p. 223-230.

[۱۸] Bisht, S., et al., *Polymeric nanoparticle-encapsulated curcumin (" nanocurcumin"): a novel strategy for human cancer therapy.* Journal of nanobiotechnology, 2007. **5**(1): p. 1-18.

[۱۹] Farsani, S.S.M., et al., *Nanocurcumin as a novel stimulator of megakaryopoiesis that ameliorates chemotherapy-induced thrombocytopenia in mice.* Life Sciences, 2020. **256**: p. 117840.

[۲۰] TAHMASEBI, B.M., et al., *Dendrosomal Nano-curcumin, the Novel Formulation to Improve the Anticancer Properties of Curcumin.* 2015.

[۲۱] Masters, J.R., *HeLa cells 50 years on: the good, the bad and the ugly.* Nature Reviews Cancer, 2002. **2**(4): p. 315-319.

[۲۲] El-Azab, M., et al., *Anti-angiogenic effect of resveratrol or curcumin in Ehrlich ascites carcinoma-bearing mice.* European journal of pharmacology, 2011. **652**(1-3): p. 7-14.

[۲۳] Carvalho Ferreira, L., et al., *Effect of curcumin on pro-angiogenic factors in the xenograft model of breast cancer.* Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents), 2015. **15**(10): p. 1285-1296.

[۲٤] Pradhan, N., et al ,*Curcumin nanoparticles inhibit corneal neovascularization.* Journal of Molecular Medicine, 2015. **93**(10): p. 1095-1106.

[۲۵] Li, L., et al., *Liposomal curcumin with and without oxaliplatin: effects on cell growth, apoptosis, and angiogenesis in colorectal cancer.*

Biotechnology-Tarbiat Modares University

Title: A Comparison of Curcumin and Nanocurcumin Effect on the expression of the vascular endothelial growth factor (*VEGF-A*) in HeLa cell line
Running title: Effects of nanocurcumin on the expression of *VEGF-A*

Rezvaneh Vahedian Sadeghi[1],Masoud Parsania*[2], Majid Sadeghizadeh[3], Setareh Haghighat[4],Seyedeh Sahar Mortazavi Farsani[5]

1- Ph.D. Candidate, Department of Microbiology, Faculty of Advanced Science and Technology, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University ,Tehran, Iran
2- Associate Professor, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran
3- Professor, Department of Genetics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.
4- Associate Professor, Department of Microbiology, Faculty of Advanced Science and Technology, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran
5- PhD, Department of Genetics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

**Corresponding Address: Postal Code:1936893813 ,,Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad university, Tehran, Iran*
Email: mparsania@iautmu.ac.ir

Receipt: 2021/10/26 Accepted: 2021/11/28

Abstract

Introduction: Cervical cancer is the fourth most common cancer among women. In recent years, attention has increased to natural products such as curcumin with anti-cancer potential as a therapeutic supplement. However, due to its poor solubility, its clinical use is limited. In this regard, in this study, to improve clinical parameters, the effects of nanocurcumin on the angiogenesis inhibition of cervical cancer were investigated and compared with free curcumin.

Materials and Methods: MTT method was used to evaluate the proliferation of the HeLa cell line with free curcumin and nanocurcumin at different doses and time intervals and the rate of apoptosis was assessed by flow cytometry. Then, the expression of the vascular endothelial growth factor (*VEGF-A*) gene in HeLa cells was measured by Real-Time PCR and Western blotting, respectively.

Results: According to IC50 for 48 hours in the HeLa cell line, which was 15 µM/ml and 50 µM/ml for nanocurcumin and free curcumin, respectively, the nanocurcumin showed a greater lethal effect. *VEGF-A* gene expression (*p*

<0.0001) and protein level (p <0.01) were significantly lower following nano-curcumin treatment than free curcumin.
Conclusion: Nanocarrier increased the solubility and further inhibited the proliferation of cervical cancer HeLa cells and was three times more effective than curcumin in inhibiting angiogenesis at the same concentration. Therefore, nanocurcumin can be a good option for drug supplementation along with routine cervical cancer treatment.

Keywords: Cervical cancer, Nanocurcumin, HeLa cell, *VEGF-A*.